ต่านี่ พิมพ์พงศ์ : การคัดเลือกแบรดดี้ไรโซเบียมเพื่อการผลิตถั่วลิสงในสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (SELECTION OF BRADYRHIZOBIA FOR PEANUT PRODUCTION IN THE LAO PEOPLE'S DEMOCRATIC REPUBLIC) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง, 94 หน้า

คำสำคัญ: แบรดดี้ไรโซเบียม/ถั่วลิสง (*Arachis hypogea* L.)/การตรึงไนโตรเจน

แบรดดี้ไรโซเบียม *Bradyrhizobium* จัดเป็น Alphaproteobacteria ที่อยู่ในวงศ์ Bradyrhizobiaceae มีความสามารถในการตรึงในโตรเจนจากอากาศ ให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียที่พืชในตระกูลถั่วสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ อย่างไรก็ตามปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชตระกูลถั่วและแบรดดี้ไรโซเบียมนั้นถูกจำกัดด้วยความจำเพาะเจาะจงของชนิดและสายพันธุ์ถั่ว ดังนั้น การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบรดดี้ไรโซเบียมเพื่อนำไปใช้ เป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับพืชตะกูลถั่วจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น ถั่วลิสง (*Arachis hypogea* L.) เป็นพืชตระกูลถั่วที่ได้รับความนิยมและมีการปลูกมากที่สุดในประเทศ สปป. ลาว อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้ปุ๋ยชีวภาพนี้ยังไม่ได้รับความสนใจมากนัก ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของแบรดดี้ไรโซเบียมที่เหมาะสม มีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มความสามารถในการผลิตถั่วลิสงสำหรับพื้นที่ในประเทศ สปป. ลาว โดยคัดแยกเชื้อแบรดดี้ไรโซเบียม 14 สายพันธุ์ PMVTL-01, PMVTL-02, SMVTL-01, SMVTL-02, SPXBL-01, SPXBL-02, SPXBL-03, SPXBL-04, SPXBL-05, SPXBL-06, SPXBL-07, BLXBL-01, BLXBL-02 และ BLXBL-03 จากปมรากถั่วลิสง ที่ได้จากตัวอย่างดินจากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศ สปป. ลาว สายพันธุ์ PMVTL-01, SMVTL-02 และ BLXBL-03 เป็นเชื้อ 3 ลำดับแรกที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการเพิ่มความสามารถในการเจริญเติบโตของถั่วลิสง โดยทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ได้ถูกจำแนกเพิ่มเติมได้แก่ การวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ ชีวเคมี ความสามารถต้านทานสารปฏิชีวนะ และการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเทคนิค multilocus DNA sequencing ของยีน 16S rRNA และ 4 ยีนพื้นฐานได้แก่ *recA*, *atpD*, *glnII* และ *rpoB* พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์เหล่านี้เป็นแบคทีเรียในสกุล แบรดดี้ไรโซเบียม ซึ่งสายพันธุ์ PMVTL-01 และ SMVTL-02 มีความใกล้เคียงกับแบรดดี้ไรโซเบียมในกลุ่มของ *Bradyrhizobium* genosp. SA-3 Rp7b และ *B. zhanjiangense* ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ BLXBL-03 ใกล้เคียงกับ *Bradyrhizobium* sp. CCBAU51745 และ *B. manausense* BR3351 ความสามารถในการแข่งขันเข้าสร้างปมของสายพันธุ์เหล่านี้ทำการทดสอบโดยเปรียบเทียบกับแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ SUTN9-2::GFP ผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ SMVTL-02 เท่านั้นที่มีความสามารถในการเข้าสร้างปมสูงกว่าแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ SUTN9-2::GFP ที่อัตราส่วนของสายพันธุ์ SUTN9-2::GFP ต่อ แบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ SMVTL-02 ในสัดส่วน 1:9 พบว่า การเข้าสร้างปม ของสายพันธุ์ SUTN9-2::GFP อยู่ที่ (27.93% SUTN9-2::GFP และ 72.07% SMVTL-02)

ซึ่งในสัดส่วน 3:7 การเข้าสร้างปมอยู่ที่ (28.84% SUTN9-2::GFP และ 71.16% SMVTL-02) ในสัดส่วน 5:5 การเข้าสร้างปมอยู่ที่ (38.73% SUTN9-2::GFP และ 61.27% SMVTL-02) ในสัดส่วน 7:3 การเข้าสร้างปมอยู่ที่ (36.82% SUTN9-2::GFP และ 63.18% SMVTL-02) และในสัดส่วน 9:1 การเข้าสร้างปมอยู่ที่ (64.24% SUTN9-2::GFP และ 35.76% SMVTL-02) จากนั้นได้ทดสอบความสามารถในการเข้าสร้างปมของแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ SMVTL-02 ในระดับกระถาง ด้วยตัวอย่างดินจาก สปป. ลาว โดยใช้การติดตามโดย แบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ SMVTL-02 ที่มียีนในการติดตาม *DsRed* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีนที่มีการติดตามด้วยยีน *DsRed* มีความสามารถในการเข้าสร้างปมมากกว่าสายพันธุ์ตามธรรมชาติในดิน โดยสายพันธุ์ SMVTL-02::DsRed มีความสามรถในการเข้าสร้างปม 81.98% ขณะที่สายพันธุ์ประจำถิ่น อยู่ที่ 18.02% นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า Acetylene Reduction Assay (ARA) จำนวนปม น้ำหนักแห้งปม และน้ำหนักแห้งทั้งหมดของถั่วลิสง ที่ทำการทดลองปลูกในระดับกระถางร่วมกับการใช้ปุ๋ยชีวภาพ สายพันธุ์ SMVTL-02::DsRed มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่วลิสงสูงกว่าการไม่ใช้ปุ๋ยชีวภาพ ดังนั้นแบรดดี้ไรโซเบียมสายพันธุ์ SMVTL-02 จะถูกนำไปทดสอบในระดับแปลงต่อไป เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพในการผลิตถั่วลิสงใน สปป. ลาว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

TARNEE PHIMPHONG : SELECTION OF BRADYRHIZOBIA FOR PEANUT PRODUCTION IN THE LAO PEOPLE'S DEMOCRATIC REPUBLIC. THESIS ADVISOR : PROF. NEUNG TEAUMROONG, Ph.D., 94 PP.

Keyword: *Bradyrhizobium* sp./*Arachis hypogea* L./Nitrogen fixation

Bradyrhizobium sp. is Alphaproteobacteria bacteria (Family: Bradyrhizobiaceae) that can promote leguminous growth by fix N_2 and convert to bioavailable ammonium. However, the interaction between leguminous plant and *Bradyrhizobium* is limited and known as host specificity. Therefore, selection of an appropriate bradyrhizobial strain for use as biofertilizer inoculum for legume is necessary. Peanut (*Arachis hypogea* L.) is the most popular of legume production in Lao People's Democratic Republic (PDR). However, applications of biofertilizer have not been promoted. Therefore, the objective in this research was to obtain the appropriate bradyrhizobial strain which provides high efficiency in peanut production in the Lao PDR. The 14 strain bradyrhizobial isolates PMVTL-01, PMVTL-02, SMVTL-01, SMVTL-02, SPXBL-01, SPXBL-02, SPXBL-03, SPXBL-04, SPXBL-05, SPXBL-06, SPXBL-07, BLXBL-01, BLXBL-02 and BLXBL-03 were isolated from root nodules of *A. hypogea* L. trapped with Lao PDR soil samples. The isolates PMVTL-01, SMVTL-02 and BLXBL-03 were the top three showing high efficiency for peanut growth promotion. The top three isolates were characterized along with phenotypic, biochemical, physiological characteristics, antibiotic resistance profiles and multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene and four housekeeping genes (*recA*, *atpD*, *glnII*, and *rpoB*). The isolates were assigned to the genus *Bradyrhizobium* strains PMVTL-01 and SMVTL-02 were closely related with *Bradyrhizobium* genosp. SA-3 Rp7b and *B. zhanjiangense*, respectively, whilst strain BLXBL-03 was closely related with *Bradyrhizobium* sp. CCBAU51745 and *B. manausense* BR3351. The competitiveness of these strains with *Bradyrhizobium* sp. strain SUTN9-2::GFP was analyzed, the results indicated that only *Bradyrhizobium* sp. strain SMVTL-02 performed a number of occupied nodules higher than SUTN9-2::GFP, at 1:9 (27.93% SUTN9-2::GFP and 72.07% SMVTL-02), 3:7 (28.84% SUTN9-2::GFP and 71.16% SMVTL-02), 5:5 (38.73% SUTN9-2::GFP and 61.27% SMVTL-02), 7:3 (36.82% SUTN9-2::GFP and 63.18% SMVTL-02) and 9:1 (64.24% SUTN9-2::GFP

and 35.76% SMVTL-02). In addition, the competitiveness of selected strain *Bradyrhizobium* sp. strain SMVTL-02 in soil samples from Lao PDR in pot level was employed by tagging the SMVTL-02 with *DsRed* gene. The results demonstrated the DsRed-expressing tagged strain was higher in nodules occupancy than indigenous strains (81.98% SMVTL-02::DsRed and 18.02% indigenous). Moreover, the results of Acetylene Reduction Assay (ARA), nodules number, nodules dry weight and total plant dry weight from the pot experiment which was inoculated with SMVTL-02::DsRed strain indicated higher potential to promote peanut growth than non-inoculation. Thus, *Bradyrhizobium* sp. strain SMVTL-02 will be tested in the field prior to produce as biofertilizer inoculum for peanut production in Lao PDR.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology
Academic Year 2022

Student's Signature _____
Advisor's Signature _____
Co-advisor's Signature _____
Co-advisor's Signature _____