ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การคัดแยกเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูลถั่วพื้นเมืองของไทย

ผู้เขียน นางสาวศกุนตลา ศิริอุดม

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร.สายสมร ลำยอง

บทคัดย่อ

ในการคัดแยกเชื้อไรโซเบียมจากปมรากของพืชตระกูลถั่วพื้นเมืองของไทย 25 ชนิด ซึ่งมีพืชตระกูลถั่วเพียง 9 ชนิดที่มีรายงานการพบปม และสามารถแยกเชื้อไรโซเบียมได้ พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 64 ไอโซเลต โดยได้คัดเลือกเชื้อ 14 ไอโซเลต ที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมี คือ ไม่สามารถใช้ซิเตรท และไม่สามารถสร้าง 3-คีโตแลคโตสได้ มาทดสอบการสร้างปมกับพืชตระกูลถั่ว คือ ถั่วซิราโตร (*Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro) และวิเคราะห์ด้วย nif PCR พบว่า มีเชื้อ 10 ไอโซเลตที่สามารถสร้างปม และมี *nif* gene ตัวอย่างดินที่ไม่เคยมีการปลูกถั่วมาก่อนไม่สามารถแยกเชื้อไรโซเบียมจากได้ เนื่องจากตรวจไม่พบการสร้างปมในถั่วที่ทดสอบ คือ ถั่วปากอ้า (*Vicia faba*) ถั่วลันเตา (*Pisum sativum*) ถั่วเลนส์ (*Lens culinaris*) และ *Vicia hirsuta* ที่ปลูกในดินตัวอย่าง เชื้อไรโซเบียมที่แยกได้สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็ง (YMA) อาหารเหลว (YMB) และการสร้างกรด-ด่างของเชื้อ คือ กลุ่มเจริญเร็ว ได้แก่ ไอโซเลต LLE2 และ MPD2 ที่แยกจาก กระถิน (*Leucaena leucocephala*) และไมยราบ (*Mimosa pudica*) ตามลำดับ สอดคล้องตามที่มีผู้รายงานไว้ กับกลุ่มเจริญช้า ได้แก่ ไอโซเลต AOD1 AOD2 และ AOD5 ที่แยกจากกางขี้มอด (*Albizia odoratissima*) ไอโซเลต DOL3 และ ACL1(ACL3) ที่แยกจากชิงชัน (*Dalbergia oliveri*) และ ไครย้อย (*Archidendron clypearia*) ตามลำดับ ซึ่งไม่ปรากฏว่ามีรายงานการแยกเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูลถั่วทั้ง 3 ชนิดนี้มาก่อน และไอโซเลต X14 X15 และ X21 ที่แยกจาก *Centrocema pubescens* Bth. (ถั่วลาย) (X1) และ *Desmodium heterocarpon* (L.) DC. ssp. *heterocarpon* var. *strigosum* Mee. (X2) ตามลำดับ สอดคล้องตามที่มีผู้รายงานไว้ เมื่อนำไปทดสอบสมบัติทางกายภาพ และชีวเคมี พบว่า เชื้อสามารถเจริญได้ในอาหาร YMA ที่มี NaCl ความเข้มข้น 0.0-2.0% สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30-45 °C และสามารถเจริญได้ที่ pH 5.0-11.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไม่เจริญหรือเจริญได้ไม่ดีบนอาหาร Glucose peptone agar ไม่ย่อยแป้ง และเจลาติน รวมทั้งสามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้ แต่มีไอโซเลตที่ย่อยแป้ง และเจลาตินได้ คือ X14 และมีไอโซเลตที่ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทได้ คือ DOL3 และ AOD2 โดยมี mean of generation time (MGT) และ growth rate อยู่ระหว่าง 3.938-16.788 ชม. และ 0.041-0.176 ต่อชม. ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบการผลิต 3-indole acetic acid (IAA) พบว่า มีเชื้อ 5 ไอโซเลต ที่สามารถผลิต IAA ได้ โดยมีไอโซเลต LLE2 ผลิตได้มากที่สุด คือ 67.60 ไมโครโมล

Phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA แสดงให้เห็นว่าเชื้อไอโซเลต LLE2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อในจีนัส *Sinorhizobium* และไอโซเลต X21 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อในจีนัส *Bradyrhizobium* และเมื่อทดสอบการปลูกเชื้อข้ามพันธุ์ของเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลตกับถั่วใน vetch group 5 ชนิด และ ถั่วในกลุ่มอื่น คือ ถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris*) ถั่วเหลือง (*Glycine max*) และถั่วเขียว (*Vigna radiata*) พบว่าจากเชื้อทั้งหมด 10 ไอโซเลต มีเชื้อถึง 9 ไอโซเลตที่สามารถสร้างปมกับตัวอย่างพืชตระกูลถั่วที่ใช้ในการทดลองได้ โดยมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันไป และมีเพียงไอโซเลตเดียว คือ AOD5 ที่แยกจากปมรากของกางขี้มอดที่ไม่สร้างปมในถั่วทั้งหมดที่ทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Isolation of *Rhizobium* from Thai Native Legumes

Author Miss. Sakuntala Siri-Udom

Degree Master of Science (Biology)

Thesis Advisor Assoc. Prof. Dr. Saisamon Lumyong

ABSTRACT

Biochemical properties were used to select 14 isolates out of total 64 isolates from root nodules of 25 Thai native legumes. Only nine of these legumes have been reported in other reports that found root nodules and could isolated rhizobium. These isolates could neither utilize nor produce citrate and 3-ketolactose. Ten rhizobial isolates had nitrogen fixing gene (*nif* gene) and were able to form root nodules on *Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro. Rhizobium could not be isolated from soil where legumes crop has never been grown, according to the non-nodulation on roots of grain legumes (*Vicia faba Pisum sativum Lens culinaris* and *Vicia hirsuta*) that were planted in these soils. The isolates were grouped into 2 groups based on their growth characteristics in agar and broth media (YMA and YMB) and pH reaction, fast-growing rhizobium, LLE2 and MPD2, were isolated from *Leucaena leucocephala* and *Mimosa pudica*, respectively, similar to the results that have been reported in other reports. Slow-growing rhizobium, AOD1 AOD2 and AOD5 were isolated from *Albizia odoratissima,* DOL3 and ACL1 (ACL3) were isolated from *Dalbergia oliveri* and *Archidendron clypearia,* respectively and no data that have been reported these results and X14 X15 and X21 were isolated from *Centrocema pubescens* Bth. (X1) and *Desmodium heterocarpon* (L.) DC. ssp. *heterocarpon* var. *strigosum* Mee. (X2), respectively, similar to the results that have been reported in other reports. The isolates could grow at 0.0-2.0 % NaCl and pH 5.0-11.0 and had heat tolerance ranged from 30 to 45 °C. They could not grow in glucose peptone agar, starch agar and gelatin agar, but one isolate, X14 could utilize both starch and gelatin whilst could not reduce nitrate. Only two strains DOL3 and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

AOD2 capable to reduce nitrate. The mean generation time and specific growth rate ranged from 3.938 to 16.788 h and 0.041 to 0.176 h^{-1}, respectively. Five isolates produced 3-indole acetic acid (IAA) and the highest level of IAA, 67.60 μM was obtained from strain LLE2.

The phylogenetic tree from 16S rDNA sequencing analysis suggested that strains LLE2 and X21 closely related to genus *Sinorhizobium* and genus *Bradyrhizobium,* respectively. Five legumes in vetch group and other group, *Phaseolus vulgari* *Glycine max* and *Vigna radiata* were used in cross-inoculation study with 10 rhizobia from leguminous tree. Nine out of 10 isolates were able to induce nodulation on roots of these grain legumes by different nodulation efficiency. One isolate AOD5, from *Albizia odoratissima* was unable to induce nodulation in any legumes.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved