จันทร์เพ็ญ ประกำแหง : การเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลืองโดยการใช้หัวเชื้อร่วมระหว่าง PGPR และ *Bradyrhizobium japonicum* (MAXIMIZATION OF N_2-FIXING EFFICIENCY IN SOYBEAN (*Glycine max*) USING COINOCULATION WITH PGPR AND *Bradyrhizobium japonicum*) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง, 137 หน้า.

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของกลุ่มแบคทีเรีย PGPR ที่เหมาะสม และประเมินอิทธิพลในการส่งเสริมการสร้างปม และการเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในถั่วเหลือง (*Glycine max*) โดยการใช้หัวเชื้อร่วมกันระหว่าง *Bradyrhizobium japonicum* และแบคทีเรีย PGPR พบว่า แบคทีเรีย PGPR ที่ผ่านการคัดเลือกทั้งหมด 12 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการตรึงไนโตรเจน การเพิ่มจำนวนปม การเพิ่มน้ำหนักแห้งของปม และน้ำหนักแห้งของต้นถั่วเหลือง เมื่อมีการใช้หัวเชื้อร่วมกับ *B. japonicum* สายพันธุ์ THA6 และ USDA110 ($p<0.05$) นอกจากนี้ PGPR 2 ไอโซเลตที่ดีที่สุด คือ ไอโซเลต S141 และ S222 ที่มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus* sp. นั้น ได้ถูกคัดเลือกเพื่อใช้เป็นเชื้อร่วมกับแบคทีเรีย *B. japonicum* สายพันธุ์ THA6 และ USDA110 สำหรับการทดลองต่อไป ปริมาณหัวเชื้อ PGPR : *B. japonicum* ทั้งสองสายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองมากที่สุดเมื่อใช้เป็นหัวเชื้อร่วม คือที่ 10^6 : 10^6 CFU ml^{-1} การใช้หัวเชื้อร่วมกันในสภาพแปลงปลูกจริง สามารถเพิ่มผลผลิตเมล็ดถั่วเหลืองต่อเฮกตาร์ สูงกว่าการใช้หัวเชื้อ PGPR หรือ *B. japonic*um เพียงชนิดเดียวถึง 9.7-43.6% การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อการใช้หัวเชื้อร่วมกัน ด้วยเทคนิค RT- PCR ทั้งยีนของพืชและของเชื้อแบคทีเรีย ทั้งในรากและปมถั่วเหลือง พบว่า ยีนที่เกี่ยวข้องในช่วงแรกของการสร้างปม ได้แก่ยีน *nodD1, GmCaMK1* และ *GmNIN1A* ในรากถั่วเหลืองอายุ 7 วันหลังการใส่หัวเชื้อ (DAI) ร่วมระหว่าง *B. japonicum* และ PGPR มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะยีน *nodD1* และ *GmCCaMK* แต่ระดับการแสดงออกของยีน *GmNIN1A* ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับการใส่หัวเชื้อเพียงชนิดเดียว ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการทำงานของ PGPR ได้แก่ ยีน *iaaH* และ *ipdC* พบว่า ยีนดังกล่าวถูกควบคุมโดยการใส่หัวเชื้อร่วมระหว่าง *B. japonicum* และ PGPR นอกจากนี้ เมื่อทดลองใส่หัวเชื้อเพียงชนิดเดียว เปรียบเทียบกับการใส่หัวเชื้อร่วมระหว่าง *B. japonicum* และ PGPR ที่ช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ต่อการแสดงออกของยีนของทั้งถั่วเหลืองและเชื้อแบคทีเรีย (ยีน *GmMyb* , *otsA* , *phbC* , *dctA* และ *nifH*) ที่พบในปมถั่วเหลือง พบว่า ยีนดังกล่าวมีการแสดงออกทั้งที่เพิ่มขึ้นและลดลง แสดงถึงการถูกควบคุมโดยผลของการใส่เชื้อร่วมระหว่าง *B. japonicum* และ PGPR ผล

การศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองด้านกายภาพ ทั้งการทดลองใน Leonard's jar และในสภาพแปลงปลูกจริง อีกทั้งยังสอดคล้องกับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ในปมถั่วเหลือง ที่แสดงให้เห็นถึงความหนาแน่นของแกรนูล poly-ß-hydroxybutyrate (PHB) ภายใน bacteroids ซึ่ง PHB นี้ พบมากในปมแก่ของตัวอย่างปมที่ใส่หัวเชื้อร่วม ในขณะปมของตัวอย่างที่ใส่หัวเชื้ออย่างเดียวกลับมีการเสื่อมสภาพ เมื่อนำผลการศึกษาทั้งหมดนี้มารวมกัน ทำให้สรุปได้ว่า เชื้อจุลินทรีย์ PGPR อาจช่วยให้เกิดการชักนำการสะสมของน้ำตาล Trehalose และเพิ่มการขนส่ง C4-dicarboxylic acid ซึ่งบ่งบอกถึงการเพิ่มขึ้นของการสะสม PHB ในปม ส่งผลต่อเนื่องในการส่งเสริมการสร้างปม และการตรึงไนโตรเจนในถั่วเหลือง ดังนั้น การเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลือง โดยใช้กลยุทธ์การใช้หัวเชื้อร่วมระหว่าง PGPR ไอโซเลต S141 และ S222 ร่วมกับแบคทีเรีย *B. japonicum* สายพันธุ์ USDA110 และ THA6 นั้น สามารถพัฒนาเพื่อเป็นใช้เป็นหัวเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับถั่วเหลืองได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

JANPEN PRAKAMHANG : MAXIMIZATION OF N_2-FIXING EFFICIENCY IN SOYBEAN (*Glycine max*) USING COINOCULATION WITH PGPR AND *Bradyrhizobium japonicum*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. NEUNG TEAUMROONG, Dr.rer.nat., 137 PP.

SOYBEAN/COINOCULATION/*Bradyrhizobium japonicum*/PGPR/MECHANISM

The objectives of this research are to select the appropriate PGPR and evaluate its influence on promoting nodulation and N_2-fixing efficiency of soybean (*Glycine max*) by coinoculation with *Bradyrhizobium japonicum* strain. The selected 12 appropriate PGPR had significant capability of promoting N_2-fixation, nodule number, nodule and plant dry weight with both commercial Bradyrhizobial strains, *B. japonicum* THA6 and USDA110 (P<0.05). Furthermore, the best two PGPR, isolates S141 and S222 which are closely related to *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus* sp., were selected for coinoculation with *B. japonicum* USDA110 and THA6. The effective coinoculation doses of PGPR:Bradyrhizobium on soybean were 10^6:10^6 CFU ml^{-1}. The effect of coinoculation experiment under field condition could increase 9.7-43.6% of seed yield per hectare which is higher than those of uninoculated or single inoculation of PGPR or *B. japonicum*. The effects of simultaneous presence of coinoculation on the plant and bacterial response by the gene expression analyses were identified under soybean root and nodule associated stage. The early nodulation response genes including *nodD1, GmCaMK1* and *GmNIN1A* were monitored by RT-PCR on 7 DAI soybean roots. The coinoculation of *B. japonicum* and PGPR obviously enhanced the up-regulation of *nodD1* and *GmCCaMK* genes, but the

expression level of *GmNIN1A* gene was not significantly different from those of single inoculation. The relative expression levels of PGPR mode of action related genes including *iaaH* and *ipdC* were also up-regulated by coinoculation of *B. japonicum* and PGPR. Moreover, the expressions of soybean and the bacterial related genes (*GmMyb*, *otsA*, *phbC*, *dctA* and *nifH*) in nodule after single and coinoculation with *B. japonicum* and PGPR were identified using RT-PCR at different time frames. The results revealed that the related genes expression triggered discontinuously both up- and down regulations by *B. japonicum*-PGPR coinoculation. These results were in accordance with phenotyptic characters in Leonard's jar and field experiments in terms of enhancing the nodulation and N_2-fixation in soybean. The TEM micrograph of soybean nodule demonstrated densely packed poly-ß-hydroxybutyrate (PHB) granules within the bacteroids. PHBs were present in mature nodule of coinoculated treatments whilst those in single inoculated nodules were senescent. These results taken together suggest that the PGPR may facilitate the induction of trehalose accumulation and the transport of C4-dicarboxylic acids which present an increase in PHB accumulation, resulting in the enhanced nodulation and N_2-fixation in soybean. Therefore, the efficiency to enhance soybean N_2-fixation by PGPR S141 and S222 with *B. japonicum* coinoculation strategy could be developed for supreme inoculants for soybean.

School of Biotechnology

Academic Year 2013

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____