



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ที่มี
คุณสมบัติ phosphorus solubilizing ในการกระตุ้นการ
เจริญเติบโตและชักนำความต้านทานต่อโรคใบไหม้มันสำปะหลัง

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ

พฤษภาคม 2558

สัญญาเลขที่MRG5580195

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007
ที่มีคุณสมบัติ phosphorus solubilizing ในการกระตุ้นการ
เจริญเติบโตและชักนำความต้านทานต่อโรคใบไหม้
มันสำปะหลัง

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐริญา เปื่อนสันเทียะ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รูปแบบ Abstract (บทคัดย่อ)

รหัสโครงการ: MRG5580195

Project Title : The phosphorus solubilizing PGPR, *Bacillus subtilis* strain CaSUT007 and its role on cassava growth promotion and induced resistance against cassava leaf blight disease

(ชื่อโครงการ) การใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ที่มีคุณสมบัติ phosphorus solubilizing ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและชักนำความต้านทานต่อโรคใบไหม้มันสำปะหลัง

ชื่อนักวิจัย : ผศ. ดร. ณัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

E-mail Address : natthiya@sut.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ที่มีคุณสมบัติ phosphorus solubilizing ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและชักนำความต้านทานต่อโรคใบไหม้มันสำปะหลัง จากคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลายหินฟอสเฟต และยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง พบว่าเชื้อไอโซเลต CaSUT007 มีบริเวณยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคเท่ากับ 8.0 ± 0.058 มม. และประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตเฉลี่ยสูงสุด 209.91 ไมโครกรัมต่อมล. และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบไหม้ของมันสำปะหลังในสภาพเรือนทดลองในมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) พบว่า การแช่ท่อนพันธุ์หรือฉีดพ่นเชื้อไอโซเลต CaSUT007 สามารถควบคุมโรคใบไหม้ของมันสำปะหลังได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยโดยมีระดับความรุนแรงของโรคใบไหม้มันสำปะหลัง เท่ากับ 1 เทียบเท่ากับการใช้สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ จากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาเกี่ยวกับกลไกความต้านทาน พบว่ามีการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยใช้เทคนิค FTIR microspectroscopy พบกลุ่มไขมันชนิด C-H stretching ($\sim 3,000$ - $2,800$ cm^{-1}) กลุ่มไขมันชนิด C=O ester ($\sim 1,740$ cm^{-1}) และกลุ่ม amide I ($\sim 1,700$ - $1,600$ cm^{-1}) กลุ่มคาร์โบไฮเดรตชนิด C-H bonding, C-O stretching และ polysaccharide ($\sim 1,450$ - $1,350$ cm^{-1} , $\sim 1,246$ cm^{-1} และ $\sim 1,200$ - 900 cm^{-1}) เพิ่มขึ้น ซึ่งสารเหล่านี้มีความสำคัญในการส่งสัญญาณการทำงานของเอนไซม์ ทั้งยังช่วยให้ผนังเซลล์พืชมีความแข็งแรงเพื่อปกป้องตนเองให้ต้านทานจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช จากผลการศึกษาดังนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อไอโซเลต CaSUT007 สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และกระตุ้นให้มันสำปะหลังต้านทานโรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* ได้

คำหลัก : มันสำปะหลัง, *Bacillus subtilis*, การเจริญเติบโต, FTIR – microspectroscopy, caโรคใบไหม้มันสำปะหลัง

Abstract

The objective of this study was to investigate the phosphorus solubilizing PGPR, *Bacillus subtilis* strain CaSUT007 and its role on growth promotion and induced resistance against leaf blight disease in cassava. Therefore, this rhizobacteria was isolated and screened for antagonistic bacteria (BCA) that has high inhibiting activity to *X. axonopodis* pv. *manihotis*, the causal agent cassava bacterial leaf blight disease and then screen for phosphate solubilizing bacteria (PSB) that high phosphate solubilizing activity, and then determine for the effects of rhizobacteria on the bacterial leaf blight disease control and its mode of action under the green house condition. The results showed that 12 isolates were obtained. Among of there, isolates CaSUT007 exhibited high antagonistic activity of *X. axonopodis* pv. *manihotis* at 8.0 ± 0.058 mm and showed high phosphate solubilizing activity at concentration from 209.91 $\mu\text{g/ml}$. Bacterial leaf blight disease control was done by cassava stake treating and spraying of CaSUT007 using the Randomized Complete Block Design (RCBD). Our result was found that cassava treated by CaSUT007 gave the significantly lowest averaged disease score at level 1. Analysis of biochemical composition changes in cassava tissue using FTIR microspectroscopy, cassava treated by CaSUT007 gave the higher increase significantly of C-H stretching ($\sim 3,000$ - $2,800$ cm^{-1}), C=O ester ($\sim 1,740$ cm^{-1}), amide I ($\sim 1,700$ - $1,600$ cm^{-1}), C-H bonding, C-O stretching, polysaccharide ($\sim 1,450$ - $1,350$ cm^{-1} , $\sim 1,246$ cm^{-1} and $\sim 1,200$ - 900 cm^{-1}), the accumulation of these biochemical composition involve in plant defense mechanism. This result indicated that increase content of plant biochemical composition in treated plant when compared with healthy plant, suggesting that strain CaSUT007 might be inhibited *X. axonopodis* pv. *manihotis* infection process might activate or suppress these elements accumulation for signaling transduction, defense enzyme activities and cell wall construction in plant defense mechanism process. Results of this study initial indicated that the strain CaSUT007 could be used to reduce bacterial leaf blight disease severity in cassava plant.

Key words : cassava, *Bacillus subtilis*, growth promotion, FTIR – microspectroscopy, cassava bacterial leaf blight

บทสรุปผู้บริหาร

การปลูกมันสำปะหลังมักประสบปัญหาเรื่องโรคและแมลงเป็นสำคัญ ซึ่งโรคมันสำปะหลังที่สำคัญโรคหนึ่งคือโรคใบไหม้ (cassava leaf blight) มีรายงานความเสียหายในแหล่งปลูกมันสำปะหลังของโลก (Fokunang et al., 2001; Owolade et al., 2005) สำหรับในประเทศไทย พบว่ามันสำปะหลังเกือบทุกพันธุ์เป็นโรคใบไหม้ ความรุนแรงของขึ้นอยู่กับพันธุ์และอายุมันสำปะหลังและสภาพแวดล้อม ลักษณะอาการส่วนใหญ่ที่พบ คือ มีอาการไหม้ที่ขอบใบและปลายใบ ขยายตัวเข้าสู่กลางใบ ในที่สุดตัวใบจะไหม้หมด และหลุดร่วง โดยพันธุ์มันสำปะหลังที่อ่อนแอต่อโรคอาจเสียหายมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ เชื้อราสาเหตุโรคดังกล่าวสามารถติดไปกับท่อนพันธุ์ได้ ซึ่งเมื่อนำท่อนพันธุ์ที่เป็นใบไหม้ เหล่านั้นไปขยายพันธุ์ ความสามารถในการแตกหน่อของท่อนพันธุ์จะลดลง โดยจะแตกหน่อใหม่เพียง 40-60 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาการแตกหน่อจะช้ากว่าท่อนพันธุ์มันสำปะหลังปกติ 7-8 วัน

จากปัญหาดังกล่าว การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัด ส่งผลให้อาจจะเกิดการต้านทานของเชื้อสาเหตุโรค อีกทั้งยังเกิดการสะสมของสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อเกษตรกร อย่างไรก็ตามยังมีการป้องกันกำจัดโดยวิธีอื่นที่ร่วมกันหรือทดแทนการใช้สารเคมีได้ เช่น การเกษตรกรรม การควบคุมโดยชีววิธี (biological control) และวิธีผสมผสาน (integrated pests management: IPM) เป็นต้น ซึ่งวิธีการหนึ่งที่นิยมนักวิชาการวิจัยและเริ่มนำมาใช้ในปัจจุบัน คือการชักนำให้พืชเกิดความต้านทาน (induced resistance) เป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยให้พืชสามารถสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองให้มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งตัวกระตุ้น (elicitor) ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดระบบดังกล่าวได้ อาทิ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ และสารเคมีสังเคราะห์ ซึ่ง elicitors เหล่านี้จะสามารถกระตุ้นความต้านทานของพืชให้มีการกระจายแบบทั่วทั้งต้น (induced systemic resistance) อย่างไรก็ตามบทบาทของกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการกระตุ้นความต้านทานในมันสำปะหลังที่ถูกชักนำเพื่อให้ต่อต้านต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้ ยังไม่มีการศึกษาและยังไม่ทราบว่าเกิดจากกระบวนการใด ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จะนำไปสู่ความเข้าใจเบื้องต้นเกี่ยวกับกลไกที่เกิดขึ้น เพื่อนำข้อมูลเหล่านี้มาเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการเพื่อป้องกัน ควบคุมโรค และเพิ่มผลผลิตของมันสำปะหลังที่หลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีต่อไปในอนาคต

ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคพืช ซึ่งจุลินทรีย์ดินในกลุ่ม *Bacillus* มีคุณสมบัติสามารถละลายไออโนฟอสเฟตจากสารประกอบอินทรีย์ฟอสฟอรัส อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า โดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช จึงช่วยให้พืชเจริญเติบโตดี (growth promotion) แข็งแรง และต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช (induced resistance)

วัตถุประสงค์

- 1.1 ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย PGPR, *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นให้มันสำปะหลังเกิดความต้านทานต่อโรคใบไหม้
- 1.2 ศึกษากลไกของมันสำปะหลังเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย PGPR, *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007

ระเบียบและวิธีวิจัย

3.1 การรวบรวมเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรากมันสำปะหลัง (rhizosphere) จำนวน 50 ตัวอย่าง จากจังหวัด นครราชสีมา แล้วเลี้ยงแยกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar จากนั้นทำการแยกหาแบคทีเรีย ละลายฟอสเฟตเบื้องต้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast extract agar ที่เทหนา 2 ชั้น (double-layered) โดยมีตะกอน CaHPO_4 เป็นส่วนประกอบอยู่ชั้นบนของอาหาร ตามวิธีของ Katznelson and Boss (1959) เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแบบจุด (spot-inoculation) แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิตู้บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส วัดและ บันทึกความกว้างของวงใสที่ปรากฏอยู่รอบโคโลนีเชื้อแบคทีเรียเมื่อบ่มได้ 3 และ 7 วันโดยให้คะแนนตาม ความกว้าง ของวงใสดังนี้ระดับที่ (1) 0 มิลลิเมตร (2) 0-3 มิลลิเมตร (3) 3-6 มิลลิเมตร (4) 6-9 มิลลิเมตร และ (5) มากกว่า 9 มิลลิเมตร เก็บรวบรวมเชื้อเดี่ยวที่แสดงความกว้างของวงใสระดับ 6-9 มิลลิเมตรและ มากกว่า 9 มิลลิเมตร เพื่อการทดลองขั้นต่อไป

3.2 การรวบรวมและยืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง

ทำการรวบรวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลังที่ผ่านการทดสอบสอบโรคและวินิจฉัย เชื้อสาเหตุจากห้องปฏิบัติการโรคพืชและชีวโมเลกุลพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยทำการคัดเลือกเชื้อ สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลังที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดนครราชสีมา จำนวน 15 ไอโซเลต มายืนยัน ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคก่อนทำการทดลองครั้งนี้ โดยนำโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่ อุณหภูมิห้อง ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ให้มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 1×10^8 cfu/ml โดยวัดค่าการดูดกลืน แสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่า Optical density (O.D.) เท่ากับ 0.2 จากนั้นทำการปลูกเชื้อแต่ละไอโซเลตเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมคือน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ ลงบนใบมัน สำปะหลังพันธุ์อ่อนแอ ระยะเวลา 72 จากนั้นเก็บตัวอย่างทดสอบในกล่องขึ้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยวางแผนการ ทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ และทำการประเมินความรุนแรงของโรค หลังปลูกเชื้อทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน โดยวัดจากระดับความรุนแรงของโรคจากระดับ 0 ถึง 4 โดยที่ระดับ คะแนน 0 คือไม่ปรากฏอาการ, คะแนน 1 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลน้อยกว่า 25%, คะแนน 2 คือพื้นที่ใบที่เป็น แผลระหว่าง 26-50%, คะแนน 3 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลระหว่าง 51-75% และคะแนน 4 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผล มากกว่า 75% เปรียบเทียบกับพื้นที่ใบทั้งหมดของใบมันสำปะหลัง เมื่อสังเกตเห็นใบมันสำปะหลังแสดง อาการของโรค ทำการแยกเชื้อสาเหตุโรคอีกครั้ง จากใบมันสำปะหลัง (re - isolation) ที่แสดงอาการของโรค รุนแรงที่สุด แล้วทำการ cross streak บนอาหาร NA จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว (single colony) แล้วนำมาปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่แยกได้ลงบนใบมันสำปะหลังชุดใหม่ (re - inoculation) อีกครั้งตามกฎการพิสูจน์โรคของ Koch (Koch's postulation) จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้มา streak บนอาหาร nutrient agar (NA) เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์ไอโซเลตรุนแรงที่สุด (aggressive strain) เพื่อทำการเก็บเชื้อและศึกษาในขั้นตอนต่อไป (วิลาวรรณ เชื้อบุญและคณะ, 2549)

3.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลายหินฟอสเฟต และยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง

3.3.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลายหินฟอสเฟต

นำจุลินทรีย์จากข้อที่ 3.1 ที่แสดงความกว้างของวงใสระดับ 6-9 มิลลิเมตรและมากกว่า 9 มิลลิเมตร มาคัดเลือกให้ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลายหินฟอสเฟต ในสภาพห้องปฏิบัติการดังนี้ เพราะจุลินทรีย์ที่สามารถละลายตะกอน CaHPO_4 ลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Pikovskaya ที่มีหินฟอสเฟตอัตรา 0.0000 0.2500 0.5000 0.7500 และ 1.0000 กรัม ต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร pH 6.5 จากนั้นเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย โดยกำหนดให้ปริมาณเซลล์มีชีวิต เท่ากับ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่ละลายออกมาโดยวิธีของ Watanabe and Olsen (1965) ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำได้โดยการทำให้เกิดสีด้วยกรดแอสคอบิกที่ระยะเวลาบ่ม 3, 7 และ 14 วัน เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างอาหารที่เลี้ยงและไม่เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นเก็บเชื้อที่คัดเลือกแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงเพื่อการทดลองต่อไป

3.3.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง

รวบรวมเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ตระกูล *Bacillus* จากการทดลอง 3.3.1 วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 3 petri dish จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลังไอโซเลตรุนแรงที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการก่อโรคจากข้อ 3.2 และเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ดังกล่าว มาเลี้ยงแยกกันแต่ละไอโซเลตในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.2 ที่มีความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 1×10^8 cfu/ml จากนั้นใช้ micropipette ดูดสารแขวนลอย (suspension) เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลังไอโซเลตรุนแรงที่เตรียมไว้ปริมาณ 1 มิลลิลิตรผสมลงในขวดที่บรรจุอาหาร NA ที่ห่อหมกอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียสปริมาณ 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รอให้อาหารแข็งตัว (pour plate method) จากนั้นวางกระดาษกรองกรองเบอร์ 1 (paper disc: ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร) ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วใช้ micropipette ดูดสารแขวนลอย (suspension) ของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาณ 10 ไมโครลิตรหยดลงบนกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่อบฆ่าเชื้อ แล้วบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบบริเวณใส (clear inhibition zone) รอบแผ่นกระดาษหลังปลูกเชื้อ (วิลาวรรณ เชื้อบุญและคณะ, 2549) เปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้งดังสมการข้างล่างเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง เพื่อศึกษาในสภาพเรือนทดลองต่อไป

$$\text{บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)} = \frac{\text{ความกว้างบริเวณยับยั้งทั้งหมด} - \text{ความกว้างของโคโลนี}}{2}$$

2

3.4 ศึกษากลไกการกระตุ้นความต้านทานต่อโรคใบไหม้ของมันสำปะหลังด้วยเชื้อ PGPR *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น ดังนี้ ทรีตเมนต์ที่ 1 แช่ท่อนพันธุ์ก่อนปลูกและฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยเชื้อแบคทีเรีย PGPR *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml ทรีตเมนต์ที่ 2 แช่ท่อนพันธุ์ก่อนปลูกและฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยสารเคมี benomyl ทรีตเมนต์ที่ 3 แช่ท่อนพันธุ์ก่อนปลูกและฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยสาร salicylic acid ความเข้มข้น 2.5 mM ทรีตเมนต์ที่ 4 ฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยเชื้อแบคทีเรีย PGPR *B. subtilis* สายพันธุ์

CaSUT007 ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml ทรีตเมนต์ที่ 5 ฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยด้วยสารเคมี benomyl ทรีตเมนต์ที่ 6 ฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยสาร salicylic acid ความเข้มข้น 2.5 mM ทรีตเมนต์ที่ 7 ฉีดพ่นด้วยน้ำ เป็นชุดควบคุม

หลังจากฉีดพ่นด้วยสารกระตุ้น (elicitors) เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ จากนั้นทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง ในรูปของสารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น 1×10^6 spore/ml บนใบ ณ 3 ช่วงเวลา คือ 0, 7 และ 14 วัน หลังจากกระตุ้น elicitors ชนิดต่าง ๆ จากนั้นประเมินคะแนนการเกิดโรค (disease scores) โดยให้คะแนนระดับการเกิดโรคเป็น 5 อันดับ คือ 0= ใบพืชไม่แสดงอาการ, 1= เกิดแผลน้อยกว่า 25%ของพื้นที่ใบ, 2= เกิดแผล 25-50% ของพื้นที่ใบ, 3= เกิดแผลมากกว่า 50-75%ของพื้นที่ใบ, 4= เกิดแผลมากกว่า 75% ของจำนวนแผลจากทรีตเมนต์ที่ 7 นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS for Windows V.14.0 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีตเมนต์โดยวิธีการของ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงด้านชีวเคมีของตัวอย่างมันสำปะหลังด้วยเทคนิค FTIR

microspectroscopy ร่วมกับการทำ **multivariate data analysis** แบบ **principle component analysis** และ **Hierarchical Cluster Analysis (HCA)**

3.5.1 การวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้เครื่อง FTIR spectroscope

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชที่เตรียมจากการทำ cryosection ให้ได้ขนาดประมาณ $10 \mu\text{m}$ วางลงบน IR Slide จากนั้นนำไปทำให้ตัวอย่างแห้งใน vacuum desicator เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR microspectroscopy ตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) โดยใช้เครื่อง IR spectrometer (Tensor 27, Bruker optic) ที่มีระบบตรวจวัดแบบ Mercury Cadmium Telluride (MCT) สามารถวัดการดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ตั้งแต่ช่วง $700\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$ การวัดสเปกตรัมจะวัดแบบสะท้อนกลับและแบบส่องผ่าน วัดที่ค่า resolution 6 cm^{-1} , scan 64 โดยใช้โปรแกรม OPUS 6.6 (Bruker optic, German) (Manrique and Lajolo, 2004; Kenneth and Lawrence, 2005; Dokken and Davis, 2007)

3.5.2 การทำ Data pretreatment และการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Multivariate data analysis

สเปกตรัมที่ได้จะนำมาผ่านกระบวนการ Pretreatment โดยการทำ second derivative และ vector normalize แบบ S-Golay 3 polynomial ที่ 9 pt จากนั้นจะนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยการทำ Multivariate data analysis แบบ Principle component analysis (PCA), โดยใช้โปรแกรม The Unscrambler 9.7, CAMO

3.5.3 การวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Hierarchical Cluster Analysis (HCA)

สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อจะทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Cytospec ซึ่งเป็นโปรแกรมเฉพาะสำหรับงานทางด้าน IR Imaging analysis โดยสามารถทำการ Pretreatment ข้อมูลของตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อลดปัญหาจากการเกิด artifact ต่าง ๆ เช่น mie scattering, dispersion artifacts, slopping baselines, poor quality spectra หลังจากนั้นข้อมูลที่ได้จะนำมาผ่านกระบวนการ Pretreatment โดยการทำ second derivative และ vector normalize จากนั้นวิเคราะห์ HCA แบบ Ward Algorithm ซึ่งผลที่ได้จะให้ข้อมูลในลักษณะของความแตกต่างจากสารชีวโมเลกุลของตัวอย่างเนื้อเยื่อ ที่อาศัยหลักความแตกต่างของลักษณะค่าการดูดกลืนแสง และพื้นที่ใต้กราฟในการจัดจำแนกความแตกต่างของสเปกตรัม โดยจะแสดงลักษณะข้อมูลในแบบ color coded ที่แตกต่างกัน

ผลการทดลอง

3.1 การรวบรวมเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟต

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากมันสำปะหลัง (rhizosphere) จำนวน 50 ตัวอย่าง จากจังหวัด นครราชสีมา แล้วเลี้ยงแยกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar เพื่อแยกหาแบคทีเรียละลายฟอสเฟต พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 177 ไอโซเลต และพบว่าโคโลนีเชื้อแบคทีเรียเมื่อบ่มได้ 3 และ 7 วัน จำนวน 12 ไอโซเลต มีขนาดของความกว้างของวงใส โดยให้คะแนนตามความกว้างของวงใส (clear zone) ระดับ 6-9 มิลลิเมตรและมากกว่า 9 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 1 เก็บรวบรวมเชื้อเดี่ยวที่แสดง ความกว้างของวงใส เพื่อการทดลองต่อไป

ตารางที่ 1 ขนาดของความกว้างของวงใสของเชื้อแบคทีเรียละลายฟอสเฟตที่แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณ รากมันสำปะหลัง

แบคทีเรียไอโซเลต	ขนาดความกว้างวงใส (มม.)	แบคทีเรียไอโซเลต	ขนาดความกว้างของวงใส (มม.)
CaSUT002	8.1	CaSUT0057	8.4
CaSUT007	9.2	CaSUT069	6.6
CaSUT008	8.7	CaSUT075	7.8
CaSUT034	6.5	CaSUT097	7.2
CaSUT038	7.3	CaSUT101	8.3
CaSUT044	6.8	CaSUT168	9.1

3.2 การรวบรวมและยืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง

นำเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง ที่ผ่านการทดสอบโรค และวินิจฉัยเชื้อสาเหตุจากห้องปฏิบัติการโรคพืชและชีวโมเลกุลพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยเชื้อ แบคทีเรียดังกล่าว แยกได้จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการใบไหม้ แผลสีเหลี่ยมจมน้ำ ซึ่งเก็บรวบรวมตัวอย่าง โรคมาจากพื้นที่ปลูกในจังหวัดนครราชสีมา จำนวน 15 ไอโซเลตซึ่งมีลักษณะของโคโลนี สีเหลืองเหลืองอ่อน ขอบเรียบ หนูน ผิวมัน ลักษณะกลม เป็นเมือกเยิ้ม (ภาพที่ 4.1) มายืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรคอีก ครั้งก่อนการทำการทดลองครั้งนี้ พบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถก่อให้เกิดอาการใบไหม้แผล สีเหลี่ยมจมน้ำบนใบมันสำปะหลังพันธุ์อ่อนแอ ระยะ 72 ได้ โดยพบอาการจมน้ำหลังจากปลูกเชื้อประมาณ 18 ชั่วโมง จากนั้นเกิดแผลไหม้ขนาดเล็กบริเวณแผล (ภาพที่ 1) เมื่อประเมินความรุนแรงของอาการเน่าและที่ ปรากฏบนใบมันสำปะหลัง หลังทำการปลูกเชื้อ 1, 2 และ 3 วัน พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตก่อให้เกิด ความรุนแรงของลักษณะอาการใบไหม้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยไอโซเลต Xam11 มีความสามารถในการ ก่อให้เกิดโรครุนแรงที่สุด สามารถสังเกตเห็นลักษณะอาการของโรคตั้งแต่วันแรกหลังการปลูกเชื้อ โดยมี คะแนนการเกิดโรคเน่าและสูงที่สุดคือ 4.15 คะแนน (ตารางที่ 2) ดังนั้นจากการทดลองจึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อ แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* ไอโซเลต Xam11 ที่มีความรุนแรงสูงสุดเป็นตัวแทนในการศึกษาขั้น ต่อไป

ตารางที่ 2 ผลการยืนยันความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง

ไอโซเลต	การเกิดโรคใบไหม้	
	คะแนนการเกิดโรค ^{2/}	ระยะเวลาที่โรคแสดงอาการหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรค (วัน)
ไอโซเลต Xam1	3.85a ^{1/}	1
ไอโซเลต Xam2	3.33c	1
ไอโซเลต Xam3	1.33e	3
ไอโซเลต Xam4	1.31e	3
ไอโซเลต Xam5	1.33e	3
ไอโซเลต Xam6	2.04d	2
ไอโซเลต Xam7	1.32e	3
ไอโซเลต Xam8	2.05d	2
ไอโซเลต Xam9	3.68b	1
ไอโซเลต Xam10	1.36e	3
ไอโซเลต Xam11	4.15a	1
ไอโซเลต Xam12	3.39c	1
ไอโซเลต Xam13	3.47c	1
ไอโซเลต Xam14	3.25c	1
ไอโซเลต Xam15	3.33c	1
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	0	-
F-test	**	
CV (%)	12.11	

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

$P \leq 0.05$ โดยวิธี DMRT

^{2/} ระดับคะแนนการเกิดโรค ระดับคะแนน 0 คือไม่ปรากฏอาการ, คะแนน 1 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลน้อยกว่า 25%, คะแนน 2 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลระหว่าง 26-50%, คะแนน 3 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลระหว่าง 51-75% และคะแนน 4 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลมากกว่า 75% เมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบทั้งหมด



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคน้ำหนึบมันสำปะหลัง บนอาหาร nutrient agar (NA) โดยมีลักษณะของโคโลนี สีเหลืองเหลืองอ่อน ขอบเรียบ หนูน ผิวนั้น ลักษณะกลม เป็นเมือกเยิ้ม



ภาพที่ 2 แสดงผลการทดสอบการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคน้ำหนึบมันสำปะหลัง บนมันสำปะหลังพันธุ์อ่อนแอ ระยะ 72

3.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลายหินฟอสเฟต และยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง

3.3.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลายหินฟอสเฟต

นำจุลินทรีย์จากข้อที่ 3.1 ที่แสดงความกว้างของวงใสระดับ 6-9 มิลลิเมตรและมากกว่า 9 มิลลิเมตร มาคัดเลือกให้ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลายหินฟอสเฟต ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่ามีปริมาณฟอสเฟตที่ละลายอยู่ในสารกรอง (culture filtrate) ภายหลังการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตในอาหารทดสอบ เป็นเวลา 7 วัน พบแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 สามารถละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุด โดยปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ คือ 209.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ไอโซเลต CaSUT008 และ CaSUT168 ซึ่งพบปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ คือ 194.78 และ 191.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียไอโซเลตอื่นๆ อย่างอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายอยู่ในสารกรอง (culture filtrate) ภายหลังการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตในอาหารทดสอบ เป็นเวลา 7 วัน

แบคทีเรียไอโซเลต	ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายใน culture filtrate (ug P mL ⁻¹) *
CaSUT002	110.21e
CaSUT007	209.91a
CaSUT008	194.78a
CaSUT034	124.32d
CaSUT038	132.65c
CaSUT044	117.21d
CaSUT0057	129.36cd
CaSUT069	154.75b
CaSUT075	116.30d
CaSUT097	182.10ab
CaSUT101	157.85b
CaSUT168	191.26a
F-test	**
CV (%)	14.10

* ปริมาณฟอสเฟตที่ละลายได้ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต ซึ่งลบออกจากปริมาณฟอสเฟตที่ละลายในชุด ควบคุมที่ไม่มีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียใดๆ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 109.2 mg P L⁻¹

3.3.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง

ผลของการคัดเลือกประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ทั้งหมด 12 ไอโซเลต ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง ไอโซเลต Xam11 ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่า หลังการบ่มเชื้อร่วมกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ทั้งหมด 12 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง ไอโซเลต Xam11 ได้ เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 8.0 ± 0.058 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4)

ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 ที่มีความกว้างบริเวณยับยั้งและมีความสามารถละลายหินฟอสเฟตเฉลี่ยสูงสุด เป็นตัวแทนในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง ไอโซเลต Xam11 ด้วยวิธี Paper disc diffusion

แบคทีเรียไอโซเลต	บริเวณยับยั้ง (mm.) ^{1/}
CaSUT002	7.5 ± 0.032
CaSUT007	8.0 ± 0.058
CaSUT008	6.0 ± 0.080
CaSUT034	7.0 ± 0.061
CaSUT038	8.0 ± 0.006
CaSUT044	7.5 ± 0.032
CaSUT0057	7.0 ± 0.058
CaSUT069	6.0 ± 0.080
CaSUT075	7.0 ± 0.061
CaSUT097	8.0 ± 0.006
CaSUT101	7.5 ± 0.032
CaSUT168	7.0 ± 0.058

^{1/} บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) = (ความกว้างบริเวณยับยั้งทั้งหมด-ความกว้างของโคโลนี)/2

3.4 ศึกษาประสิทธิภาพการกระตุ้นความต้านทานต่อโรคใบไหม้ของมันสำปะหลังด้วยเชื้อ PGPR *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007

subtilis สายพันธุ์ CaSUT007

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลังและมีความสามารถละลายหินฟอสเฟตเฉลี่ยสูงสุด มาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบไหม้ของมันสำปะหลังในระดับเรือนทดลองพบว่ากรรมวิธีที่ 1 ที่มีเชื้อก่อนปลูกและฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยเชื้อแบคทีเรีย PGPR *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml และกรรมวิธีที่ 4 เชื้อก่อนปลูกและฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยเชื้อแบคทีเรีย PGPR *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml มีการเชื้อก่อนปลูกและฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยเชื้อแบคทีเรีย PGPR *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml พบว่าสามารถควบคุมการเกิดโรคใบไหม้ของมันสำปะหลังของได้มีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยมีระดับความรุนแรงของโรคใบไหม้มันสำปะหลัง เท่ากับ 1 ทั้งสองกรรมวิธี (ตารางที่ 5) ซึ่งมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 2 ที่มีการควบคุมโรคด้วยเชื้อก่อนปลูกและฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยสารเคมีคอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์ และกรรมวิธีที่ 3 ที่มีการเชื้อก่อนปลูกและฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยสาร salicylic acid ความเข้มข้น 2.5 mM โดยมีระดับความรุนแรงของโรคใบไหม้มันสำปะหลัง เท่ากับ 1 ทั้งสองกรรมวิธี ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ พบว่าไม่สามารถควบคุมการเกิดโรคใบไหม้มันสำปะหลังได้ ซึ่งมีระดับความรุนแรงของโรคใบไหม้มันสำปะหลัง เท่ากับ 4 (ตารางที่ 5)

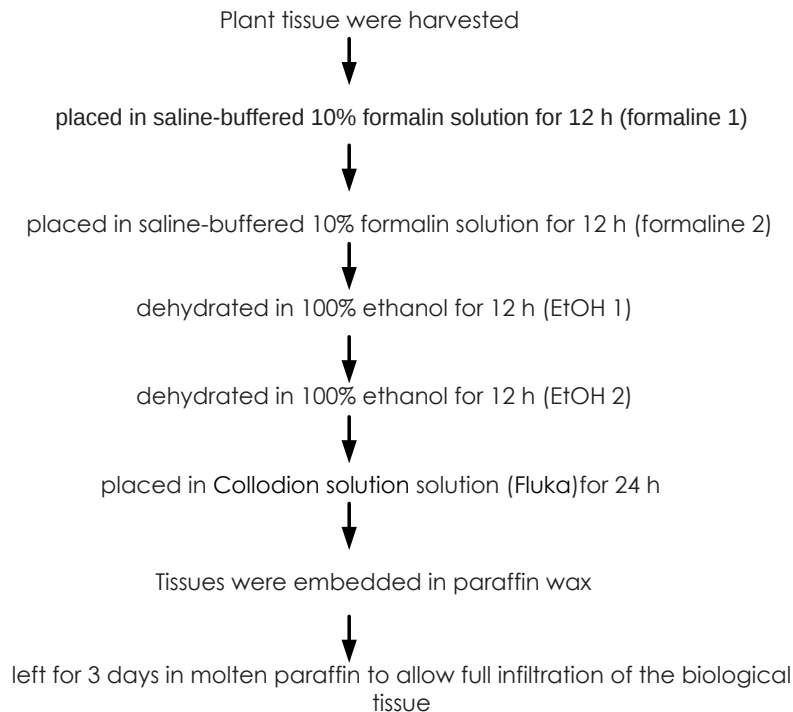
ตารางที่ 5 ระดับความรุนแรงโรคใบไหม้ของมันสำปะหลังเมื่อกระตุ้นความต้านทานด้วยเชื้อ PGPR *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007

กรรมวิธี	ระดับความรุนแรงโรคใบไหม้ของมันสำปะหลัง (disease score)
กรรมวิธีที่ 1 : เชื้อก่อนปลูกและฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยเชื้อแบคทีเรีย PGPR <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007 ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml	1
กรรมวิธีที่ 2 : เชื้อก่อนปลูกและฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยสารเคมีคอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์	1
กรรมวิธีที่ 3 : เชื้อก่อนปลูกและฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยสาร salicylic acid ความเข้มข้น 2.5 mM	1
กรรมวิธีที่ 4 : ฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยเชื้อแบคทีเรีย PGPR <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ CaSUT007 ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml	1
กรรมวิธีที่ 5 : ฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยด้วยสารเคมีคอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์	2
กรรมวิธีที่ 6 : ฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยสาร salicylic acid ความเข้มข้น 2.5 mM	1
กรรมวิธีที่ 7 : ฉีดพ่นด้วยน้ำ	4

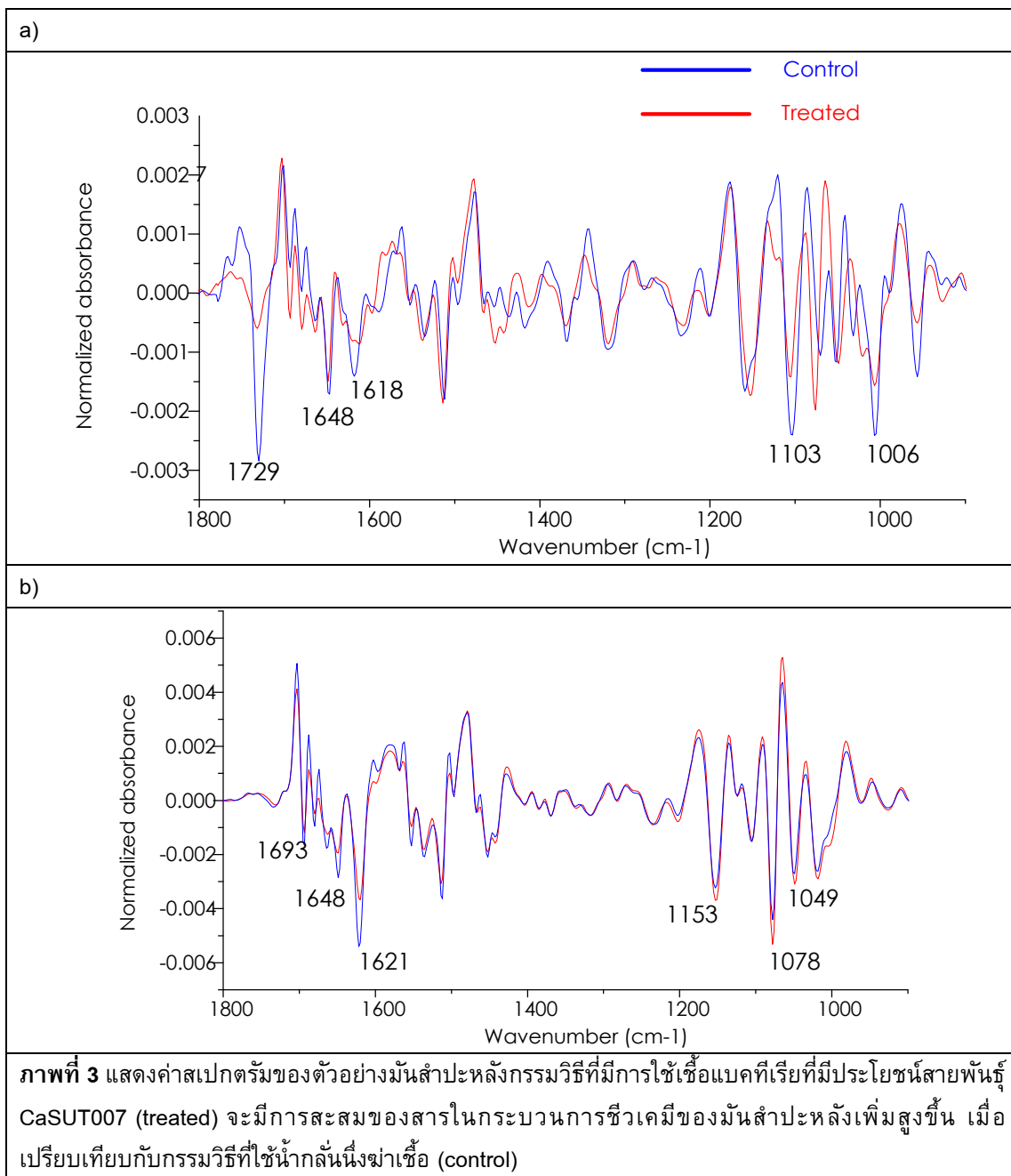
หมายเหตุ: เกณฑ์ประเมินคะแนนการเกิดโรค (disease scores) โดยให้คะแนนระดับการเกิดโรคเป็น 5 อันดับ คือ 0= ใบพืชไม่แสดงอาการ, 1= เกิดแผลน้อยกว่า 25% ของพื้นที่ใบ, 2= เกิดแผล 25-50% ของพื้นที่ใบ, 3= เกิดแผลมากกว่า 50-75% ของพื้นที่ใบ, 4= เกิดแผลมากกว่า 75% ของจำนวนแผลจากกรรมวิธีที่ 7

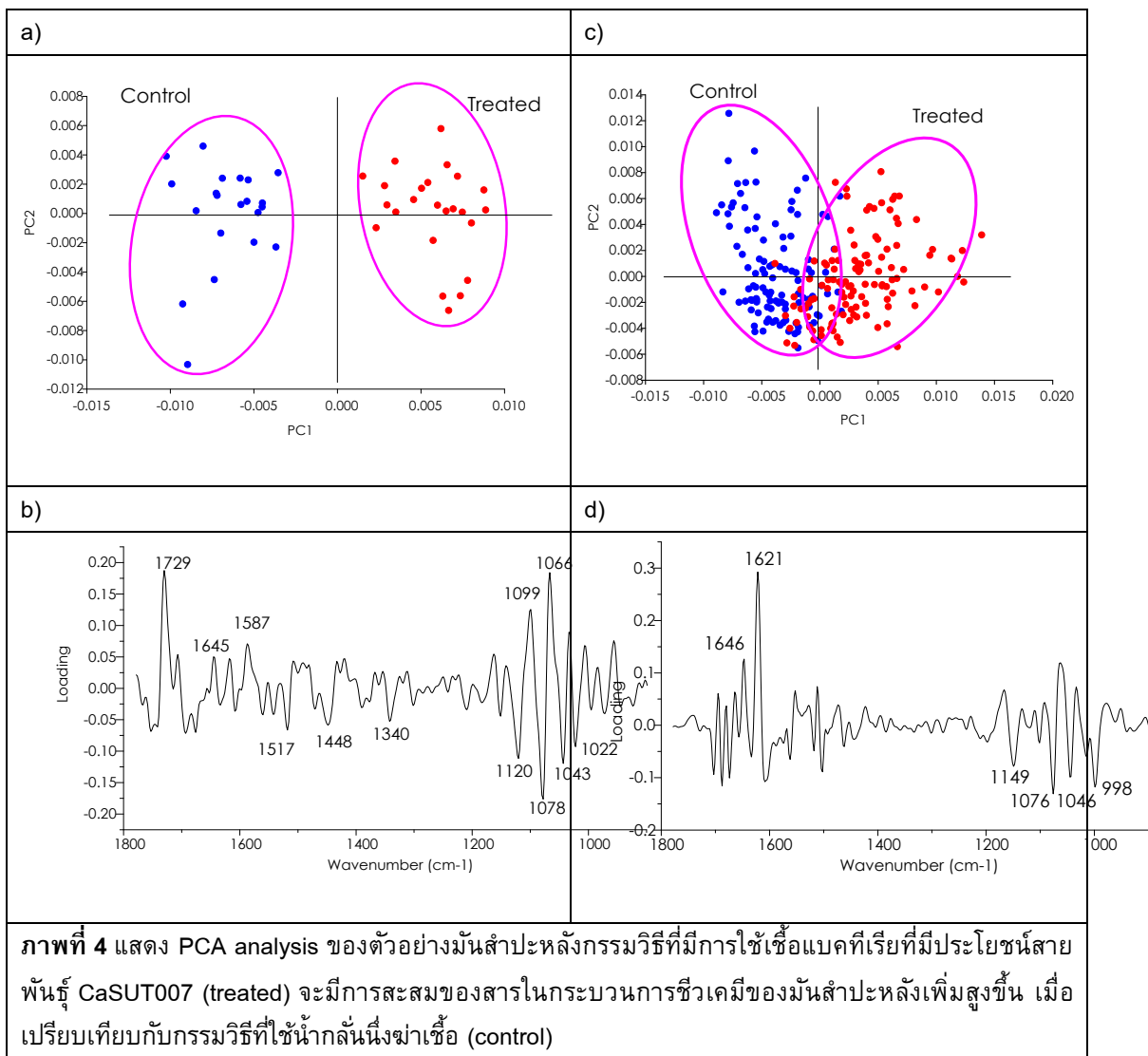
3.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงด้านชีวเคมีของตัวอย่างมันสำปะหลังด้วยเทคนิค FTIR spectroscopy ร่วมกับการทำ multivariate data analysis แบบ principle component analysis และ Hierarchical Cluster Analysis (HCA)

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชที่เตรียมจากการทำ cryosection ให้ได้ขนาดประมาณ 10 ไมโครเมตร วางลงบน IR Slide จากนั้นนำไปทำให้ตัวอย่างแห้งใน vacuum desiccator เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR microspectroscopy ดังแสดงรายละเอียดข้างล่าง



จากการศึกษาการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีของมันสำปะหลังที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยใช้เทคนิค FTIR microspectroscopy พบว่าเมื่อใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์สายพันธุ์ CaSUT007 ที่แยกได้มาจากแปลงปลูกมันสำปะหลังมีศักยภาพสูงในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมันสำปะหลังได้ดี ทั้งในลักษณะของการส่งเสริมการออกของท่อนพันธุ์ และส่งเสริมการเจริญของระบบรากและลำต้นของกล้า นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่า FT-IR สามารถบ่งชี้ว่าปริมาณกลูโคสและปริมาณ lipid มีปริมาณที่สูงขึ้น ซึ่งสารชีวเคมีเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระบวนการสร้างฮอร์โมนของพืชของมันสำปะหลัง ดังแสดงในภาพที่ 3 – 4 โดยในกรรมวิธีที่มีการใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์สายพันธุ์ CaSUT007 จะมีการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีของมันสำปะหลังเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 3) โดยเฉพาะในกลุ่มของไขมัน C-H stretching ($\sim 3,000-2,800\text{ cm}^{-1}$) กลุ่มของไขมัน C=O ester ($\sim 1,740\text{ cm}^{-1}$) กลุ่ม amide I ($\sim 1,700-1,600\text{ cm}^{-1}$) กลุ่มของคาร์โบไฮเดรต C-H bonding, C-O stretching และ polysaccharide ($\sim 1,450-1,350\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1,246\text{ cm}^{-1}$ และ $\sim 1,200-900\text{ cm}^{-1}$ ตามลำดับ) (ตารางที่ 6)





ตารางที่ 6 แสดงค่า IR spectra ที่มีความเกี่ยวข้องกับสาร functional groups ในเนื้อเยื่อพืช

Frequency range (cm ⁻¹)	Functional groups
1730	C=O ester from lignin and hemicellulose/Pectin
1650	Amide I band (C=O Stretch (80%), C-N stretch (10%), N-H bending (10%))
1550	Amide II (N-H bend (60%), C-N stretch (40%))
1510	C=C aromatic ring from lignin
1450	Asymmetric CH ₂ and CH ₃ bending from lipids, protein, lignin
1370	Symmetric CH ₂ and CH ₃ bending from lipids, protein, lignin
1246	C-O Stretching from hemicelluloses and lignin
1200-1000	Mainly C-O-C of polysaccharides; very complex and depends upon contributions from polysaccharides, cellulose, hemicellulose, and pectins
1105	C-O-C glycosidic ether mainly hemicellulose
1155	C-C ring cellulose
1022,1047,1080	C-C, C-O Stretching from carbohydrates

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากมันสำปะหลัง (rhizosphere) จำนวน 50 ตัวอย่าง จากจังหวัด นครราชสีมา แล้วเลี้ยงแยกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar เพื่อแยกหาแบคทีเรียละลายฟอสเฟต พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 177 ไอโซเลต และพบว่าโคโลนีเชื้อแบคทีเรียเมื่อบ่มได้ 3 และ 7 วัน จำนวน 12 ไอโซเลต มีขนาดของความกว้างของวงใส โดยให้คะแนนตามความกว้างของวงใส ระดับ 6-9 มิลลิเมตรและมากกว่า 9 มิลลิเมตร

เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง ที่มีลักษณะของโคโลนี สี เหลืองเหลืองอ่อน ขอบเรียบ หนูน ผิวมัน ลักษณะกลม เป็นเมือกเยิ้ม พบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถ ก่อให้เกิดอาการใบไหม้แผลสีเหลี่ยมจตุรัสบนใบมันสำปะหลังพันธุ์อ่อนแอ ระยะ 72 ได้ โดยพบอาการจ้ำน้ำ หลังจากปลูกเชื้อประมาณ 18 ชั่วโมง จากนั้นเกิดแผลไหม้ขนาดเล็กบริเวณแผล แบคทีเรียไอโซเลต Xam11 มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรครุนแรงที่สุด สามารถสังเกตเห็นลักษณะอาการของโรคตั้งแต่วันแรกหลัง การปลูกเชื้อ โดยมีคะแนนการเกิดโรคเน่าและสูงสุดคือ 4.15 คะแนน ดังนั้นจากการทดลองจึงได้ทำการ คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* ไอโซเลต Xam11 ที่มีความรุนแรงสูงสุดเป็นตัวแทนใน การศึกษาขั้นต่อไป

และเมื่อทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลายหินฟอสเฟต และยับยั้งการเจริญของเชื้อ แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง พบแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 สามารถละลายฟอสเฟตได้สูงที่สุด โดยปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ คือ 209.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผล ของการคัดเลือกประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ทั้งหมด 12 ไอโซเลต ในการยับยั้งการ เจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง ไอโซเลต Xam11 ด้วย วิธี paper disc diffusion พบว่า หลังการบ่มเชื้อร่วมกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ทั้งหมด 12 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง ไอโซเลต Xam11 ได้ เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 8.0 ± 0.058 มิลลิเมตร ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกเชื้อ แบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 ที่มีความกว้างบริเวณยับยั้งและมีความสามารถ ละลายหินฟอสเฟตเฉลี่ยสูงสุดเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป นอกจากนี้ Baker and Cook (1974) รายงานว่ากลไก ของการเป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีทั้งการแข่งขันทางด้านที่อยู่อาศัย แหล่งอาหาร และมีการผลิตสาร secondary metabolites ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีความสามารถในการเป็น เชื้อปฏิปักษ์ ทั้งนี้ในปี 2008a และ 2008b Buensanteai และคณะ รายงานว่า *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียหนึ่งที่มี ศักยภาพในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีโดยมีกลไกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกันไป และ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งมีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช นอกจากนี้วิลาวรรณ เชื้อบุญ (2551) ได้ ทำการศึกษาแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการควบคุมโรคเน่าและกะหล่ำดอกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับ Asaka และ shoda (1996) Berger และคณะ (1996) Cho และคณะ (2003) Araujo และคณะ (2005) และ Liu และคณะ (2006) ที่รายงานว่าแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *B. subtilis* สร้างสารปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น bacillomycin, iturin, basilysin, fengimysin, mycosubtilin และ mycobacillin รวมทั้งสามารถสร้างเอนไซม์ subtilin และ levansucrase ในการยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรีย สาเหตุโรคพืช จากงานวิจัยของ Buensanteai et al. (2009, 2012) กล่าวว่าเชื้อในสกุล *Bacillus* หลายสปีชีส์ มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชกระตุ้น การเจริญเติบโตของพืช และมีศักยภาพในการนำไปใช้ใน แปลงปลูกของเกษตรกร ทั้งนี้มีรายงานว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายฟอสเฟตเป็นเชื้อที่อยู่

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลังและมีความสามารถละลายหินฟอสเฟตเฉลี่ยสูงสุด มาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบไหม้ของมันสำปะหลังในระดับเรือนทดลอง พบว่ากรรมวิธีที่ 1 ที่มีแช่ท่อนพันธุ์ก่อนปลูกและฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยเชื้อแบคทีเรีย PGPR *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml และกรรมวิธีที่ 4 แช่ท่อนพันธุ์ก่อนปลูกและฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยเชื้อแบคทีเรีย PGPR *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml มีการแช่ท่อนพันธุ์ก่อนปลูกและฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยเชื้อแบคทีเรีย PGPR *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 ความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml พบว่าสามารถควบคุมการเกิดโรคใบไหม้ของมันสำปะหลังของได้มีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยมีระดับความรุนแรงของโรคใบไหม้มันสำปะหลัง เท่ากับ 1 ทั้งสองกรรมวิธี ซึ่งมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 2 ที่มีการควบคุมโรคด้วยแช่ท่อนพันธุ์ก่อนปลูกและฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยสารเคมีคอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์ และกรรมวิธีที่ 3 ที่มีการแช่ท่อนพันธุ์ก่อนปลูกและฉีดพ่นเมื่ออายุ 4 สัปดาห์ด้วยสาร salicylic acid ความเข้มข้น 2.5 mM โดยมีระดับความรุนแรงของโรคใบไหม้มันสำปะหลัง เท่ากับ 1 ทั้งสองกรรมวิธี ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้ น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ พบว่าไม่สามารถควบคุมการเกิดโรคใบไหม้มันสำปะหลังได้ ซึ่งมีระดับความรุนแรงของโรคใบไหม้มันสำปะหลัง เท่ากับ 4 และจากการศึกษาการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีของมันสำปะหลังที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยใช้เทคนิค FTIR microspectroscopy พบว่าเมื่อใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์สายพันธุ์ CaSUT007 ที่แยกได้มาจากแปลงปลูกมันสำปะหลังมีศักยภาพสูงในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมันสำปะหลังได้ดี ทั้งในลักษณะของการส่งเสริมการงอกของท่อนพันธุ์ และส่งเสริมการเจริญของระบบรากและลำต้นของกล้า นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่า FT-IR สามารถบ่งชี้ว่าปริมาณกลูโคสและปริมาณ lipid มีปริมาณที่สูงขึ้น ซึ่งสารชีวเคมีเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระบวนการสร้างฮอร์โมนของพืชของมันสำปะหลัง ดังแสดงในภาพที่ 3 – 4 โดยในกรรมวิธีที่มีการใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์สายพันธุ์ CaSUT007 จะมีการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีของมันสำปะหลังเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 3) โดยเฉพาะในกลุ่มของไขมัน C-H stretching ($\sim 3,000$ - $2,800$ cm^{-1}) กลุ่มของไขมัน C=O ester ($\sim 1,740$ cm^{-1}) กลุ่ม amide I ($\sim 1,700$ - $1,600$ cm^{-1}) กลุ่มของคาร์โบไฮเดรต C-H bonding, C-O stretching และ polysaccharide ($\sim 1,450$ - $1,350$ cm^{-1} , $\sim 1,246$ cm^{-1} และ $\sim 1,200$ - 900 cm^{-1} ตามลำดับ) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์สายพันธุ์ CaSUT007 มีความสามารถที่จะใช้เป็น “สิ่งกระตุ้น” (elicitor) ในการชักนำภูมิต้านทาน (induced resistance) ในมันสำปะหลังให้ต้านทานต่อโรคใบไหม้ เนื่องจากให้ประสิทธิภาพสูงเมื่อมีการนำมาใช้ในลักษณะของการแช่ท่อนพันธุ์ร่วมกับการฉีดพ่น สอดคล้องกับรายงานของ วิลารวรรณ เชื้อบุญ และคณะ (2549) ที่พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ไอโซเลต KPS46 สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเน่าและในผักกะหล่ำดอก ซึ่งเป็นโรคที่มีผลกระทบต่อผลผลิตโดยตรงได้ดีที่สุดเทียบเท่ากับ calcium-boron และ copper oxychloride นอกจากนี้จากงานวิจัยของ ศุภลักษณ์ มณีแสง และคณะ (2551) ได้ศึกษาการควบคุมโรคทางใบที่เกิดจากเชื้อราของถั่วฝักยาวด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. พบว่า *Bacillus* spp. ไอโซเลต HT-NK-460 และ ไอโซเลต TZ-CP-342 สามารถลด

ความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Cercospora cruenta*, *Uromyces vignae* และ *Oidium* sp. ได้ตั้งแต่ 35.85 - 65.52% อีกทั้งยังส่งผลให้ปริมาณผลผลิตของถั่วฝักยาวเพิ่มขึ้นอีกด้วย เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Buensanteai และคณะ (2008a, 2008b, 2009) ที่ทำการศึกษาการควบคุมโรคใบจุดบนของถั่วเหลืองที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *glycines* พบว่า การแช่เมล็ดถั่วเหลืองด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* ไอโซเลต KPS46 มีประสิทธิภาพในการลดระดับความรุนแรงในการเกิดโรคมามากกว่า 50% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

การทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการประยุกต์ใช้เทคนิค FTIR microspectroscopy ในการตรวจสอบสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์พืช เนื่องจากเป็นวิธีที่มีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างง่าย ใช้สารเคมีในการตรวจสอบน้อย (Cael et al., 1975; Maccann et al., 1992; Campbell and Sederuff, 1996; Kačuráková et al., 2000; Manrique and Lajolo, 2004; Kenneth and Lawrence, 2005; Dokken and Davis, 2007) วิธีการเหล่านี้จึงถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะใช้ในการศึกษากลไกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และกลไกการกระตุ้นความต้านทานเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ในอนาคต นอกจากนี้จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถแนะแนวทางการใช้ประโยชน์ในอนาคตให้กับเกษตรกรผู้ปลูกมันสำปะหลังในประเทศไทย ในใช้แบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 เพื่อชักนำให้มันสำปะหลังต้านทานโรคใบไหม้ซึ่งเป็นทางเลือกในการป้องกันการเกิดโรคพืชในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- วิลาวรรณ เชื้อบุญ. (2551). ลักษณะและการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ควบคุมเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าและของกะหล่ำดอก. **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**. 1-120 หน้า
- ศุภลักษณ์ มณีแสง เสมอใจ ชื่นจิตต์ วสันต์ เพชรรัตน์ และ วิจิตรา ลีละศุภกุล. (2551). การคัดเลือก *Bacillus* spp. สำหรับใช้ควบคุมโรคทางใบที่เกิดจากเชื้อราของถั่วฝักยาวโดยชีววิธี. **ว. วิทยาศาสตร์เกษตร**. 39(3) (พิเศษ): 189 - 192 หน้า.
- Araújo, F. F., Henning, A. A. and Hungria, M. (2005). Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology**. 21: 1639-1645.
- Arvind, K., Poonam B., and Chand L. R. (2010.) Isolation and molecular characterization of phosphate solubilizing Enterobacter and Exiguobacterium species from paddy fields of Eastern Uttar Pradesh, India. **African Journal Microbiology Research**. 4(9):820-829
- Asaka, O. and Shoda, M. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB 14. **Applied and Environmental Microbiology**. 62(11): 4081- 4085.
- Berger, F., Hong, L., White, D., Frazer, R. and Liefert, C. (1996). Effect of pathogen inoculum, antagonist density, and plant species on biological control of *Phytophthora* and *Pythium* damping-off by *Bacillus subtilis* cot1 in High-humidity fogging glasshouses. **Phytopathology**. 86: 428-433.
- Buensanteai, N., Yuen, G. Y. and Prathuangwong, S. (2008a). Changes in soybean proteome

- associated with growth promotion by seed treatment with *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46. **Phytopathology**. 98(6): S28.
- Buensanteai, N., Yuen, G. Y. and Prathuangwong, S. (2008b). The biocontrol bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 produces auxin, surfactin and extracellular proteins for enhanced growth of cucumber plant. **Thai Journal Agricultural Science**. 41:101-116.
- Buensanteai, N., Yuen, G. Y. and Prathuangwong, S. (2009). Priming, signaling, and protein production associated with induced resistance by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46. **World Journal Microbiol Biotechnology**. 25: 1275- 1286
- Buensanteai, N. (2012). The plant growth promoting bacterium *Bacillus subtilis* CaSUT007 produces phytohormone and extracellular proteins for enhanced growth of cassava. [n.d.]. Suranaree University of Technology.
- Cael, J. J., Gardner, K. H., Koenig, J. L., Blackwell, J. (1975). Infrared and Raman spectroscopy of carbohydrates. V. Normal coordinate analysis of cellulose. **Journal Chemistry Physics**. 62:1145-1153.
- Campbell, M. M., Sederoff, R. R. (1996). Variation in lignin content and composition mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. **Plant Physiology**. 110:3–13.
- Chen, Y. P., Rekha P. D., Arun A. B., Shen F. T., Lai W. A., and Young C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**. 34:33-41.
- Cho, S. J., Lee, S. K., Cha, B. J., Kim, Y. H. and Shin, K. S. (2003). Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. **FEMS Microbiology Letters**. 223: 47-51.
- Dokken, K., Davis, L. C. (2007). Infrared imaging of sunflower and maize root anatomy. **Journal Agriculture Food Chemistry**. 55(26):10517-10530.
- Liu, Y., Chen, Z., Ng, T. B., Zhang, J., Zhou, M., Song, F., Lu, F. and Liu, Y. (2006). Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. **Peptide**. 28(3): 553-559.
- Kloepper, J. W. and Schroth M. N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. P. 879-82. In: Station de Pathologievegetale et Phyto-bacteriologie, editor. Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria Vol II. Tours: Gilbert-Clary.
- Pérez-García, A., Romero, D. and de Vincente A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: bio-technological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opin. Biotechnology** 22: 187-193.
- Kačuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N., Ebringerová, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymer**. 43:195-203.
- Kenneth, M. D., Lawrence, C. D. (2005). Use of infrared microspectroscopy in plant growth and

- development. **Applied Spectroscopy Review**. 40:301–326.
- Manrique, G. D., Lajolo, F. M. (2004). Cell wall polysaccharide modifications during postharvest ripening of papaya fruit (*Carica papaya*). **Postharvest Biology Technology**. 33:11-26.
- McCann, M. C., Hammouri, M., Wilson, R., Belton, P., Roberts, K. (1992). Fourier transform infrared microspectroscopy is a new way to look at plant cell walls. **Plant Physiology**. 100(4):1940-1947.
- Rodriguez, H. and R. Fraga. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**. 17:319-339.
- Sol, L., K. Jong-Ok, and S. Hong-Gyu. (2011). Growth Promotion of *Xanthium italicum* by Application of Rhizobacterial Isolates of *Bacillus aryabhattai* in Microcosm. *Soil Journal Microbiology*. 50:45-49.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
Thumanu K, Sompong M, Phansak P, Nontapot K, and Buensanteai B. 2015. **Use of infrared microspectroscopy to determine leaf biochemical composition of cassava in response to *Bacillus subtilis* CaSUT007**. Journal of Plant Interaction. Submitted and on the process of revised condition.
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้ โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
มีการนำไปให้บริษัททดลองในแปลงขนาด 120 ไร่
 - เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
ไม่มี
 - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
กำลังอยู่ในระหว่างการสร้างเครือข่ายความร่วมมือกับทีมนักวิจัยชาวฝรั่งเศส และเกษตรกรผู้ปลูกมันสำปะหลัง อำเภอเสิงสางและครบุรี จังหวัดนครราชสีมา
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
นำการพัฒนาการเรียนการสอนนักศึกษาปริญญาตรี โท และเอก และสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ในระดับปริญญาตรี
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)
 1. Thumanu K, Sompong M, Phansak P, Nontapot K, and Buensanteai B. 2014. **Application of FTIR microspectroscopy: effect of *Bacillus subtilis* CaSUT007-induced biochemical composition on cassava**. The 2014 IS-MPMI XVI Congress. July 6-10, 2014 in Rhodes, Greece.
 2. Buensanteai, N., Thumanu, K., Sompong, M., Athinuwat, D. and Prathaungwong, S. (2012). The ability of *Bacillus subtilis* CaSUT007 to suppress *Xanthomonas manihotis* biofilm. **5th Biofilms**, Paris, France.

ภาคผนวก

Journal of Plant Interactions - Manuscript ID TJPI-2015-0043.R1

onbehalfof+massimo.maffei+unito.it@manuscriptcentral.com ในนามของ
massimo.maffei@unito.it

ศ. 8/5/2015 13:42

ถึง:Natthiya Buensanteai <natthiya@sut.ac.th>;

08-May-2015

Dear Professor Buensanteai:

Your manuscript entitled "Use of infrared microspectroscopy to determine leaf biochemical composition of cassava in response to *Bacillus subtilis* CaSUT007" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Journal of Plant Interactions.

Your manuscript ID is TJPI-2015-0043.R1.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/tjpi> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/tjpi>.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Plant Interactions.

Sincerely,
Journal of Plant Interactions Editorial Office

Reminder: Journal of Plant Interactions

onbehalfof+massimo.maffei+unito.it@manuscriptcentral.com ในนามของ
massimo.maffei@unito.it

ศ. 8/5/2015 11:34

ถึง:Natthiya Buensanteai <natthiya@sut.ac.th>;

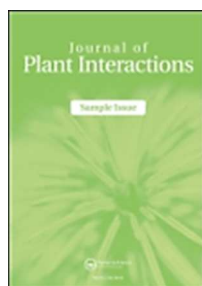
08-May-2015

Dear Professor Natthiya Buensanteai:

Recently, you received a decision on Manuscript ID TJPI-2015-0043, entitled "Infrared microspectroscopy: methods for determining cassava leaf biochemical composition response to *Bacillus subtilis* CaSUT007." The manuscript and decision letter are located in your Author Centre at <https://mc.manuscriptcentral.com/tjpi>.

This e-mail is simply a reminder that your revision is due in two weeks. If it is not possible for you to submit your revision within two weeks, we will consider your paper as a new submission.

Sincerely,
Prof. Massimo Maffei
Journal of Plant Interactions Editorial Office
massimo.maffei@unito.it



Use of infrared microspectroscopy to determine leaf biochemical composition of cassava in response to *Bacillus subtilis* CaSUT007

Journal:	<i>Journal of Plant Interactions</i>
Manuscript ID:	TJPI-2015-0043.R1
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	08-May-2015
Complete List of Authors:	Thumanu, Kanjana; Synchrotron Light Research Institute (public organization), Sompong, Mathukorn; Suranaree University of Technology, School of Crop Production Phansak, Piyaporn; Nakhon Phanom University, Division of Biology Nontapot, Kanokwan; National Institute of Metrology (Thailand), Buensanteai, Natthiya; Suranaree University of Technology, School of Crop Production
Keywords:	Fourier transform infrared (FTIR) , Cassava, Growth promotion, <i>Bacillus subtilis</i> , Biochemical composition, Hierarchical Cluster Analysis (HCA)

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

**Use of infrared microspectroscopy to determine leaf biochemical composition of cassava
in response to *Bacillus subtilis* CaSUT007**

Kanjana Thumanu^a, Mathukorn Sompong^b, Piyaporn Phansak^c, Kanokwan Nontapot^d, and
Natthiya Buensanteai^{b*}

^aSynchrotron Light Research Institute (public organization), Muang, Nakhonratchasima,
30000, Thailand

^bSchool of Crop Production Technology, Institute of Agriculture Technology, Suranaree
University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

^cDivision of Biology, Faculty of Science, Nakhon Phanom University, Muang, Nakhon
Phanom, 48000, Thailand

^dNational Institute of Metrology (Thailand), Khlong Luang, Pathumthani, 12120, Thailand

First and second authors are equal work

*Corresponding author. Tel.: +66 4 422 4204; Fax.: +66 4 422 4281
E-mail address: natthiya@sut.ac.th (N. Buensanteai)

Abstract

The objective of this study was to investigate the growth stimulating properties of *Bacillus subtilis* CaSUT007 applied to cassava plants using fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopy to monitor the production of cellular components involved in plant growth and development. Cassava stakes treated with CaSUT007 or sterile distilled water were germinated in soil. After incubation for 2 months, CaSUT007 treated plants had higher growth rate and greater biomass than the control. FTIR analysis revealed that the leaves of cassava plants treated with CaSUT007 display FTIR spectra changes in the epidermis and mesophyll tissue. These changes associated with proteins, lipids, and pectins, which are related to changes in plant cell growth and development. FTIR microspectroscopy can be used as a new tool to examine the biochemical changes within the plant tissue. This technique allows us to reveal structural chemical makeup and features of different tissue types.

Keywords:

Fourier transform infrared (FTIR)
Cassava
Growth promotion
Bacillus subtilis
Biochemical composition
Hierarchical Cluster Analysis (HCA)

Introduction

The cassava plant, *Manihot esculenta*, is one of the most important economically crops in Thailand. The aim of commercial cassava production in Thailand is to increase root

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

51 yield and starch content in addition to enhancing the crop's adaptation to a wide range of
52 plant growth conditions (Chavalparit & Ongwandee 2009; Buensanteai et al. 2012). In this
53 regard, plant growth promotion by beneficial bacteria has been widely used; however, there
54 are limited studies on the use of plant growth promoting bacteria with the propagation of
55 cassava stakes. It is well known that various commercial strains of *Bacillus* sp. can control
56 and enhance plant growth by triggering signaling pathways, leading to a more vigorous
57 growing phenotype and tolerance to biotic and abiotic stress. Furthermore, it has been
58 demonstrated that *Bacillus* cells can colonize plant roots, triggering stimulation of plant
59 growth and development through biochemical and physiological mechanisms
60 (Prathuangwong & Kasem 2004; Prathuangwong et al. 2005; Prathuangwong & Buensanteai
61 2007). *B. subtilis* CaSUT007, a plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), has both direct
62 and indirect modes of action involved in enhancing plant growth and development. Some
63 direct modes of action are production of phosphate solubilizing substances and modulation of
64 auxin levels. The rhizobacteria contributes indirectly by inducing plant defense mechanisms,
65 which is a means of biocontrol of cassava pathogens (Buensanteai et al. 2012; Buensanteai et
66 al. manuscript submitted).

67 Standard methods for the detection of changes in plant cellular components are based
68 on enzymatic analysis and histological assay (Buensanteai et al. 2008a, 2008b; Buensanteai et
69 al. 2009). However, these methods rely on the use of bulk samples resulting in averaging of
70 the intrinsic inter-tissue and cellular heterogeneity. Hence, the precise interaction of
71 important cellular changes involved with *Bacillus* cells with plant tissue is not fully
72 understood. Therefore, we proposed the use of FTIR microspectroscopy, a technique capable
73 of resolving biochemical changes at the plant cellular level (Yu et al. 2003; Skotti et al.
74 2014), to study biochemical changes in cassava plant.

FTIR microspectroscopy is a nondestructive analytical technique that is less time consuming and cheaper than the present "gold standard" methods, providing unique molecular chemical information based on the FTIR spectrum (McCann et al. 1992; Yu 2004). For example, the amide I protein band that contains vibrations of the peptide bond containing C=O (80%) and N-H stretching (20%), appearing between 1700 and 1600 cm^{-1} can provide information about protein secondary structure. The carbohydrate fingerprint region (1,200–800 cm^{-1}) of the FTIR spectrum from cells and tissues is obtained via vibrations of C-O bonds, which depend on bond linkage and sugar types. In addition, FTIR spectra from plant tissue has revealed absorbance bands uniquely assigned to higher plant cellular components such as lignin (ring vibration around 1515 cm^{-1}) (Kačuráková et al. 2000; Wilson et al. 2000).

Combining FTIR microspectroscopy with multivariate data analysis can enable to distinguish spectral fingerprint that can be related to the biochemical changes in a plant (Manrique & Lajolo 2004; Dokken & Davis 2007). This is an emerging technique for studying biochemical changes of plant tissue (Yu 2005). For example, functional characterization of plant tissues at high spatial resolution has been conducted using synchrotron infrared microspectroscopy to image the structure of plant tissues at a cellular level. The results can lead to a better understanding of plant components, such as lignin, cellulose, proteins, and lipids (Yu 2008).

In this study, we applied FTIR microspectroscopy to define plant tissue within cassava leaf sections and used this information to detect variations between control and those treated cassava stakes by *B. subtilis*. In particular, we demonstrate the use of FTIR microspectroscopy technique combined with multivariate data analysis to discriminate major tissue types in the cassava leaf, and demonstrate how this information enables us to track biochemical changes in cassava leaf tissue related to enhancement of growth and development of cassava.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

Materials and methods

Beneficial bacterial strains and culture conditions

B. subtilis CaSUT007 was cultured in 500 ml volumes of nutrient glucose broth (NGB) containing 2% glucose and incubated at $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 48 h with constant shaking at 180 rpm. Cells were collected and washed twice by centrifugation (13000 rpm; 20 min) and the bacterial cell pellet was washed three times in sterile isotonic saline (0.85% NaCl). The cells were re-suspended in sterile distilled water, with cell concentrations determined turbidimetrically and adjusted to an optical density of 0.2 at 600 nm, corresponding to 1×10^8 cfu ml^{-1} . A portion of the cell suspension was used in experiments in live form.

Plant materials and treatment

The cassava stakes cultivar Rayong 72 were surface disinfected using 95% ethanol (v/v) for 2 min, followed by soaking in 10% commercial bleach (v/v) for 20 min. The cassava stakes were then washed with sterile distilled water five times in order to remove the bleach. Before planting, cassava stakes were mixed thoroughly with 50 ml of a bacterial suspension treatment. The cell concentration in the culture was adjusted to 1×10^8 cfu ml^{-1} on the basis of absorbance. The experiment was conducted under greenhouse conditions, with treated cassava stakes placed onto sterile soil. Pots were kept in a greenhouse with a 12-h photoperiod ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and 75-80% relative humidity during the light period, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and $>93\%$ relative humidity during the dark period). The experiment was arranged in a completely randomized design (CRD) with four replicates of 20 plants per treatment with one

cassava stake in each pot. At 14 days after germination, cassava plants were harvested for measurement of growth parameters and biochemical composition changes using FTIR microspectroscopy. The experiment was performed three times. For statistical analyses, analysis of variance (ANOVA) was determined according to Duncan's Multiple Range Test at $P < 0.05$ by using SPSS version 14.

FTIR microspectroscopy

1. Sample preparation for FTIR microspectroscopy analysis

Cassava leaf tissue was fixed by placing it in a FAA (formaldehyde-acetic acid-ethanol) solution (Yu et al. 2003). Tissue was then rinsed in distilled water and dehydrated in increasing ethanol concentrations ending in absolute ethanol, then cleared in xylene. Cassava tissue was then embedded in paraffin and microtomed into thin cross section ($\sim 4 \mu\text{m}$ thickness) which were then placed on indium tin oxide coated IR slides (MirrIR slides, Tienta Sciences, OH, USA) for subsequent infrared analysis.

2. FTIR microspectroscopy analysis

The experiments were performed at the Synchrotron Light Research Institute, Thailand (public organization) by utilizing FTIR spectrometer (Vertex 70) connected to an IR microscope (Bruker optics, Germany). Measurements were performed with the synchrotron off-line, using a conventional IR source. The x-y raster maps comprising IR spectra were generated using a Hyperion 2000 IR microscope equipped with 36x objective and a mercury cadmium telluride (MCT) detector using a mapping stage controller at 10 micron intervals in

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

the x and y direction. The IR spectra were collected using point to point mapping with the aperture setting at 15x15 μm square aperture with 7.5 μm steps, in reflection mode at 6 cm^{-1} resolution, with 64 scans co added, and converted to absorbance using Bruker OPUS 7.0 software (Bruker Optics Ltd, Ettlingen, Germany).

IR maps acquired from leaf samples were analyzed using Cytospec 1.3.4 (Cytospec Inc, NY, USA). Data preprocessing was required to remove spectra showing signs of Mie scattering, dispersion artifacts, and sloping baselines. Subsequently, the spectra were converted to the second derivative using the Savitzky-Golay method employing third order polynomial fitting with nine smoothing points, and vector normalized to compensate for the effects of differing sample thickness across the sections. Hierarchical Cluster Analysis (HCA) using D-values with Ward's algorithm was carried out over the spectral ranges of 1800-900 cm^{-1} , which contained most of the biological bands in the IR spectrum. The outputs of HCA were visualized as dendograms with a unique color to assign for each spectral cluster.

3. Principal Component Analysis (PCA)

Individual spectra from each group were analyzed using principal component analysis (PCA) to distinguish different chemical components of the samples using Unscrambler X 10.1 software. (CAMO, Norway). Preprocessing of the data was conducted by performing a 2nd derivative by the Savitzky-Golay method (3rd polynomial, nine smoothing points) and normalized using Extended Multiplicative Signal Correction using the spectral regions from 1800-900 cm^{-1} in Unscrambler X 10.1 software (CAMO, Norway).

174 Results and discussion

175

176 The strain CaSUT007 was effective in promoting the growth of cassava seedlings
177 under greenhouse conditions, as measured by changes in the length, weight and lateral root of
178 the seedlings after 14 days of planting. This strain, when applied to cassava vegetative
179 propagation, increased shoot lengths by more than 35% (Figure 1a), and increased dry
180 weights by more than 90% (Figure 1b) compared to the distilled water control. Cassava
181 vegetative propagations treated with the strain CaSUT007 also increased the seedling
182 germination and number of lateral root by more than 30% and more than 90%, respectively,
183 when compared to the control treatment (Figure 1c and 1d). Similar results were obtained
184 when the experiment was repeated. In order to investigate the effects of CaSUT007 during
185 the early stages of plant growth and development, the cassava seedlings of untreated and
186 CaSUT007-treated seedlings were evaluated and their biochemical and cellular composition
187 evaluated.

188 Cassava plant tissues are comprised of a diverse group of molecules, including
189 proteins, lipids, lignins, pectins, and polysaccharides, with each molecular class having
190 characteristic conformations dependent on the individual cell type. Typically, the leaves of
191 higher plants are composed of epidermal (approximately 10% of total mass), mesophyll
192 (approximately 55% of total mass), and vascular bundle (approximately 33% of total mass)
193 tissues. Previous studies (McCann et al. 1992; Kačuráková et al. 2000; Wilson et al. 2000; Yu
194 et al. 2003; Manrique & Lajolo 2004; Yu 2004; Skotti et al. 2014) have shown that these
195 three tissue types can be readily distinguished in higher plant leaf tissue sections on the basis
196 of macromolecular chemistry using FTIR microspectroscopy. In this study, we attempted to
197 discern changes in macromolecular biochemistry in the different tissue types of cassava after
198 the stakes were treated with the CaSUT007 strain of *B. subtilis*. Figure 2 shows maps of the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

integrated area of spectral regions equivalent to absorbance intensities over the ranges 1700-1580 cm^{-1} (Figure 2c) for untreated cassava leaf (control) and cassava leaf treated with CaSUT007 (Figure 2d), over a spatial area of 120 μm x 100 μm within a transverse leaf section from a control sample (Figure 2a) and cassava leaf treated with CaSUT007 (Figure 2b). The map was contrasted using a color scheme to indicate absorbance intensity: blue (the areas of lowest level of absorbance) < green < yellow < red (the highest level of absorbance). As shown in the Figure 2c and 2d, the integrated spectra in the region of protein (1700-1580 cm^{-1}) are mostly dominated in the mesophyll region.

Hierarchical cluster analysis (HCA) was used to compare differences and similarities between tissue spectra involving spectral regions with information about Amide I protein (1700-1500 cm^{-1}), C=O ester from lipid or lignin or pectin (1770-1700 cm^{-1}), and C-O-C from polysaccharides (1200-900 cm^{-1}). The cluster analysis of spectra from an untreated (control) leaf were shown in Figure 3. The spectra from each cluster can be saved to perform multivariate data analysis with all spectra. Each cluster is displayed in a different color based on the similarities of protein, lipid, lignin and polysaccharide spectral regions. The grey color represents spectra from mesophyll, while the spectra of the vascular bundle appear in two clusters indicated by light green (cluster 2) and light blue (cluster 3) colors. The clusters coded with pink (cluster 5) and blue (cluster 4) were related spatially to epidermis tissue. The average spectrum from each cluster is shown in Figure 3b and 3c. These results indicate stronger ester carbonyl absorbance in the epidermis spectra (1729 cm^{-1}), and weaker in the vascular bundle spectra. We assumed that higher levels of endogenous lipids in the epidermis and higher levels of lignin in vascular bundle tissue accounted for these spectral similarities and differences. The highest level of protein (1621 cm^{-1}) was seen in the spectra coded with grey and assigned to mesophyll). The amide I band maximum centered at 1621 cm^{-1} indicating that these cells contain proteins with pronounced β -sheet secondary structure. By

contrast, spectra related to epidermis tissue have an amide I band profile presenting both α -helix (1648 cm^{-1}) and β -sheet structure (1618 cm^{-1}) with less intense absorbance of β -sheet and more intense absorbance from α -helix protein secondary structure compared to mesophyll tissue spectra.

The HCA of spectra acquired from a cassava leaf after treatment with *B. subtilis* is shown in Figure 4. Interestingly, the cluster colored with green (cluster 4) represents both mesophyll and vascular bundle. While the pink (cluster 1), red (cluster 2) and green (cluster 3) spectra from epidermis represent high extracellular matrix proteins and macro molecules. The average spectra from the spectral clusters assigned to epidermis all show high lipid absorbance (1729 cm^{-1}) similar to spectra assigned to epidermis in the control leaf. The amide I band profile in the average spectra from clusters assigned to epidermis in the treated leaf indicate a mixture of α -helix (1648 cm^{-1}) and β -sheet (1621 cm^{-1}) secondary structure, similar to average spectra from clusters assigned to epidermis in the leaf control. The average spectra from clusters attributed to mesophyll and vascular bundle tissue also show an amide I band profile consistent with higher levels of β -sheet secondary structure content (1621 cm^{-1}) similar to that observed in the mesophyll cluster average spectrum from the control leaf (Figure 4b and 4c).

In order to compare spectral changes occurring in the protein, lipid, and polysaccharides, average spectra between control and treated cassava from the epidermis region were performed as shown in Figure 5a. Significantly, the band in the region from $1770\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ assigned to lipid is higher in absorbance in the average spectrum from the control group. The comparisons between spectra from mesophyll tissue are shown in Figure 5b. Apparently, the β -sheet secondary structure of protein, indicated by an amide I band maximum centered at 1621 cm^{-1} is more intense in the control group compared with treated

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

cassava. In contrast, the absorbance in the polysaccharide region (1200-900 cm^{-1}) is shown to be higher in the treated plant (Séné et al. 1994; Wang et al. 2012).

The characteristic band from FTIR spectra of the main biopolymers of the plant cell wall depends on the crystallinity and conformation of the polysaccharides. Fingerprint region contains several polymers of different types, such as proteins, aromatics, polysaccharides, having a particular molecular conformation and interacting with neighboring molecules in a specific way as shown in Table 1. The cassava biochemical changes of epidermis and mesophyll in control and treated cassava showed the significant spectra shift: 1550-1600 cm^{-1} , 1350-1450 cm^{-1} , less than 1000 cm^{-1} , which can be associated with a change in the construction and formation of the plant cell wall. It is known that bacteria affect the structure of plant cell walls. In some cases, the bands in a particular spectral region cannot be assigned to a specific functional group, but they are characteristic as a whole and constitute a fingerprint for the molecule (McCann et al. 1992; Séné et al. 1994).

Multivariate data analysis, in particular PCA technique, was employed to characterize biochemical changes in the cassava leaf tissue induced by *B. subtilis* strain CaSUT007 . Score plots were used to visualize any clustering of similar spectra within the datasets, and loading plots were employed to identify spectral variables that best explained clustering patterns. The results were interpreted by taking second derivative spectra showing the negative peak. The second derivative can help resolve nearby peaks and sharpen spectral features. Therefore, the positive loading plots showed an opposite correlation with the negative score plot, and the negative loading plot showed an opposite correlation with the positive score plot. The criterion to apply the band assignment was supported by the previous section, based on observation of the average second derivative spectra from control and treated cassava.

The use of multivariate analysis, in particular Principle Component Analysis (PCA), has proven useful in the analysis of biospectroscopic data, providing two types of

information: the visualisation of the clustering of similar spectra within datasets in scores plots and the identification of variables (spectral bands representing various molecular groups within the samples) in loadings plots to explain the clustering observed in the scores plots. The PC1 and PC2 loading were shown that differences in bands associated with lipid, pectin, lignin, protein, and polysaccharide were responsible for the separation of the sample clusters treated and un-treated cassava stakes treated with bacteria CaSUT007 (Figure 6). Lipid or lignin bands (at 1729 cm^{-1}) and complex changes in bands associated with polysaccharide regions (at 1120 , 1078 , 1043 , 1022 cm^{-1}) were predominantly observed in Figure 6b, corresponding to the large difference observed in the average spectra in Figure 5a. Considering the complex biochemical changes of spectra was associated with the Amide I protein (at 1646 , 1621 cm^{-1}) and polysaccharide regions (at 1149 , 1076 , 1046 , 998 cm^{-1}) (Figure 6d), involved in difference clusters of the average spectra in Figure 5b.

This study indicated that FTIR microspectroscopy technique could investigate cassava leaf sections at a high spatial resolution and reveal macromolecular differences between control and treated leaf tissue CaSUT007. This technique combined with HCA and PCA can be used to resolve chemical structural information related to the various tissue types in the plant leaf. Importantly, both HCA and PCA enable the exploration of spectral changes from epidermis and mesophyll tissue after treatment with *B. subtilis* CaSUT007 compared with untreated controls. Our results suggest spectral differences in both the epidermal and mesophyll tissue regions consistent with changes especially in proteins, lipids, and polysaccharides. This study is consistent with other studies in which PGPR, *Bacillus* species in particular, elicit the production of plant biological molecules that lead to structural and physiological changes associated with the plant growth and development in cassava (Prathuangwong & Kasem 2004; Prathuangwong et al. 2005; Prathuangwong & Buensanteai 2007; Buensanteai et al. 2012). The results from this study show changes in the epidermal

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

tissue after treatment with *B. subtilis* strain CaSUT007 indicative of lower levels of proteins with β -sheet secondary structure as well as lower lipid levels compared with the control. Moreover, the results of the accumulation of pectin and polysaccharide in cassava plants might be associated with cell wall formation. Plant cell walls are complex composites of cellulose, cross-linking glucans, protein, and pectin substances. This technique can be applied to analyze stems of wheat cultivars via the spectral fingerprinting of cell walls and to identify chemical differences between genotypes with varying levels of lodging resistance (Wang et al. 2012). From our results, we found that the shifts in the absorbance intensities at different frequencies between control and treated leaves can be related to the concentrations of different molecules such as cellulose, protein, pectin, and lignin. In related report, ectin plays an important role within the cell walls of a growing plant. It was mentioned that pectin and pectin methyl-esterification which involves plant defense chemical compositions with mainly associated with beta-sheet secondary structure which play an important role in cell wall metabolism (McCann et al. 1992; Yu 2004; Skotti et al. 2014). These biochemical changes may possibly involve enzymes implicated in degradation processes such as pectinases that catalyze de-esterification of pectin by the action of pectin esterferase and other pectin enzymes (Kačuráková et al. 2000; Manrique & Lajolo 2004). Interestingly, the peaks in the carbohydrate fingerprint region ($1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$) show an increase in absorbance, particularly in the bands at 1076 cm^{-1} and 1153 cm^{-1} . This might be related to pectin polysaccharides, such as homogalactruonan, rhamnogalacturan, or beta-glucan (callose), known to be found in cell walls of plant leaves (Yu 2005; Dokken & Davis 2007), increasing in response to the *B. subtilis* strain CaSUT007 treatment of the cassava plants. In this context, we hypothesize that plant growth promotion by CaSUT007 results from the activation of enzymes in the plant cell walls of the epidermis (Yu 2005) that are related to growth and development processes. Due to its integral role in carbon fixation, the ribulose 1,5

biphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) enzyme comprises 50% of the total amount of proteins found in the leaf, which means that changes in its concentration in the leaf can be tracked using FTIR by looking for changes in the spectra associated with alpha-helix proteins since the secondary structure of RuBisCo is predominately alpha-helices (McCann et al. 1992; Wilson et al. 2000; Yu et al. 2003; Yu 2004; Buensanteai et al. 2009; Skotti et al. 2014). On the other hand, the epidermis appeared to have predominantly alpha helix secondary structure with an overall decrease in protein content detected in the treated group. It is unknown whether this difference in protein secondary structure could be occurring due to the environmental growth condition.

332

333 Conclusion

334

In conclusion, FTIR microspectroscopy can be used as a new tool to examine the biochemical changes within plant tissue. This technique allows us to reveal the structural chemical makeup and the features of different tissue types. The use of PCA and HCA was applied to characterize the spectral differences between epidermal and mesophyll tissues. In addition, the results showed that cassava stakes treated with *B. subtilis* CaSUT007 produced leaves that displayed changes in FTIR spectra from epidermis and mesophyll tissue regions that may be associated with compositional and concentration changes of proteins, lipids, pectins, and polysaccharides. These changes are related to the changes in cell growth and development that might be result in yield improvement. However, further research is needed to better understand and characterize these chemical and structural changes directly caused by *B. subtilis* CaSUT007 treatment. In the future, we plan to collect the leaf samples at differing harvest times in order to compare spectral differences that could be occurring during the growth and development of cassava plants with an emphasis on relating the effect of the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

348 treatment to the stimulation of plant growth regulators and yield improvement. Moreover, it
349 might be useful to study cell wall modifications in order to understand the biochemical
350 changes resulting from treatment of cassava stakes with CaSUT007. In particular, the mid
351 infrared region at 1200-800 cm⁻¹ can be used to identify polysaccharides with different
352 structures in order to examine the composition of leaf cell walls. This study represents the
353 first steps toward the achievement of our goal.

354
355 **Acknowledgements**

356
357 This work was supported by Suranaree University of Technology and by the Higher
358 Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office
359 of the Higher Education Commission. Also, this research is partially supported by funds from
360 the Thailand Research Funds MRG558. Moreover, thanks are also due to the NSTDA for the
361 grant support. Also, we would like to express our appreciation to the Synchrotron Light
362 Research Institute, for providing the partial funding support, FTIR instruments and
363 beamtimes.

364
365 **References**

366
367 Buensanteai N, Athinuwat D, Chatnaparat C, Yuen GY, Prathuangwong S. 2008b.
368 Extracellular proteome of plant growth promoting-bacteria, *Bacillus*
369 *amyloliquefaciens* KPS46 and its effect on enhanced growth promotion and induced
370 systemic resistance on soybean. Kasetsart J. Nat. Sci. 42:13-26.
371 Buensanteai N, Thumanu K, Sompong M, Athinuwat D, Prathuangwong S. 2012. The

- 372 FTIR spectroscopy investigation of the cellular components of cassava after
373 sensitization with plant growth promoting rhizobacteria, *Bacillus subtilis* CaSUT007.
374 Afr. J. Microbiol. Res. 6(3):603-610.
- 375 Buensanteai N, Yuen GY, Prathuangwong S. 2008a. The biocontrol bacterium
376 *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 produces auxin, surfactin and extracellular
377 proteins for enhanced growth of cucumber plant. Thai J. Agric. Sci. 41:101-116.
- 378 Buensanteai N, Yuen GY, Prathuangwong S. 2009. Priming, signaling, and protein
379 production associated with induced resistance by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46.
380 World J. Microbiol. Biotechnol. 25:1275-1286.
- 381 Buensanteai N, Sompong M, Phansak P, Vechklang K. 2015. Phytase and indole
382 acetic acid producing rhizobacteria *Bacillus* sp. CaSUT007 and its effect on plant
383 growth promotion. Manuscript submitted.
- 384 Cael JJ, Gardner KH, Koenig JL, Blackwell J. 1975. Infrared and Raman spectroscopy of
385 carbohydrates. V. Normal coordinate analysis of cellulose. J. Chem. Phys. 62:1145–
386 1153.
- 387 Campbell MM, Sederoff RR. 1996. Variation in lignin content and composition
388 mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants.
389 Plant Physiol. 110:3–13.
- 390 Chavalparit O, Ongwandee M. 2009. Clean technology for the tapioca starch industry
391 in Thailand. J. Clea. Produc. 17:105-110.
- 392 Colthup NB, Daly LH, Wiberley SE. 1964. Introduction to infrared and Raman
393 spectroscopy. New York, NY, USA: Academic Press.
- 394 Dokken KM, Davis LC. 2007. Infrared imaging of sunflower and maize root anatomy.
395 J. Agric. Food Chem. 55(26):10517-10530.

- 396 Faix O. 1992. Fourier transform infrared spectroscopy. In: Lin SY, Dence CW, editors.
397 Methods in lignin chemistry. New York, NY, USA: Springer- Verlag; p. 83–106.
- 398 Kačuráková M, Capek P, Sasinková V, Wellner N, Ebringerová A. 2000. FT-IR study
399 of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and
400 hemicelluloses. Carbohydr. Polym. 43:195-203.
- 401 Kenneth MD, Lawrence CD. 2005. Use of infrared microspectroscopy in plant
402 growth and development. Appl. Spectrosc. Rev. 40:301–326
- 403 Manrique GD, Lajolo FM. 2004. Cell wall polysaccharide modifications during
404 postharvest ripening of papaya fruit (*Carica papaya*). Post. Biol. Tech.
405 33:11-26.
- 406 McCann MC, Hammouri M, Wilson R, Belton P, Roberts K. 1992. Fourier transform
407 infrared microspectroscopy is a new way to look at plant cell walls. Plant
408 Physiol. 100(4):1940-1947.
- 409 Nelson WH. 1991. Modern techniques for rapid microbiological analysis. New York,
410 NY, USA: VCH Publishers.
- 411 Pelton JT, McLean LR. 2000. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary
412 structure. Anal. Biochem. 277:167–176.
- 413 Prathuangwong S, Buensanteai N. 2007. *Bacillus amyloliquefaciens* induced systemic
414 resistance against bacterial pustule pathogen with increased phenols, peroxides, and
415 1,3-glucanase in cucumber plant. Acta. Phytopathol. Et. Entomol. Hungarica. 42:321-
416 330.
- 417 Prathuangwong S, Kasem S. 2004. Screening and evaluation of thermotolerant
418 epiphytic bacteria from soybean leaves for controlling bacterial pustule disease. Thai
419 J. Agric. Sci. 37:1-8.
- 420 Prathuangwong S, Kasem S, Thowthampitak J, Athinuwat D. 2005. Multiple plant

- 421 response to bacterial mediated protection against various diseases. ISSAAS J.
422 11(3):79-87.
- 423 Séné CFB, McCann MC, Wilson RH, Crinter R. 1994. Fourier-transform raman and fourier-
424 transform infrared spectroscopy: an investigation of five higher plant cell walls and
425 their components. Plant Physiol. 106:1623-1631.
- 426 Skotti E, Kountouri S, Bouchagier P, Tsitsigiannis DI, Polissiou M, Tarantilis PA.
427 2014. FTIR spectroscopic evaluation of changes in the cellular biochemical
428 composition of the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* induced by extracts
429 of some Greek medicinal and aromatic plants. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol.
430 Spectrosc. 127:463-472.
- 431 Yu P. 2004. Application of advanced synchrotron-based fourier transform infrared
432 microspectroscopy (SR-FTIR) to animal nutrition and feed science: A novel
433 approach. Br. J. Nutr. 92(6):869-885.
- 434 Yu P. 2005. Molecular chemistry imaging to reveal structural features of various plant
435 feed tissues. J. Structural Biol. 150:81-89.
- 436 Yu P, McKinnon JJ, Christensen CR, Christensen DA, Marinkovic NS, Miller LM.
437 2003. Chemical imaging of microstructures of plant tissues within cellular dimension
438 using synchrotron infrared microspectroscopy. J. Agric. Food Chem. 51(20):6062-
439 6067.
- 440 Yu P. 2008. Synchrotron-based microspectroscopic analysis of molecular and
441 biopolymer structures using multivariate techniques and advanced multi-component
442 modeling. Can J. Anal. Sci. Spectrosc. 53:220-231.
- 443 Wang J, Zhuac J, Huangac RZ, Yang Y. 2012. Investigation of cell wall composition related
444 to stem lodging resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.) by FTIR spectroscopy.
445 Plant Signaling & Behavior 7(7):856–863;

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

446 Wetzal DJ, LeVine SM. 2000. Biological applications of infrared microspectroscopy. In:
447 Gremllich HU, Yan B, editors. Infrared and Raman Spectroscopy of Biological
448 Materials. New York: Marcel Dekkar; p. 101-142.
449 Wilson RH, Smith AC, Kačuráková M, Saunders PK, Wellner N, Waldron KW. 2000. The
450 mechanical properties and molecular dynamics of plant cell wall polysaccharides
451 studied by fourier-transform infrared spectroscopy. Plant Physiol. 124:397–405.

Table 1 Band assignment of IR spectra presented in the plant tissues.

Frequency range (cm ⁻¹)	Functional groups	References
1730	C=O ester from lignin and hemicellulose/Pectin	Kenneth & Lawrence 2005; Dokken & Davis 2007; McCann et al. 1992
1650	Amide I band (C=O Stretch (80%), C-N stretch (10%), N-H bending (10%))	Yu 2004, 2005, 2006, 2008; Pelton & McLean 2000; Nelson 1991; Wetzel & Levine 2000
1550	Amide II (N-H bend (60%), C-N stretch (40%))	Yu 2004, 2005; Pelton & McLean 2000; Nelson 1991; Wetzel & LeVine 2000
1510	C=C aromatic ring from lignin	Colthup et al. 1964; Campbell & Sederoff 1996; Wetzel & LeVine 2000
1450	Asymmetric CH ₂ and CH ₃ bending from lipids, protein, lignin	Kenneth & Lawrence 2005; Colthup et al. 1964
1370	Symmetric CH ₂ and CH ₃ bending from lipids, protein, lignin	Kenneth & Lawrence 2005 Colthup et al. 1964
1246	C-O Stretching from hemicelluloses and lignin	Dokken & Davis 2007; Faix 1992; Kenneth & Lawrence 2005
1200-1000	Mainly C-O-C of polysaccharides; very complex and depends upon contributions from polysaccharides, cellulose, hemicellulose, and pectins	Kacuráková et al. 2000; Cael et al. 1975
1105	C-O-C glycosidic ether mainly hemicellulose	Dokken & Davis 2007; Wang et al. 2012
1155	C-C ring cellulose	Dokken & Davis 2007; Wang et al. 2012
1022,1047,1080	C-C, C-O Stretching from carbohydrates	Dokken & Davis 2007; Wang et al. 2012

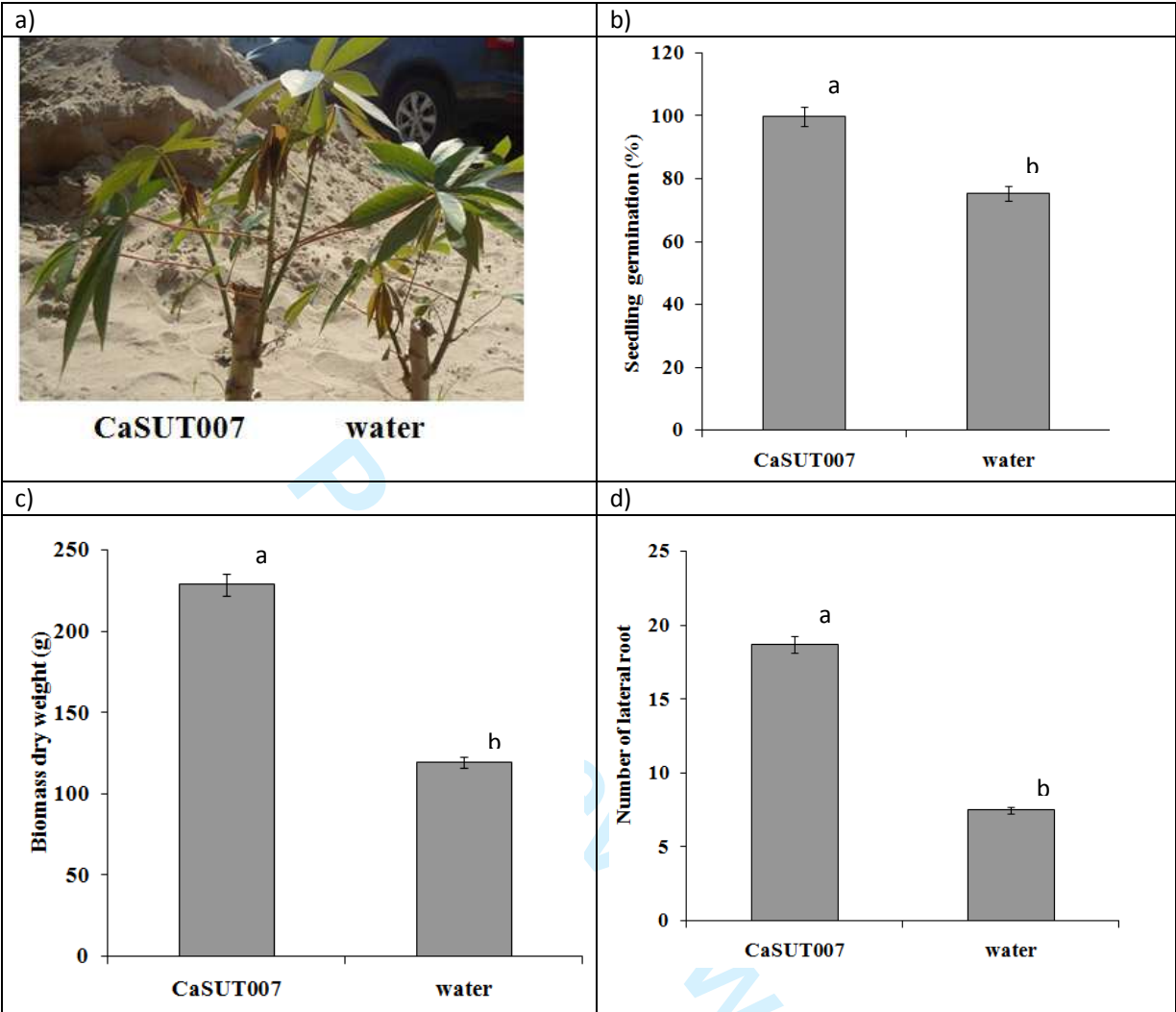


Figure 1 Effects of PGPR *Bacillus subtilis* CaSUT007 on the growth and development of cassava seedling under greenhouse conditions, as measured at 14 days after inoculation. (a) cassava seedling under greenhouse conditions in sterile soil, (b) percent of seedling germination, (c) dry weight, (d) number of lateral root. The data are the average of four replications (three plants per replication) for each treatment. Error bars represent the standard deviation. For each growth parameter, different letters indicate significant difference ($P \leq 0.05$) among treatments.

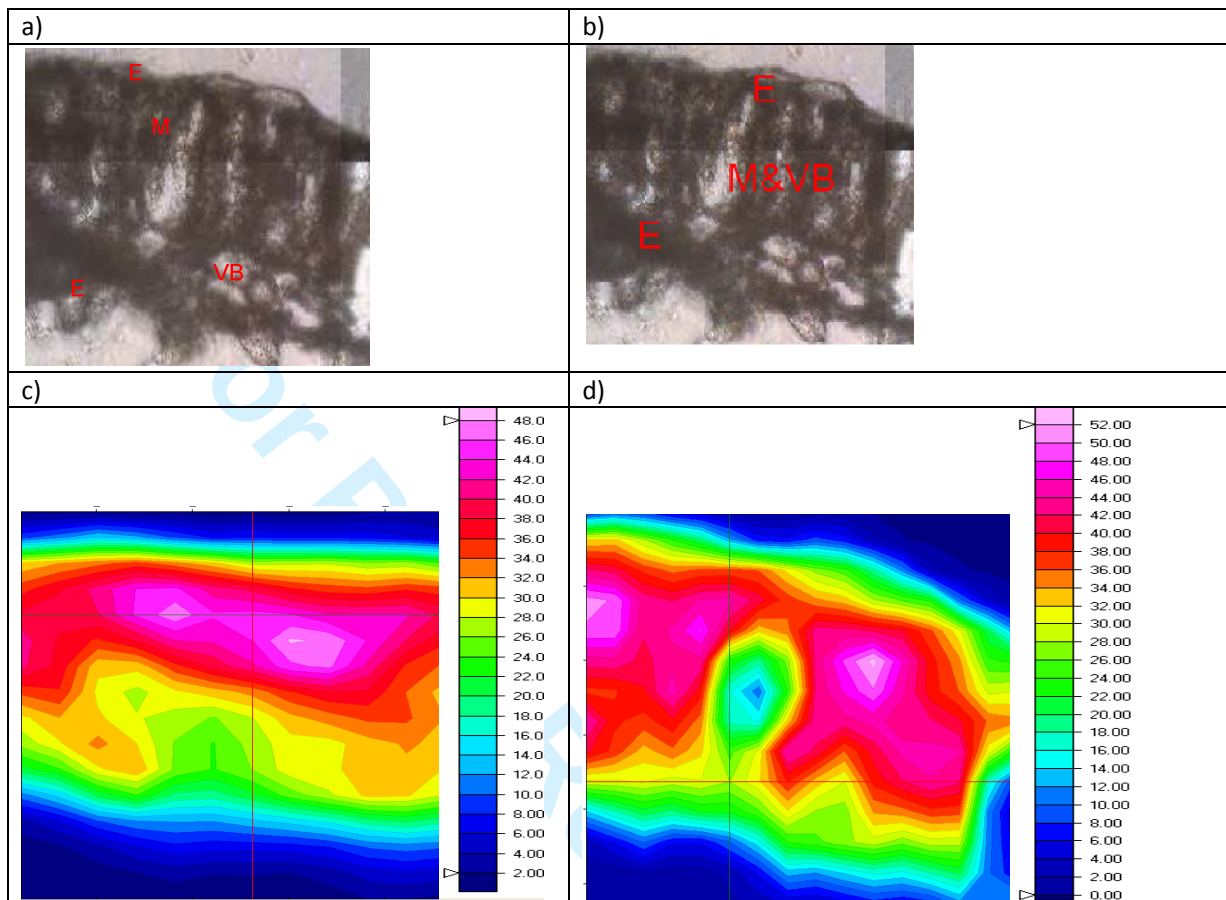
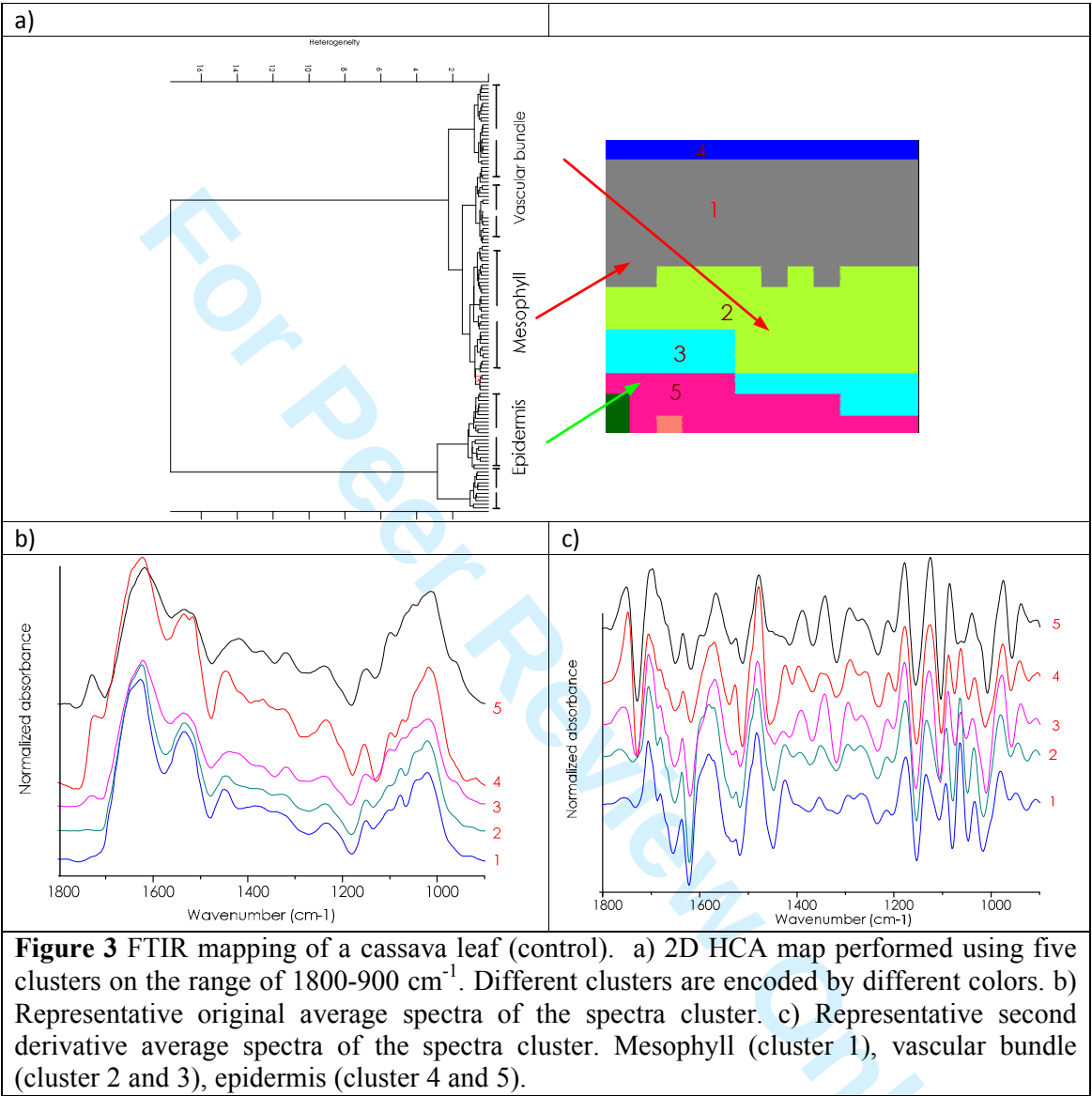
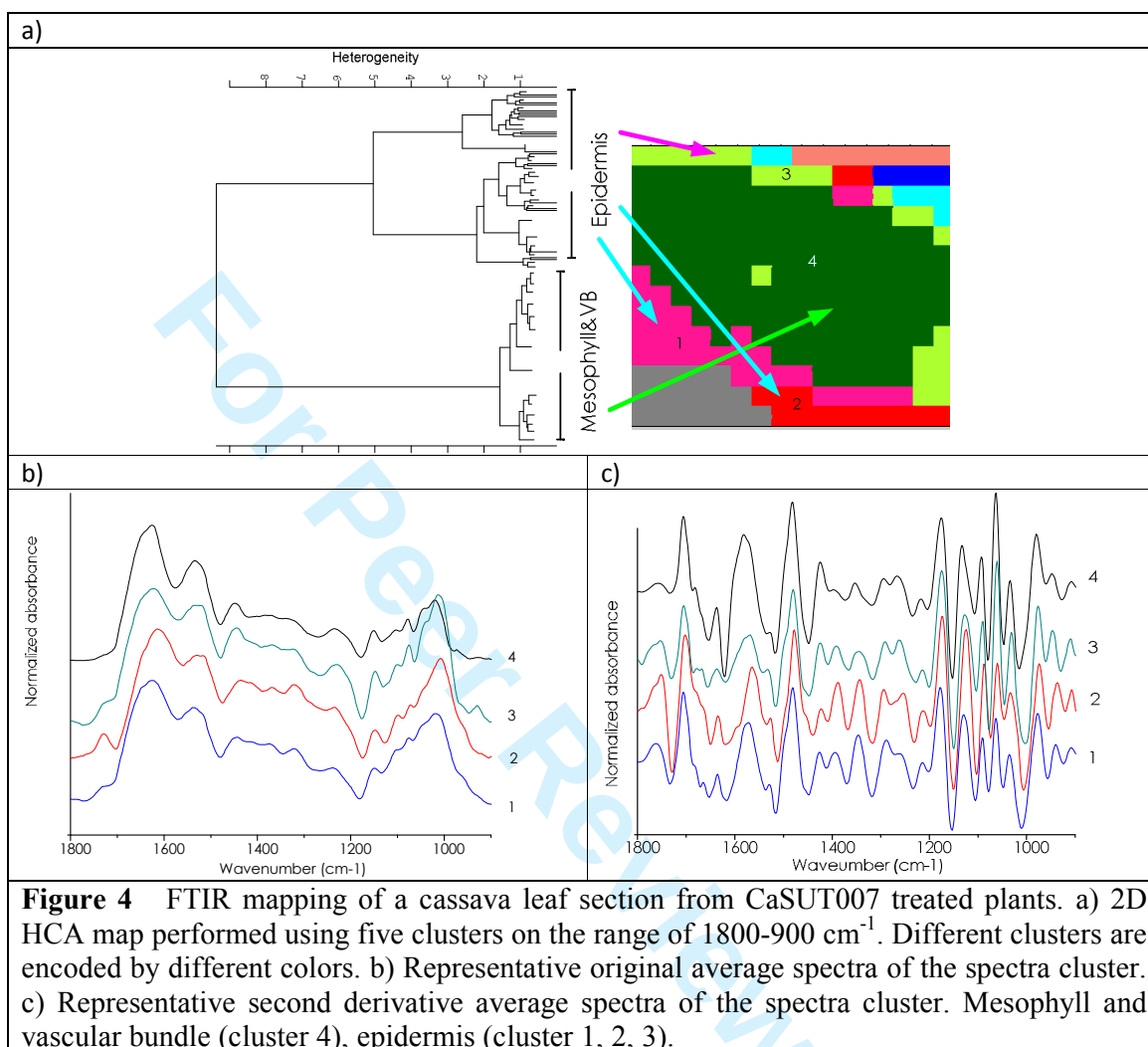
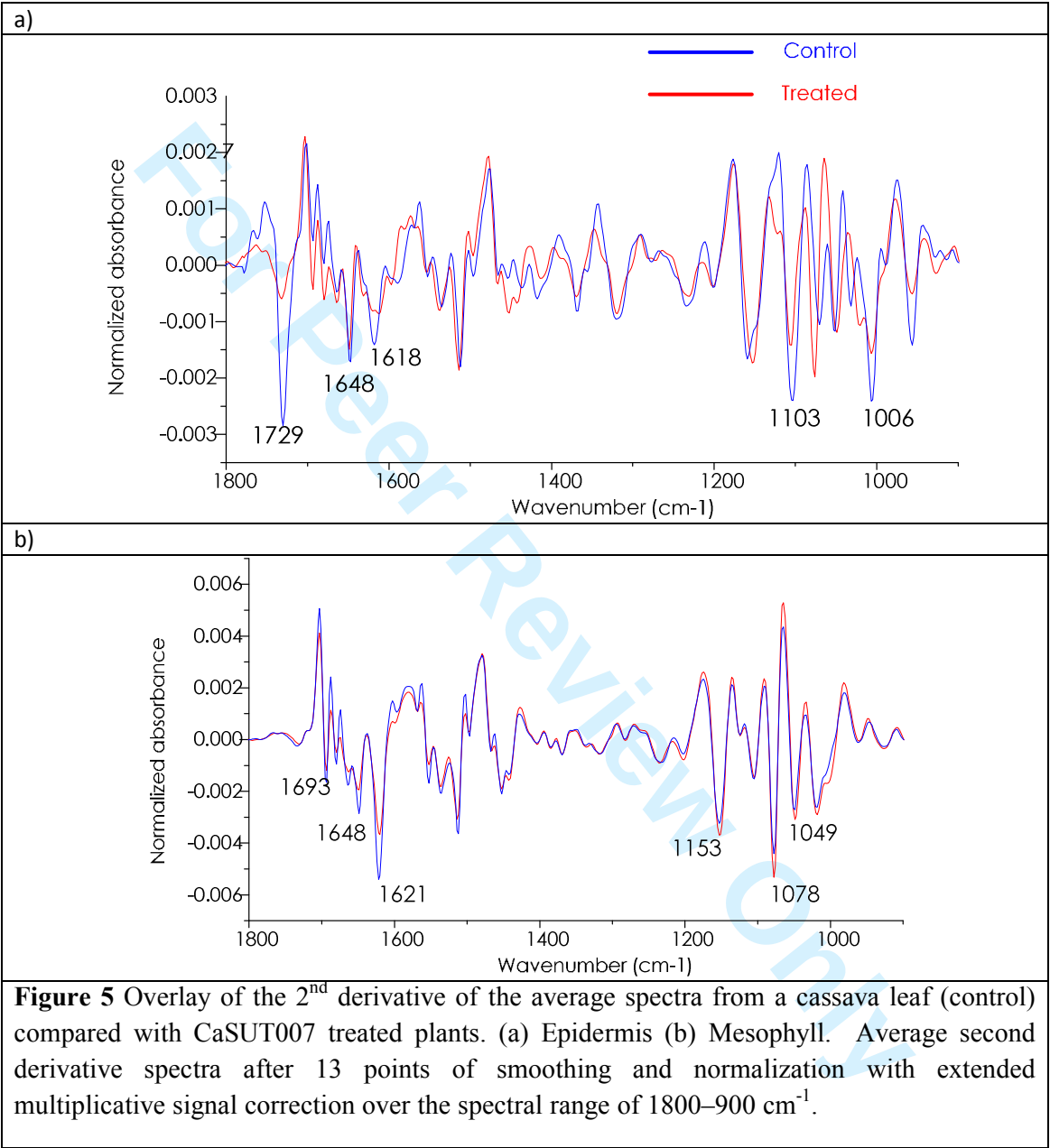
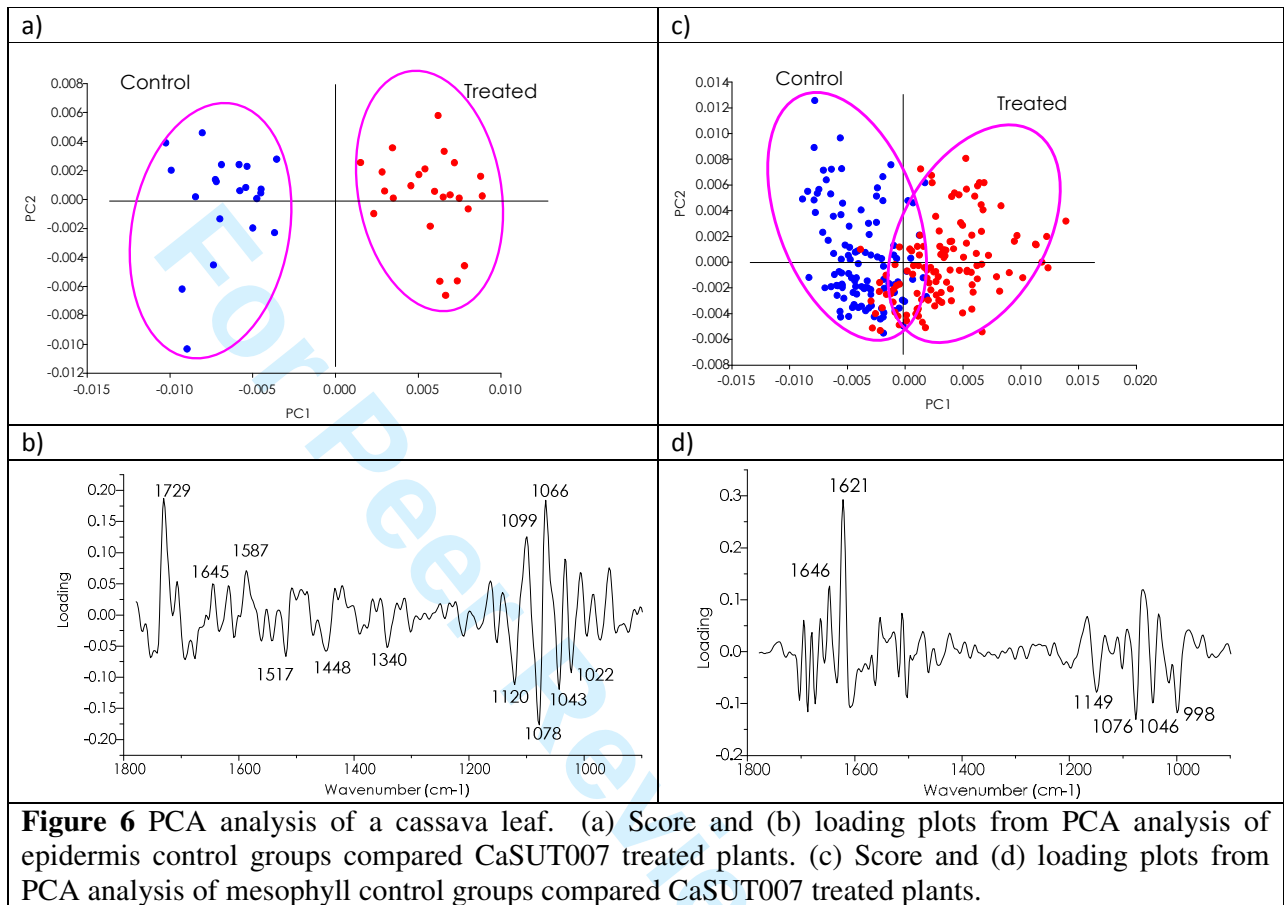


Figure 2 Functional group area maps of a part of a transverse leaf section from cassava achieved using FTIR microspectroscopy point to point mapping with aperture setting at $15 \times 15 \mu\text{m}$ square aperture with $7.5 \mu\text{m}$ steps. a) A micrograph of the untreated (control) transverse section. b) A micrograph of a transverse cassava leaf section from CaSUT007 treated plants. c) Integrated functional groups maps obtained under the spectral region between $1700\text{--}1580 \text{ cm}^{-1}$ for untreated (control). d) Cassava leaf treated with CaSUT007. Dimensions of the area studied of $120 \times 100 \mu\text{m}$ E: Epidermis, M: Mesophyll, VB: Vascular bundle.









Answer Reviewer Question

Your manuscript ID is TJPI-2015-0043.R1.

Reviewer: 1

Comments to the Author

Following are some corrections and queries that require attention:

1) The title of the manuscript should be slightly modified. The title signifies that Infrared microspectroscopy has only single application that is to determine leaf biochemical composition. It would be better if the title is changed to 'Use of Infrared microspectroscopy to determine leaf biochemical composition of cassava in response to *Bacillus subtilis* CaSUT007'. However, it is up to the authors to incorporate this change.

Answer: Our title was changed to "Use of Infrared microspectroscopy to determine leaf biochemical composition of cassava in response to *Bacillus subtilis* CaSUT007".

2) In abstract fourier transform infrared is abbreviated as FTIR but the full form of IR is not mentioned anywhere.

Answer: The IR abbreviation was changed into FTIR in all manuscript.

3) In abstract sentence 'These changes may be associated with protein, lipid, and pectin, which are apparently related to changes in plant cell growth and development' has comma (,) before 'and' 'lipid, and pectin,' and such grammatical error is observed at several instances throughout the manuscript where author needs to perform corrections. This error is being repeated for 22 times in manuscript.

Answer: All the corrections were performed.

4) On page 3, 'In this regard, plant growth promotion by beneficial bacteria has been widely used, however, up to now there are no good studies on the use of plant growth promoting bacteria with the propagation of cassava stakes' has to be rewritten. Terms such as 'good studies' doesn't appear scientific.

Answer: The correction was rewritten in term of "good studies" to "limit studies".

5) On page 4, under Introduction section sentence 'These results can lead to a better understanding of plant intrinsic structures, such as lignin, cellulose, protein, lipid, etc.' has to be reframed. Use of word 'These' in the beginning of the sentence should be avoided.

Answer: The correction was rewritten.

6) Last line of introduction section 'In particular, we demonstrate the use of FTIR microspectroscopy technique combined with multivariate data analysis, in particular PCA and HCA, to discriminate major tissue types in the leaf, and demonstrate how this information enables us to track biochemical changes in cassava leaf tissue related to beneficial bacterial *B. subtilis* CaSUT007 treatment and enhancement of growth and development of cassava plants' is highly complex and it should be rewritten.

Answer: The correction was rewritten.

7) In materials and method, what does NGB signify? If it is the growth medium then what is its full form and its composition?

Answer: The correction was rewritten, NGB = nutrient glucose broth.

8) What is the accession number of *B. subtilis* CaSUT007.

Answer: The *B. subtilis* CaSUT007 does not submit the sequence into the NCBI database yet so there is no accession number.

9) Does the strain *B. subtilis* CaSUT007 show PGPR abilities such as Phosphate solubilization, IAA production, colonization on plant roots, etc.? It is true that *B. subtilis* is known for Plant Growth Promotion (PGP) but it is not proved that all the strain of *B. subtilis* show PGP.

Answer: The *B. subtilis* CaSUT007 does not submit the sequence into the NCBI database yet.

10) If the *B. subtilis* CaSUT007 is proven PGPR strain, has its data been published? If yes then provide reference and if not then author should prove that *B. subtilis* CaSUT007 is showing PGPR traits and should provide data.

Answer: *Bacillus subtilis* CaSUT007, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) is the rhizobacteria and have mode of action into directly or indirectly involved in enhancing plant growth and development via production of phosphate solubilizing substance, modulating plant hormone as indole acetic acid (IAA) levels, or indirectly by inducing plant defense mechanism, decreasing the infection of plant pathogens in the forms of bio-control agents (BCA) (Buensanteai et al. 2012; Buensanteai et al. manuscript submitted).

11) Under what conditions cassava stakes were grown? Green house was used? If not then what were the temperature and humidity levels? If these parameters were not measured then provide the month and year where cassava stakes were grown and provide the environmental parameters of Thailand when cassava stakes were grown. Basically provide the environmental conditions under which pots of cassava stakes were kept to germinate.

Answer: The information has been included under materials and methods section. Pots were kept in a greenhouse with a 12-h photoperiod (28 ± 2 °C and 75-80% relative humidity during the light period, 25 ± 2 °C and >93% relative humidity during the dark period). The experiment was arranged in a randomized completely randomized design (CRD) with four replicates of 20 plants per treatment with one cassava stake in each pot.

For statistical analyses, analysis of variance (ANOVA) was carried out to evaluate the differences among the treatments was determined according to Duncan's Multiple Range Test at $P < 0.05$ by using SPSS version 14.

12) Provide the cultivar of cassava stakes.

Answer: cultivar Rayong 72

13) Under results and discussion portion it is mentioned that cassava stakes were grown under green house conditions which is not mentioned under materials and method.

Answer: The information has been included under materials and methods section. Pots were kept in a greenhouse with a 12-h photoperiod (28 ± 2 °C and 75-80% relative humidity during the light period, 25 ± 2 °C and >93% relative humidity during the dark period).

14) Legend of Figure 1 mentions 'For each growth parameter, different letters indicate significant difference (P < 0.05) among treatments'. In contradiction, there are no letters mentions on error bar showing significance. ANOVA is not performed nor mentioned in the manuscript then how does P value suddenly appear in the legend of Figure 1?

Answer: The letters were added into the graph.

15) In results the PCA is described compares control with B. subtilis CaSUT007 treated cassava stakes. But the difference in the levels of Carbohydrates, Lipids, Proteins, etc. deduced by FTIR among the control and B. subtilis CaSUT007 treated cassava stake is not compared scientifically.

16) Thus there is need for better comparison of FTIR microspectroscopy results for control and B. subtilis CaSUT007 treated cassava stakes.

Answer 15 & 16: The use of multivariate analysis, in particular Principle Component Analysis (PCA), has proven useful in the analysis of biospectroscopic data, providing two types of information: the visualisation of the clustering of similar spectra within datasets in scores plots and the identification of variables (spectral bands representing various molecular groups within the samples) in loadings plots to explain the clustering observed in the scores plots.

PC1 and PC2 loading were shown that difference in bands associated with lipid, pectin, lignin, protein and polysaccharide were responsible for the separation of the clusters of the sample before and after cassava stakes treated with bacteria (figure6). Lipid or lignin bands (at 1729 cm^{-1}) and complex changes in bands associated with polysaccharide regions (at $1120, 1078, 1043, 1022 \text{ cm}^{-1}$) were predominant observed in figure6b, corroborating the large difference observed in the average spectra in figure 5a. Considering the complex changes in bands associated with Amide I protein (at $1646, 1621 \text{ cm}^{-1}$) and polysaccharide regions (at $1149, 1076, 1046, 998 \text{ cm}^{-1}$) in figure6d, involved in difference clusters of the spectra corroborating with average spectra in figure 5b.

17) On the whole manuscript has originality and significant results. However, some language and grammatical errors needs to be corrected. Missing information mentioned above should be provided. Comparison of the results for the control and B. subtilis CaSUT007 treated cassava stake should be represented in the better way.

Answer: Language and grammatical errors was corrected.

Reviewer: 2

Comments to the Author

Article of Thumanu et al. "Infrared microspectroscopy: methods for determining cassava leaf biochemical composition response to *Bacillus subtilis* CaSUT007" the possibility of using infrared microspectroscopy for determining cassava leaf biochemical composition response to *Bacillus subtilis* CaSUT007. It was found that treatment of seeds by the bacterial culture results in increased germination rate of seeds, number of lateral roots and possibly other physiological functions of plants, according to the literature data on the results of using the plant growth promoting microorganisms.

In the studies the modern method fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopy has emerged as a tool that has been extensively developed in biological and medical fields. FT-IR spectroscopy has been extensively employed for the assessment of secondary structure of proteins and protein aggregates in solution, especially exploiting the sensitivity of the Amide I band to protein conformation. However, these measurements are technically demanding, due to the need of absolute control of the optical path of the liquid chambers for accurately compensating the dominant water contribution to the Amide I band. Highlighting protein conformation on individual hydrated live cells is a task even more challenging. The exploitation of microfabrication techniques to produce visible-infrared (Vis-IR) transparent microfluidic devices has provided only in recent times the technological breakthrough for overcoming the constraints encountered in monitoring live cells by FT-IR microspectroscopy. (Mitri, E.; Birarda, G.; Vaccari, L.; Kenig, S.; Tormen, M.; Greci, G. *Lab Chip* 2013, 14, 210–218. Birarda, G.; Greci, G.; Businaro, L.; Marmiroli, B.; Pacor, S.; Piccirilli, F.; Vaccari, L. *Vib. Spectrosc.* 2010, 53, 6–11. Holman, H.-Y. N.; Bechtel, H. A.; Hao, Z.; Martin, M. C. *Anal. Chem.* 2010, 82, 8757–8765.) Interesting data on the correlation between the level of dry mass accumulation and derivation in the IR spectra, for example, indicators of accumulation of carbohydrates and proteins was shown, and it is logical conclusion. According to the authors FTIR microspectroscopy may be use as a new tool to examine the biochemical changes within the plant tissue, and I agree with them but I have some remarks.

Remarks

On the basis of the data obtained it is not clear what biochemical alterations firstly should be under consideration of researcher after reception of IR maps..

What indicators introduced by bacteria, are priority? It must be defined if the authors says in introduction the phrase "Combining FTIR microspectroscopy with multivariate data analysis can enable phenotype characterization, by defining "spectral fingerprint" that can be related to the identification of biological strains and species".

Answer: We were added our work related references and Table1 into the revised manuscript.

Introduction

page 3 line 45

Therefore, we proposed the FTIR microspectroscopy technique, which has the ability to resolve biochemical changes at the single cell level (Yu et al. 2003; Skotti et al. 2014), to study micro-structural changes in cassava plant.

You can give a more modern references: Vongsvivut J, Heraud P, Gupta A, Thyagarajan T, Puri M, McNaughton D, Barrow CJ Synchrotron-FTIR Microspectroscopy Enables the Distinction of Lipid Accumulation in Thraustochytrid Strains Through Analysis of Individual Live Cells // *Protist.* 2015 Feb;166(1):106-21. doi: 10.1016/j.protis.2014.12.002. Mitri E, Kenig S, Coceano G, Bedolla DE, Tormen M, Greci G, Vaccari L. Time-Resolved FT-IR Microspectroscopy of Protein Aggregation Induced by Heat-Shock in Live Cells. // *Anal Chem.* 2015 Apr 7;87(7):3670-7. doi: 10.1021/ac5040659.

page 4, line 10

...IR spectra from plant tissue have absorbance bands uniquely assigned to higher plant components, such as lignin (ring vibration around 1515 and 1595 cm⁻¹) or cell wall pectin (stretching vibration from carboxylated group at 1420 cm⁻¹)

The authors must explain the discrepancy between their data and literature data, such as follow:

Plant tissues are characterized by a major absorption peak at 1,510 cm⁻¹, indicating the presence of high amounts of lignin. (These peaks are characterized by non-specific functional groups of lignin) The peaks at 1,428, 1,373, and 1,247 cm⁻¹ characterize of nonspecific lignin functional groups (Faix O (1991) Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. *Holzforschung* 45: 21–27), 1,000 to 1,200 cm⁻¹ range characteristic of both cellulose and hemicelluloses (Marechal Y, Chanzy H (2000) The hydrogen bond network in lbeta cellulose as observed by infrared spectrometry. *J Mol Struct* 523: 183–196).

The peak at approximately 1,737 cm⁻¹ in stem tissues is probably associated with pectin- or xylan-associated ester functions (Kacurakova M, Capek P, Sasinkova V, Wellner N, Ebringerova A (2000) FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr Polym* 43: 195–203).

Material and methods

Page 7, line 7

Hierarchical Cluster Analysis (HCA) using D-values with Ward's algorithm was carried out over the spectral ranges of 1800-900 cm⁻¹ and 3050-2800 cm⁻¹, which contained most of the biological bands in the IR spectrum. However, in the caption to Figure 3 and 4 is written: 2D UHCA map performed using five clusters on the range of

1800-900 cm⁻¹.

The results of spectral ranges of 3050-2800 cm⁻¹ is not listed. Wherefore?

Answer The samples were prepared by using paraffin embedding, then the sections were following alcohol dehydration deparaffinized in xylenes and then dried overnight under vacuum. So, the spectral changes between 3050-2800 cm⁻¹ as a results of CH Stretching bands mainly from lipid were decided not to used for data analysis. The sentence were rewritten as shown below

Hierarchical Cluster Analysis (HCA) using D-values with Ward's algorithm was carried out over the spectral ranges of 1800-900 cm⁻¹, which contained most of the biological bands in the IR spectrum.

Results and discussion.

Page 9. Line 3

The spectral region of organic substances are given not exactly: Unsupervised hierarchical cluster analysis (UHCA) was used to compare differences and similarities between tissue spectra involving spectral regions with information about protein (1700-1580 cm⁻¹), lipid or lignin (1770-1700 cm⁻¹), and polysaccharides (1200-900 cm⁻¹). The authors should clarify the combine consideration of lipid and lignin. From the above phrase it is difficult to understand that the source of these data (author or literature or computer database). If it's published data, is necessary to specify.

It's necessary to pay attention to the follow reference:

The area integral of the following bands were considered: spectral region 3000-2800 cm⁻¹, representative of cellular lipids (Lipids); spectral region 1705-1480 cm⁻¹, representative of cellular proteins (Proteins); spectral region 1590-1480 cm⁻¹, Amide II (AmII); spectral region 1270-1185 cm⁻¹, asymmetric stretching of phosphate moieties (PhI); spectral region 1150-1005 cm⁻¹, symmetric stretching of phosphate moieties (PhII). (Birarda, G.; Bedolla, D. E.; Mitri, E.; Pacor, S.; Grenzi, G.; Vaccari, L. Analyst 2014, 139, 3097-3106.)

Answer We added a new table for the band assignment table of the main IR spectra in the revised manuscript.

Page 9, line 7:

lipid or lignin (1770-1700 cm⁻¹), and for comparison page 4 line 11: such as lignin (ring vibration around 1515 and 1595 cm⁻¹).

The specters' of lipids and lignin's do not coincide in comparison with results from the reference.

Answer This sentence will edited to IR spectra from plant tissue have absorbance bands uniquely assigned to higher plant components, such as lignin (ring vibration around 1515 cm⁻¹) or C=O ester from lipid or lignin or pectin (around 1730 cm⁻¹) (Kenneth & Lawrence 2005; Dokken & Davis 2007; McCann, M.C., 2005, Colthup et.al. 1964).

It has been rewritten in the new the revised version. .

Page 10 line 21-39.

Description of the differences in the spectra of organic substances between the epidermis and mesophyll in control and treated with bacteria plants (Figure 5), is incomplete, inadequate. It is necessary to describe in detail the differences found in the epidermis in areas

Answer The characteristic band from IR spectra of the main biopolymers of the cell wall depends on the crystallinity and conformation of the polysaccharide; fingerprint region. It contains several of polymers of different types such as proteins, aromatics, polysaccharides, having a particular molecular conformation and interacting with neighboring molecules in a specific way. (Séné et.al. 1994; Wang et al. 2012) The differences in the spectra of biochemical changes between the epidermis and mesophyll in control and treated with bacteria plants with the significant shift: 1550-1600 cm⁻¹., 1350-1450 cm⁻¹, less than 1000 cm⁻¹, which can be associated with a change in the construction of the cell wall and formation of the plant cell wall. It is known that bacteria affect the structure of plant cell walls. In some cases the bands in a particular spectral region cannot be assigned to a specific functional group, but they are characteristic of the molecule as a whole and constitute a fingerprint for the molecule. (Sene et al.1994; McCann et al. 1992).

Page 12, line 43-52

The results of an increased level of rhamnogalacturonan or beta-glucan (callose), should be reinforced the measurements of these substances by other methods. For example, callose staining by p-Rosolic acid (Sigma). It is strange that in the IR maps of experimental plants didn't demonstrate new peaks responsible for new substances, which formed under the bacterial influence. It is not clear, what marker-changes took place under the influence of seed treatment with bacteria. So, it isn't clear what changes can be used as an indicator. It is necessary to examine IR spectra of the cell walls enzymes situated in epidermis and RUBISCO in mesophyll if these enzymes were considered as a markers. The effect of bacteria on these plant enzymes which should be more fully describe with literature data.

The article has interesting material but their interpretation requires some revisions. The article should be reviewed by the expert on the field of FTIR microspectroscopy methods, if it is possible. The article may be publicity with some revisions and can increase the journal rate.

Answer The cell wall of plant cells are complex composites of cellulose, cross-linking glucans, protein and pectin substances. The specific functional groups of these molecules have been difficult to ascribe. There is some literature reviews studied on plant cell wall modifications. For example, the chemical characterization of cell walls

ascribed with habituation to cellulose biosynthesis inhibitors and related to other stress condition (Alonso-Simon, A. et.al. 2004). This technique can be applied to analyze stems of wheat cultivars via the spectral fingerprinting of cell walls and to identify chemical differences between different lodging resistance samples. (Wang et.al. 2012) From our results, we found that the absorbance intensities at different frequency from control and treated groups can be related to the concentrations of different molecules such as cellulose, protein, pectin and lignin. So, in the future, it might be useful to study cell wall modifications in order to study in more details of biochemical changes under the influence of cassava stakes treatment with bacteria. (Kenneth & Lawrence 2005; Kacuráková et al. 2000; Wilson et al. 2000) Especially, the mid infrared region at $1200\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ can be useful for identification of polysaccharide with different structure and composition from leaf cell walls. Investigation of cell wall composition can be further more studied by to identify particular polysaccharide compared with model compounds representing individual polysaccharide types and their mixture based on major sugar components. (McCann et al.1992; Wilson et al. 2000).