246354
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246354

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

เรื่อง

การใช้ RFLPs ของชิ้นส่วนบริเวณ *nodD1* และ *nodA* ของไรโซเบียมถั่วเหลือง ระบุศักยภาพการตรึงไนโตรเจน

Use of *nodD1– nodA* RFLP patterns of soybean rhizobia to predict nitrogen– fixing potential

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา ชาญสง่าเวช
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

b00250879

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246354

รายงานการวิจัยที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

เรื่อง

การใช้ RFLPs ของชิ้นส่วนบริเวณ *nodD1* และ *nodA* ของไรโซเบียมถั่วเหลือง ระบุศักยภาพการตรึงไนโตรเจน

Use of *nodD1– nodA* RFLP patterns of soybean rhizobia to predict nitrogen– fixing potential

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา ชาญสง่าเวช
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 และขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย ได้แก่ Mr. Ly Kim Pheng และนางสาวณิชานันท์ กาบเกษร

รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา ชาญสง่าเวช
ผู้วิจัย

ชื่อโครงงาน (ภาษาไทย) การใช้ RFLPs ของชิ้นส่วนบริเวณ *nodD1* และ *nodA* ของไรโซเบียมถั่วเหลือง ระบุศักยภาพการตรึงไนโตรเจน

(ภาษาอังกฤษ) Use of *nodD1 – nodA* RFLP patterns of soybean rhizobia to predict nitrogen-fixing potential

ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

ระยะเวลา 1 ปี **ตั้งแต่** 1 ตุลาคม 2550 **ถึง** 30 กันยายน 2551

ผู้ดำเนินงาน รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา ชาญสง่าเวช ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 02-218-5077

246354

บทคัดย่อ

ภาษาไทย ถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจที่ใช้เป็นอาหารและแปรเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำนมถั่วเหลือง เต้าหู้ เต้าเจี้ยว และซีอิ๊ว นอกจากนี้ เกษตรกรบางรายปลูกถั่วเหลืองเป็นพืชหมุนเวียน เพราะที่ปมรากถั่วเหลืองมีแบคทีเรียไรโซเบียม ช่วยเปลี่ยนไนโตรเจนจากอากาศให้เป็นแอมโมเนียให้ถั่วเหลืองใช้ในการเจริญ เป็นการลดการใช้ปุ๋ยเคมีเช่น ยูเรีย เกษตรกรในประเทศที่เป็นผู้นำด้านการส่งออกถั่วเหลือง เช่นสหรัฐอเมริกา จึงปลูกถั่วเหลืองเป็นพืชหมุนเวียน สลับกับพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น เช่น ข้าวโพด เป็นการบำรุงดินอย่างยั่งยืน ปัจจุบันพื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองในประเทศไทยลดลงเหลือประมาณ 831,000 ไร่ (1 ไร่ เท่ากับ 1,600 ตารางเมตร) เพราะราคาขายเฉลี่ยของถั่วเหลืองต่ำ (12 บาทต่อกิโลกรัม) ทำให้ไม่คุ้มทุนแก่เกษตรกรในการปลูกถั่วเหลืองเป็นพืชหมุนเวียน เกษตรกรไทยจึงใช้ปุ๋ยเคมีในการปลูกพืชชนิดอื่นที่ทำรายได้ให้เกษตรกรสูงกว่าถั่วเหลือง เช่น ข้าว ข้าวโพด อ้อย ยางพารา ปาล์ม และมันสำปะหลัง ซึ่งการใช้ปุ๋ยเคมีปริมาณมากและใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน ทำให้ดินขาดความอุดมสมบูรณ์ เนื่องจากการใช้ปุ๋ยเคมีไม่ใช่การบำรุงดิน แต่เป็นการอัดธาตุอาหารให้พืช โดยไม่มีการเติมอินทรียวัตถุเพิ่มลงในดิน และการใช้ปุ๋ยเคมียังเร่งอัตราการสลายตัวของอินทรียวัตถุในดิน ทำให้โครงสร้างของดินเสื่อมลง ดินจึงอัดตัวแน่น ไม่อุ้มน้ำในฤดูแล้ง วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 58 สายพันธุ์กับ RFLPs ซึ่งในงานวิจัยนี้หมายถึงรูปแบบการเรียงตัวบนอกาโรสเจลของแถบดีเอ็นเอของชิ้นส่วนระหว่างยีน *nodD1* และยีน *nodA* หลังจากตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *sphI* ซึ่งถ้าตรวจพบความสัมพันธ์ดังกล่าว จะสามารถใช้รูปแบบการเรียงตัวหรือ RFLPs ดังกล่าวในการทำนายศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็วที่แยกจากอำเภอชาติตระการ อำเภอพรหมพิราม และอำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 8 สายพันธุ์ที่แยกได้พร้อมกับการแยกไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า และเติมลงในโหลเลี้ยวนาร์ดที่เลี้ยงถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์จำนวน 7 พันธุ์ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์ไม่สร้างปมที่รากถั่วเหลือง แบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็วทั้ง 8 สายพันธุ์จึงไม่ใช่ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว ผลการหา RFLPs ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 58 สาย

246354

พันธุ์ พบว่าไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 45 สายพันธุ์ มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *nodD1* และยีน *nodA* ซึ่งแยกโดยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ *nodY*f (5'TGTACGCGGGTAAACC3') และ *nodY*r (5'AGCGCAACGAGAAGAT3') เป็นไพร์เมอร์ขนาด 395 คู่เบส และไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 13 สายพันธุ์ มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวขนาด 350 คู่เบส ทั้งนี้เมื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากอกาโรสเจลและทำให้ดีเอ็นเอปราศจากสิ่งปนเปื้อนโดยใช้ชุดสำเร็จรูป Nucleospin®และตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *sphI* ผลการทดลองพบรูปแบบ RFLPs จำนวน 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบ A ประกอบด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 395 คู่เบส รูปแบบ B ประกอบด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 350 คู่เบส และรูปแบบ C ประกอบด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 120 และ 275 คู่เบส โดยไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 30, 12, และ 16 สายพันธุ์มี RFLPs รูปแบบ A, B และ C ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าที่มี RFLPs รูปแบบ A , B และ C มีแนวโน้มที่มีจำนวนปมทั้งหมดที่รากในระดับน้อย (1-10 ปมต่อต้น) ถึงระดับปานกลาง (11-20 ปมต่อต้น) ผลการทดลองไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบ RFLPs กับศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า ซึ่งหาโดยการใช้น้ำหนักแห้งของลำต้น ในปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่ของดีเอ็นเอซึ่งอยู่ระหว่าง *nodD1* และ *nodA* ซึ่งได้แก่ *nodY* ในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า ดังนั้นผลการทดลองที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบ RFLPs ของ *nodY* กับศักยภาพการเข้าสร้างปมและศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า อาจชี้ให้เห็นว่า *nodY* อาจไม่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเข้าสร้างปมและกระบวนการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า

Abstract

Soybean is an economic plant which is used as food and feed and is modified into soybean oil, soybean milk, tofo, soybean paste, and soy sauce. In addition, some farmers grow soybean as a rotational crop because there are bacteria rhizobium in soybean root nodules which change nitrogen from the atmosphere into ammonia for soybean's use for growth to reduce the extent of uses of chemical fertilizers such as urea. Farmers in countries which are leading soybean exporters grow soybean in rotation with other economic plants such as corn for sustainable soil maintenance. At present, soybean cultivation areas in Thailand have been reduced to about 831,000 *rais* (1 *rai* equals 1,600 sq.m.) because the average sale price for soybean is 12 baht per kilogram. Therefore, Thai farmers tend to use chemical fertilizers to grow plants with higher return for investments, such as rice, corn, sugarcane, rubber plants, palm, and cassava. Continuous usages of large quantities of chemical fertilizers for a long time lead to soil infertility. The practice does not lead to soil fertility since it only adds plant mineral nutrients to soils. Moreover, chemical fertilizer usages lead to an

increase in degradation of soil organic matters which leads to deterioration of soil structure resulting in compactness of soil with less water holding capacity during dry periods. The aim of these experiments is to find correlation(s) between nitrogen-fixing potential of 58 strains of slow-growing soybean rhizobia and RFLP patterns of DNA region between *nodD1* and *nodA* genes after cutting with the restriction enzyme *sphI*. If a correlation is found, the RFLP patterns might be used to predict nitrogen-fixing potential of slow-growing soybean rhizobia. Authentication tests of 8 fast-growing bacteria isolated at the same time as the isolation of the slow-growing soybean rhizobia indicated that the strains did not nodulate the 7 cultivars of soybeans used in the authentication tests in Leonard jars. Therefore, they were not fast-growing soybean rhizobia. Amplification of DNA fragments between *nodD1* and *nodA* genes by PCR using *nodY*f (5'TGTACGCGGGTAAACC3') and *nodY*r (5'AGCGCAACGAGAAGAT3') as the primers showed a 395-bp DNA fragment for 45 slow-growing soybean strains and a 350-bp fragment for the remaining 13 strains. DNA fragments from agarose gels putified by Nucleospin® kit, restricted with *sphI*, and separated by agarose gel electrophoresis revealed 3 RFLP patterns or RFLPs. The first RFLP pattern A consisted of a 395 bp fragment, the second RFLP pattern B consisted of a 350 bp fragment, while the third RFLP pattern C consisted of 120 bp and 275 bp fragments. The number of slow-growing soybean rhizobia belonging to RFLP patterns A, B, and C were 30, 12, and 16 strains, respectively. The soybean rhizobium strains with RFLP patterns A, B, and C tended to yield an average total number of root nodules in the low (1-10 nodules per plant) to medium ranges (11-20 nodules per plant). No correlation was found between RFLP patterns and nitrogen fixing potential in the form of plant dry weight. At present, the function of the region between *nodD1* and *nodA* which constitutes *nodY* in slow-growing soybean rhizobia is unknown. Based on the no correlations between RFLPs of *nodY* and levels of nodulation and nitrogen fixation potential obtained from this research, *nodY* may not have an essential role in nodulation and nitrogen fixation processes.

สารบัญเรื่อง

		หน้า
1.	คำนำ	10
2.	วัตถุประสงค์	27
3.	วิธีการวิจัย	28
4.	ผลการวิจัย	31
5.	วิจารณ์และสรุปผล	44
	เอกสารอ้างอิง	46
	ภาคผนวก ก	52

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ปริมาณการนำเข้าถั่วเหลืองและปริมาณการผลิตถั่วเหลืองในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2550-2553	11
ตารางที่ 2	ผลผลิตเฉลี่ยและราคาขายเฉลี่ยต่อไร่ของพืชเศรษฐกิจชนิดต่างๆในปี พ.ศ. 2553/2554	11
ตารางที่ 3	พื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองในฤดูฝนและฤดูแล้งในประเทศไทย รวมทั้งผลผลิตเฉลี่ย	11
ตารางที่ 4	ความแตกต่างระหว่างไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วและประเภทเพิ่มจำนวนช้า	20
ตารางที่ 5	โครงสร้างทางเคมีของ Nod factors	24
ตารางที่ 6	สมบัติของไพร์เมอร์ *nodY*F และ *nodY*R	28
ตารางที่ 7	น้ำหนักแห้งของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดโดยเติมไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆ	42

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	ส่วนประกอบของโหลเลียวนาร์ด	16
รูปที่ 2	โหลเลียวนาร์ดที่ใช้ปลูกเมล็ดถั่วเหลืองในโรงปลูกพืชทดลอง	16
รูปที่ 3	การหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไรโซเบียมถั่วเหลืองโดยวิธี RAPD-PCR	17
รูปที่ 4	กลไกการสร้างปมในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า	22
รูปที่ 5	โครงสร้าง C_6-C_3-C_6	22
รูปที่ 6	สูตรโครงสร้างทางเคมีของเฟลโวนอยด์บางชนิดที่ขับออกจากรากถั่วเหลือง	23
รูปที่ 7	การสังเคราะห์ Nod factor	24
รูปที่ 8	ไดอะแกรมแสดงโพรโมเตอร์ของ *nodD1*	25
รูปที่ 9	แผนที่แสดงยีนที่เกี่ยวข้องกับการเข้าสร้างปมของไรโซเบียมถั่วเหลือง	26
รูปที่ 10	รากของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดที่เติมแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็วที่แยกจากปมรากถั่วเหลือง	31
รูปที่ 11	ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าทำให้เกิดปมที่รากถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60	32
รูปที่ 12	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หาโดยวิธี RAPD-PCR ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าสายพันธุ์ D509 และของแบคทีเรียไอโซเลต 509-1 ถึง 509-8	35
รูปที่ 13	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วน *nodY* โดยใช้ดีเอ็นเอจากไรโซเบียมประเภทเพิ่มจำนวนช้าสายพันธุ์ D121, D176, D221 และ D263	35
รูปที่ 14	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nodY* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า สายพันธุ์ D121 แสดงตำแหน่ง restriction site ของ *SphI* จำนวน 1 ตำแหน่ง	36
รูปที่ 15	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nodY* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า สายพันธุ์ D176 แสดงตำแหน่ง restriction site ของ *SphI* จำนวน 1 ตำแหน่ง	37
รูปที่ 16	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nodY* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า สายพันธุ์ D221 ไม่พบ restriction site ของ *SphI*	38
รูปที่ 17	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nodY* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า สายพันธุ์ D263 ไม่พบ restriction site ของ *SphI*	39

รูปที่ 18 ผลการหา RFLPs ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า จำนวน 58 สายพันธุ์ 40
รูปที่ 19 ตัวอย่างไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าที่มี RFLPs แบบ A B และ C 45