SUT3-304-55-12-39

รายงานการวิจัย

การตรวจสอบกลไกของเชื้อไรโซเบียมที่ใช้ส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วม
(Investigation of rhizobial mechanisms associated with enhancing peanut growth under flooding condition)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

SUT3-304-55-12-39

รายงานการวิจัย

การตรวจสอบกลไกของเชื้อไรโซเบียมที่ใช้ส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วม (Investigation of rhizobial mechanisms associated with enhancing peanut growth under flooding condition)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรรณลดา ติตตะบุตร

ดร. รุจิเรข น้อยเสงี่ยม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กุมภาพันธ์ 2559

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสภาวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2555 และดำเนินการภายใต้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ทดลอง เครื่องมือวิเคราะห์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการปุ๋ยชีวภาพ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

สภาวะน้ำท่วมเป็นปัญหาหนึ่งที่อาจเกิดขึ้นแบบเฉียบพลันจากสภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงที่ไม่สามารถคาดการณ์ได้ งานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่ส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง รวมทั้งเพื่อตรวจสอบกลไกที่เชื้อไรโซเบียมใช้ในการส่งเสริมการเจริญ และความสามารถที่ทำให้พืชทนต่อความเครียดภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังได้ ทั้งนี้ในงานวิจัยได้ดำเนินการทดสอบเชื้อไรโซเบียมหลายสายพันธุ์ในกลุ่ม *Bradyrhizobium* ที่สามารถเข้าสร้างปมกับถั่วลิสงได้ทั้งสภาวะปกติและสภาวะน้ำท่วมขัง โดยผลการทดลองพบว่าเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 สามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงได้มากที่สุด รองลงมาคือ เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 โดยเมื่อตรวจสอบพบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้มีความใกล้เคียงกับเชื้อในกลุ่ม *B. yuanmingense* และถึงแม้เชื้อ SUTN8-1 และ SUTN9-2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสอยู่ในระดับปานกลางเมื่อเทียบกับหัวเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วลิสงทางการค้า (*Bradyrhizobium* sp. TAL173) แต่พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ทำให้มีการปลดปล่อย ethylene จากพืชในสภาวะเครียดน้อยลง ซึ่งเป็นผลจากกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ที่เป็นกลไกสำคัญในการส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง ทั้งนี้ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์นี้ในหัวเชื้อไรโซเบียมการค้า สายพันธุ์ TAL173 ซึ่งอาจส่งผลให้การเจริญของถั่วโดยรวมน้อยกว่าการใช้เชื้อสายพันธุ์ SUTN8-1 หรือ SUTN9-2 กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง จากนั้นเพื่อให้ทราบบทบาทของเอนไซม์ ACC deaminase ในการตอบสนองต่อความเครียดของพืชภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง จึงได้ดำเนินการถ่ายทอดยีน *acdRS* ซึ่งเป็นยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ ACC deaminase จากเชื้อ *Sinorhizobium* sp. BL3 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์สูง เข้าไปในเชื้อสายพันธุ์ SUTN8-1 และ SUTN9-2 แต่อย่างไรก็ตามในระยะเวลาดำเนินงานวิจัยไม่ประสบความสำเร็จในการถ่ายทอดยีนนี้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัญหาของพลาสมิด pRK404 ไม่เสถียรในเชื้อ *Bradyrhizobium* ที่ใช้ทดสอบ ดังนั้นจึงไม่สามารถตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเมื่อมีการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ได้ อย่างไรก็ตามได้ทำการตรวจสอบบทบาทและกลไกของเอนไซม์นี้ในเชื้อสายพันธุ์ SUTN8-1 (wild-type) โดยผลการทดลองพบว่าเชื้อ SUTN8-1 สามารถตรึงไนโตรเจนและส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงในสภาวะน้ำท่วมขังได้ดีกว่าถั่วที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ โดยเมื่อตรวจสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่ตอบสนองในพืชภายใต้สภาวะเครียด พบว่าพืชที่ปลูกภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังมีแนวโน้มปริมาณคลอโรฟิลล์ A และ B รวมทั้งปริมาณ proline ลดลง ในขณะที่มีการเกิด lipid peroxidation และมีกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ แสดงให้เห็นว่าพืชมีความเครียดเพิ่มมากขึ้นเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง และเมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์เหล่านี้ในพืชที่มีการปลูกเชื้อ SUTN8-1 พบว่ามีแนวโน้มของการลดความเครียดในพืชได้มากขึ้น ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นในทางอ้อมว่าเชื้อไรโซเบียมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase มีบทบาทในการช่วยลดความเครียดของพืชและส่งเสริมให้ถั่วลิสงเจริญในสภาวะน้ำท่วมขังได้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถทำให้ประสิทธิภาพการเจริญดีขึ้นได้เทียบเท่ากับสภาวะปกติ

Abstract

Water logging is one of problems could be happened from unexpected climate change condition. This research focused on selection peanut bradyrhizobium that can support plant growth under water logging condition, and on investigation bradyrhizobial mechanisms associated with enhancing peanut growth and reduce stress response under water logging condition. Several peanut bradyrhizobia were selected based on nodulation ability with peanut under both normal and water logging condition, while *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 followed by strain SUTN9-2 was the two best strains promoting peanut growth under water logging condition. Both strains of SUTN8-1 and SUTN9-2 were identified to be similar as *B. yuanmingense*. Although these strains have moderate nitrogenase activity when compared with commercial peanut bradyrhizobial inoculant (*Bradyrhizobium* sp. TAL173), both strains could reduce ethylene evolved from plant under water logging condition. These results may be indicated the effect of ACC deaminase activity in strain SUTN8-1 and SUTN9-2 as an important mechanism to support peanut growth under stress condition since no ACC deaminase activity was found in the commercial strain TAL173 which may subsequently resulted in reduce plant growth under the same stress condition. To understand the role of ACC deaminase in response to stress from water logging condition, the *acdRS* genes encoded for a high activity of ACC deaminase enzyme from *Sinorhizobium* sp. BL3, were transferred into strain SUTN8-1 and SUTN9-2. However, it was not success in this step probably due to the un-stability of carrying plasmid pRK404 in these bradyrhizobia. Therefore, the role of higher ACC deaminase activity from strategy of increasing *acdRS* copy number on supporting plant growth under water logging condition could not be obtained. Nevertheless, the role and mechanisms of ACC deaminase in wild-type strain SUTN8-1 were examined under normal and water logging conditions. The result showed strain SUTN8-1 fixed nitrogen and promoted peanut growth better than that of non-inoculated plant under water logging condition. Analysis of chlorophyll content and other stress related enzymes responsive for water logging condition was done to investigate the role of ACC deaminase in which reduce stress response in plant. It was found that the content of chlorophyll A and B as well as proline tended to be reduced, while lipid peroxidation and peroxidase enzyme activity were increased in plant grew under water logging condition when compared with normal condition. These results confirmed that plant stress was increased under water logging condition. Interestingly, observation of stress related parameters in plant inoculated with SUTN8-1 showed the better trend of reducing plant stress than that of non-inoculation. This result indirectly demonstrates the role of ACC deaminase on reducing plant stress and support peanut growth under water

logging condition. However, the efficiency of plant growth promotion by SUTN8-1 was not as good as growing under normal condition.

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค

สารบัญเรื่อง..... ง

สารบัญภาพ..... จ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 1

1.3 ทฤษฎีสมมติฐาน..... 1

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย..... 2

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย..... 2

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย..... 3

2.1 การตรวจสอบเชื้อกลุ่มแบรดดี้ไรโซเบียมถั่วลิสงและการส่งเสริมการเจริญเบื้องต้นภายใต้สภาวะน้ำท่วม..... 3

2.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ของเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมที่ใช้ในการทดสอบ..... 3

2.3 การถ่ายทอดยีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase เข้าสู่เชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมตัวแทนเพื่อเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์..... 4

2.4 การตรวจสอบการตอบสนองของพืชต่อการใช้หัวเชื้อไรโซเบียมภายใต้สภาวะน้ำท่วม..... 4

2.5 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล..... 6

บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล..... 7

3.1 ผลการตรวจสอบเชื้อกลุ่มแบรดดี้ไรโซเบียมถั่วลิสงและการส่งเสริมการเจริญของพืชเบื้องต้นภายใต้สภาวะน้ำท่วม..... 7

3.2 การถ่ายทอดยีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase เข้าสู่เชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมตัวแทนเพื่อเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์..... 10

3.3 การตรวจสอบการตอบสนองของพืชต่อการใช้หัวเชื้อไรโซเบียมภายใต้สภาวะน้ำท่วม..... 11

บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 18

บรรณานุกรม..... 18

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของถั่วลิสงเมื่อปลูกด้วยเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมชนิดต่าง ๆ ภายสภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง..... 7
รูปที่ 2 น้ำหนักโดยรวมของถั่วลิสงเมื่อปลูกด้วยเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมชนิดต่าง ๆ ภายสภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง..... 8
รูปที่ 3 ปริมาณเอทธิลีนที่ปลดปล่อยจากถั่วลิสงเมื่อปลูกด้วยเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมชนิดต่าง ๆ ภาย สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง..... 9
รูปที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ของเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ..... 9
รูปที่ 5 พลาสมิด pRK404 ที่ต้องการนำยีน *acdRS* (ยีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase จาก *Sinorhizobium* sp. สายพันธุ์ BL3) เข้าแทรกในตำแหน่ง *Bam*HI..... 10
รูปที่ 6 ปริมาณคลอโรฟิลล์ A ในใบของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง..... 11
รูปที่ 7 ปริมาณคลอโรฟิลล์ B ในใบของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ระดับ ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง..... 12
รูปที่ 8 ปริมาณโพรลีน (proline) ในใบของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง..... 13
รูปที่ 9 การเกิด lipid peroxidation ในรากของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง..... 14
รูปที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ในใบของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง..... 15
รูปที่ 11 น้ำหนักต้นแห้งของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ระดับความ เข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง..... 15
รูปที่ 12 น้ำหนักรากแห้งของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ระดับความ เข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง..... 16
รูปที่ 13 จำนวนปมของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ระดับความเข้มข้น ต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง..... 16
รูปที่ 14 น้ำหนักปมแห้งของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ระดับความ เข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง..... 17
รูปที่ 15 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง..... 17

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ดังที่ได้ระบุไว้ในแผนการวิจัยถึงปัญหาของสภาวะอากาศที่เปลี่ยนแปลงส่งผลให้เกิดอุทกภัยเป็นระยะเวลายาวนานในพื้นที่การเกษตร ทำให้พืชที่เกษตรกรเพาะปลูกตายลง หรือสูญเสียผลผลิตเนื่องจากน้ำท่วมขังเป็นจำนวนมาก ทั้งนี้จากงานวิจัยได้เน้นไปที่การเพาะปลูกถั่วลิสง ซึ่งในเบื้องต้นได้พบเชื้อไรโซเบียม (*Bradyrhizobium* sp. SUT8-1) ที่สามารถส่งเสริมให้ถั่วลิสงเจริญได้ในสภาวะน้ำท่วมขัง และเบื้องต้นพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ซึ่งอาจเป็นกลไกที่ช่วยให้พืชสามารถเจริญในสภาวะเครียดได้ ดังนั้นจึงควรตรวจสอบกลไกของเชื้อไรโซเบียมชนิดนี้ รวมทั้งการตอบสนองของพืชต่อเชื้อไรโซเบียมที่สามารถส่งเสริมให้พืชเจริญในสภาวะน้ำท่วมขังเพื่อเป็นความรู้ในเชิงวิชาการในแง่ของเอนไซม์ ACC deaminase ที่มีบทบาทต่อการลดความเครียดในพืช ซึ่งอาจจะประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงหัวเชื้อไรโซเบียม หรือหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพอื่น ๆ ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) เพื่อให้ทราบสายพันธุ์และคุณสมบัติอื่น ๆ ของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUT8-1 ในการส่งเสริมการเจริญของพืช
2) เพื่อให้ทราบบทบาทของเอนไซม์ ACC deaminase ที่แสดงออกในเชื้อไรโซเบียมต่อการเจริญ และการตอบสนองของพืชต่อความเครียดภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง

1.3 ทฤษฎีสมมติฐาน

พืชตอบสนองต่อสภาวะน้ำท่วมโดยการลดการดูดซึมน้ำและแร่ธาตุ เพิ่มการปิดปากใบ และลดการสังเคราะห์แสง รวมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงสมดุลของฮอร์โมนต่าง ๆ ที่ลดการเจริญของรากและลำต้น และมีการหลุดร่วงของใบมากขึ้น (Vartapetian and Jackson 2007) อาการเหล่านี้เกิดขึ้นมาจากสภาวะขาดออกซิเจน (Hypoxia) ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ ethylene ในพืช ซึ่งพบว่าปริมาณออกซิเจนที่ลดลงนี้ส่งผลต่อการเกิด ACC oxidation เพื่อเปลี่ยน ACC ให้เป็น ethylene ในสภาวะน้ำท่วมขัง ทั้งนี้ได้มีการทดลองในมะเขือเทศที่ปลูกโดยให้ส่วนรากอยู่ในสภาวะไร้อากาศ (ในบรรยากาศของไนโตรเจน) พบว่าปริมาณ ethylene เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในต้นพืช (Jackson et al. 1978) นอกจากนี้ยังพบว่ารากที่อยู่ในสภาวะ Hypoxia จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC synthase (เอนไซม์ที่เปลี่ยน S-adenosyl methionine (SAM) ให้เป็น ACC) เพิ่มขึ้น ทำให้มีการสะสม ACC มากขึ้นในรากภายใน 5 ชม. และส่งผลให้ปริมาณ ethylene เพิ่มขึ้นในที่สุด (Drew

1997) นอกจากนี้ยังพบว่าในสภาวะน้ำท่วมขังรากพืชยังมีการปลดปล่อย ACC ออกมาสู่ดินโดยรอบรากพืช (Else et al. 1995) ทำให้แบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ที่อยู่รอบรากพืชสามารถนำ ACC ไปใช้ได้ และยังพบว่ายีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในสภาวะ anaerobic condition อีกด้วย (Grichko and Glick 2001) ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์นี้เป็นหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการลดปริมาณของ ethylene ในพืชที่ประสบกับสภาวะน้ำท่วมขัง ซึ่งได้ผลมาแล้วกับการใช้ใน Canola (Farwell et al. 2007) ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase อาจเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUT8-1 สามารถทำให้ถั่วลิสงเจริญได้ในสภาวะน้ำท่วมขัง โดยการลดปริมาณ ethylene นี้คาดว่าจะส่งผลต่อการตอบสนองของพืชที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับการไม่ใช้เชื้อไรโซเบียมในการปลูกพืช

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

ทำการตรวจสอบสายพันธุ์และคุณสมบัติอื่น ๆ ของเชื้อกลุ่ม *Bradyrhizobium* ในการส่งเสริมการเจริญของพืชภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง จากนั้นแผนเดิมต้องการถ่ายทอดพลาสมิดที่มียีน *acdRS* (ยีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase) จากเชื้อ *Sinorhizobium* sp. BL3 เข้าสู่ *Bradyrhizobium* ตัวแทนที่คัดเลือกได้ (*Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1) แล้วตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นเทียบกับเชื้อดั้งเดิม (wild-type) แต่อย่างไรก็ตามไม่ประสบผลสำเร็จในขั้นตอนการถ่ายทอดพลาสมิด ดังนั้นจึงนำเชื้อที่คัดเลือกได้ที่เป็น wild-type เป็นตัวแทนในการตรวจสอบการเจริญของพืช การตรึงไนโตรเจน และการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาอื่น ๆ ของพืชเพื่อยืนยันบทบาทของเอนไซม์ ACC deaminase ในการช่วยลดความเครียดในพืชภายใต้สภาวะน้ำท่วม

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ได้ข้อมูลซึ่งใช้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยที่สามารถใช้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการต่อไป เพื่อเผยแพร่ความรู้ความเข้าใจกลไกเกี่ยวกับการใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ ACC deaminase เป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อลดความเครียดในพืชภายใต้สภาวะน้ำท่วม

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การตรวจสอบเชื้อกลุ่มแบรดดี้ไรโซเบียมถั่วลิสงและการส่งเสริมการเจริญเบื้องต้นภายใต้สภาวะน้ำท่วม

2.1.1 เชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม

ทำการรวบรวมเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมชนิดต่าง ๆ ที่สามารถเข้าสร้างปมกับกับถั่วลิสง โดยเชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รับมาจาก สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร ม.เทคโนโลยีสุรนารี ประกอบไปด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. สายพันธุ์ S58, S23321, USDA110, BTAi 1, ORS278, ORS285, TAL173, DOA2, DOA4, DOA7, DOA9, SUTN1-4, SUTN1-7, SUTN1-8, SUTN2-1, SUTN4-3, SUTN5-1, SUTN7-1A, SUTN7-1B, SUTN7-2, SUTN8-1, SUTN9-2 โดยเลี้ยงในอาหาร Yeast Extract Mannitol ที่อุณหภูมิ 28°C จนกระทั่งเชื้อเจริญถึงระยะ late log phase

2.1.2 การทดสอบการส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงโดยเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง

ทำการเลี้ยงเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมในอาหารเหลว YEM จนกระทั่งเซลล์เข้าสู่ระยะ late log phase จากนั้นล้างเซลล์และละลายในสารละลาย 0.85% NaCl เพื่อปรับให้เชื้อมีจำนวนเซลล์ที่ระดับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยตรวจสอบนับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตในสารละลายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ hemocytometer จากนั้นนำไปทดสอบกับถั่วลิสงที่ปลูกใน Leonard's jar ที่บรรจุเวอร์มิคูไลท์ผสมทรายในอัตราส่วน 1:1 เป็นวัสดุปลูก ภายใต้สภาวะควบคุมการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยปลูกถั่วลิสงร่วมกับการปลูกเชื้อ (inoculation) แบรดดี้ไรโซเบียมที่ปริมาณเซลล์ 10^8 เซลล์ต่อเมล็ด เทียบกับถั่วลิสงที่ไม่ได้มีการปลูกเชื้อ (un-inoculated plant) จำนวน 5 ซ้ำ ในสภาวะปกติ และสภาวะที่มีน้ำท่วมขัง โดยจัดให้มีน้ำท่วมขังระดับโคนต้นเริ่มในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากการปลูกจนกระทั่งสัปดาห์ที่ 6 จากนั้นตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ปริมาณเอทธิลีนที่พืชปลดปล่อยโดยใช้ Gas Chromatography น้ำหนักต้นและรากโดยรวม เพื่อตรวจสอบผลการส่งเสริมการเจริญภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง (Somasegaran and Hoben, 1994)

2.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ของเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมที่ใช้ในการทดสอบ

ทำการเลี้ยงเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมในอาหาร YEM ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28°C, 200 rpm จนกระทั่งเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ early stationary phase จากนั้นล้างเซลล์จำนวน 2 รอบ ด้วยอาหาร minimal medium แล้วละลายเซลล์ที่ได้ในอาหารนี้ในปริมาตร 15 มิลลิลิตร โดยใส่ ACC ลงไปในอาหารให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในสภาวะเดิม เป็นระยะเวลา 40 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้เซลล์สร้างเอนไซม์ ACC deaminase จากนั้นเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน แล้วล้างเซลล์จำนวน 2 รอบ ด้วย 0.1 โมลลาร์ Tris–HCl (pH 7.5) จากนั้นละลายเซลล์ที่ได้ใน 1 มิลลิลิตร ของ 0.1 โมลลาร์ Tris–HCl (pH 8.5) จากนั้นทำการเติม 5% toluene (v/v) และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเทคนิค sonication (pulse 40 วินาที ที่ระดับความแรงสูงสุด แล้วหยุดเป็นเวลา 1 นาที ต่อเนื่องจำนวน 10 รอบ) โดยการทำให้เซลล์แตกนี้จะต้องทำบนน้ำแข็ง (on ice) เพื่อป้องกันการเสื่อมสลายของกิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อเซลล์แตกแล้วนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000×g นาน 20 นาที แล้วแบ่ง supernatant ที่มี crude enzyme ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มพร้อมกับ 50 มิลลิโมลาร์ ACC ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 1.8 มิลลิลิตร 0.56 โมลลาร์ HCl และ 0.1% (w/v) 2,4-dinitrophenylhydrazine (เตรียมในสารละลาย 2 โมลลาร์ HCl) ลงไปในปฏิกิริยา แล้วบ่มที่ 30°C ต่ออีกเป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาการเกิดสีโดยเติม 2 มิลลิลิตร 2 โมลลาร์ NaOH แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทั้งนี้ กิจกรรมของเอนไซม์ 1 unit เท่ากับความสามารถในการสร้างสาร α-ketobutyrate 1 มิลลิโมลต่อชั่วโมงต่อปริมาณโปรตีน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร α-ketobutyrate ที่ความเข้มข้นระดับ 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 1 ไมโครโมล (Tittabutr et al., 2008)

2.3 การถ่ายทอดยีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase เข้าสู่เชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมตัวแทนเพื่อเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์

ทำการเพิ่มการแสดงออกของกิจกรรม ACC deaminase ในเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม โดยการนำพลาสมิด pRK404 ที่มีการเชื่อมต่อของยีน *acdRS* (ยีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase) จากเชื้อ *Sinorhizobium* sp. BL3 ซึ่งพบว่าเป็นไรโซเบียมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์นี้สูงในระดับหนึ่ง นำมาถ่ายทอดเข้าสู่เชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมตัวแทนที่ใช้ในการทดลอง คือ *Bradyrhizobium* sp. SUT8-1 โดยใช้วิธี biparental-mating เพื่อให้ได้ transconjugant ของเชื้อ SUT8-1:pACC แต่อย่างไรก็ตามไม่ประสบความสำเร็จในขั้นตอนนี้

2.4 การตรวจสอบการตอบสนองของพืชต่อการใช้หัวเชื้อไรโซเบียมภายใต้สภาวะน้ำท่วม

นำเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมตัวแทนที่คัดเลือกได้ (*Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 wild-type) มาทดสอบการส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายทั้งภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วม ทั้งนี้เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมได้สำเร็จ จึงได้ทำการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมที่อาจส่งผลต่อการเจริญของพืช และการตอบสนองของพืชภายใต้สภาวะน้ำท่วมที่แตกต่างกัน โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม SUTN8-1 ในอาหารเหลว YEM จนกระทั่งเซลล์เข้าสู่ระยะ late log phase จากนั้นล้างเซลล์และละลายในสารละลาย 0.85% NaCl เพื่อปรับให้เชื้อมีจำนวนเซลล์ที่แตกต่างกัน โดยทำการนับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตในสารละลายเริ่มต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ hemocytometer จากนั้นจึงทำการเจือจางเพื่อให้มีจำนวนเชื้อไรโซเบียมในปริมาณต่าง ๆ กัน คือ 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปทดสอบกับถั่วลิสงที่ปลูกใน Leonard's jar ที่บรรจุเวอร์มิคูไลท์ผสมทรายในอัตราส่วน 1:1 เป็นวัสดุปลูก ภายใต้สภาวะควบคุมการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยปลูกถั่วลิสงร่วมกับการปลูกเชื้อ (inoculation) แบรดดี้ไรโซเบียมที่ปริมาณเซลล์ 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 เซลล์ต่อเมล็ด เทียบกับถั่วลิสงที่ไม่ได้มีการปลูกเชื้อ (un-inoculated plant) จำนวน 5 ซ้ำ ในสภาวะปกติ และสภาวะที่มีน้ำท่วมขัง โดยจัดให้มีน้ำท่วมขังระดับโคนต้นเริ่มในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากการปลูกจนกระทั่งสัปดาห์ที่ 6 จากนั้นตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส น้ำหนักต้นแห้ง น้ำหนักรากแห้ง จำนวนปม และน้ำหนักปม รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของพืชที่ตอบสนองต่อการใช้เชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังตามวิธีการของ El-Enany et al. (2013) ดังต่อไปนี้

2.4.1 การตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์

นำใบถั่วลิสงมาชั่งให้ได้ 4 กรัม ล้างให้สะอาดแล้วตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปบดให้ละเอียด แล้วเติมอะซิโตน 20 มิลลิลิตร ปิดฝา แช่ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เขย่าขวดเป็นครั้งคราว จากนั้นกรองสารละลายที่สกัดได้ด้วยกระดาษกรอง ใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ ปิดฝาขวดด้วยกระจกนาฬิกา หรือจุกแก้ว เพื่อกันการระเหย เมื่อครบเวลาที่บ่มไว้แล้วนำไปวัดสเปคตรัมของรงควัตถุที่สกัดได้จากใบถั่วลิสง ที่ค่าดูดกลืนแสง 420 และ 680 นาโนเมตร สำหรับคลอโรฟิลล์ A และที่ค่าดูดกลืนแสง 470 และ 640 นาโนเมตร สำหรับคลอโรฟิลล์ B นำไปคำนวณโดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

คลอโรฟิลล์ A (ไมโครกรัม/ลิตร) = 11.9 (A420-A680) – (B420 – B680) (V/L) (1,000/S)

คลอโรฟิลล์ B (ไมโครกรัม/ลิตร) = 11.9 (A470-A640) – (B470 – B640) (V/L) (1,000/S)

เมื่อ A420 = ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

A680 = ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร

B420 = ค่าการดูดกลืนแสง Blank ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

B680 = ค่าการดูดกลืนแสง Blank ที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร

V = มล. ของสารละลาย acetone ที่ใช้

L = ความหนา (ซม.) ของ cuvette ที่ใช้กับเครื่อง spectrophotometer

S = มล. ของน้ำตัวอย่างที่นำมากรอง

ทั้งนี้ Blank หมายถึงสารละลายที่ไม่มีตัวอย่างที่ต้องการวัด ในที่นี้คือ อะซิโตน

2.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณโพรลีน (proline)

ชั่งใบพืชตัวอย่าง 10 มิลลิกรัม เติม 0.5 มิลลิลิตร ของ 3% aqueous sulphosalicylic acid นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ supernatant ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมด้วย acid-ninhydrin 1 มิลลิลิตร และ glacial acetic acid 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดแก้วเดียวกัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซสเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างแช่ในถังน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วเติม toluene 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีเพื่อให้เกิดการตกตะกอน จากนั้นดูดส่วนของสารละลาย 1 มิลลิลิตรไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร โดยใช้ toluene เป็น Blank โดยคำนวณปริมาณโพรลีนที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้ว โดยทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ตามวิธีข้างต้น

2.4.3 การวิเคราะห์หา Lipid peroxidation

ชั่งรากพืชตัวอย่างน้ำหนัก 100 มิลลิกรัม จากนั้นเติม 0.5 มิลลิลิตร ของ 0.1% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซสเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วน supernatant 0.5 มิลลิลิตร เติมด้วย 1.5 มิลลิลิตรของ 0.5% Thiobarbituric acid (TBA) ที่เจือจางใน 20% TCA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นนำตัวอย่างใส่ถังน้ำแข็งทันทีที่ครบเวลาเพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 15000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซสเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 และ 600 นาโนเมตร เทียบกับปฏิกิริยาที่ใช้สารละลาย TCA ตามความเข้มข้นและทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนข้างต้น แล้วคำนวณค่า lipid peroxidation ในรูปของ malondialdehyde (MDA) โดยใช้สูตรดังนี้

MDA (umol/g FW^{-1}) = (A532-A600) × volume of extract (ml)/155x sample weight

2.4.4 การวิเคราะห์ Peroxidase activity (POD)

ชั่งตัวอย่างใบพืช 0.5 กรัม ลงใน Extraction buffer แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ supernatant ที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้ supernatant 65 ไมโครลิตร แล้วเติม reaction mixture 920 ไมโครลิตร และ H_2O_2 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร โดยทำปฏิกิริยาเทียบกับ blank ที่มีส่วนผสมเช่นเดียวกัน ที่ไม่มีการเติม H_2O_2 แต่เติมด้วย deionized water 15 ไมโครลิตร แทน จากนั้นจึงนำปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไปวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ 465 นาโนเมตร ทุก ๆ 10 วินาที เป็นเวลา 180 วินาที ค่าที่ได้นำมาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Units/mg} = \frac{\text{delta A /min}}{e \times (\text{mg (enzyme)/ml(reaction mixture)})}$$

เมื่อ e ของ DAB = 3.16 mM^{-1} cm^{-1}

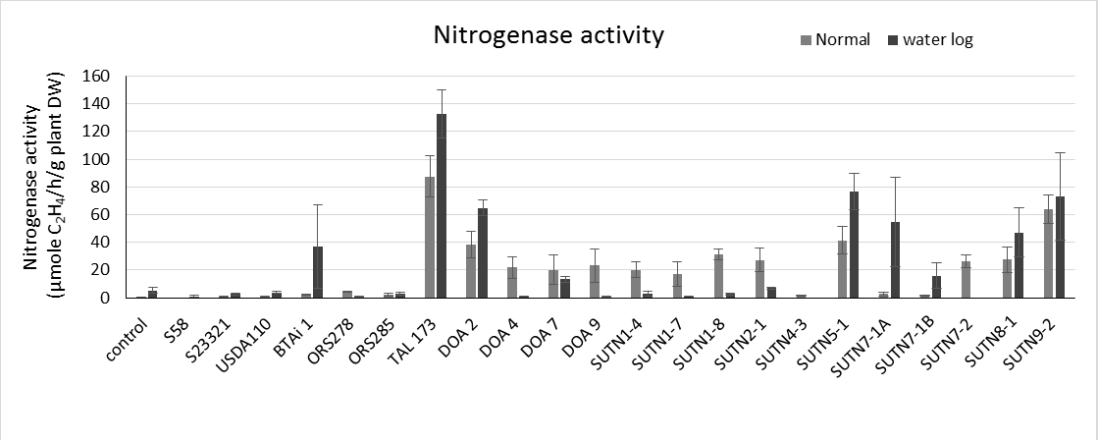
2.5 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์วาเรียนซ์ (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS v. 17 for window (Levesque and SPSS Inc., 2006) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

บทที่ 3
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

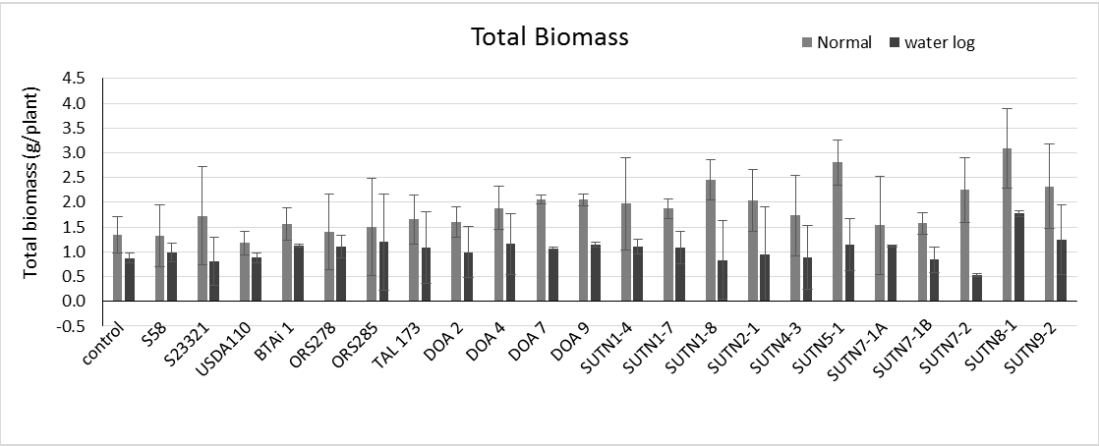
3.1 ผลการตรวจสอบเชื้อกลุ่มแบรดดี้ไรโซเบียมถั่วลิสงและการส่งเสริมการเจริญของพืชเบื้องต้นภายใต้สภาวะน้ำท่วม

ได้ทำการทดสอบเชื้อในกลุ่ม *Bradyrhizobium* sp. จำนวน 22 สายพันธุ์ ที่สามารถเข้าสร้างปมกับถั่วลิสงได้ โดยทำการทดสอบทั้งภายใต้สภาวะปกติ (normal) และสภาวะน้ำท่วมขัง (water log) แล้วทำการตรวจสอบความสามารถของเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมเบื้องต้นในการส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสง ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และระดับของเอทธิลีนที่ปลดปล่อยออกมา ทั้งนี้ผลการตรวจวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแบรดดี้ในถั่วลิสง เชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมบางสายพันธุ์ถึงแม้เข้าสร้างปมกับถั่วลิสงได้ แต่มีระดับการตรึงไนโตรเจนที่น้อยมาก เช่น ในสายพันธุ์ S58, S23321, USDA110, ORS278, ORS285 เป็นต้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความไม่เข้ากันระหว่างปฏิสัมพันธ์ของเชื้อกับถั่วลิสง โดยเชื้อเหล่านี้ถูกพบว่าเข้าสร้างปมและตรึงไนโตรเจนได้ดีกับถั่วชนิดอื่น ๆ เช่น ถั่วเหลือง โสนขน โสนหางไก่ (*Aeschynomene* sp.) เป็นต้น อย่างไรก็ตามเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมในกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนให้กับถั่วลิสงได้ พบว่ามีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจนที่แตกต่างกันในสภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง โดยเชื้อส่วนใหญ่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสลดลงเมื่อเผชิญกับสภาวะน้ำท่วมขัง ทั้งนี้เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. TAL173 ซึ่งเป็นเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมทางการค้าที่ใช้กับถั่วลิสง ให้ผลการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุดทั้งในสภาวะปกติและสภาวะน้ำท่วมขัง นอกจากนี้ยังพบเชื้อ DOA2, SUTN5-1, SUTN7-1A, SUTN8-1 และ SUTN9-2 สามารถตรึงไนโตรเจนภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังได้มากกว่าในสภาวะปกติ (รูปที่ 1) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนในดินมีน้อยกว่าปกติ จึงอาจทำให้เอนไซม์ไนโตรจีเนสทำงานได้มีประสิทธิภาพได้ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกภายใต้สภาวะปกติ



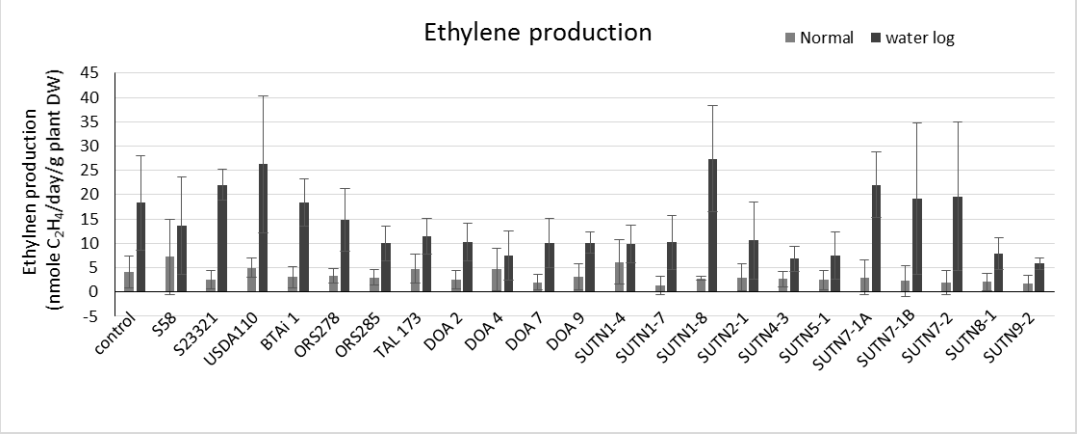
รูปที่ 1 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของถั่วลิสงเมื่อปลูกด้วยเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมชนิดต่าง ๆ ภายสภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง

จากนั้นเมื่อทำการตรวจสอบผลของน้ำหนักพืชโดยรวม (รูปที่ 2) พบว่าน้ำหนักโดยรวมของถั่วลิสงที่ปลูกด้วยเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมทุกสายพันธุ์ลดลงเมื่อปลูกภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง โดยพบว่าเชื้อ Bradyrhizobium sp. SUTN8-1 มีแนวโน้มที่ส่งเสริมการเจริญของพืชได้สูงที่สุดทั้งในสภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าถึงแม้เชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูง แต่อาจไม่เพียงพอที่จะทำให้พืชสามารถเจริญภายใต้สภาวะเครียดได้ดี การเจริญของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมอาจจำเป็นต้องอาศัยปัจจัยอื่นของเชื้อในการส่งเสริมการเจริญควบคู่กันไปด้วย ซึ่งเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญเมื่อพืชเผชิญกับสภาวะเครียด

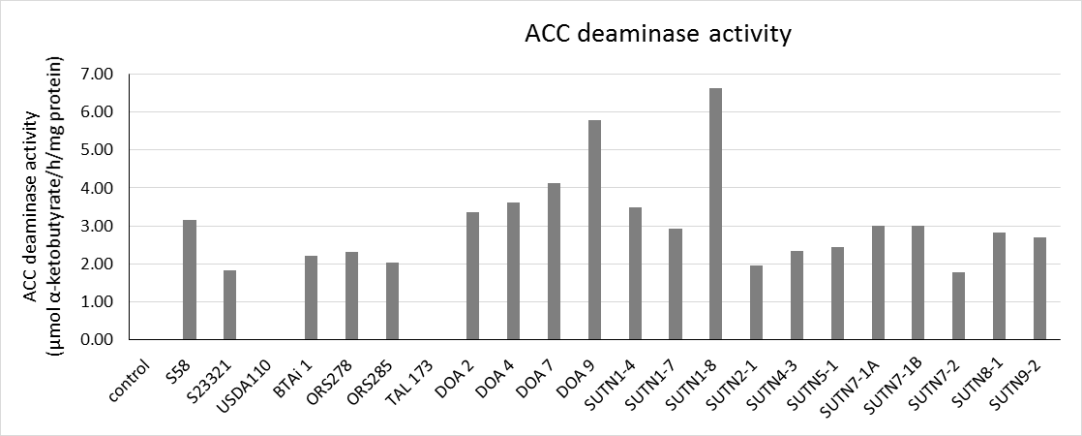


รูปที่ 2 น้ำหนักโดยรวมของถั่วลิสงเมื่อปลูกด้วยเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมชนิดต่าง ๆ ภายสภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง

จากการที่บทบาทของเอนไซม์ ACC deaminase ซึ่งช่วยลดความเครียดในพืชได้โดยกลไกการลดปริมาณ stress ethylene ซึ่งเป็นโมเลกุลสัญญาณที่บ่งบอกถึงความเครียดในพืช โดยแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์นี้สามารถนำสาร ACC ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่จะเปลี่ยนไปเป็น ethylene ในพืช มาใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ ดังนั้นหากระดับของ ACC ลดลงจะส่งผลถึงปริมาณ stress ethylene ในพืชที่ลดลงด้วย ซึ่งอาจส่งผลดีต่อการลดความเครียดในพืช ดังนั้นจึงได้ตรวจสอบปริมาณของ ethylene ที่ปลดปล่อยออกมาจากถั่วลิสงที่ปลูกด้วยเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อปลูกพืชภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง (รูปที่ 3) ผลการทดลองพบว่าพืชที่ปลูกภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังมีการปลดปล่อย ethylene ออกมาสูงกว่าพืชที่ปลูกภายใต้สภาวะปกติ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อบางสายพันธุ์เมื่อปลูกเชื้อให้กับถั่วลิสงแล้วสามารถลดปริมาณ ethylene ที่ปลดปล่อยออกมาจากพืชภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังได้ดีเมื่อเทียบกับพืชที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (control) ทั้งนี้เชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมที่สามารถลดปริมาณ ethylene ที่ปลดปล่อยออกมาได้ เช่น สายพันธุ์ DOA4, SUTN4-3, SUTN5-1, SUTN8-1 และ SUTN9-2 เป็นต้น ดังนั้นอาจเป็นไปได้ที่เชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมเหล่านี้อาจมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ที่ส่งผลต่อการลดปริมาณ ethylene และความเครียดในพืช ดังนั้นจึงได้ทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อแบรดดี้ ซึ่งผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 4



รูปที่ 3 ปริมาณเอทธิลีนที่ปลดปล่อยจากถั่วลิสงเมื่อปลูกด้วยเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมชนิดต่าง ๆ ภายสภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง

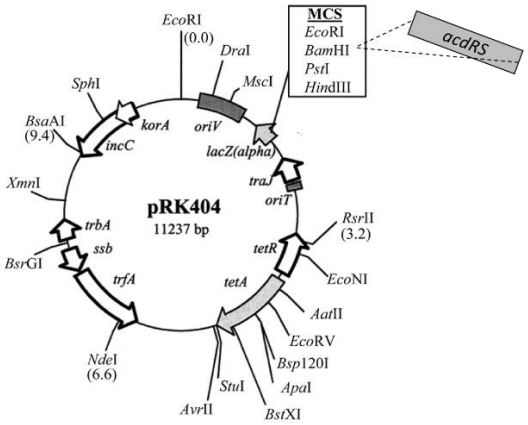


รูปที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ของเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ

จากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า เชื้อส่วนใหญ่มีกิจกรรมของเอนไซม์นี้ แต่มีระดับแตกต่างกันไป โดยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN1-8 มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด รองลงมาคือสายพันธุ์ DOA9 ซึ่งมีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ในช่วง 5-7 µmol α-ketobutyrate/h/mg protein ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์อื่น ๆ มีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 1-4 µmol α-ketobutyrate/h/mg protein แต่อย่างไรก็ตามการมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในระดับสูงไม่ได้ส่งผลให้สามารถลดปริมาณ ethylene ได้ดีเสมอไป เช่น ในแบรดดี้ไรโซเบียม สายพันธุ์ SUTN1-8 ถึงแม้มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดถึง 6.63 µmol α-ketobutyrate/h/mg protein แต่พบว่ามีการปลดปล่อยเอทธิลีนออกมาในระดับสูง ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้แบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อสายพันธุ์ SUTN1-8 นี้มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสต่ำเมื่อปลูกกับถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วม แสดงให้เห็นว่าอิทธิพลของความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อเมื่อ symbiosis กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะเครียดยังคงเป็นปัจจัยที่สำคัญในการส่งเสริมการเจริญของพืชภายใต้สภาวะเครียดด้วยเช่นกัน ทั้งนี้เมื่อประมวลผลการทดลองโดยรวมในเบื้องต้นจึงได้คัดเลือกแบรดดี้ไรโซเบียมที่มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในระดับปานกลางซึ่งสามารถลดระดับการปลดปล่อย ethylene ได้ ในขณะเดียวกันยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูง ที่สามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงเมื่อ symbiosis ร่วมกับพืชภายใต้สภาวะน้ำท่วม ซึ่งจากการทดลองมีแบรดดี้ไรโซเบียมอย่างน้อย 3 สายพันธุ์ คือ SUTN5-1, SUTN8-1 และ SUTN9-2 ที่มีความเหมาะสม อย่างไรก็ตามได้คัดเลือกเชื้อ SUTN8-1 ไปดำเนินการทดสอบต่อไปเนื่องจากสามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงได้สูงที่สุดภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง และเมื่อตรวจสอบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของเชื้อในกลุ่มนี้พบว่าใกล้เคียงกับ *Bradyrhizobium yuanmingense*

3.2 การถ่ายทอดยีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase เข้าสู่เชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมตัวแทนเพื่อเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์

เพื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase จึงได้ทำการเพิ่มการแสดงออกของกิจกรรม ACC deaminase ในเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม โดยการนำพลาสมิด pRK404 (รูปที่ 5) ที่มีการเชื่อมต่อของยีน *acdRS* (ยีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase) จากเชื้อ *Sinorhizobium* sp. BL3 ซึ่งพบว่าเป็นไรโซเบียมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์นี้สูงในระดับหนึ่ง นำมาถ่ายทอดเข้าสู่เชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมตัวแทนที่ใช้ในการทดลอง คือ *Bradyrhizobium* sp. SUT8-1 โดยใช้วิธี biparental-mating เพื่อให้ได้ transconjugant ของเชื้อ SUT8-1:pACC แต่อย่างไรก็ตามไม่ประสบความสำเร็จในขั้นตอนนี้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพลาสมิด pRK404 ไม่สามารถคงอยู่ในแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์นี้ได้ ถึงแม้พลาสมิดนี้สามารถใช้เป็น carry vector สำหรับเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์อื่น ๆ ดังนั้นแนวทางแก้ไขจึงอาจต้องใช้พลาสมิดชนิดอื่นมาทดสอบแทน แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้สามารถบรรลุวัตถุประสงค์ในการทราบบทบาทของเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อไรโซเบียมต่อการเจริญ และการตอบสนองของพืชต่อความเครียดภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง จึงได้ดำเนินการทดลองโดยใช้เชื้อสายพันธุ์ SUTN8-1 (wild-type) ในการทดสอบต่อไป



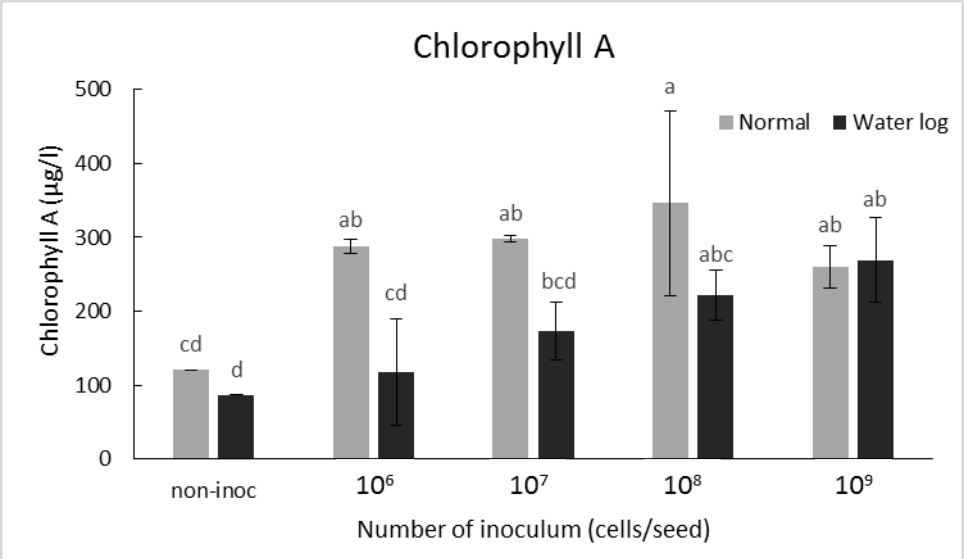
รูปที่ 5 พลาสมิด pRK404 ที่ต้องการนำยีน *acdRS* (ยีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase จาก *Sinorhizobium* sp. สายพันธุ์ BL3) เข้าแทรกในตำแหน่ง *Bam*HI

3.3 การตรวจสอบการตอบสนองของพืชต่อการใช้หัวเชื้อไรโซเบียมภายใต้สภาวะน้ำท่วม

เพื่อให้ทราบการตอบสนองของพืชต่อสภาวะน้ำท่วมขัง เมื่อมีการใช้และไม่ใช้หัวเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase โดยตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ A และ B ปริมาณสารโพรลีน รวมทั้ง lipid peroxidation และกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ที่

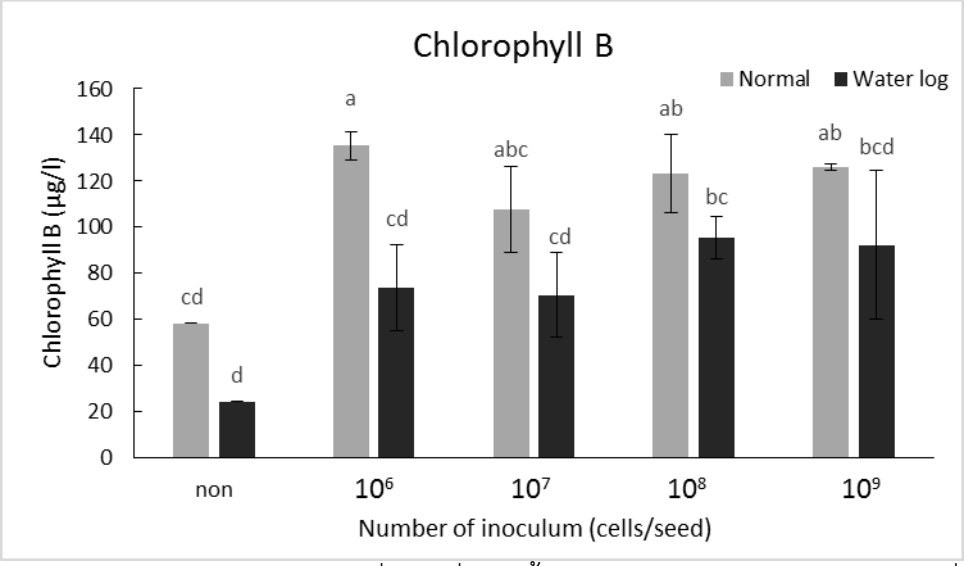
ตอบสนองต่อความเครียดของพืช โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้จากถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อที่ระดับปริมาณเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม 10^6, 10^7, 10^8 และ 10^9 เซลล์ต่อเมล็ด เปรียบเทียบกับตำรับที่ไม่ได้ใส่เชื้อ (non-inoculation) ภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง ทั้งนี้ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังตามปกติมักจะลดการเจริญเติบโตลงเนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่รากนำไปใช้ได้มีน้อยลง ซึ่งการขาดแคลนออกซิเจนนี้เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้พืชเกิดความเครียดจากสภาวะน้ำท่วมขัง ซึ่งมักจะเกิดขึ้นควบคู่ไปกับการสะสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และเอทธิลีน (Ponnamperuma, 1984) ทำให้กระตุ้นการหลุดร่วงของใบ อาการใบเหลือง และสุดท้ายส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตในที่สุด (Bailey-Serres and Voesenek, 2008) ดังนั้นการลดปริมาณ stress ethylene จากกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อ SUTN8-1 อาจเป็นกลไกที่สำคัญในการช่วยลดผลกระทบจากความเครียดที่เกิดขึ้นจากสภาวะน้ำท่วมขังได้

ทั้งนี้ผลการตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ A และปริมาณคลอโรฟิลล์ B ของใบถั่วลิสงพบว่ามีปริมาณลดลงเมื่อปลูกภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง แสดงให้เห็นว่าพืชมีความเครียดเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้เชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase สามารถเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ได้มากกว่าตำรับที่ไม่มีการปลูกเชื้อ และเมื่อปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นพบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นด้วย โดยเฉพาะที่ระดับการปลูกเชื้อ 10^8 และ 10^9 เซลล์ต่อเมล็ด สามารถเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ A ในถั่วลิสงที่ปลูกภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังได้มากกว่าถั่วลิสงที่ระดับการปลูกเชื้อ 10^6 เซลล์ต่อเมล็ด และตำรับที่ไม่มีการปลูกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ปริมาณคลอโรฟิลล์ A ในใบของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง

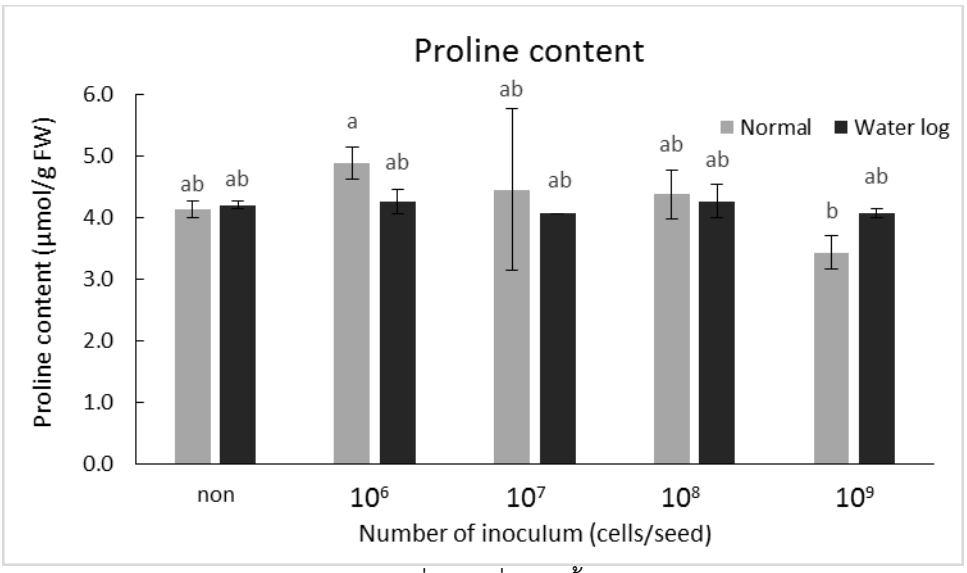
ในขณะที่ปริมาณคลอโรฟิลล์ B พบว่าการปลูกเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมที่ระดับ 10^8 และ 10^9 เซลล์ต่อเมล็ด สามารถเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ B ได้สูงที่สุดภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากตำรับที่ไม่มีการปลูกเชื้อ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับถั่วลิสงสงที่ปลูกเชื้อที่ระดับ 10^6 และ 10^7 เซลล์ต่อเมล็ด ภายใต้สภาวะเดียวกัน (รูปที่ 7) แสดงให้เห็นว่าการปลูกเชื้อที่ระดับ 10^8-10^9 เซลล์ต่อเมล็ดสามารถช่วยลดความเครียดในพืชที่เกิดจากสภาวะน้ำท่วมขังได้ระดับหนึ่ง แต่ระดับปริมาณเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมไม่ส่งผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ A และ B ที่แตกต่างกันภายใต้สภาวะปกติ ทั้งนี้งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าความเครียดที่เกิดจากน้ำท่วมขัง กระตุ้นการทำลายคลอโรฟิลล์ ซึ่งการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์นี้ส่งผลกระทบโดยตรงต่อประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของพืชที่ปลูกภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง (Ashraf et al., 2011)



รูปที่ 7 ปริมาณคลอโรฟิลล์ B ในใบของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง

จากการที่พืชเจริญในสภาวะน้ำท่วมขังส่งผลต่อการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ ซึ่งส่งผลให้กระบวนการ photosynthetic electron transport chain เกิดการ reduced ที่มากเกินไปซึ่งทำให้มีการสร้าง reactive oxygen species (ROS) มากขึ้นในเซลล์พืช ดังนั้นระดับของ ROS ที่เพิ่มขึ้นจึงสัมพันธ์กับระดับความเครียดของพืชที่เพิ่มขึ้นเมื่อเจริญภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม โดย ROS ที่เกิดขึ้นนี้เป็นสาเหตุทำให้เกิด oxygen toxicity ไปทำลายโมเลกุลต่าง ๆ ในเซลล์พืช เช่น คลอโรฟิลล์ DNA โปรตีน และไขมัน ดังนั้นพืชจึงมีกลไกในการป้องการการทำลายเซลล์จาก ROS นี้ โดยการทำงานของ antioxidative enzymes ชนิดต่าง ๆ รวมทั้งการผลิตสาร antioxidant เพื่อกำจัด ROS ที่เกิดขึ้น ในการทดลองนี้ได้ตรวจสอบปริมาณของโพรลีน ซึ่งจัดว่าเป็น antioxidant

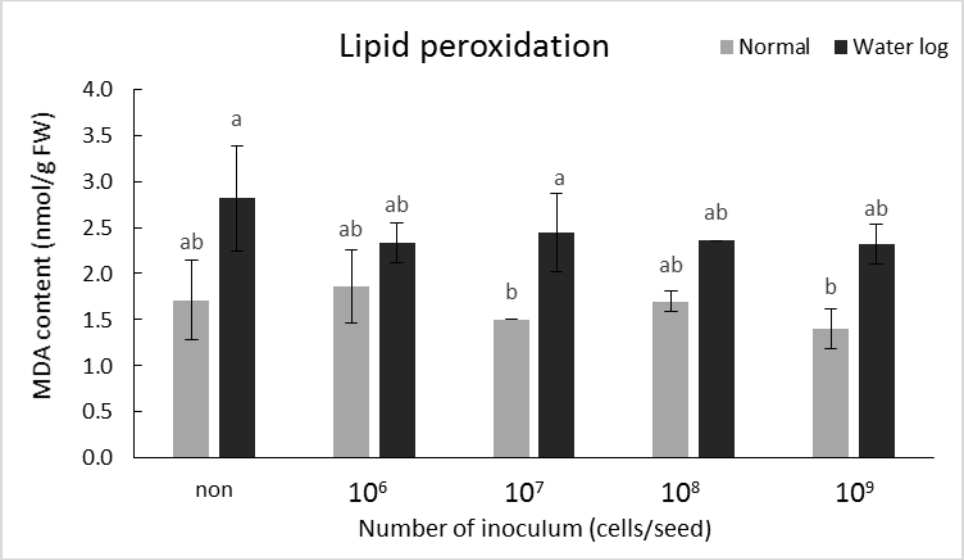
substance ชนิดหนึ่ง และพบว่ามักมีการสะสมโพรลีนในเซลล์พืชภายใต้สภาวะเครียด อย่างไรก็ตามผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่าถั่วลิสงมีการสะสมโพรลีนในพืชภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง ไม่แตกต่างจากพืชที่ปลูกภายใต้สภาวะปกติ (รูปที่ 8) ทั้งนี้เคยมีรายงานของ El-Enany et al. (2013) พบว่าปริมาณโพรลีนของถั่วพุ่มที่ปลูกในสภาวะน้ำท่วมขังไม่มีการเปลี่ยนแปลงเช่นกันในส่วนต้นของพืช แต่มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อตรวจสอบในรากพืชเมื่อเทียบกับพืชที่ปลูกในสภาวะปกติ ทั้งผลการทดลองในรูปที่ 8 เป็นปริมาณโพรลีนที่ตรวจวัดจากส่วนใบ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณโพรลีนในสภาวะน้ำท่วมขังและสภาวะปกติ นอกจากนี้ในงานวิจัยของ El-Enany et al. (2013) ยังรายงานว่าปริมาณโพรลีนตอบสนองต่อสภาวะเครียดที่เกิดจากการขาดน้ำมากกว่าสภาวะน้ำท่วมขัง



รูปที่ 8 ปริมาณโพรลีน (proline) ในใบของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง

จากนั้นทำการตรวจสอบระดับของการเกิด lipid peroxidation ในรากของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง โดยวัดในรูปของปริมาณ malondialdehyde (MDA) เพื่อใช้ในการประมาณระดับของการที่ lipid membrane ของพืชถูกทำลายจาก ROS ที่เกิดขึ้นจากความเครียดในพืช โดยผลการทดลองพบว่าในสภาวะน้ำท่วมขังรากของถั่วลิสงมีปริมาณ MDA เกิดขึ้นสูงกว่ารากพืชที่ปลูกภายใต้สภาวะปกติ (รูปที่ 9) แสดงให้เห็นว่าพืชมีความเครียดเกิดเพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาเฉพาะปริมาณ MDA ในรากพืชที่เจริญภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังพบว่าการใส่เชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase มีแนวโน้มลดปริมาณ MDA ลงเมื่อเทียบกับพืชที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (non-inoculation) แต่อย่างไรก็ตามไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าปริมาณ

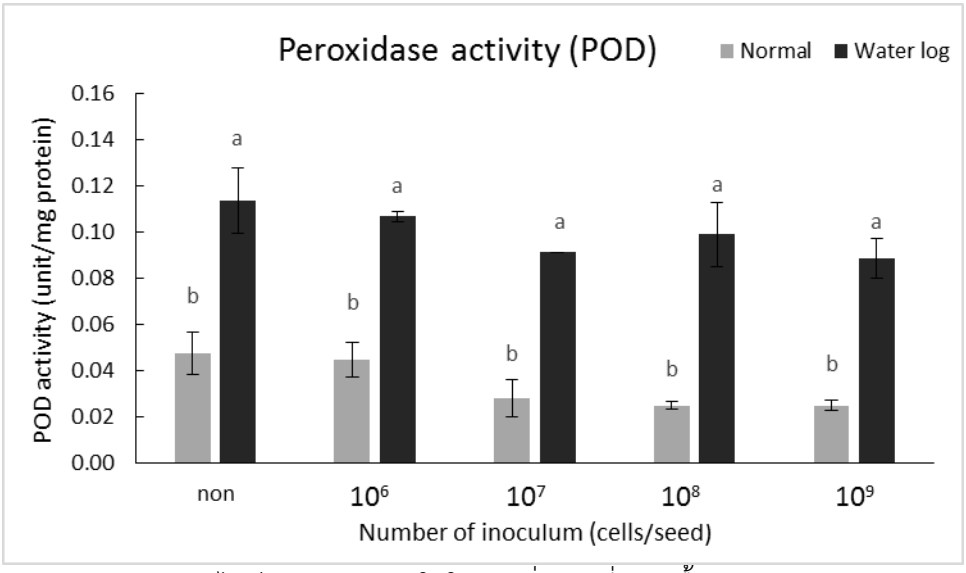
MDA ที่ตรวจวัดได้อาจไม่ได้มาจากการเกิดการที่ lipid membrane ของพืชถูกทำลายจาก ROS เพียงอย่างเดียว เนื่องจากการสลายตัวของสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต และกรดอะมิโนบางชนิดก็ผลิต MDA ออกมาเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (end-product) เช่นกัน ดังนั้นอาจทำให้ไม่เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อปลูกเชื้อที่ระดับความเข้มข้นเซลล์ต่างกัน อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณ MDA มีแนวโน้มลดลงเมื่อปลูกเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมให้กับถั่วลิสงในสภาวะน้ำท่วมขัง ซึ่งอาจเป็นผลจากกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase



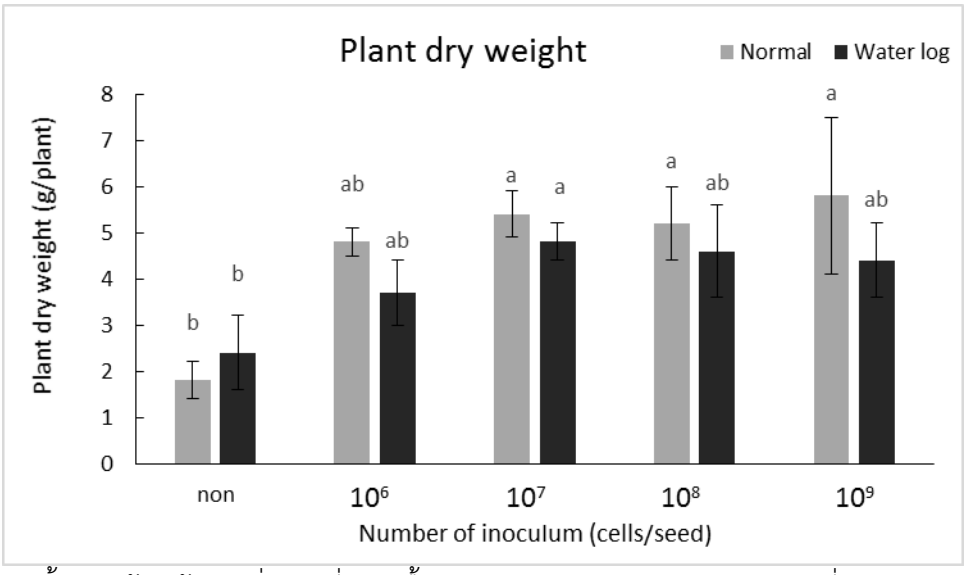
รูปที่ 9 การเกิด lipid peroxidation ในรากของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง

จากการที่พืชพยายามปรับตัวเพื่อลดปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นจากความเครียดเมื่อเจริญภายใต้สภาวะเครียด พืชจึงต้องมีการสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม antioxidative enzyme ให้มากขึ้นเพื่อลดสภาวะเครียดนี้ โดยในการทดลองได้ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ซึ่งทำหน้าที่กำจัด H_2O_2 ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เป็นผลผลิตจากการที่เอนไซม์ superoxide dismutase ทำปฏิกิริยากับ ROS ดังนั้นเซลล์ต้องมีการผลิตเอนไซม์ peroxidase เพื่อกำจัด H_2O_2 ด้วยเช่นกัน โดยจากผลการทดลองพบว่าถั่วลิสงที่ปลูกในสภาวะน้ำท่วมขังมีกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase สูงกว่าพืชในสภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่ามีความเครียดเกิดขึ้นในพืชสูงทำให้พืชพยายามกำจัด ROS รวมทั้ง H_2O_2 เพื่อไม่ให้เป็นพิษต่อเซลล์มากขึ้น อย่างไรก็ตามกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ในพืชที่ปลูกเชื้อที่ปริมาณเซลล์แบรดดี้ไรโซเบียมแตกต่างกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับพืชที่ไม่ได้ปลูกเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม (non-inoculation) แต่พบว่ามีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้นข้นของเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมเพิ่มขึ้น (รูปที่ 10)

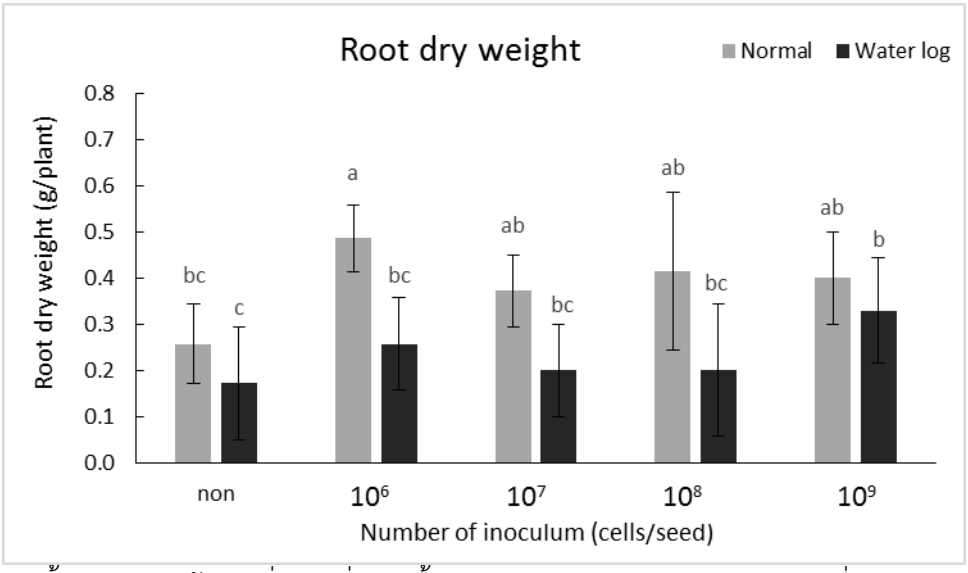
และเมื่อตรวจสอบการเจริญเติบโตของพืชโดยวัดจากน้ำหนักแห้งของต้นพืช (รูปที่ 11) พบว่าถั่วลิสงมีการเจริญเติบโตลดลงในสภาวะน้ำท่วมขังเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยการปลูกเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมที่ระดับเซลล์ 10^7-10^9 เซลล์ต่อเมล็ด สามารถส่งเสริมให้พืชเจริญในสภาวะน้ำท่วมขังได้ดี เช่นเดียวกับน้ำหนักรากแห้งพบว่าถั่วลิสงมีน้ำหนักรากแห้งลดลงในสภาวะน้ำท่วมขังแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสภาวะปกติ และเมื่อปลูกเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมที่ระดับ 109 เซลล์ต่อเมล็ด ทำให้มีน้ำหนักรากแห้งสูงกว่าพืชที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (non-inoculation) อย่างมีนัยสำคัญในสภาวะน้ำท่วมขัง (รูปที่ 12) แต่อย่างไรก็ตามจำนวนปม และน้ำหนักปมของถั่วลิสงลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ (รูปที่ 13 และ 14) แต่เป็นที่น่าสนใจว่าถั่วลิสงที่มีการใส่เชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมมีแนวโน้มของกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงกว่าพืชที่ปลูกภายใต้สภาวะปกติถึงแม้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าการปลูกเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียมที่ระดับ 10^9 เซลล์ต่อเมล็ด มีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด ซึ่งอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ถั่วลิสงมีการเจริญในสภาวะน้ำท่วมขังได้ (รูปที่ 15) ดังนั้นโดยรวมเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. สายพันธุ์ SUTN8-1 สามารถใช้เป็นหัวเชื้อไรโซเบียมถั่วลิสงเมื่อต้องเผชิญกับสภาวะน้ำท่วมขังได้ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ที่ช่วยลดความเครียดในพืช และความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูงเป็นกลไกสำคัญแม้ปลูกในสภาวะน้ำท่วมขัง



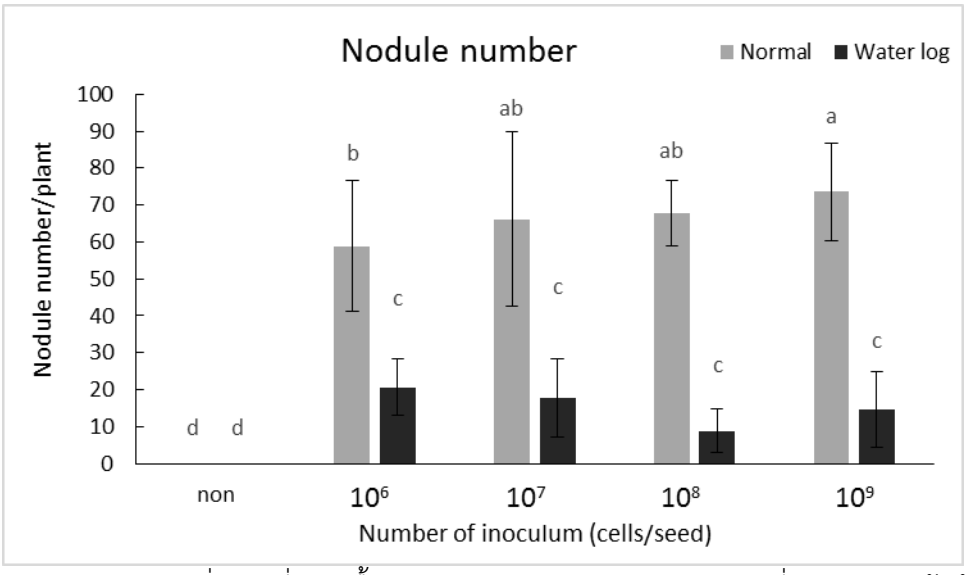
รูปที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ในใบของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง



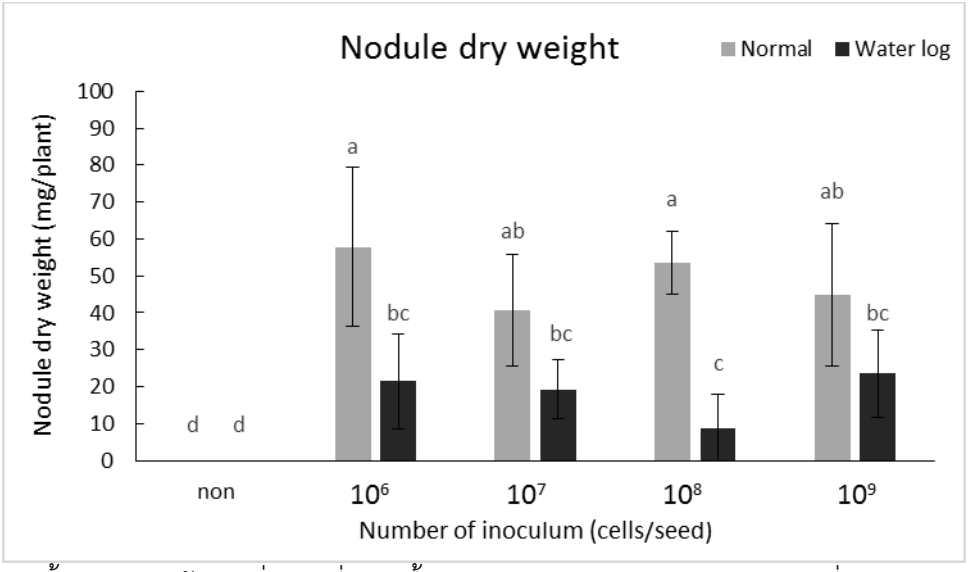
รูปที่ 11 น้ำหนักต้นแห้งของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง



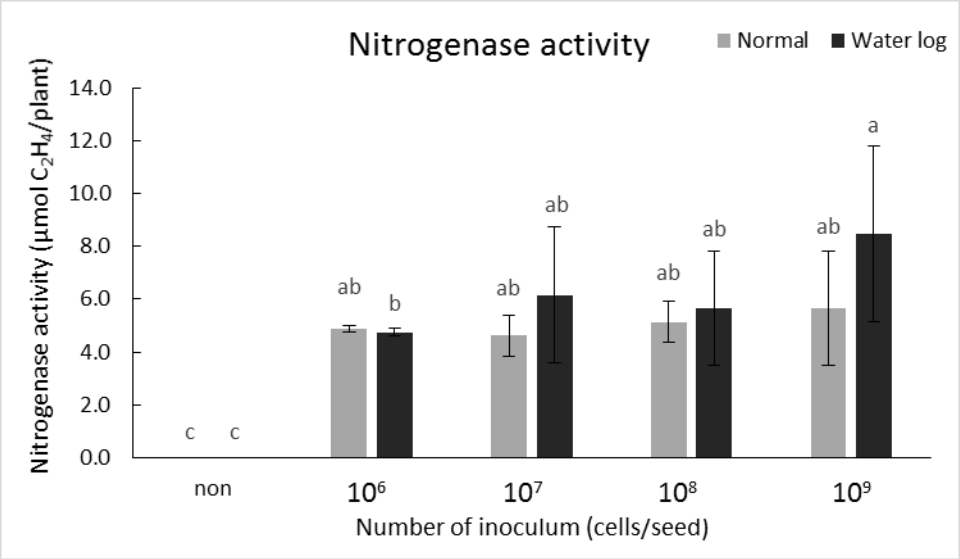
รูปที่ 12 น้ำหนักรากแห้งของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง



รูปที่ 13 จำนวนปมของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง



รูปที่ 14 น้ำหนักปมแห้งของถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง



รูปที่ 15 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ และสภาวะน้ำท่วมขัง

บทที่ 4
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่ส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง รวมทั้งเพื่อตรวจสอบกลไกที่เชื้อไรโซเบียมใช้ในการส่งเสริมการเจริญ และความสามารถที่ทำให้พืชทนต่อความเครียดภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังได้ โดยผลการทดลองพบว่า เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN8-1 สามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงได้มากที่สุด และเมื่อตรวจสอบพบว่าเชื้อนี้มีความใกล้เคียงกับเชื้อในกลุ่ม *B. yuanmingense* ทั้งนี้เชื้อ SUTN8-1 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสอยู่ในระดับปานกลางเมื่อเทียบกับหัวเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วลิสงทางการค้า (*Bradyrhizobium* sp. TAL173) แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ส่งผลให้มีการปลดปล่อย ethylene จากพืชในสภาวะเครียดน้อยลง และส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังได้ โดยเชื้อ SUTN8-1 สามารถตรึงไนโตรเจนและส่งเสริมการเจริญของถั่วลิสงในสภาวะน้ำท่วมขังได้ดีกว่าถั่วที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ โดยเมื่อตรวจสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่ตอบสนองในพืชภายใต้สภาวะเครียด พบว่าพืชที่ปลูกภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังมีความเครียดเพิ่มมากขึ้นกว่าการปลูกในสภาวะปกติ และเมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์เหล่านี้ในพืชที่มีการปลูกเชื้อ SUTN8-1 พบว่ามีแนวโน้มของการลดความเครียดในพืชได้มากขึ้น ดังนั้นแสดงให้เห็นในทางอ้อมว่าเชื้อไรโซเบียมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase มีบทบาทในการช่วยลดความเครียดของพืช แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถทำให้ประสิทธิภาพการเจริญของพืชดีขึ้นได้เทียบเท่ากับสภาวะปกติ

ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้ทราบบทบาทของเอนไซม์ ACC deaminase ในการตอบสนองต่อความเครียดของพืชภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง หากไม่สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ได้ อาจเปลี่ยนวิธีโดยทำให้ยีน *acdRS* ซึ่งเป็นยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ ACC deaminase ของเชื้อนั้นไม่แสดงออก (mutation) เพื่อให้ทราบบทบาทที่แท้ของเอนไซม์นี้ต่อการทำให้พืชเจริญในสภาวะเครียดได้

บรรณานุกรม

Ashraf M.A., Ahmad M.S.A., Ashraf M., Al-Qurainy F., Ashraf M.Y. (2011) Alleviation of waterlogging stress in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by exogenous application of potassium in soil and as a foliar spray. Crop Pasture Sci. 62: 25-38.

Bailey-Serres J., Voesenek L.A.C.J. (2008) Flooding stress: acclimations and genetic diversity. Annu. Rev. Plant Biol. 59: 313-339.

Drew M.C. (1997) Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:223–250.

El-Enany A.E., AL-Anazi A.D., Dief N., Al-Taisan W.A. (2013) Role of antioxidant enzymes in amelioration of water deficit and waterlogging stresses on *Vigna sinensis* plants. J. Biol Earth Sci. 3:B144-B153.

Else M.A., Hall K.C., Arnold G.M., Davies W.J., Jackson M.B. (1995) Export of abscisic acid, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, phosphate, and nitrate from roots to shoots of flooded tomato plants, Plant Physiol. 107:377–384.

Farwell A.J., Vesely S., Nero V., Rodriguez H., McCormack K., Shah S., Dixon D.G., Glick B.R. (2007) Tolerance of transgenic canola plants (*Brassica napus*) amended with plant growth-promoting bacteria to flooding stress at a metal-contaminated field site. Environ. Pollut 147:540–545.

Grichko V.P., Glick B.R. (2001) Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growthpromoting bacteria. Plant Physiol. Biochem. 39:11–17.

Jackson M.B., Gales K., Campbell D.J. (1978) Effect of waterlogged soil conditions on the production of ethylene and on water relationships in tomato plants. J. Exp. Bot. 29:183–193.

Ponnamperuma F.N. (1984) Effects of flooding on soils. In: Kozlowski TT. (Ed.), Flooding and Plant Growth. Academic Press, Orlando, Florida; pp: 1-44.

Vartapetian B.B., Jackson M.B. (1997) Plant adaptations to anaerobic stress. Ann. Bot. 79: 3–20.