SUT3-304-56-12-29

รายงานการวิจัย

ประสิทธิภาพของเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการปรับปรุงให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มขึ้นโดยใช้เทคนิค metabolic evolution เมื่อใช้เป็นหัวเชื้อกับพืชตระกูลถั่วที่ปลูกภายใต้สภาวะเครียด

(Performance of metabolic evoluted ACC deaminase producing rhizobia as legume inoculant under stress conditions)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รายงานการวิจัย

ประสิทธิภาพของเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการปรับปรุงให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มขึ้นโดยใช้เทคนิค metabolic evolution เมื่อใช้เป็นหัวเชื้อกับพืชตระกูลถั่ว ที่ปลูกภายใต้สภาวะเครียด

(Performance of metabolic evoluted ACC deaminase producing rhizobia as legume inoculant under stress conditions)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรรณลดา ติตตะบุตร

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556 และดำเนินการภายใต้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ทดลอง และเครื่องมือวิเคราะห์โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

พฤษภาคม 2559

บทคัดย่อ

จากความสำเร็จเกี่ยวกับการใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับสาร ACC ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตฮอร์โมน ethylene ทำให้ปริมาณ ethylene ในพืชลดลงเมื่อเผชิญกับสภาวะเครียด ซึ่งส่งผลให้พืชที่ปลูกด้วยเชื้อที่มีคุณสมบัตินี้สามารถเจริญในสภาวะเครียดหรือสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้น ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จึงได้นำเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ที่ผ่านการพัฒนาให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มสูงขึ้นด้วยเทคนิค metabolic evolution (SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0) มาดำเนินการทดลองกับพืชตระกูลถั่ว 2 ชนิด คือ ถั่วเขียว (*Vigna radiata* สายพันธุ์ SUT4) และถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* สายพันธุ์ Tainan 9) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการเข้าสร้างปม และการตรึงไนโตรเจนที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงไประหว่างกระบวนการวิวัฒนาการ รวมทั้งทดสอบความสามารถในการลดความเครียดให้กับพืชเมื่อพืชต้องเผชิญกับสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม 3 รูปแบบคือ สภาวะแล้ง สภาวะเค็ม และสภาวะน้ำท่วมขัง จากผลการทดลองพบว่าเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution มีแนวโน้มสามารถเข้าสร้างปมและตรึงไนโตรเจนได้ดีไม่แตกต่างจากเชื้อดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญในการปลูกภายใต้สภาวะปกติ และเมื่อทำการทดลองภายใต้สภาวะเครียดในระยะเวลานานมากกว่า 2 อาทิตย์ พบว่าเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ดั้งเดิม เชื้อ SUTN9-2_2.5 และเชื้อ SUTN9-2_3.0 ยังคงเข้าสร้างปม และมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสได้ แต่สภาวะเครียดส่งผลกระทบต่อการเจริญของพืชตระกูลถั่วทั้งสองชนิดอย่างรุนแรง ถึงแม้โดยภาพรวมเชื้อ SUTN9-2_2.5 จะมีแนวโน้มที่จะสามารถลดปริมาณเอทธิลีนที่พืชปลดปล่อยออกมาได้มากกว่าเชื้อ SUTN9-2_3.0 หรือเชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิม แต่ก็ไม่สามารถช่วยให้พืชเจริญได้ดีเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ แต่อย่างไรก็ตามสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้มากกว่าพืชที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นเชื้อ SUTN9-2_2.5 ที่พัฒนาได้จากเทคนิค metabolic evolution สามารถนำเอาไปใช้ในสภาพไร่ได้ โดยในสถานการณ์จริงหากมีการปลูกภายใต้สภาวะปกติ หรือมีการเผชิญกับสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในระยะสั้น ๆ ก็อาจสามารถช่วยกระตุ้นให้พืชลดความเครียดได้ดีขึ้น และส่งเสริมการเจริญของพืชได้ต่อไป แต่หากเผชิญกับสถานการณ์ความเครียดอย่างรุนแรงการใช้เชื้อไรโซเบียมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ก็ไม่สามารถช่วยให้พืชเจริญได้เทียบเท่ากับสภาวะปกติ

Abstract

According to the successful of using bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase enzyme activity to degrade ACC, a precursor of ethylene synthesis in plant and resulted in reducing stress ethylene in plant and promote plant growth when encountering stress conditions. This research project gathered *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 wild-type which contain ACC deaminase activity and the metabolic evoluted strains (SUTN9-2_2.5 and SUTN9-2_3.0) in which developed higher ACC deaminase enzyme activity to test their symbiosis ability with 2 economic legumes, mungbean (*Vigna radiata* cv. SUT4) and peanut (*Arachis hypogaea* cv. Tainan 9). The plant growth experiments were performed under normal and 3 types of stress condition, including drought, salinity, and water logged, and then determined the nodulation, nitrogen fixation, and lowering of ethylene production ability which may be changed during the metabolic evolution process. The results showed that metabolic evoluted strains could nodulate and fix nitrogen as good as SUTN9-2 wild-type strain when planted under normal condition. Under extreme stress conditions of more than 2 weeks encountering the stress, the wild-type and metabolic evoluted strains still be able to nodulate and fix nitrogen. However, the extreme stress condition affected overall growth of legumes, although the metabolic evoluted strain SUTN9-2_2.5 tend to reduce stress ethylene more than that of SUTN9-2_3.0 or wild-type. Plant growth under extreme condition was still lower than that of plants grew under normal condition. Nevertheless, the ACC deaminase containing strains could support plant growth significantly higher than non-inoculated plants. In this case, the metabolic evoluted strain SUTN9-2_2.5 can be used as rhizobial inoculant for mungbean and peanut in the field under normal condition and take the benefit of ACC deaminase activity to reduce the stress ethylene and further support the growth when stress condition was appeared in a short period. However, bradyrhizobium containing high level of ACC deaminase activity in this study could not promote plant growth under extreme stress condition as good as that of 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 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	3
2.1 การเตรียมเชื้อไรโซเบียมสำหรับการทดสอบกับพืชตระกูลถั่ว	3
2.2 การทดสอบเชื้อที่ผ่านการพัฒนาประสิทธิภาพโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับพืชในสภาวะต่าง ๆ	3
2.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ	4
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล	5
3.1 การทดสอบเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับถั่วเขียวภายใต้สภาวะปกติ	5
3.2 การทดสอบเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับถั่วเขียวภายใต้สภาวะแล้ง	8
3.3 การทดสอบเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับถั่วเขียวภายใต้สภาวะเค็ม	11
3.4 การทดสอบเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับถั่วเขียวภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง	15
3.5 การทดสอบเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะปกติ	18
3.6 การทดสอบเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะแล้ง	21

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

3.7 การทดสอบเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะเค็ม..... 24

3.8 การทดสอบเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 27

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง..... 32

บรรณานุกรม..... 33

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 การทดสอบเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution กับถั่วเขียวภายใต้สภาวะปกติ..... 6

รูปที่ 2 น้ำหนักแห้ง (plant dry weight) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะปกติ 6

รูปที่ 3 จำนวนปม (number of nodule) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะปกติ 7

รูปที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะปกติ..... 7

รูปที่ 5 ปริมาณเอทธีลีน (ethylene) ของถั่วเขียวที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะปกติ..... 8

รูปที่ 6 การทดสอบเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution กับถั่วเขียวภายใต้สภาวะแล้ง..... 9

รูปที่ 7 น้ำหนักแห้ง (plant dry weight) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะแล้ง 9

รูปที่ 8 จำนวนปม (number of nodule) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะแล้ง 10

รูปที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะแล้ง..... 10

รูปที่ 10 ปริมาณเอทธีลีน (ethylene) ของถั่วเขียวที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะแล้ง..... 11

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 11 การทดสอบเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution กับถั่วเขียวภายใต้สภาวะเค็ม..... 12

รูปที่ 12 น้ำหนักแห้ง (plant dry weight) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะเค็ม..... 13

รูปที่ 13 จำนวนปม (number of nodule) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะเค็ม..... 13

รูปที่ 14 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะเค็ม..... 14

รูปที่ 15 ปริมาณเอทธีลีน (ethylene) ของถั่วเขียวที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะเค็ม..... 14

รูปที่ 16 การทดสอบเชื้อ Bradyrhizobium sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution กับถั่วเขียวภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 16

รูปที่ 17 น้ำหนักแห้ง (plant dry weight) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 16

รูปที่ 18 จำนวนปม (number of nodule) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ Bradyrhizobium sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 17

รูปที่ 19 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 17

รูปที่ 20 ปริมาณเอทธีลีน (ethylene) ของถั่วเขียวที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 18

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 21 การทดสอบเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะปกติ 19

รูปที่ 22 น้ำหนักแห้ง (plant dry weight) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะปกติ 19

รูปที่ 23 จำนวนปม (number of nodule) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะปกติ 20

รูปที่ 24 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะปกติ..... 20

รูปที่ 25 ปริมาณเอทธีลีน (ethylene) ของถั่วลิสงที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะปกติ..... 21

รูปที่ 26 การทดสอบเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะแล้ง..... 22

รูปที่ 27 น้ำหนักแห้ง (plant dry weight) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะแล้ง 22

รูปที่ 28 จำนวนปม (number of nodule) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะแล้ง..... 23

รูปที่ 29 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะแล้ง..... 23

รูปที่ 30 ปริมาณเอทธีลีน (ethylene) ของถั่วลิสงที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะแล้ง..... 24

รูปที่ 31 การทดสอบเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะเค็ม..... 25

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 32 น้ำหนักแห้ง (plant dry weight) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะเค็ม..... 25

รูปที่ 33 จำนวนปม (number of nodule) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะเค็ม..... 26

รูปที่ 34 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะเค็ม..... 26

รูปที่ 35 ปริมาณเอทธีลีน (ethylene) ของถั่วลิสงที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะเค็ม..... 27

รูปที่ 36 การทดสอบเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 28

รูปที่ 37 น้ำหนักแห้ง (plant dry weight) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 28

รูปที่ 38 จำนวนปม (number of nodule) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 29

รูปที่ 39 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 29

รูปที่ 40 ปริมาณเอทธีลีน (ethylene) ของถั่วลิสงที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง..... 30

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

จากการพบว่าเชื้อไรโซเบียมที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ซึ่งสามารถทำปฏิกริยากับสาร 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตฮอร์โมน ethylene จึงทำให้ปริมาณฮอร์โมน ethylene ในพืชลดลงเมื่อเผชิญกับสภาวะเครียด ส่งผลให้พืชมีระบบรากที่เจริญและสมบูรณ์ขึ้น พืชจึงมีโอกาสในการดูดซับสารอาหารในดินได้มากขึ้น (Madhaiyan et al. 2006; Belimov et al. 2001) และช่วยให้พืชสามารถเจริญในสภาวะการปลูกที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้นอีกด้วย (Mayak et al. 2004; Cheng et al. 2007; Saravanakumar and Samiyappan 2007) แต่อย่างไรก็ตามเชื้อไรโซเบียมโดยทั่วไปมีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในระดับไม่มากนักเมื่อเทียบกับเชื้อในกลุ่ม PGPR ดังนั้นการพัฒนาเชื้อไรโซเบียมโดยการปรับปรุงให้มีกิจกรรมของเอนไซม์นี้เพิ่มขึ้นจึงอาจเป็นวิธีการที่สำคัญที่จะสามารถนำเชื้อไรโซเบียมนี้ไปใช้กับพืชตระกูลถั่วที่อาจเผชิญปัญหาจากสภาวะอากาศที่ไม่เหมาะสมได้ต่อไป

ทั้งนี้การปรับปรุงเชื้อไรโซเบียมให้มีคุณสมบัติเป็นไปตามที่ต้องการโดยใช้เทคนิค metabolic evolution เป็นแนวทางที่สามารถเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของเชื้อได้โดยอาศัยการปรับตัว และการคัดเลือกทางธรรมชาติเพื่อให้ได้เชื้อที่มีลักษณะหรือคุณสมบัติตามต้องการโดยไม่อาศัยการเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ดังนั้นเชื้อไรโซเบียมที่ปรับปรุงได้อาจจะมีคุณสมบัติตามที่ต้องการเพิ่มขึ้น และในขณะเดียวกันอาจมีคุณสมบัติพื้นฐานในการเจริญ หรือการอยู่อาศัยร่วมกับพืชที่เปลี่ยนแปลงไป อย่างไรก็ตามการเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์ในการลดความเครียดให้กับพืชหากพืชต้องเผชิญกับสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม น่าจะทำให้เชื้อไรโซเบียมที่พัฒนาได้นี้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ ได้ดีขึ้นกว่าการใช้เชื้อไรโซเบียมดั้งเดิม ดังนั้นเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการปรับปรุงให้มีกิจกรรม ACC deaminase ตามต้องการโดยใช้เทคนิค metabolic evolution ควรได้รับการประเมินเบื้องต้นในการใช้เป็นหัวเชื้อไรโซเบียมเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการเข้าสร้างปม และการตรึงไนโตรเจนที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงไประหว่างกระบวนการวิวัฒนาการ รวมทั้งทดสอบความสามารถในการลดความเครียดให้กับพืชเมื่อพืชต้องเผชิญกับสภาะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาวะแล้ง สภาวะเค็ม สภาวะน้ำท่วมขัง เป็นต้น โดยหากเชื้อที่พัฒนาได้จากเทคนิคดังกล่าวสามารถเข้าสร้างปม และตรึงไนโตรเจน รวมทั้งช่วยให้พืชเจริญในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ ได้ดีขึ้น ก็จะสามารถนำแนวทางนี้ไปใช้ในการพัฒนาเชื้อไรโซเบียมเพื่อใช้ในสภาพไร่ได้ต่อไป เนื่องจากเป็นเชื้อไรโซเบียมที่พัฒนาได้โดยไม่ใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อให้ทราบความสามารถในการเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่ว และความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อที่ผ่านการพัฒนาประสิทธิภาพโดยใช้เทคนิค metabolic evolution ในสภาวะปกติ

1.2.2 เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเมื่อปลูกภายใต้สภาวะเครียดแบบต่าง ๆ

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

เชื้อไรโซเบียมที่มีการปรับปรุงเพื่อให้มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มขึ้นโดยใช้เทคนิค metabolic evolution ได้ถูกนำมาตรวจสอบคุณสมบัติการเจริญของเชื้อในอาหาร ความสามารถในการเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่ว และความสามารถในการตรึงไนโตรเจนเปรียบเทียบกับเชื้อดั้งเดิม จากนั้นทำการปลูกเชื้อให้กับถั่วเขียว และถั่วลิสง แล้วตรวจสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเมื่อปลูกภายใต้สภาวะเครียดแบบต่าง ๆ คือ สภาวะขาดน้ำ สภาวะน้ำท่วมขัง และสภาวะเค็ม โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเชื้อไรโซเบียมดั้งเดิม

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

ได้ทราบข้อมูลการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการเจริญ การเข้าสร้างปม และการตรึงไนโตรเจนในเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการปรับปรุงโดยใช้เทคนิค metabolic evolution รวมทั้งได้ทราบประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญของพืชตระกูลถั่วเมื่อปลูกในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ โดยหัวเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยเทคนิคนี้ ซึ่งหากประสบผลสำเร็จ หน่วยงานต่าง ๆ เช่น กรมวิชาการเกษตร นักวิชาการ และเกษตรกร สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมเชื้อไรโซเบียมสำหรับการทดสอบกับพืชตระกูลถั่ว

จากโครงการย่อยที่ 1 ได้พัฒนาเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มขึ้นโดยใช้เทคนิค metabolic evolution ซึ่งทำให้ได้เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ SUTN9-2 ที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของสาร ACC ที่ 2.5 mM (SUTN9-2_2.5) และ 3.0 mM (SUTN9-2_3.0) จากนั้นนำเชื้อที่พัฒนาได้มาทดสอบความสามารถในการเข้าสร้างปมกับถั่วเขียว (*Vigna radiata* สายพันธุ์ SUT4) และถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* สายพันธุ์ Tainan 9) ภายใต้สภาวะต่าง ๆ โดยทำการเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild-type) และสายพันธุ์ที่พัฒนาได้ในอาหารเหลว YEM จนกระทั่งเซลล์เข้าสู่ระยะ late log phase จากนั้นล้างเซลล์และละลายในสารละลาย 0.85% NaCl แล้วปรับให้เชื้อมีจำนวนเซลล์ที่ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยทำการนับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตในสารละลายเริ่มต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ hemocytometer แล้วนำไปทดสอบกับถั่วชนิดต่าง ๆ โดยทำการปลูกเชื้อ (inoculation) ที่จำนวน 10^8 เซลล์ต่อเมล็ด เทียบกับถั่วที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (non-inoculation)

2.2 การทดสอบเชื้อที่ผ่านการพัฒนาประสิทธิภาพโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับพืชในสภาวะต่าง ๆ

นำเมล็ดถั่วที่ต้องการทดสอบมาทำการฆ่าเชื้อปนบนผิวเมล็ดก่อนการเพาะ โดยนำถั่วแช่ใน 95% (v/v) แอลกอฮอลล์ เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อจำนวน 3 ครั้ง แล้วแช่ใน 3% (w/v) โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaClO) เป็นเวลา 5 นาที โดยทำการเขย่าเบา ๆ เป็นครั้งคราว จากนั้นล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อจำนวน 6 ครั้ง แล้วแช่ในน้ำปลอดเชื้อ 1 คืน เมื่อเมล็ดดูดน้ำเข้าไปแล้วให้นำมาเพาะบน Water agar เพื่อให้เมล็ดงอกเป็นเวลา 1 คืน เมื่อรากงอกแล้วนำไปปลูกใน Leonard's jar (กรณีทดสอบในทุก ๆ สภาวะ ยกเว้นสภาวะน้ำท่วมขัง) ที่บรรจุเวอร์มิคูไลท์ผสมทรายในอัตราส่วน 1:1 เป็นวัสดุปลูก ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ภายใต้สภาวะควบคุมการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากปลูกได้ 2 วัน ทำการปลูกเชื้อ (inoculation) ไรโซเบียมที่ปริมาณเซลล์ 10^8 เซลล์ต่อเมล็ด เทียบกับถั่วลิสงที่ไม่ได้มีการปลูกเชื้อ (control; non-inoculation) ในสภาวะต่าง ๆ ดังนี้

สภาวะปกติ: เติมธาตุอาหารสาหรับพืชโดยใช้ N-free medium ที่ไม่มีไนโตรเจน (Somasegaran and Hoben, 1994) ทำการปลูกพืชเป็นเวลา 30 วัน สำหรับถั่วเขียว และ 37 วัน สำหรับถั่วลิสง แล้วจึงเก็บข้อมูลผลการทดลอง

สภาวะแล้ง: เติมธาตุอาหารสำหรับพืชโดยใช้ N-free medium ที่ไม่มีไนโตรเจน (Somasegaran and Hoben, 1994) ทั้งนี้ทำการปลูกพืชเป็นเวลา 14 วัน ภายใต้สภาวะปกติ จากนั้นจำลองสถานการณ์สภาวะแล้งโดยงดการให้น้ำ แล้วปลูกต่อจนพืชเริ่มแสดงอาการใบเหี่ยว ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เวลาปลูกทั้งหมดรวม 26 วัน (สำหรับถั่วเขียว) และ 24 วัน (สำหรับถั่วลิสง) พืชจึงแสดงอาการเหี่ยว จึงทำการเก็บข้อมูลผลการทดลอง

สภาวะเค็ม: เติมธาตุอาหารสำหรับพืชโดยใช้ N-free medium ที่ไม่มีไนโตรเจน (Somasegaran and Hoben, 1994) ทั้งนี้ทำการปลูกพืชเป็นเวลา 14 วัน ภายใต้สภาวะปกติ จากนั้นจำลองสถานการณ์สภาวะเค็ม โดยเทอาหารสำหรับพืชแบบปกติออก แล้วเติมอาหารสำหรับพืชที่มีเกลือ (NaCl) 50 มิลลิโมลาร์ (สำหรับถั่วเขียว) และ 75 มิลลิโมลาร์ (สำหรับถั่วลิสง) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ส่งผลกระทบต่อการเจริญของพืชแทน แล้วปลูกต่อจนครบเวลา 30 วัน จึงเก็บข้อมูลผลการทดลอง

สภาวะน้ำท่วมขัง: ทำการปลูกถั่วเขียวโดยใช้เวอร์มิคูไลท์ (vermiculite) ผสมกับทรายอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เป็นวัสดุปลูก ปริมาตร 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในแก้วพลาสติกขนาด 500 ลูกบาศก์เซนติเมตรแล้วเติมธาตุอาหารสำหรับพืชโดยใช้ N-free medium ที่ไม่มีไนโตรเจน (Somasegaran and Hoben, 1994) ทั้งนี้ทำการปลูกพืชเป็นเวลา 14 วัน ภายใต้สภาวะปกติ จากนั้นจำลองสถานการณ์สภาวะน้ำท่วมขังโดยเติมอาหารพืชให้ท่วมสูง 1 นิ้ว จากผิววัสดุปลูก แล้วปลูกต่อจนครบเวลา 30 วัน

เมื่อครบกำหนดระยะการปลูกทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส และตรวจสอบปริมาณ ethylene ที่ปลดปล่อยออกมาจากพืช โดยใช้ Gas Chromatography ตามวิธีการมาตรฐาน (Somasegaran and Hoben, 1994) และตรวจวัดน้ำหนักต้นแห้ง น้ำหนักรากแห้ง จำนวนปม และน้ำหนักปม เพื่อเปรียบเทียบการเจริญในสภาวะต่าง ๆ

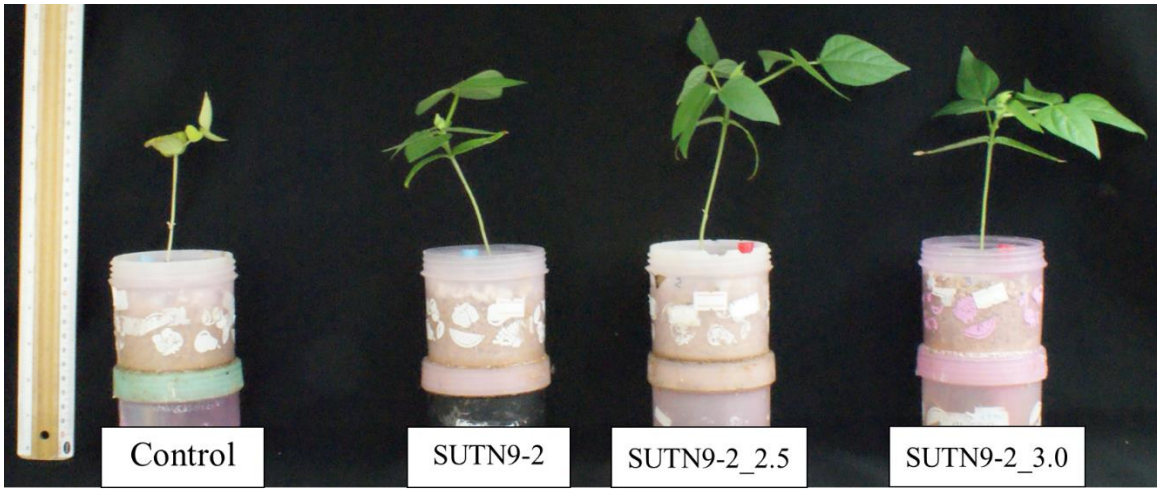
2.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ ที่ได้จากแต่ละการทดลอง ได้นำมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS version 17 Windows (SPSS Inc., Chicago, IL) โดยวิเคราะห์ Anova และ Duncan’s multiple range test (Duncan 1955)

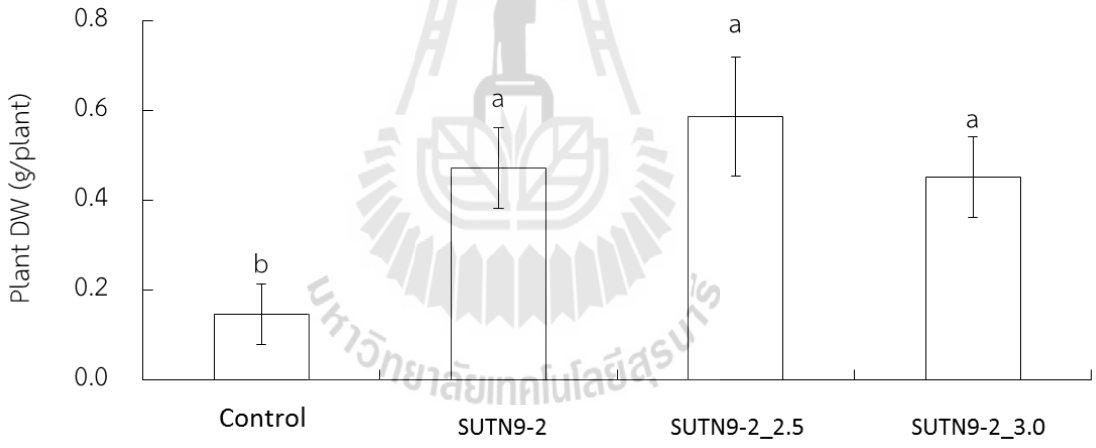
บทที่ 3
ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 การทดสอบเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับถั่วเขียวภายใต้สภาวะปกติ

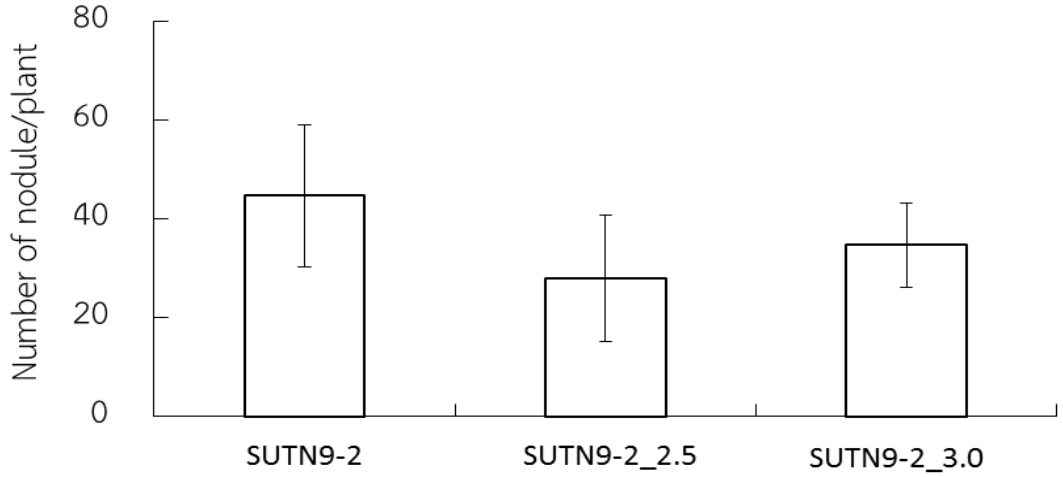
โดยภาพรวมภายใต้สภาวะปกติ เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 สามารถตรึงไนโตรเจนและส่งเสริมการเจริญของถั่วเขียวภายใต้สภาวะปกติได้ดี โดยส่งผลให้พืชมีน้ำหนักต้นที่สูงกว่าตำรับที่ไม่ได้ใส่เชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ถั่วเขียวที่ทำการปลูกเชื้อ (inoculation) ด้วย *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ที่ผ่านการพัฒนาให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มขึ้นด้วยเทคนิค metabolic evolution สามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วเขียวภายใต้สภาวะปกติได้ดีเช่นกัน โดยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2_2.5 มีแนวโน้มส่งเสริมการเจริญเติบโตได้สูงที่สุดโดยส่งผลให้มีน้ำหนักต้นหลังจากอบแห้งอยู่ที่ประมาณ 6 กรัมต่อต้น แต่อย่างไรก็ตามไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการใช้เชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิม (wild-type) หรือเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution อีกสายพันธุ์หนึ่งคือ SUTN9-2_3.0 (รูปที่ 1 และ 2) นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบจำนวนปมและกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งบ่งบอกถึงประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของถั่วเขียวพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเชื้อดั้งเดิมและเชื้อที่ผ่านการพัฒนาแล้ว โดยมีการติดปมอยู่ในช่วง 30-45 ปมต่อต้น และมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในช่วง 18-20 ไมโครโมลเอทธิลีนต่อชั่วโมงต่อกรัมของน้ำหนักปมแห้ง (รูปที่ 3 และ 4) และเมื่อตรวจสอบปริมาณ ethylene ที่ปลดปล่อยออกมาจากพืชที่ทดสอบในตำรับต่าง ๆ พบว่าในสภาวะปกติพืชมีการปลดปล่อย ethylene ออกมาเช่นกัน โดยถั่วเขียวที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อปลดปล่อยเอทธิลีนอยู่ที่ประมาณ 9 นาโนโมลต่อกรัมน้ำหนักแห้งพืช ในขณะที่ถั่วเขียวที่ปลูกเชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิม หรือที่ผ่านการพัฒนา มีการปลดปล่อย ethylene อยู่ในช่วง 3-5 นาโนโมลต่อกรัมของน้ำหนักแห้งพืช ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับตำรับที่ไม่ได้มีการปลูกเชื้อ (รูปที่ 5) ดังนั้นจากการทดลองภายใต้สภาวะปกติแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ไม่มีความแตกต่างจากเชื้อดั้งเดิมเมื่อปลูกภายใต้สภาวะปกติ



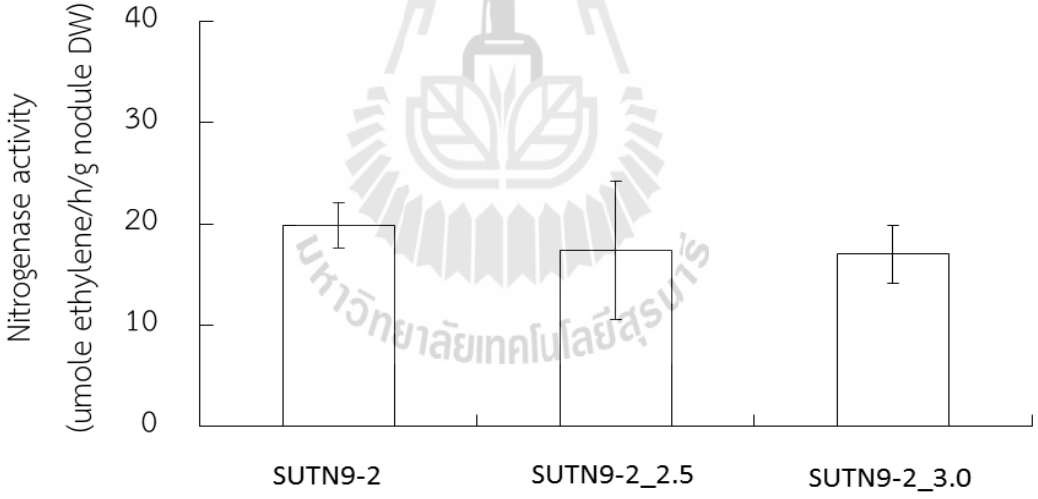
รูปที่ 1 การทดสอบเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution กับถั่วเขียวภายใต้สภาวะปกติ



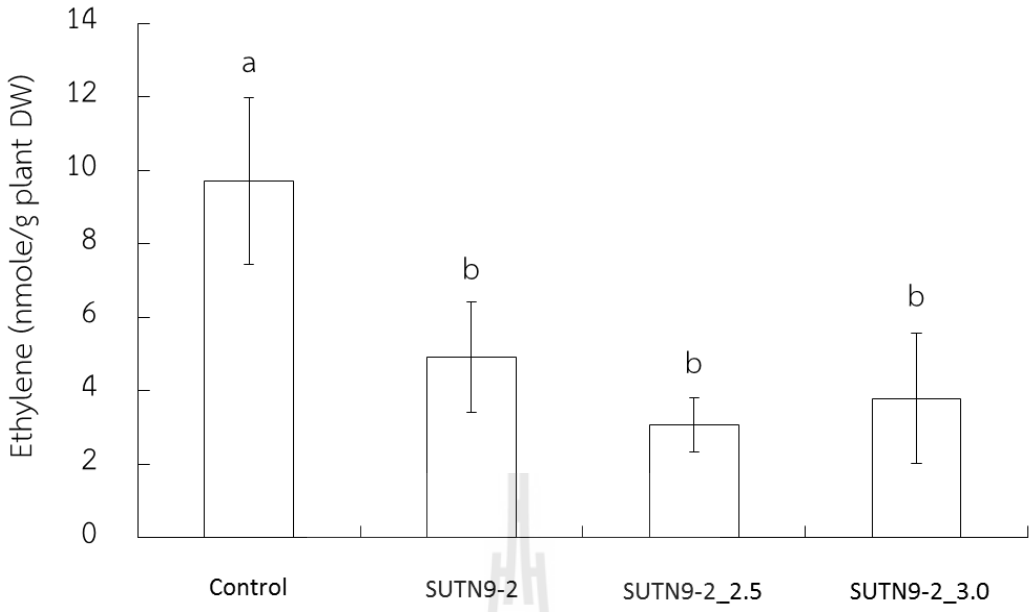
รูปที่ 2 น้ำหนักแห้ง (plant dry weight) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะปกติ



รูปที่ 3 จำนวนปม (number of nodule) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะปกติ



รูปที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะปกติ

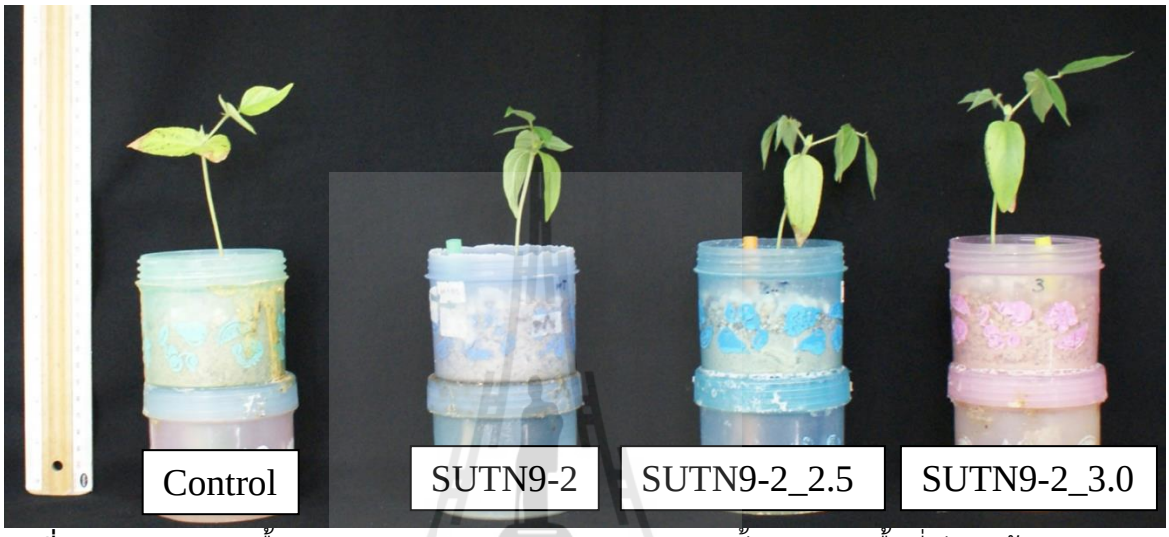


รูปที่ 5 ปริมาณเอทธีลีน (ethylene) ของถั่วเขียวที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะปกติ

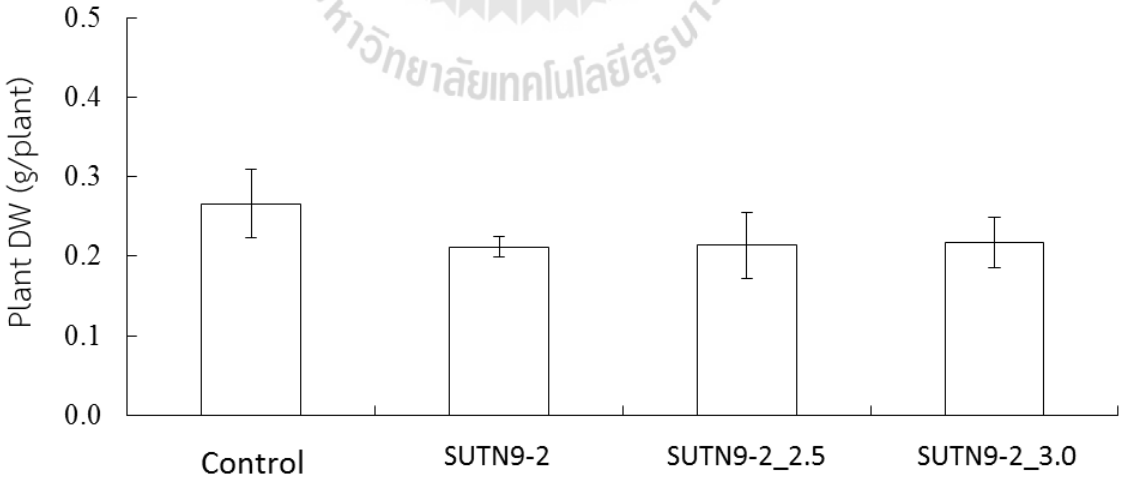
3.2 การทดสอบเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับถั่วเขียวภายใต้สภาวะแล้ง

เมื่อทำการทดสอบเชื้อไรโซเบียมกับถั่วเขียวเมื่อปลูกภายใต้สภาวะแล้ง ผลการทดลองพบว่าเชื้อไรโซเบียมยังสามารถเข้าสร้างปมและตรึงไนโตรเจนได้ โดยใบพืชที่ปลูกเชื้อไรโซเบียมมีสีเขียวมากกว่าพืชที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามโดยภาพรวมพืชยังคงมีอาการเหี่ยวหลังจากงดให้น้ำ โดยส่งผลให้มีการเจริญที่ไม่สมบูรณ์เมื่อเทียบกับสภาวะปกติ แสดงให้เห็นว่าสภาวะการขาดน้ำส่งผลต่อการเจริญของถั่วเขียวโดยตรง ที่ทำให้การปลูกเชื้อไรโซเบียมไม่สามารถทำให้พืชมีน้ำหนักต้นแตกต่างจากตำรับที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (รูปที่ 6 และ 7) ในกรณีของเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution (SUTN9-2_3.0) ถึงแม้จะมีแนวโน้มในการเข้าสร้างปมกับถั่วเขียวได้สูงที่สุด และดีกว่าเชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิม แต่ก็ไม่สามารถช่วยให้พืชมีการตรึงไนโตรเจนได้แตกต่างจากเชื้ออื่นที่ทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 8 และ 9) และเมื่อตรวจสอบปริมาณเอทธิลีนที่ปลดปล่อยออกมาจากพืชพบว่าไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละตำรับการทดลอง โดยมีปริมาณเอทธิลีนอยู่ในช่วง 3-4 นาโนโมลต่อกรัมของน้ำหนักแห้งพืช (รูปที่ 10) ทั้งนี้ปริมาณเอทธิลีนที่ปลดปล่อยออกมาถูกตรวจพบในปริมาณน้อยในการทดลองนี้ อาจเนื่องมาจากพืชอาจมีการปลดปล่อยเอทธิลีนในช่วงก่อนหน้านี้ที่พืชเริ่มมีความเครียดจากการขาดน้ำ แต่ในการทดลองได้ทำการตรวจวัดในระยะที่พืชอาจมีอาการเหี่ยวมากเกินไป ซึ่งอาจทำให้

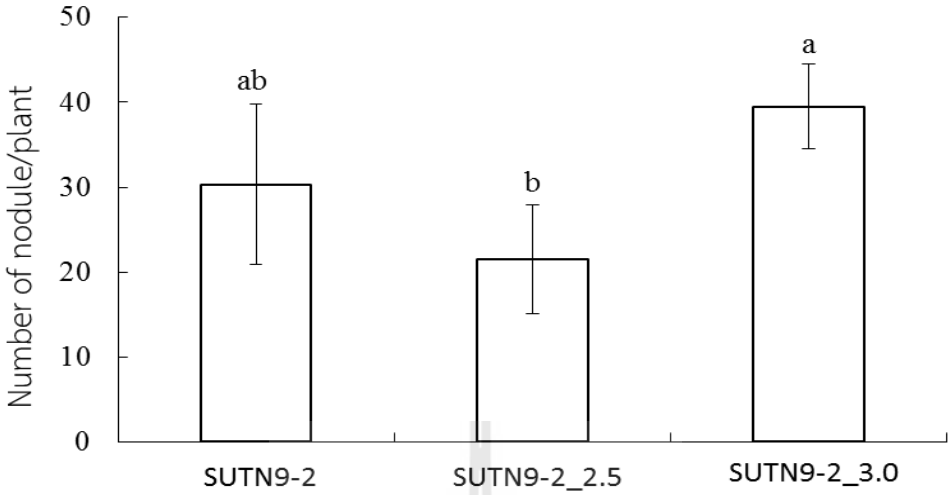
ไม่พบกิจกรรมของพืชในช่วงนี้ ดังนั้นในสภาวะแล้งจึงไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าเชื้อที่พัฒนาจากเทคนิค metabolic evolution สามารถลดความเครียดโดยการลดปริมาณเอทธิลีนที่พืชผลิตได้มากกว่าพืชที่ปลูกด้วยเชื้อดั้งเดิมหรือไม่ แต่อย่างไรก็ตามในภาพรวมพบว่าสภาวะแล้งอย่างรุนแรงส่งผลโดยตรงต่อการเจริญของพืช โดยการใช้เชื้อไรโซเบียมถึงแม้จะสามารถเข้าสร้างปมได้ แต่ไม่สามารถทำให้ถั่วเขียวเจริญได้เทียบเท่ากับสภาวะปกติ



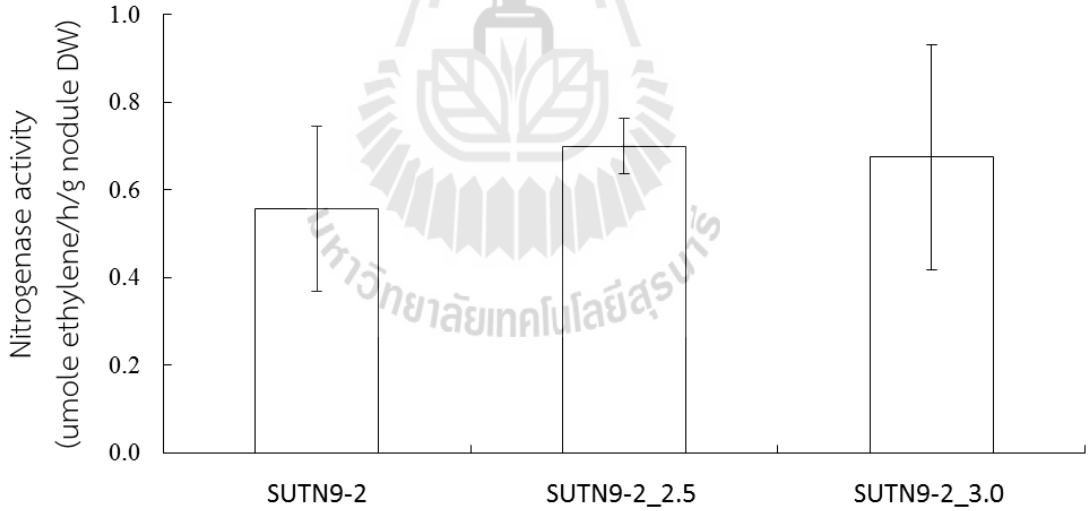
รูปที่ 6 การทดสอบเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution กับถั่วเขียวภายใต้สภาวะแล้ง



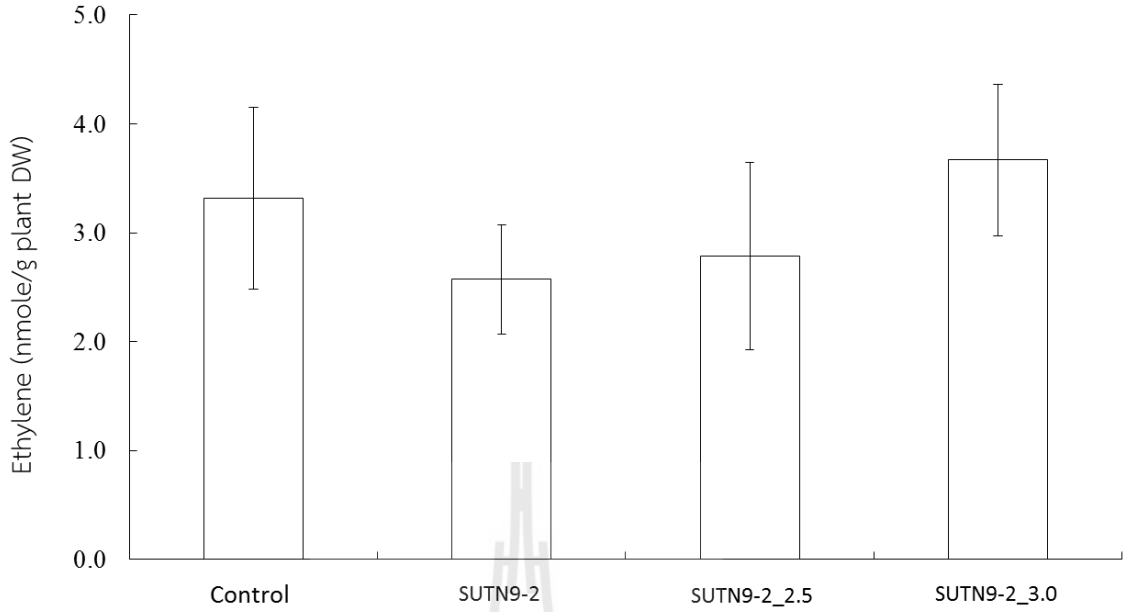
รูปที่ 7 น้ำหนักแห้ง (plant dry weight) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะแล้ง



รูปที่ 8 จำนวนปม (number of nodule) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะแล้ง



รูปที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะแล้ง

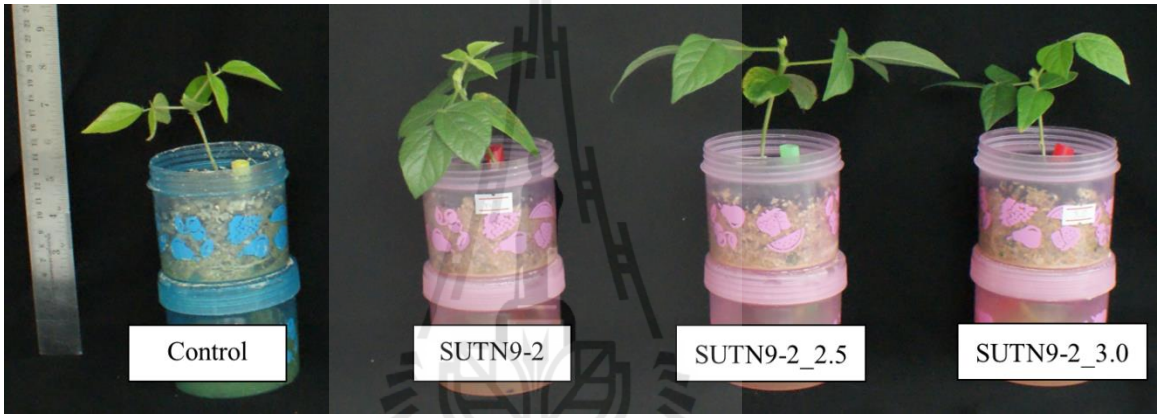


รูปที่ 10 ปริมาณเอทธีลีน (ethylene) ของถั่วเขียวที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะแล้ง

3.3 การทดสอบเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับถั่วเขียวภายใต้สภาวะเค็ม

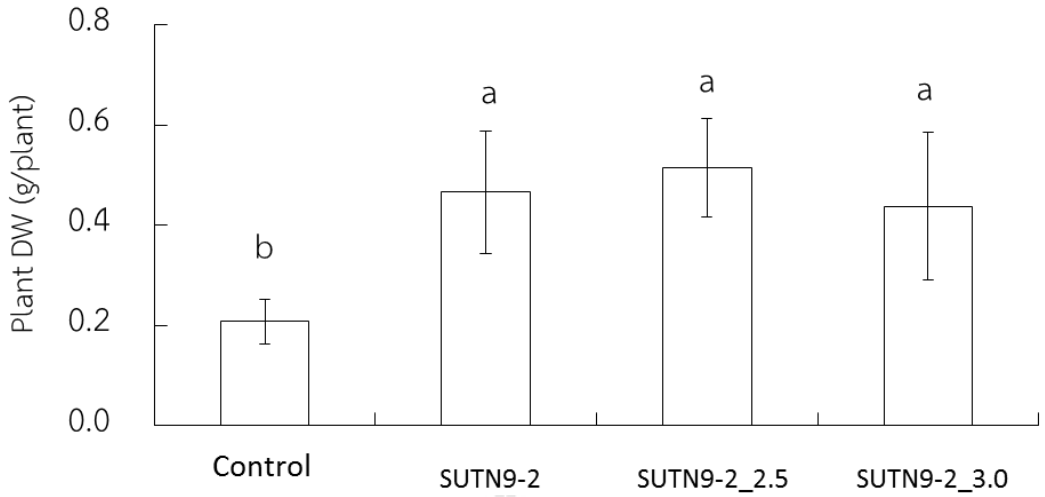
ผลการทดสอบโดยรวมพบว่าถั่วเขียวที่ปลูกเชื้อไรโซเบียมมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าถั่วเขียวที่ไม่ได้ใช้เชื้อไรโซเบียม ทั้งนี้ในภาพรวมการปลูกถั่วเขียวภายใต้สภาวะเค็มที่ความเข้มข้นเกลือ 50 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้ถั่วเขียวมีการเจริญลดลงเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ ทั้งนี้เมื่อตรวจสอบน้ำหนักแห้งของถั่วเขียวพบว่าการใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 และเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่แตกต่างจากตำรับควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อไรโซเบียม (รูปที่ 11 และ 12) โดยเมื่อตรวจสอบจำนวนปมพบว่าภายใต้สภาวะเค็มเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution SUTN9-2_2.5 สามารถสร้างปมกับถั่วเขียวได้มากที่สุด (30-40 ปม) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับตำรับที่ใช้เชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิม อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อ SUTN9-2_3.0 ให้จำนวนปมน้อยที่สุด (รูปที่ 13) ซึ่งผลของจำนวนปมที่ได้สอดคล้องไปในทางเดียวกันกับผลของกิจกรรมการตรึงไนโตรเจน (รูปที่ 14) และเมื่อตรวจสอบปริมาณเอทธิลีนที่ปลดปล่อยออกมาจากพืชภายใต้สภาวะเค็มพบว่ามีปริมาณสูงมากกกว่าการปลูกภายใต้สภาวะเครียดแบบอื่น ๆ โดยพบว่าพืชที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อมีการปลดปล่อยเอทธิลีนอยู่ในช่วง 80-90 นาโนโมลล์ต่อน้ำหนักแห้ง ซึ่งอยู่ในระดับเดียวกับปริมาณเอทธิลีนจากถั่วเขียวที่ปลูกด้วยเชื้อ SUTN9-2_3.0 ในขณะที่ถั่วเขียวที่ปลูกเชื้อ

SUTN9-2 และ SUTN9-2_2.5 มีปริมาณเอทธิลีนที่ปลดปล่อยออกมาอยู่ในช่วง 30-40 นาโนโมลล์ต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 15) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ถึงแม้จะมุ่งเน้นให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มขึ้น แต่การพัฒนาด้วยเทคนิคนี้ไม่สามารถคาดเดาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางด้านอื่นของเซลล์แบคทีเรียได้ การที่เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2_3.0 ไม่สามารถลดปริมาณเอทธิลีนที่ปลดปล่อยออกมาจากถั่วเขียวเมื่อเทียบกับตำรับควบคุมในการปลูกภายใต้สภาวะเค็ม อาจเป็นไปได้ที่ยีน หรือเมทาบอลิซึมของเชื้ออื่น ๆ อาจมีการเปลี่ยนแปลงและอาจทำให้ไม่สามารถทำงานได้ดีภายใต้สภาวะเค็ม ดังนั้นการพัฒนาเชื้อไรโซเบียมด้วยวิธีนี้จึงต้องมีการทดสอบในสภาวะต่าง ๆ ก่อนนำไปใช้จริง

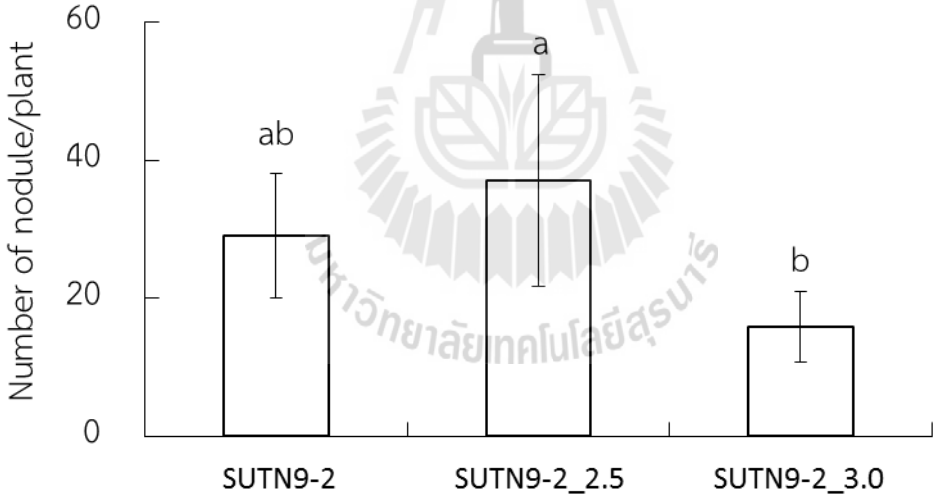


รูปที่ 11 การทดสอบเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution กับถั่วเขียวภายใต้สภาวะเค็ม

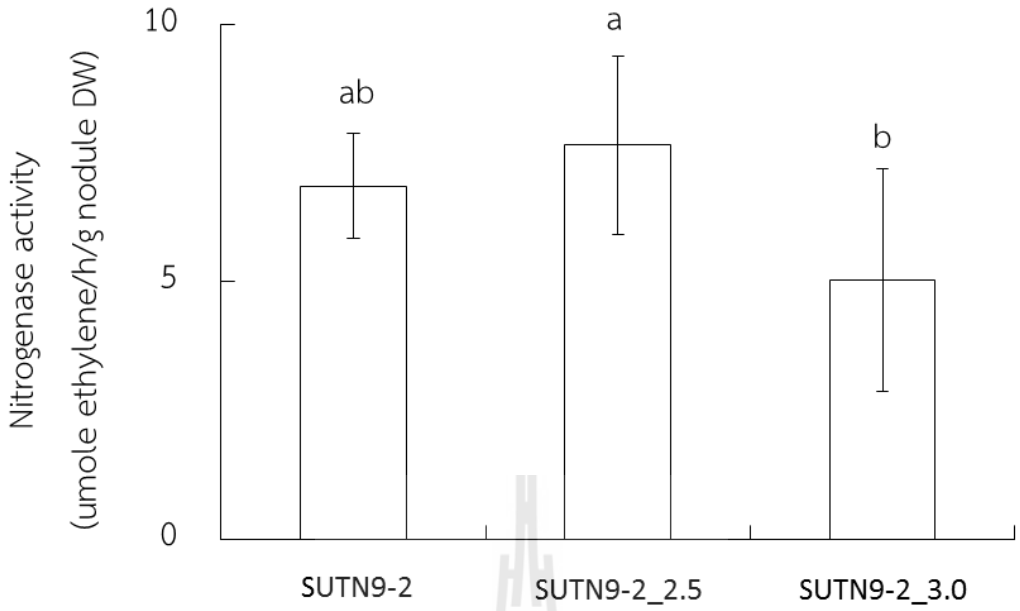
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



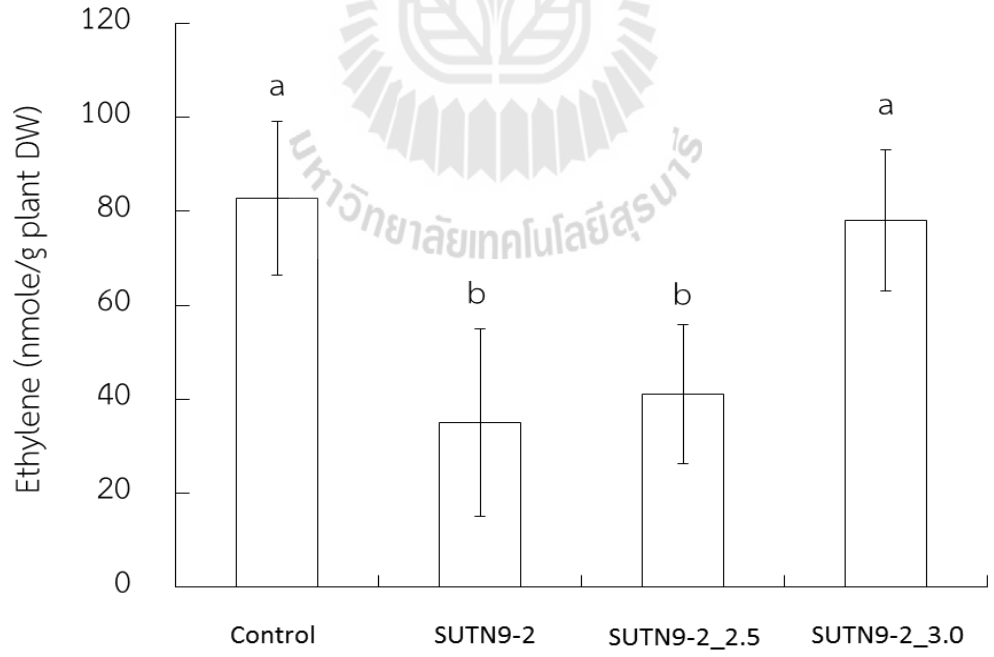
รูปที่ 12 น้ำหนักแห้ง (plant dry weight) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะเค็ม



รูปที่ 13 จำนวนปม (number of nodule) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะเค็ม



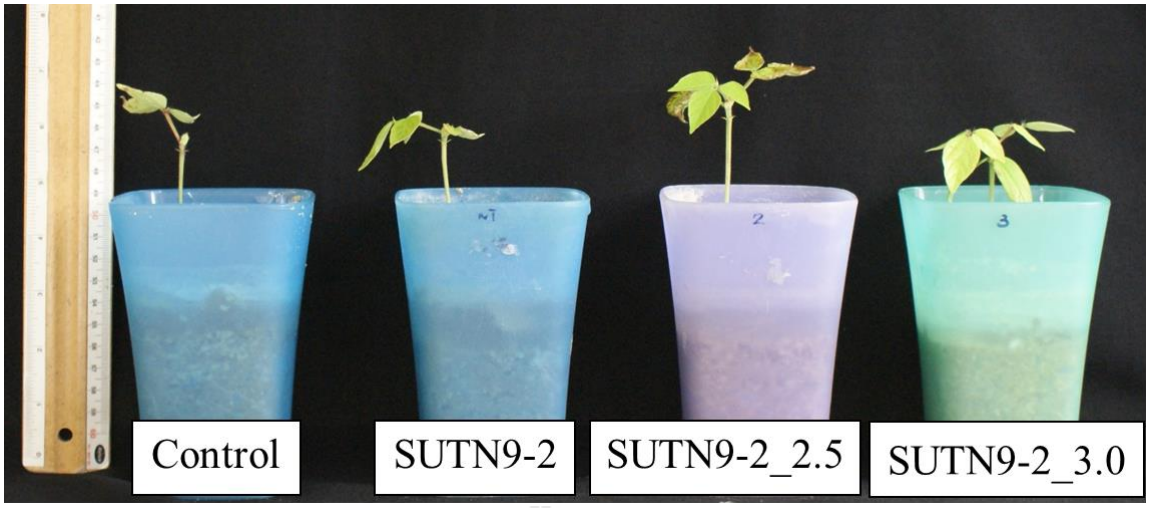
รูปที่ 14 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะเค็ม



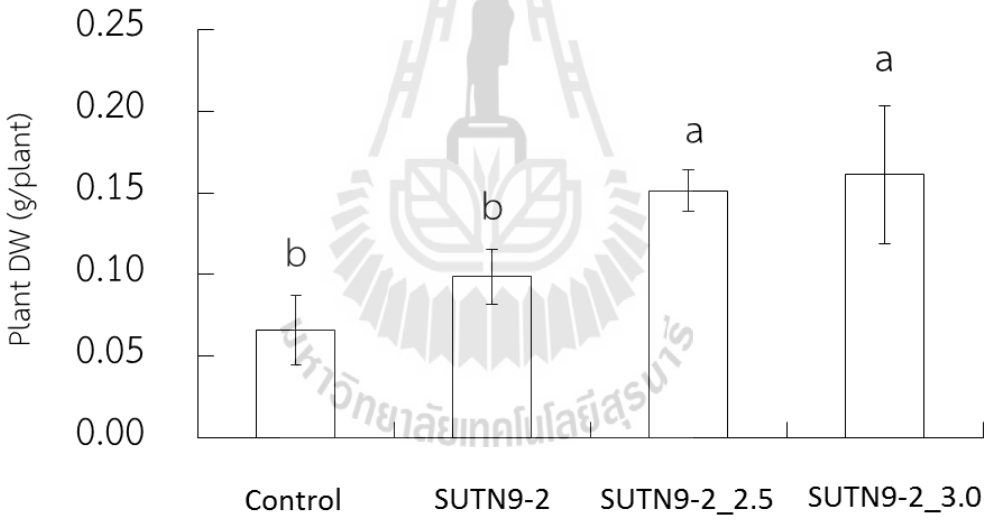
รูปที่ 15 ปริมาณเอทธีลีน (ethylene) ของถั่วเขียวที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะเค็ม

3.4 การทดสอบเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับถั่วเขียวภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง

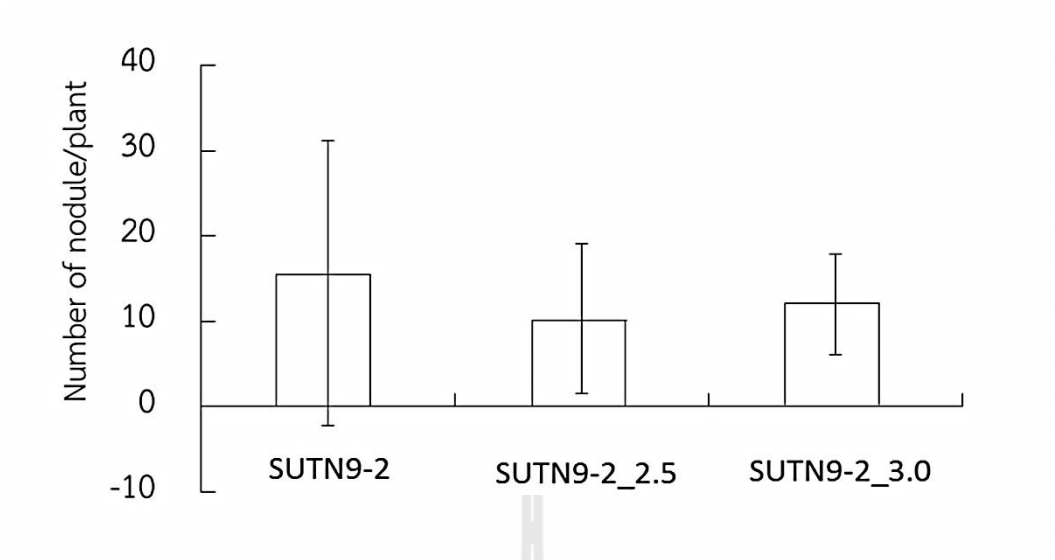
จากภาพรวมของการทดลองภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังซึ่งได้จำลองสถานการณ์ในกรณีมีน้ำท่วมขังหลังจากปลูกพืชไปแล้ว 2 อาทิตย์ พบว่าน้ำท่วมขังส่งผลให้พืชชะงักการเจริญเติบโตอย่างเห็นได้ชัดเจน โดยพืชมีลักษณะใบเหลืองแคระแกร็น เมื่อตรวจสอบน้ำหนักแห้งพบว่ามีน้ำหนักน้อยกว่าการปลูกถั่วเขียวภายใต้สภาวะปกติ อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มของการเพิ่มน้ำหนักพืชได้โดยการใช้เชื้อไรโซเบียมที่พัฒนาจากเทคนิค metabolic evolution ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการปลูกด้วยเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ดั้งเดิม (รูปที่ 16 และ 17) แต่ในภาพรวมพบว่าเชื้อไรโซเบียมไม่สามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วเขียวได้ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง เมื่อตรวจสอบการเข้าสร้างปมของเชื้อไรโซเบียมพบว่าสามารถเข้าสร้างปมได้เพียงเล็กน้อยในช่วง 10-15 ปมต่อต้น ทั้งในตำรับที่ปลูกเชื้อดั้งเดิมและเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution (รูปที่ 18) ทั้งนี้เชื้อไรโซเบียมสามารถเข้าสร้างปมได้ในช่วงแรก แต่เมื่อเผชิญกับสภาวะน้ำท่วมขัง อาจทำให้เชื้อไรโซเบียมไม่สามารถเข้าสร้างปมได้เพิ่มเติมเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ อย่างไรก็ตามภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังพบว่าพืชที่ปลูกเชื้อไรโซเบียมในทุกตำรับมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสเพิ่มขึ้นมากกว่าสภาวะปกติ (รูปที่ 19) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณออกซิเจนในสภาวะน้ำท่วมขังมีน้อยลงซึ่งส่งผลให้เอนไซม์ไนโตรจีเนสทำงานได้ดีขึ้น แต่การตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นไม่สามารถทำให้พืชเจริญได้ดีในสภาวะนี้ เนื่องจากสภาวะน้ำท่วมขังอาจส่งผลต่อปัจจัยอื่น ๆ ที่กระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น การเจริญของราก เป็นต้น และเมื่อตรวจสอบปริมาณเอทธิลีนที่พืชปลดปล่อยออกมาภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังพบว่ามีปริมาณน้อย ซึ่งอาจเป็นไปได้เช่นเดียวกับการตรวจสอบภายใต้สภาวะแล้งที่พืชอาจมีการปลดปล่อยเอทธิลีนในปริมาณมากในช่วงที่พืชเริ่มเผชิญกับสภาวะน้ำท่วมขัง ซึ่งอาจเกิดขึ้นก่อนการตรวจวัด จึงทำให้ในช่วงการตรวจสอบจึงพบการปลดปล่อยเอทธิลีนในปริมาณน้อย แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีแนวโน้มที่เชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มมากขึ้น (SUTN9-2_3.0) สามารถลดการปลดปล่อยเอทธิลีนได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับพืชที่ปลูกด้วยเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ดั้งเดิม หรือพืชในตำรับควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (รูปที่ 20)



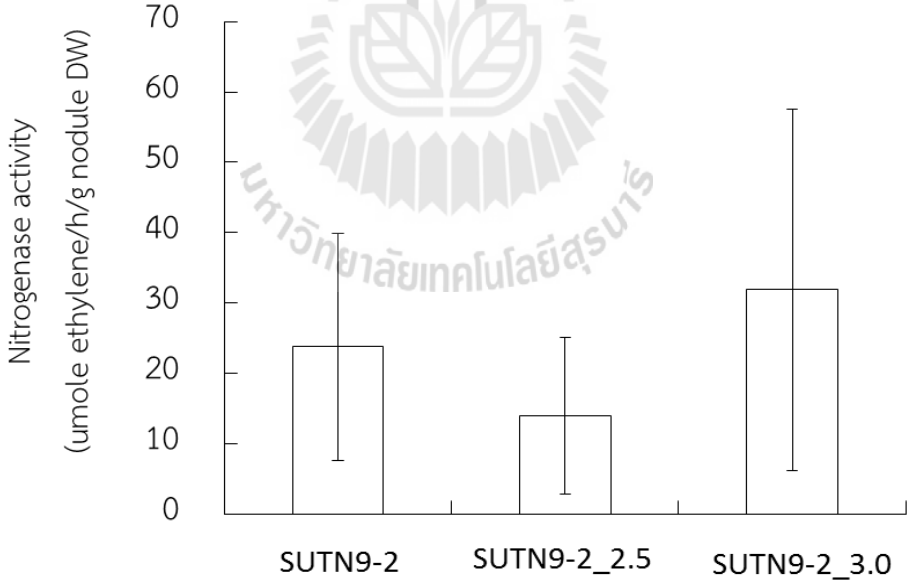
รูปที่ 16 การทดสอบเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution กับถั่วเขียวภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง



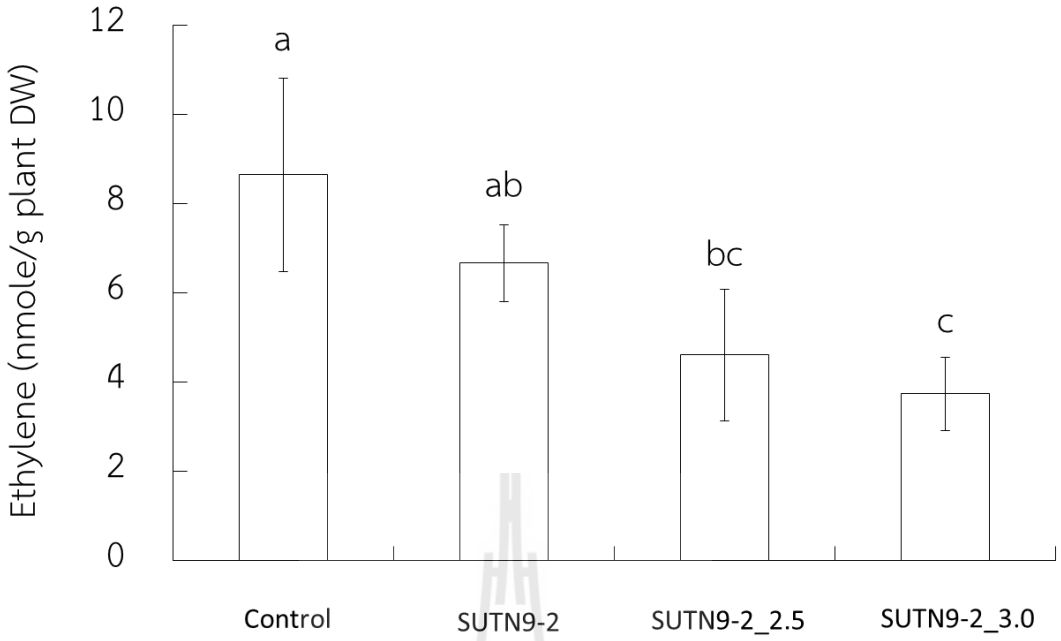
รูปที่ 17 น้ำหนักแห้ง (plant dry weight) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง



รูปที่ 18 จำนวนปม (number of nodule) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง



รูปที่ 19 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของถั่วเขียวที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง

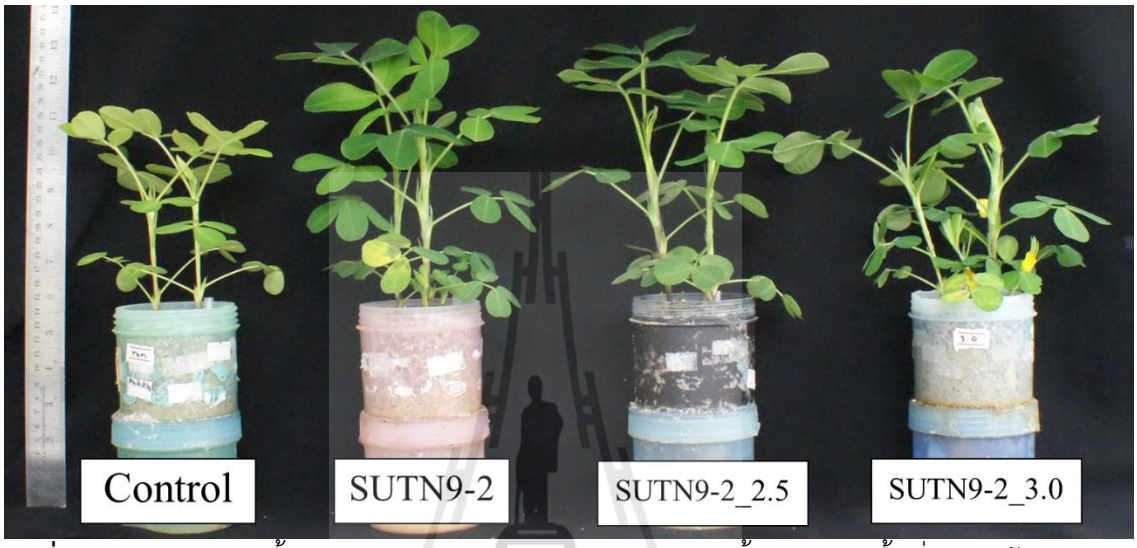


รูปที่ 20 ปริมาณเอทธีลีน (ethylene) ของถั่วเขียวที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง

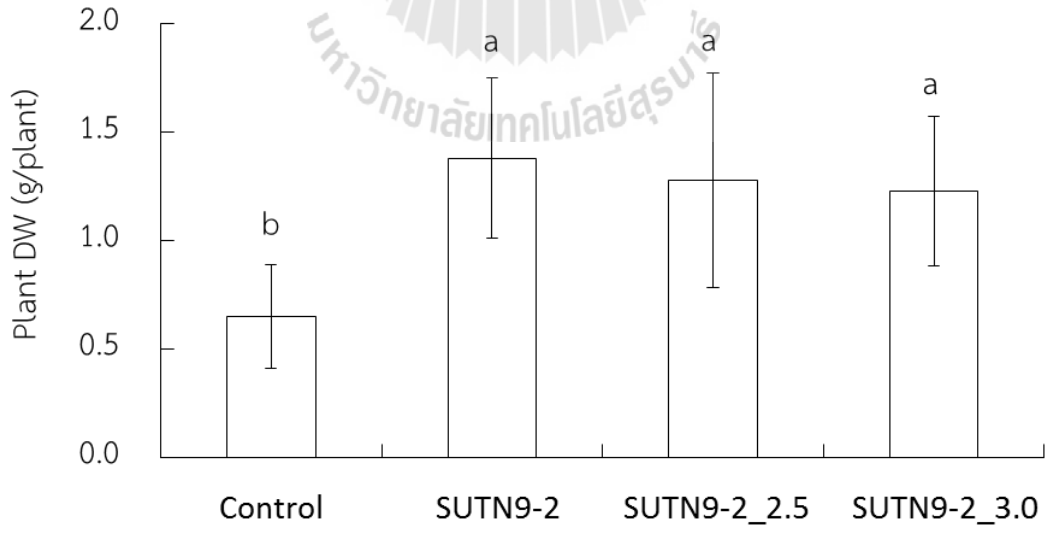
3.5 การทดสอบเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะปกติ

ในโครงการนี้ได้ดำเนินการทดสอบกับถั่วลิสงซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งที่เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 สามารถเข้าสร้างปมได้ โดยเมื่อตรวจสอบการปลูกภายใต้สภาวะปกติพบว่าการปลูกเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution กับถั่วลิสงสามารถส่งเสริมการเจริญของถั่วในภาพรวมได้ดีโดยให้น้ำหนักต้นแห้งมากกว่าถั่วลิสงในตำรับควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามน้ำหนักแห้งของพืชที่ได้จากการปลูกเชื้อ SUTN9-2 และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution แล้วไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญภายใต้สภาวะปกติ (รูปที่ 21 และ 22) และเมื่อตรวจสอบจำนวนปมพบว่าเชื้อไรโซเบียมที่ทำการทดสอบสามารถเข้าสร้างปมได้อยู่ในช่วง 100-200 ปมต่อต้น โดยเชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิมสามารถเข้าสร้างปมได้มากกว่าเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 23) แต่เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสพบว่าถั่วลิสงที่ปลูกด้วยเชื้อ SUTN9-2_3.0 สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงที่สุดซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากถั่วลิสงที่ปลูกด้วยเชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิม ในขณะที่ถั่วลิสงปลูกด้วยเชื้อ SUTN-2_2.5 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในระดับรองลงมาแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับตำรับอื่น ๆ (รูปที่ 24) และเมื่อตรวจสอบปริมาณเอทธิลีนที่พืชผลิตพบว่ามีการปลดปล่อย

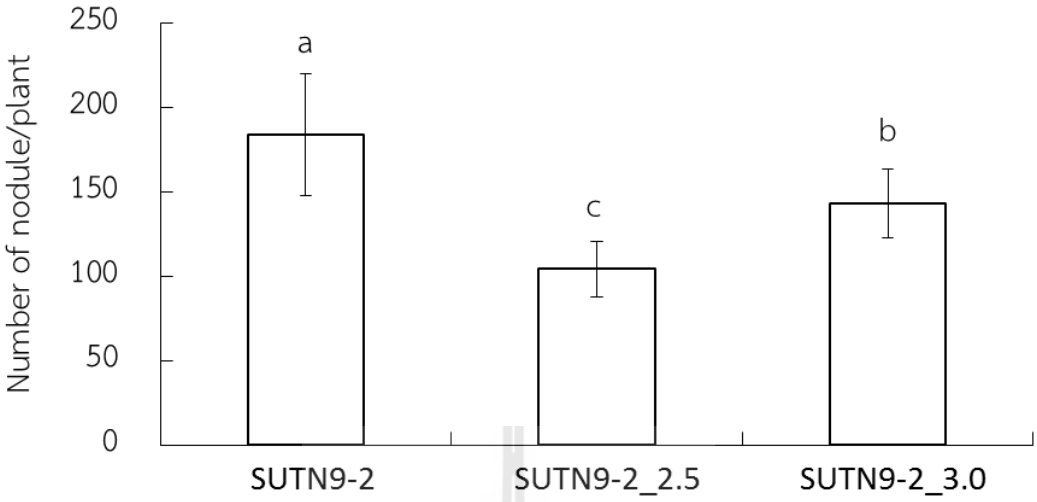
ออกมาเช่นกันในสภาวะปกติ โดยอยู่ในช่วง 3-8 นาโนโมลล์ต่อกรัมของน้ำหนักแห้งพืช โดยพบว่าถั่วลิสงที่ปลูกด้วยเชื้อในกลุ่มที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution มีการปลดปล่อยเอทธิลีนสูงกว่าตำรับควบคุม และตำรับที่ปลูกด้วยเชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 25) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเก็บผลปริมาณเอทธิลีนอยู่ในช่วงที่ถั่วลิสงเริ่มมีการออกดอกซึ่งอาจทำให้มีการปลดปล่อยเอทธิลีนออกมาเพิ่มขึ้น



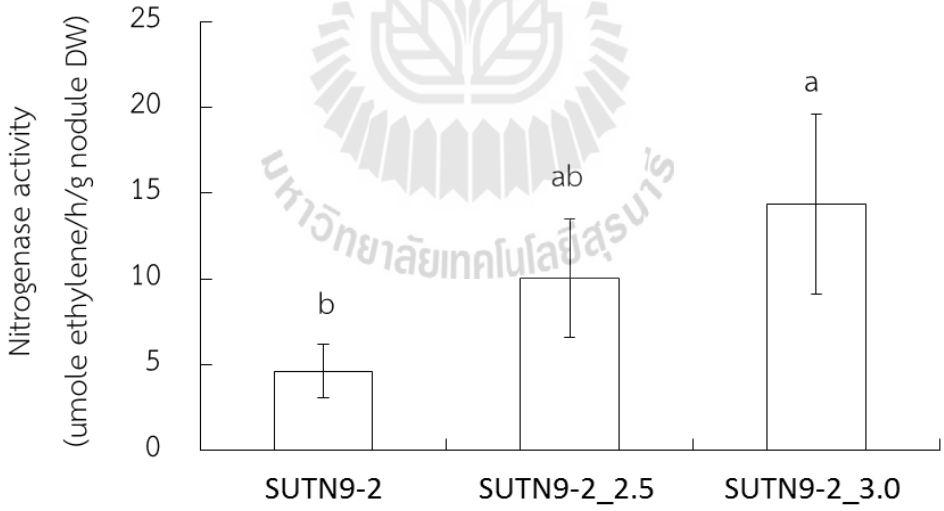
รูปที่ 21 การทดสอบเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะปกติ



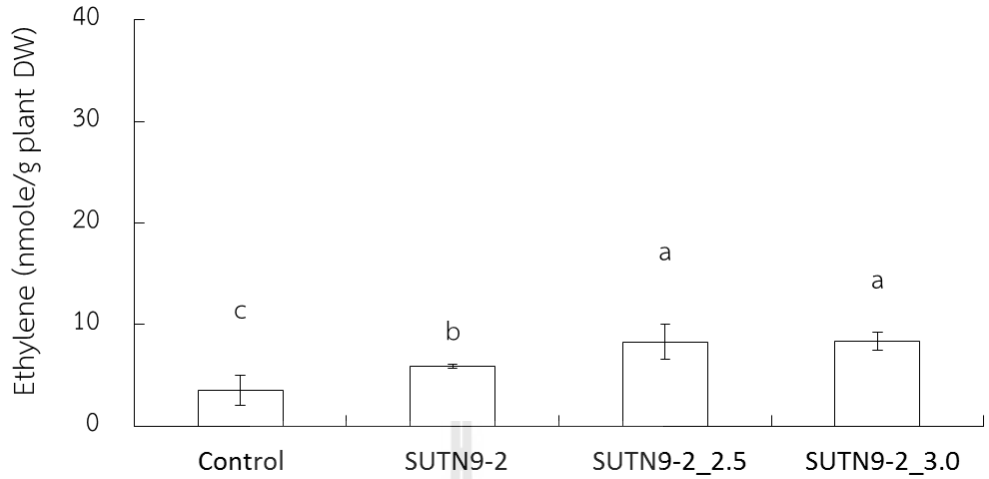
รูปที่ 22 น้ำหนักแห้ง (plant dry weight) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะปกติ



รูปที่ 23 จำนวนปม (number of nodule) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะปกติ



รูปที่ 24 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะปกติ

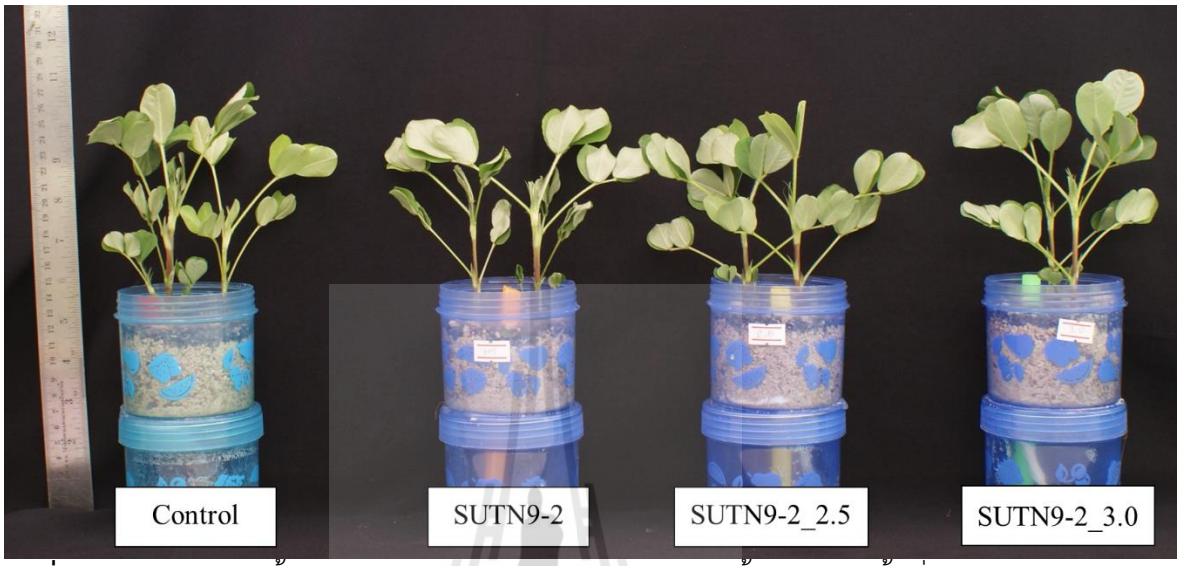


รูปที่ 25 ปริมาณเอทธีลีน (ethylene) ของถั่วลิสงที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะปกติ

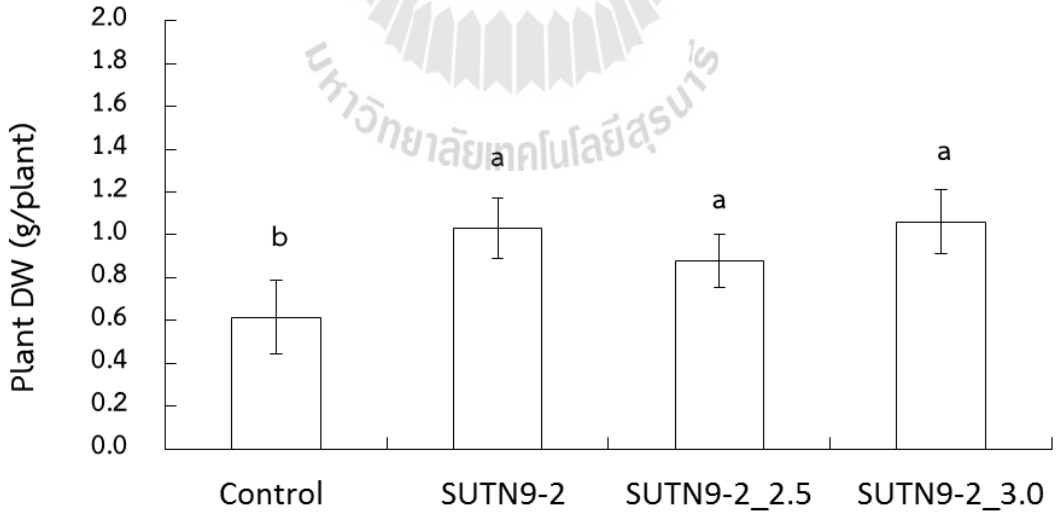
3.6 การทดสอบเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะแล้ง

ผลการทดลองโดยรวมพบว่าถั่วลิสงเมื่อเผชิญกับสภาวะแล้งส่งผลให้พืชชะงักการเจริญเติบโต ทำให้การเจริญของพืชลดลงน้อยกว่าการปลูกภายใต้สภาวะปกติเช่นเดียวกับการทดสอบกับถั่วเขียว อย่างไรก็ตามถั่วลิสงที่ปลูกด้วยเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution มีน้ำหนักแห้งที่มากกว่าตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 26 และ 27) โดยเมื่อตรวจสอบจำนวนปมพบว่าเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2_3.0 สามารถเข้าสร้างปมกับถั่วลิสงได้สูงที่สุดมากกว่า 120 ปมต่อต้น และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิม หรือ SUTN9-2_2.5 (รูปที่ 28) แต่เมื่อทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสพบว่ามีระดับของการตรึงไนโตรเจนที่น้อยมากเมื่อพืชเผชิญกับความแล้ง โดยถั่วลิสงที่ปลูกด้วยเชื้อไรโซเบียมในทุกตำรับมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (อยู่ในช่วง 50-80 นาโนโมล์ต่อน้ำหนักแห้งของพืช) (รูปที่ 29) และเมื่อตรวจสอบปริมาณเอทธิลีนที่ปลดปล่อยออกมาจากถั่วลิสงภายใต้สภาวะแล้งพบว่าถั่วลิสงที่ปลูกด้วยเชื้อไรโซเบียมในทุกตำรับสามารถลดปริมาณเอทธิลีนที่ปลดปล่อยได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับควบคุม อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างระหว่างตำรับที่ใช้เชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิมและเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution (รูปที่ 30) จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าถึงแม้เชื้อไรโซเบียมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase จะสามารถช่วยลดปริมาณเอทธิลีนได้ แต่การปลูกภายใต้สภาวะแล้งส่งผลอย่างรุนแรงโดยตรงต่อกิจกรรมการตรึงไนโตรเจน และการเจริญเติบโตของถั่วลิสง ดังนั้นการใช้เชื้อไรโซเบียมเพื่อส่งเสริมการ

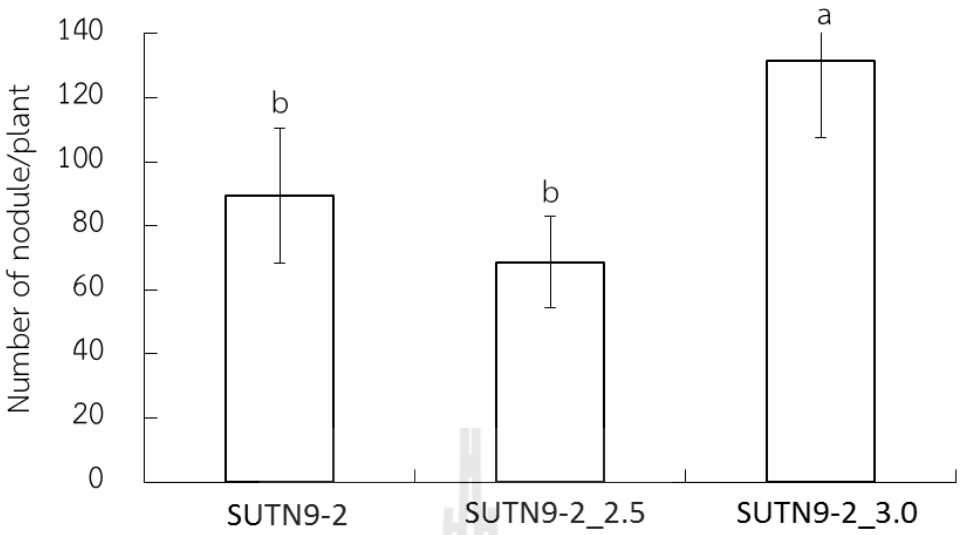
เจริญเติบโตของพืชในสภาวะแล้งอย่างต่อเนื่องจึงไม่ประสบผลสำเร็จ แต่อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มที่เชื้อไรโซเบียมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase จะสามารถบรรเทาความเครียดในพืชได้หากสถานกาณ์ความแล้งไม่รุนแรงมากนัก



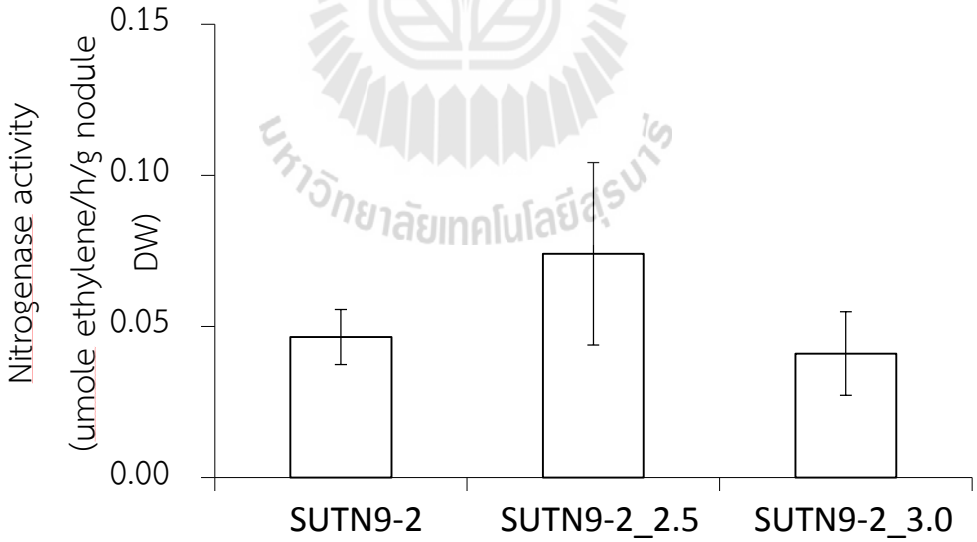
รูปที่ 26 การทดสอบเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะแล้ง



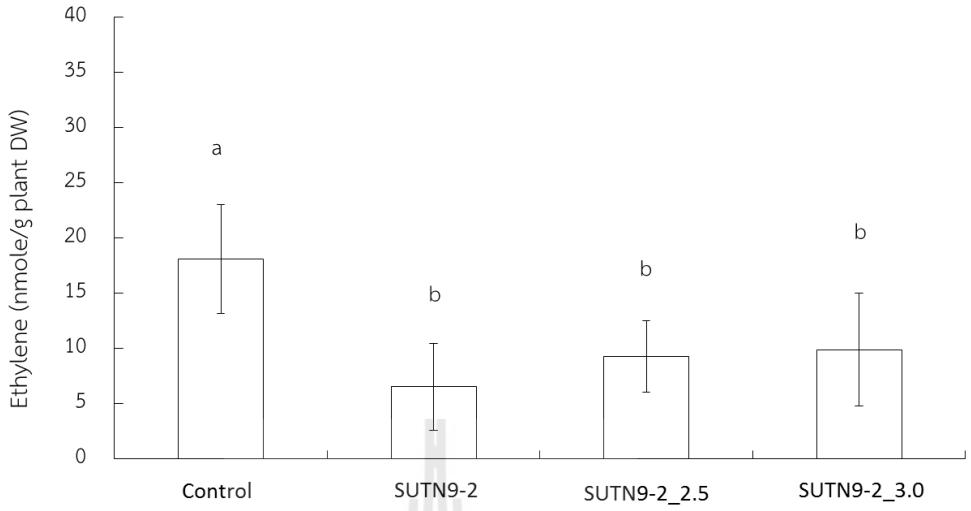
รูปที่ 27 น้ำหนักแห้ง (plant dry weight) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะแล้ง



รูปที่ 28 จำนวนปม (number of nodule) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะแล้ง



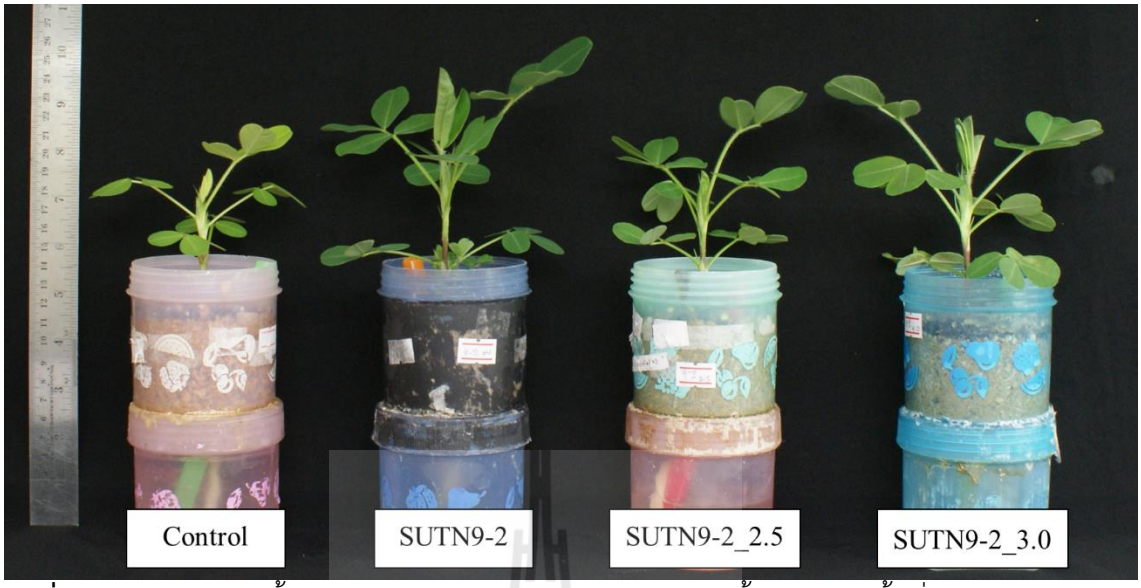
รูปที่ 29 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะแล้ง



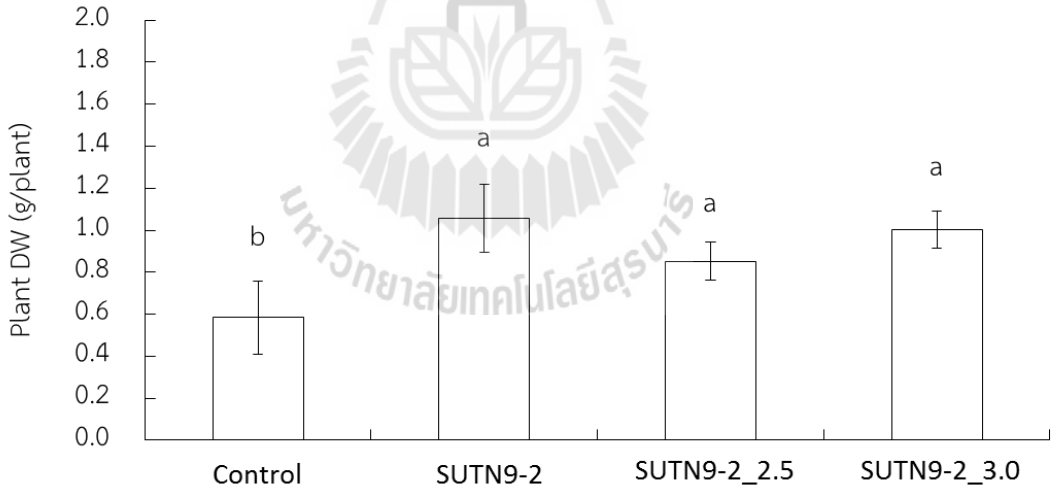
รูปที่ 30 ปริมาณเอทธีลีน (ethylene) ของถั่วลิสงที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะแล้ง

3.7 การทดสอบเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะเค็ม

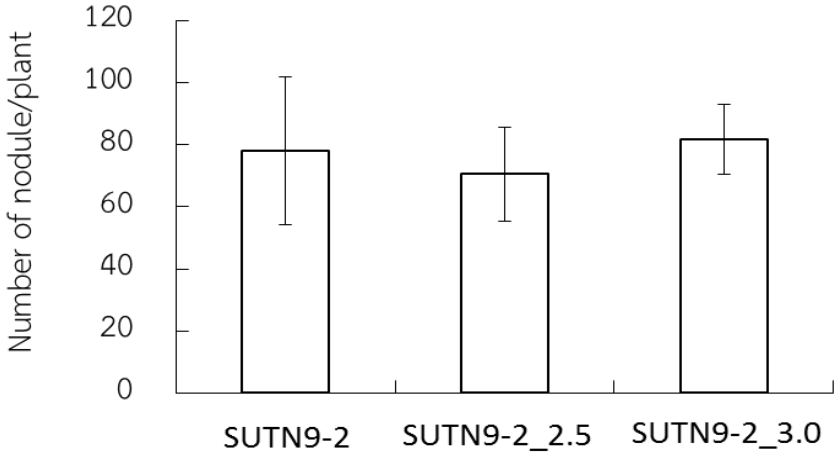
ภาพรวมของผลการทดลองภายใต้สภาวะเค็มที่ความเข้มข้นเกลือ 75 มิลลิโมลาร์ แสดงให้เห็นว่าสภาวะเค็มมีผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วลิสงเช่นกันโดยทำให้พืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้เทียบเท่ากับพืชที่ปลูกภายใต้สภาวะปกติ อย่างไรก็ตามถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อไรโซเบียมสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดีกว่าตำรับควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยการใช้เชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ดั้งเดิมไม่ส่งผลต่อน้ำหนักต้นแห้งแตกต่างไปจากเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution (รูปที่ 31 และ 32) เช่นเดียวกับการเข้าสร้างปมและการตรึงไนโตรเจนพบว่าไม่มีความแตกต่างในตำรับที่มีการใช้เชื้อไรโซเบียมแต่ละชนิดโดยสามารถเข้าสร้างปมในช่วง 70-80 ปมต่อต้น (รูปที่ 33) และมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสอยู่ในช่วง 2-3 ไมโครโมลล์ของเอทธิลีนต่อชั่วโมงต่อกรัมของน้ำหนักแห้งปม (รูปที่ 34) และเมื่อตรวจสอบปริมาณเอทธิลีนที่ถั่วลิสงปลดปล่อยภายใต้สภาวะเค็มพบว่าตำรับควบคุมที่ไม่ได้มีการปลูกเชื้อไรโซเบียมมีการปลดปล่อยเอทธิลีน 25 นาโนโมลล์ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของพืช และเมื่อปลูกเชื้อไรโซเบียมสามารถลดการปลดปล่อยเอทธิลีนได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยไม่มีความแตกต่างของการลดปริมาณการปลดปล่อยเอทธิลีนในถั่วที่ปลูกด้วยเชื้อไรโซเบียม SUTN9-2 ดั้งเดิม หรือตำรับที่ใช้เชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution (รูปที่ 35) ดังนั้นภายใต้สภาวะเค็มมีแนวโน้มที่จะใช้เชื้อไรโซเบียมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพื่อลดความเครียดในพืชได้



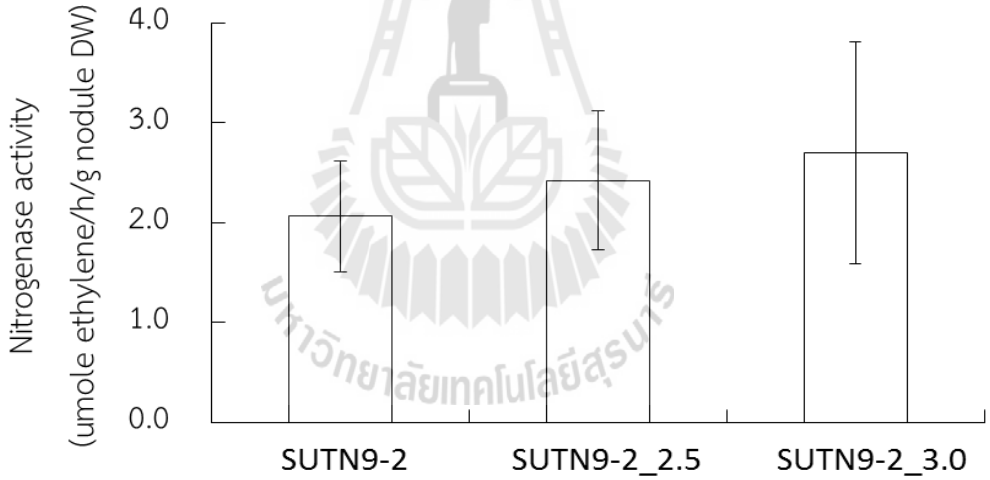
รูปที่ 31 การทดสอบเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะเค็ม



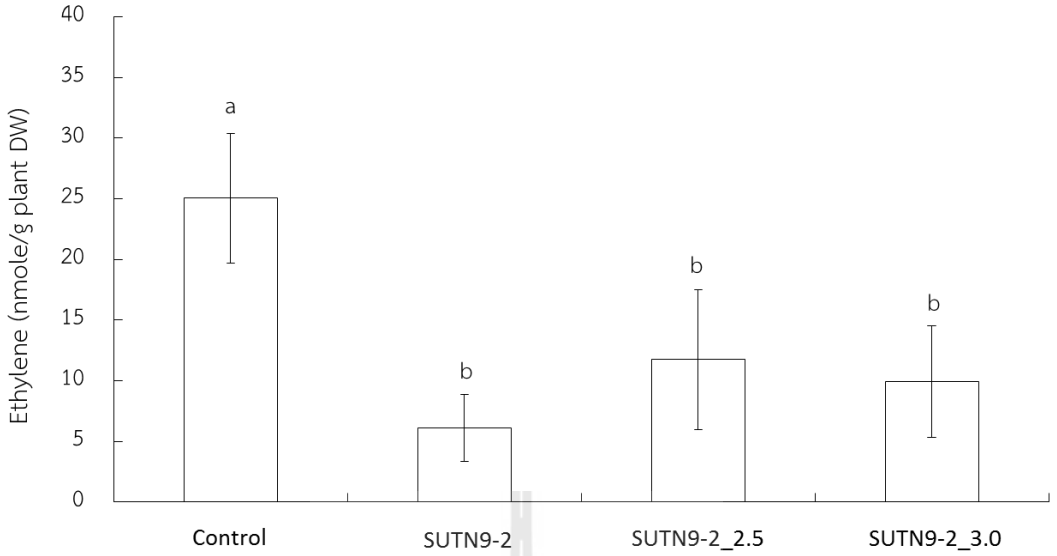
รูปที่ 32 น้ำหนักแห้ง (plant dry weight) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะเค็ม



รูปที่ 33 จำนวนปม (number of nodule) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะเค็ม



รูปที่ 34 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะเค็ม

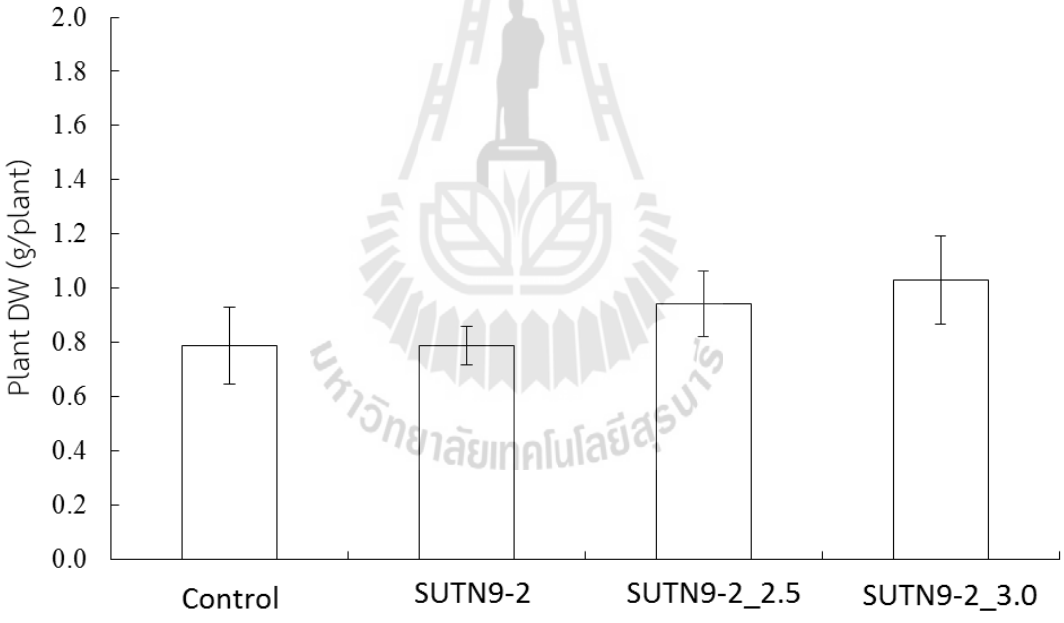


รูปที่ 35 ปริมาณเอทธีลีน (ethylene) ของถั่วลิสงที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะเค็ม

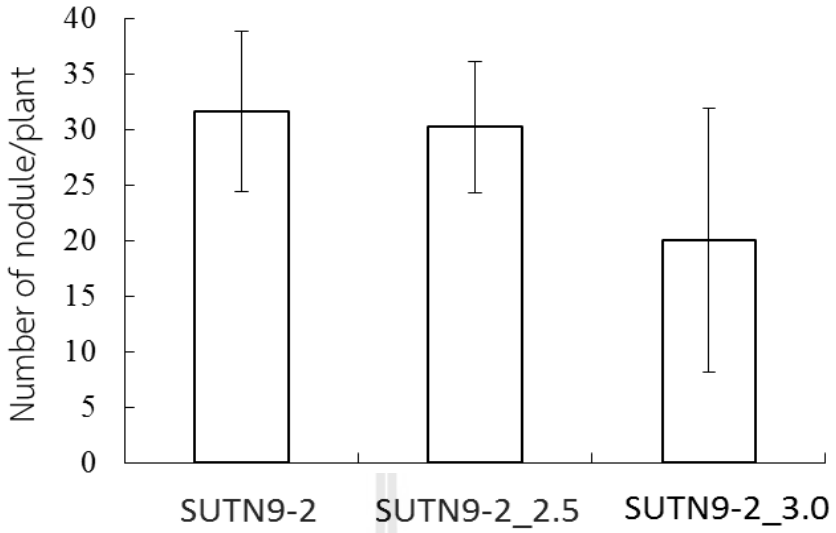
3.8 การทดสอบเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง

การทดสอบภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังในภาพรวมพบว่าถั่วลิสงไม่สามารถเจริญได้เทียบเท่ากับสภาวะปกติ โดยเมื่อตรวจสอบน้ำหนักแห้งพบว่าถั่วลิสงที่ปลูกด้วยเชื้อไรโซเบียมในทุกตำรับมีน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับถั่วลิสงในตำรับควบคุม (รูปที่ 36 และ 37) ถึงแม้เชื้อไรโซเบียมในทุกตำรับจะสามารถเข้าสร้างปมกับถั่วลิสงได้ 20-30 ปมต่อต้น (รูปที่ 38) และมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ในระดับสูง (12-15 ไมโครโมลล์ของเอทธิลีนต่อชั่วโมงต่อกรัมของน้ำหนักปมแห้ง) (รูปที่ 39) แต่พบว่าพืชที่ปลูกด้วยเชื้อไรโซเบียมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ไม่สามารถลดปริมาณเอทธิลีนที่ปลดปล่อยจากพืชได้แตกต่างจากตำรับควบคุม (รูปที่ 40) แสดงให้เห็นว่าภายใต้สภาวะน้ำท่วมขังเป็นระยะเวลานานมากกว่า 2 อาทิตย์ ส่งผลกระทบรุนแรงต่อการเจริญเติบโตของพืช ถึงแม้จะมีการตรึงไนโตรเจนในระดับสูงแต่ก็ไม่สามารถทำให้พืชต้านทานจากความเครียดที่เกิดจากสภาวะน้ำท่วมขังเป็นระยะเวลานานได้

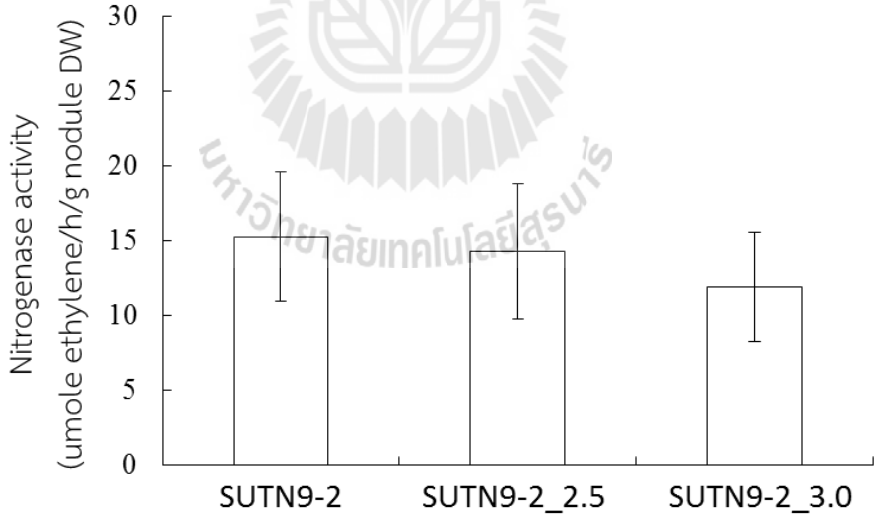
รูปที่ 36 การทดสอบเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution กับถั่วลิสงภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง



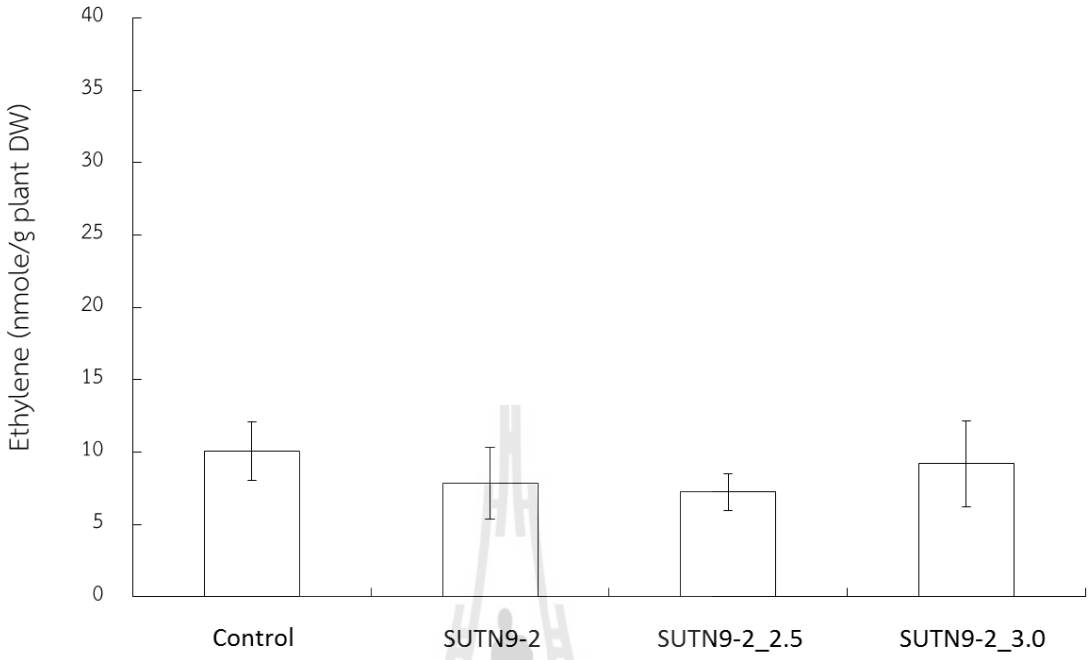
รูปที่ 37 น้ำหนักแห้ง (plant dry weight) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง



รูปที่ 38 จำนวนปม (number of nodule) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง



รูปที่ 39 กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase activity) ของถั่วลิสงที่ทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง



รูปที่ 40 ปริมาณเอทธีลีน (ethylene) ของถั่วลิสงที่ปลดปล่อยออกมาเมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ดั้งเดิม และเชื้อที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ภายใต้สภาวะน้ำท่วมขัง

ถึงแม้ในงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการใช้เชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อ PGPR ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase สามารถช่วยลดความเครียดในพืชเมื่อปลูกในสถานการณ์ที่ไม่เหมาะสมได้โดยเปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกด้วยเชื้อไรโซเบียม หรือเชื้อ PGPR ที่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์นี้ภายใต้สภาวะเดียวกัน ซึ่งพบว่าเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สามารถส่งเสริมการเจริญได้ดีกว่า แต่ไม่ได้ทำการเปรียบเทียบผลที่ได้กับพืชที่ปลูกภายใต้สภาวะปกติ (Mayak et al. 2004; Saravanakumar and Samiyappan 2007, Tittabutr et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตามหากพิจารณาในแง่ของการนำไปใช้ประโยชน์ พืชควรจะมีการเจริญเติบโตได้ดีไม่แตกต่างจากการปลูกภายใต้สภาวะปกติ ดังนั้นการทดลองในโครงการวิจัยนี้เป็นการจัดรูปแบบสถานการณ์ให้พืชเผชิญกับสภาวะความเครียดอย่างรุนแรงเพื่อตรวจสอบแนวโน้มของการใช้เชื้อไรโซเบียมที่มีการพัฒนาให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มสูงขึ้นหากนำไปใช้ประโยชน์ในสถานการณ์จริงที่อาจเผชิญกับสถานการณ์ธรรมชาติอย่างรุนแรง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าในสภาวะที่ต้องเผชิญกับความเครียดอย่างรุนแรง เป็นระยะเวลานานมีอิทธิพลต่อการเจริญของพืชมากกว่า และแม้ว่าจะทำการพัฒนาให้เชื้อไรโซเบียมมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มมากขึ้น (ผลการทดลองจากโครงการย่อยที่ 1) แต่ก็ไม่อาจส่งเสริมการเจริญในสภาวะ

เครียดแบบรุนแรงในระยะเวลาติดต่อกันได้ ถึงแม้จะพบว่าเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution จะมีแนวโน้มในการลดปริมาณเอทธิลีนได้สูงเช่นกัน ดังนั้นการใช้กิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase จึงเป็นเพียงแค่การลดความเครียดได้ในระดับเบื้องต้นที่หากพืชเผชิญกับสภาวะเครียดที่ไม่รุนแรงจะสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชได้ต่อไป นอกจากนี้ในการใช้เชื้อไรโซเบียมที่พัฒนาได้จากเทคนิค metabolic evolution ซึ่งเป็นการคัดเลือกเชื้อโดยใช้ความกดดันจากสภาวะที่เพิ่มปริมาณ ACC ในอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นเรื่อย ๆ เพื่อกระตุ้นให้เซลล์มีการปรับตัวให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มมากขึ้น ถึงแม้จะสามารถนำไปใช้กับการปลูกในสภาพไร่ได้เนื่องจากไม่ใช่การปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยวิธีพันธุวิศวกรรม แต่การพัฒนาด้วยวิธีนี้อาจส่งผลกระทบต่อ metabolism ในด้านอื่น ๆ ของเซลล์ด้วย เช่น เซลล์อาจมีความสามารถในการเจริญแตกต่างไปจากเชื้อดั้งเดิม หรือไม่สามารถเจริญในสภาวะที่ไม่เหมาะสมด้านอื่น ๆ เช่น เชื้อเจริญในสภาวะเค็มได้น้อยลงเป็นต้น ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการเข้าสร้างปมกับพืช ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบเชื้อก่อนการนำไปใช้จริงในสภาพไร่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
บทสรุปการทดลอง

เชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มสูงขึ้นโดยใช้เทคนิค metabolic evolution ซึ่งทำให้ได้เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี ACC ในระดับ 2.5 mM (SUTN9-2_2.5) และระดับ 3.0 mM (SUTN9-2_3.0) ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิม ทั้งนี้จากการทดสอบกับถั่วเศรษฐกิจที่เชื้อไรโซเบียมชนิดนี้สามารถเข้าสร้างปมและตรึงไนโตรเจนได้ดี คือ ถั่วเขียว และถั่วลิสง ผลการทดลองโดยรวมพบว่าเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution SUTN9-2_2.5 มีแนวโน้มสามารถเข้าสร้างปมและตรึงไนโตรเจนได้ดีไม่แตกต่างจากเชื้อดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญในการปลูกภายใต้สภาวะปกติ และเมื่อปลูกภายใต้สภาวะเครียดในระยะเวลานานมากกว่า 2 อาทิตย์ พบว่าเชื้อไรโซเบียมยังคงเข้าสร้างปม และมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส แต่สภาวะเครียดส่งผลกระทบต่อการเจริญของพืชตระกูลถั่วทั้งสองชนิดอย่างรุนแรง ถึงแม้เชื้อ SUTN9-2_2.5 จะมีแนวโน้มที่จะสามารถลดปริมาณเอทธิลีนที่พืชปลดปล่อยออกมาได้มากกว่าเชื้อ SUTN9-2_3.0 หรือเชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิม แต่ก็ไม่สามารถช่วยให้พืชเจริญได้ดีเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ แต่อย่างไรก็ตามสามารถส่งเสริมการเจริญของพืชได้มากกว่าพืชที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นเชื้อ SUTN9-2_2.5 ที่พัฒนาได้จากเทคนิค metabolic evolution สามารถนำเอาไปใช้ในสภาพไร่ได้ โดยในสถานการณ์จริงหากมีการปลูกภายใต้สภาวะปกติ หรือมีการเผชิญกับสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในระยะสั้น ๆ ก็อาจสามารถช่วยกระตุ้นให้พืชลดความเครียดได้ดีขึ้น และส่งเสริมการเจริญของพืชได้ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

Belimov AA., Safronova VI, Sergeeva TA, Egorova TN, Matveeva VA, Tsyganov VE, Borisov AY, Tikhonovich IA, Kluge C, Priestfeld A, Dietz KJ, Stepanok VV (2001) Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. Can J Microbiol 47: 642-652.

Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11, 1-42.

Madhaiyan M, Poonguzhali S, Ryu JH, Sa TM (2006) Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. Planta 224: 268-278.

Mayak S, Tirosh T, Glick BR (2004) Plant gowth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomato and pepper. Plant Sci 166: 525-530.

Saravanakumar D, Samiyappan R (2007) ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. J Appl Microbiol 102: 1283-1292.

Somasegaran, P. and Hoben, H. J. 1994. Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-*Rhizobium* technology. Springer-Verlag, NewYork. pp. 7-23

Tittabutr P, Piromyou P, Longtonglang A, Noisa-ngiam R., Boonkerd N., and Teaumroong N. (2013). Alleviation of the effect of environmental stresses using co-inoculation of mungbean by bradyrhizobium and rhizobacteria containing stress induced ACC deaminase enzyme. Soil Science and Plant Nutrition. 59: 559-571.