นายสุรชาติ สิบพลกรัง : ปัจจัยจาก PGPR ที่สามารถเพิ่มผลผลิตถั่วเหลืองและถั่วเขียวเมื่อใช้ร่วมกับแบรดี้ไรโซเบียม (DETERMINANTS DERIVED FROM PGPR CAPABLE OF INCREASING SOYBEAN AND MUNG BEAN PRODUCTION VIA *Bradyrhizobium* INOCULATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง, 215 หน้า.

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีอยู่ในดินตามธรรมชาติโดยอาศัยอยู่บริเวณรากพืช และเป็นประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การใช้หัวเชื้อร่วมกันระหว่างแบรดี้ไรโซเบียมและแบคทีเรียในกลุ่ม PGPR สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโต และการสร้างปมในถั่วเหลืองได้ อย่างไรก็ตามอิทธิพลจากการใช้หัวเชื้อร่วม ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองยังต้องการการศึกษาในเชิงลึก วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อประเมินอิทธิพลจากการใช้หัวเชื้อร่วมกันระหว่างแบรดี้ไรโซเบียมกับแบคทีเรียในกลุ่ม PGPR และสารที่ปลดปล่อยจากแบคทีเรียในกลุ่ม PGPR ในการส่งเสริมการสร้างปม และการเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในถั่วเหลือง (*Glycine max*) สายพันธุ์เชียงใหม่ 60 และถั่วเขียว (*Vigna radiata*) สายพันธุ์ SUT4 จากการทดลองใช้หัวเชื้อร่วมกันระหว่าง *Bacillus* สายพันธุ์ S141 กับแบรดี้ไรโซเบียม สามารถส่งเสริมการสร้างปม เพิ่มขนาดปม เพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และเพิ่มผลผลิตของถั่วเหลืองและถั่วเขียว นอกจากนั้นการใช้หัวเชื้อร่วมกันระหว่างแบรดี้ไรโซเบียมกับสารที่ปลดปล่อยจาก *Bacillus* สายพันธุ์ S141 ยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองและถั่วเขียวเช่นเดียวกับการใช้เซลล์ของ *Bacillus* สายพันธุ์ S141 อีกด้วย จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนแสดงให้เห็นว่า *Bacillus* สายพันธุ์ S141 สามารถปลดปล่อยสารประกอบที่หลากหลายชนิด โดยสารประกอบเหล่านี้สามารถกระตุ้นกระบวนการเมตาบอลิซึม และการตอบสนองต่อสารเคมี ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการสร้างปม และเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลืองและถั่วเขียว เพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการทำงานร่วมกันที่ซับซ้อนระหว่างแบรดี้ไรโซเบียม แบคทีเรียในกลุ่ม PGPR และพืช จึงได้ทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในจีโนมของ *Bacillus* สายพันธุ์ S141 สามารถจำแนกชนิดของ *Bacillus* สายพันธุ์ S141 เป็น *Bacillus velezensis*/*amyloliquafaciens* โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดนี้ มีลักษณะโครโมโซมเป็นวงกลม (Circular chromosome) และมีขนาด 3,974,582 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย 3,817 ยีน เมื่อทำการวิเคราะห์จีโนม พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ออกซิน และไซโตไคนินใน *B. velezensis* สายพันธุ์ S141 จากการทำลายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ IAA พบปริมาณการสังเคราะห์ IAA ลดลงในสายพันธุ์กลาย S141Δ*dhaS*, S141Δ*yhcX* และ S141Δ*IPyAD* แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ถูกทำลายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ IAAทั้งหมดเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ IAA นอกจากนี้การทดลองใช้หัวเชื้อร่วมกันระหว่างแบรดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA110 กับ S141Δ*yhcX* ทำให้จำนวนปมที่มีขนาดใหญ่ลดลง รายงานนี้เป็นการรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับยีน *yhcX* ซึ่งอาจจะมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์ IAA ใน *Bacillus velezensis* ที่ส่งผลกระทบหลักต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง จากการทำลายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซโตไคนินที่ประกอบด้วยยีน *IPT* และ *IPI* เมื่อทำการทดลองใช้หัวเชื้อร่วมกัน

ระหว่างแบรดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA110 กับ เชื้อสายพันธุ์กลาย S141Δ*IPI* ทำให้จำนวนปมที่มีขนาดใหญ่ลดลง โดย *IPI* อาจจะมีบทบาทสำคัญต่อขนาดของปมถั่วเหลือง อย่างไรก็ตาม นอกจากผลของ IAA หรือ ไซโตไคนิน อาจจะมีผลจากสารอื่นที่ปลดปล่อยออกมาจาก *B. velezensis* สายพันธุ์ S141 ช่วยส่งเสริมแบรดี้ไรโซเบียม ทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างปมที่มีขนาดใหญ่ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเนสูงขึ้น ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลือง โดยใช้กลยุทธ์การใช้หัวเชื้อร่วมระหว่าง *B. velezensis* สายพันธุ์ S141 ร่วมกับแบรดี้ไรโซเบียมนั้น สามารถพัฒนาเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับถั่วเหลืองและถั่วเขียวได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

SURACHAT SIBPONKRUNG : DETERMINANTS DERIVED FROM PGPR CAPABLE OF INCREASING SOYBEAN AND MUNG BEAN PRODUCTION VIA *Bradyrhizobium* INOCULATION. THESIS ADVISOR : PROF. NEUNG TEAUMROONG, Dr.rer.nat., 215 PP.

SOYBEAN/MUNG BEAN/CO-INOCULATION/*Bradyrhizobium*/PGPR

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are naturally occurring soil bacteria that aggressively colonize plant roots and benefit plants by providing growth promotion. Co-inoculation of soybean plants with PGPR strain and *Bradyrhizobium* altered plant growth parameters and significantly improved nodulation. However, the effects of co-inoculation need to be analyzed in more detail. The objectives of this research were to evaluate PGPR and its supernatant influence on promoting nodulation and N_2-fixing efficiency of soybean (*Glycine max* cv. CM60) and mung bean (*Vigna radiate* cv. SUT4) by co-inoculation with *Bradyrhizobium*. Co-inoculation between *Bacillus* sp. S141 and *Bradyrhizobium* with soybean and mung bean resulted in enhancing nodulation, size of nodule, N_2-fixing efficiency and increasing soybean and mung bean production. Besides, co-inoculation of supernatant of S141 with *Bradyrhizobium* produced the same results by using cells of S141. SDS-PAGE and protein identification suggested that S141 might facilitate the induction of numerous compounds which were strong attractants stimulating chemotactic response and metabolism, resulting in the enhanced nodulation and N_2-fixing efficiency. In order to better understand these complex *Bradyrhizobium*-PGPR-plant interactions, the whole genome of the typical S141 was analyzed. The genome of S141 is categorized in *Bacillus velezensis*/*amyloliquefaciens* and comprises a 3,974,582 bp long circular chromosome that consists of 3,817 protein-coding genes. Based on genomic analysis, auxin and cytokinin functionally related genes in the genome of S141 were

discovered. The disruption of putative genes related to IAA biosynthesis pathway revealed the IAA reduction in S141Δ*dhaS*, S141Δ*yhcX* and S141Δ*IPyAD* suggested that all of S141 IAA related mutant strains are related with IAA biosynthesis. Moreover, co-inoculation of *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 with S141Δ*yhcX* also reduced nodule number of L size nodules. This was the first time it was reported that *yhcX* may play a major role in IAA biosynthesis in *Bacillus velezensis* as well as provide a major impact on soybean growth promotion. The disruption of genes related to cytokinin biosynthesis pathway including: *IPT* and *IPI* genes and co-inoculation of USDA110 with S141Δ*IPI* reduced the nodule number of VL size nodules, it appears that *IPI* might play an important role in nodule size of soybean-*Bradyrhizobium* symbiosis. However, it was possible that not only IAA and cytokinin but also some other substrates secreted from S141 facilitate *Bradyrhizobium* to trigger bigger nodule formation resulting in the higher efficiency of N_2-fixation. Therefore, the efficiency to enhance soybean and mung bean N_2-fixation by S141 with *Bradyrhizobium* co-inoculation strategy could be developed for supreme soybean and mung bean inoculants.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2018

Student's Signature Surachat

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

Co-advisor's Signature