

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553-2554 และดำเนินการภายใต้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ทดลอง และเครื่องมือวิเคราะห์โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) สำหรับการสนับสนุนการใช้รังสีแกมมาในงานวิจัย รวมทั้งกรมวิทยาศาสตร์สำหรับการสนับสนุนวัสดุพาหะในงานวิจัย และผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เป็นปัจจัยจำกัดต่อการเจริญของถั่วเหลือง ซึ่งส่งผลต่อเชื้อไรโซเบียมที่เข้าสร้างปมด้วยเช่นกัน โดยประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของหัวเชื้อ ขึ้นอยู่กับลักษณะแวดล้อมที่พืชเจริญอยู่ เชื้อไรโซเบียมที่ทนต่อสภาวะเครียด จะส่งผลต่อของถั่วเหลืองให้การเจริญเป็นปกติได้ ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาผลกระทบของสภาวะเครียดแบบต่างๆ ต่อการเจริญและการอยู่รอดของเซลล์ไรโซเบียมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมถึงพิจารณาผลการตรึงไนโตรเจน เพื่อส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเหลืองที่ปลูกในทราย และในดิน ซึ่งจากเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท นำมาทดสอบพบว่า มี 5 ไอโซเลท ที่เจริญได้ดีบนอาหารที่ใช้คัดเลือก โดยเมื่อทดสอบกับถั่วเหลืองที่ปลูกในสภาวะเครียดในทราย และในดิน พบว่าเชื้อไอโซเลท 194 ให้ผลในการตรึงไนโตรเจนและน้ำหนักแห้งของถั่วสูงสุดในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อไอโซเลท 194 ยังมีความสามารถในการแข่งขันเพื่อเข้าสร้างปมกับถั่วเหลือง ได้ดีกว่าเชื้อ USDA110 การทดลองที่ช่วยให้เชื้อไรโซเบียมทนต่อสภาวะเครียด โดยการเสริม compatible solute พบว่าน้ำตาลซูโครส ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ช่วยให้เชื้ออยู่รอด และเจริญได้ดีกว่าการเติมสารชนิดอื่น โดยเชื้อไอโซเลท 194 ที่เสริมซูโครส มีการเจริญในสภาวะแห้งแล้งหลังวันที่ 5 และเจริญในสภาวะกรดหลังวันที่ 3 มีการสะสมทรีฮาโรส และกลีเซอรอลอยู่ภายในเซลล์ ส่วนการเจริญของเชื้อในสภาวะเครียดแบบอุณหภูมิสูง ที่เสริมและไม่เสริมซูโครสพบว่า มีการสะสมกลีเซอรอลภายในเซลล์ตลอดช่วงของการเจริญ แต่หลังจากวันที่ 10 ของการเจริญที่ไม่ได้เสริมน้ำตาลนั้นไม่พบการสะสมกลีเซอรอลอีก ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญที่ลดลงของเชื้อ จากการศึกษาทำให้ทราบว่า เชื้อไรโซเบียมที่สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะเครียด จะช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเหลือง อีกทั้งการเสริมซูโครส สามารถช่วยให้เชื้อไรโซเบียมอยู่รอดได้ในสภาวะเครียด โดยการสะสมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ภายในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลกลีเซอรอล และน้ำตาลทรีฮาโรส ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันเซลล์เมื่อเผชิญกับสภาวะเครียดต่าง ๆ

Abstract

Several adverse environmental conditions are the limiting factors for soybean growth and symbiosis capability of rhizobia. The process of N₂-fixation by symbiont is strongly related to physiological state development of the host plant. *Bradyrhizobium* spp. that can tolerate to environmental stress would increase soybean growth under stress conditions. This study examined the effect of single and mixed stress conditions on the growth and survival of *Bradyrhizobium* spp. in culture media, and the effect on symbiosis with soybean plant grew in the sand and soil conditions. Twenty isolates of bradyrhizobia were isolated from nodules of soybean grew in fields, and five isolates were selected according to their tolerant ability under stress conditions *in vitro* experiments. The efficiency of stress tolerant bradyrhizobia on soybean growth was investigated under various stress conditions. *Bradyrhizobium* sp. isolate 188 and 194 could promote high level of nitrogenase activity and plant biomass when plants were grown in sand and soil under stress conditions. *Bradyrhizobium* sp. isolate 194 also has higher nodulation competition ability than *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 under stress conditions. Moreover, supplementation with compatible solute was used to improve the symbiosis efficiency of bradyrhizobial inoculant under stress conditions. The isolate 194 was supplemented with sucrose showing highest percent survival of bacteria when cultured in medium under various stress conditions. The appropriate concentration of 300 mM sucrose could promote the cell growth under stress conditions. It was found that the bacterial cells in sucrose supplemented medium were able to accumulated trehalose and glycerol after 5 days grow under drought condition. Trehalose and glycerol were also found to be accumulated in cell after 3 days grow under acid condition. The accumulation of glycerol was found in every bacterial growth periods under high temperature with and without sucrose supplementation, but it was not found in non-sucrose supplemented bacterial cell cultured after 10 days, This was related to the decreasing of cell survival. Results of this study suggested that the inoculation of stress tolerant bradyrhizobia could enhance the symbiosis efficiency and soybean growth under stress conditions and the sucrose supplementation in medium could improve their survival by accumulating several sugars, especially glycerol and trehalose inside the cell when encounter to the various stress.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง ...	จ
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	
- ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
- ขอบเขตของการวิจัย	3
- ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
- การทดสอบเชื้อแบคทีเรียโรโซเปียมที่ทนต่อสภาวะเครียด.	4
- ขั้นตอนการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียโรโซเปียมที่คัดเลือกได้ ในการเข้าสร้างปม และตรึงไนโตรเจนให้กับถั่วเหลืองภายใต้สภาวะเครียด.	4
- การวัดประสิทธิภาพการแข่งขันเพื่อเข้าสร้างปมของเชื้อที่คัดเลือกกับเชื้อทางการค้า.	5
- คัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของ Compatible solute ที่ช่วยให้เซลล์แบคทีเรียอยู่รอด และเจริญได้ในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ	6
- การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลภายในเซลล์แบคทีเรียโรโซเปียม เมื่อเลี้ยงและเสริม Compatible solute ในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ โดยใช้ HPLC ในการวิเคราะห์	
- วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	6
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
- เชื้อแบคทีเรียโรโซเปียมที่ทนต่อสภาวะเครียด	7
- ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียโรโซเปียมในการตรึงไนโตรเจน และส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเหลืองโดยปลูกในทรายภายใต้สภาวะเครียดแบบต่างๆ	8
- ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียโรโซเปียมในการตรึงไนโตรเจน และส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเหลืองโดยปลูกในดินภายใต้สภาวะเครียดแบบต่างๆ	11

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
- การทดสอบประสิทธิภาพการแข่งขันเพื่อเข้าสร้างปมกับรากถั่วเหลืองระหว่างเชื้อไอโซเลท 194 และเชื้อมาตรฐาน USDA 110	13
- การเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโรโซเปียมที่คัดเลือก ในสภาวะเครียด	14

โดยการเสริม Compatible solute	
- ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียโพรเบียมไอโซเลท 194 โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC.	16
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	
- สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	19
ภาคผนวก	
ประวัติผู้วิจัย	I

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 ผลการทดสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโรโซเปียม ภายใต้สภาวะเครียดแบบต่างๆ	7
ตารางที่ 3.2 ก. ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียโรโซเปียมที่คัดเลือกกับถั่วเหลืองโดยการปลูกในทรายภายใต้สภาวะเครียดแบบต่างๆ	9
ตารางที่ 3.2 ข. ค่า Stress tolerance index (STI) ของน้ำหนักแห้งถั่วเหลืองที่ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียโรโซเปียม ในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ ที่ปลูกในทราย	11
ตารางที่ 3.3 ก. ผลค่าวิเคราะห์ตัวอย่างดินที่ใช้ในการทดสอบ	11
ตารางที่ 3.3 ข. ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียโรโซเปียมที่คัดเลือกกับถั่วเหลืองโดยการปลูกในดิน ภายใต้สภาวะเครียดแบบต่าง ๆ	12
ตารางที่ 3.3 ค. ค่า Stress tolerance index (STI) ของน้ำหนักแห้งถั่วเหลืองที่ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียโรโซเปียม ในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ ที่ปลูกในดิน	13

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะแบนของดีเอ็นเอบนแผ่นเจลอะกาโรส ที่ได้จากการทำ Box-PCR (ซ้าย) และแผนภาพแสดงการจัดจำแนกเชื้อด้วยวิธี Neighbor Joining method (ขวา)	8
รูปที่ 3.2 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเข้าสร้างปมของเชื้อผสมระหว่าง เชื้อไอโซเลท 194 และ USDA 110 ภายใต้สภาวะที่ใช้ปลูกถั่วเหลืองแบบต่าง ๆ	14
รูปที่ 3.3 แสดงผลของอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate (μ)) ที่มีการเสริมและไม่เสริม compatible solute ทั้ง 6 ชนิด ภายใต้สภาวะเครียดแบบต่างๆ ระหว่าง เชื้อไอโซเลท 194 และ USDA 110 โดยเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ได้เสริม	15
รูปที่ 3.4 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลภายในเซลล์ของเชื้อ แบคทีเรียไรโซเบียมไอโซเลท 194 ที่เจริญในสภาวะเครียดแบบต่างๆ โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	18
