รายงานการวิจัยที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

เรื่อง

การใช้ RFLPs ของชิ้นส่วนบริเวณ *nodD1* และ *nodA* ของไรโซเบียมถั่วเหลือง ระบุศักยภาพการตรึงไนโตรเจน

Use of *nodD1– nodA* RFLP patterns of soybean rhizobia to predict nitrogen– fixing potential

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา ชาญสง่าเวช
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานการวิจัยที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

เรื่อง

การใช้ RFLPs ของชิ้นส่วนบริเวณ *nodD1* และ *nodA* ของไรโซเบียมถั่วเหลือง ระบุศักยภาพการตรึงไนโตรเจน

Use of *nodD1– nodA* RFLP patterns of soybean rhizobia to predict nitrogen– fixing potential

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา ชาญสง่าเวช
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 และขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย ได้แก่ Mr. Ly Kim Pheng และนางสาวณิชานันท์ กาบเกษร

รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา ชาญสง่าเวช
ผู้วิจัย

ชื่อโครงงาน (ภาษาไทย) การใช้ RFLPs ของชิ้นส่วนบริเวณ *nodD1* และ *nodA* ของไรโซเบียมถั่วเหลือง ระบุศักยภาพการตรึงไนโตรเจน

(ภาษาอังกฤษ) Use of *nodD1 – nodA* RFLP patterns of soybean rhizobia to predict nitrogen-fixing potential

ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

ระยะเวลา 1 ปี **ตั้งแต่** 1 ตุลาคม 2550 **ถึง** 30 กันยายน 2551

ผู้ดำเนินงาน รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา ชาญสง่าเวช ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 02-218-5077

บทคัดย่อ

ภาษาไทย ถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจที่ใช้เป็นอาหารและแปรเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำนมถั่วเหลือง เต้าหู้ เต้าเจี้ยว และซีอิ๊ว นอกจากนี้ เกษตรกรบางรายปลูกถั่วเหลืองเป็นพืชหมุนเวียน เพราะที่ปมรากถั่วเหลืองมีแบคทีเรียไรโซเบียม ช่วยเปลี่ยนไนโตรเจนจากอากาศให้เป็นแอมโมเนียให้ถั่วเหลืองใช้ในการเจริญ เป็นการลดการใช้ปุ๋ยเคมีเช่น ยูเรีย เกษตรกรในประเทศที่เป็นผู้นำด้านการส่งออกถั่วเหลือง เช่นสหรัฐอเมริกา จึงปลูกถั่วเหลืองเป็นพืชหมุนเวียน สลับกับพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น เช่น ข้าวโพด เป็นการบำรุงดินอย่างยั่งยืน ปัจจุบันพื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองในประเทศไทยลดลงเหลือประมาณ 831,000 ไร่ (1 ไร่ เท่ากับ 1,600 ตารางเมตร) เพราะราคาขายเฉลี่ยของถั่วเหลืองต่ำ (12 บาทต่อกิโลกรัม) ทำให้ไม่คุ้มทุนแก่เกษตรกรในการปลูกถั่วเหลืองเป็นพืชหมุนเวียน เกษตรกรไทยจึงใช้ปุ๋ยเคมีในการปลูกพืชชนิดอื่นที่ทำรายได้ให้เกษตรกรสูงกว่าถั่วเหลือง เช่น ข้าว ข้าวโพด อ้อย ยางพารา ปาล์ม และมันสำปะหลัง ซึ่งการใช้ปุ๋ยเคมีปริมาณมากและใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน ทำให้ดินขาดความอุดมสมบูรณ์ เนื่องจากการใช้ปุ๋ยเคมีไม่ใช่การบำรุงดิน แต่เป็นการอัดธาตุอาหารให้พืช โดยไม่มีการเติมอินทรียวัตถุเพิ่มลงในดิน และการใช้ปุ๋ยเคมียังเร่งอัตราการสลายตัวของอินทรียวัตถุในดิน ทำให้โครงสร้างของดินเสื่อมลง ดินจึงอัดตัวแน่น ไม่อุ้มน้ำในฤดูแล้ง วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 58 สายพันธุ์กับ RFLPs ซึ่งในงานวิจัยนี้หมายถึงรูปแบบการเรียงตัวบนอกาโรสเจลของแถบดีเอ็นเอของชิ้นส่วนระหว่างยีน *nodD1* และยีน *nodA* หลังจากตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *sphI* ซึ่งถ้าตรวจพบความสัมพันธ์ดังกล่าว จะสามารถใช้รูปแบบการเรียงตัวหรือ RFLPs ดังกล่าวในการทำนายศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็วที่แยกจากอำเภอชาติตระการ อำเภอพรหมพิราม และอำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 8 สายพันธุ์ที่แยกได้พร้อมกับการแยกไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า และเติมลงในโหลเลี้ยวนาร์ดที่เลี้ยงถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์จำนวน 7 พันธุ์ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์ไม่สร้างปมที่รากถั่วเหลือง แบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็วทั้ง 8 สายพันธุ์จึงไม่ใช่ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว ผลการหา RFLPs ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 58 สาย

พันธุ์ พบว่าไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 45 สายพันธุ์ มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *nodD1* และยีน *nodA* ซึ่งแยกโดยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ *nodYf* (5'TGTACGCGGGTAAACC3') และ *nodYr* (5'AGCGCAACGAGAAGAT3') เป็นไพร์เมอร์ขนาด 395 คู่เบส และไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 13 สายพันธุ์ มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวขนาด 350 คู่เบส ทั้งนี้เมื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากอกาโรสเจลและทำให้ดีเอ็นเอปราศจากสิ่งปนเปื้อนโดยใช้ชุดสำเร็จรูป Nucleospin® และตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *sphI* ผลการทดลองพบรูปแบบ RFLPs จำนวน 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบ A ประกอบด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 395 คู่เบส รูปแบบ B ประกอบด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 350 คู่เบส และรูปแบบ C ประกอบด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 120 และ 275 คู่เบส โดยไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 30, 12, และ 16 สายพันธุ์มี RFLPs รูปแบบ A, B และ C ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าที่มี RFLPs รูปแบบ A , B และ C มีแนวโน้มที่มีจำนวนปมทั้งหมดที่รากในระดับน้อย (1-10 ปมต่อต้น) ถึงระดับปานกลาง (11-20 ปมต่อต้น) ผลการทดลองไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบ RFLPs กับศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า ซึ่งหาโดยการใช้น้ำหนักแห้งของลำต้น ในปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่ของดีเอ็นเอซึ่งอยู่ระหว่าง *nodD1* และ *nodA* ซึ่งได้แก่ *nodY* ในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า ดังนั้นผลการทดลองที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบ RFLPs ของ *nodY* กับศักยภาพการเข้าสร้างปมและศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า อาจชี้ให้เห็นว่า *nodY* อาจไม่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเข้าสร้างปมและกระบวนการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า

Abstract

Soybean is an economic plant which is used as food and feed and is modified into soybean oil, soybean milk, tofo, soybean paste, and soy sauce. In addition, some farmers grow soybean as a rotational crop because there are bacteria rhizobium in soybean root nodules which change nitrogen from the atmosphere into ammonia for soybean's use for growth to reduce the extent of uses of chemical fertilizers such as urea. Farmers in countries which are leading soybean exporters grow soybean in rotation with other economic plants such as corn for sustainable soil maintenance. At present, soybean cultivation areas in Thailand have been reduced to about 831,000 *rais* (1 *rai* equals 1,600 sq.m.) because the average sale price for soybean is 12 baht per kilogram. Therefore, Thai farmers tend to use chemical fertilizers to grow plants with higher return for investments, such as rice, corn, sugarcane, rubber plants, palm, and cassava. Continuous usages of large quantities of chemical fertilizers for a long time lead to soil infertility. The practice does not lead to soil fertility since it only adds plant mineral nutrients to soils. Moreover, chemical fertilizer usages lead to an

increase in degradation of soil organic matters which leads to deterioration of soil structure resulting in compactness of soil with less water holding capacity during dry periods. The aim of these experiments is to find correlation(s) between nitrogen-fixing potential of 58 strains of slow-growing soybean rhizobia and RFLP patterns of DNA region between *nodD1* and *nodA* genes after cutting with the restriction enzyme *sphI*. If a correlation is found, the RFLP patterns might be used to predict nitrogen-fixing potential of slow-growing soybean rhizobia. Authentication tests of 8 fast-growing bacteria isolated at the same time as the isolation of the slow-growing soybean rhizobia indicated that the strains did not nodulate the 7 cultivars of soybeans used in the authentication tests in Leonard jars. Therefore, they were not fast-growing soybean rhizobia. Amplification of DNA fragments between *nodD1* and *nodA* genes by PCR using *nodY*f (5'TGTACGCGGGTAAACC3') and *nodY*r (5'AGCGCAACGAGAAGAT3') as the primers showed a 395-bp DNA fragment for 45 slow-growing soybean strains and a 350-bp fragment for the remaining 13 strains. DNA fragments from agarose gels putified by Nucleospin® kit, restricted with *sphI*, and separated by agarose gel electrophoresis revealed 3 RFLP patterns or RFLPs. The first RFLP pattern A consisted of a 395 bp fragment, the second RFLP pattern B consisted of a 350 bp fragment, while the third RFLP pattern C consisted of 120 bp and 275 bp fragments. The number of slow-growing soybean rhizobia belonging to RFLP patterns A, B, and C were 30, 12, and 16 strains, respectively. The soybean rhizobium strains with RFLP patterns A, B, and C tended to yield an average total number of root nodules in the low (1-10 nodules per plant) to medium ranges (11-20 nodules per plant). No correlation was found between RFLP patterns and nitrogen fixing potential in the form of plant dry weight. At present, the function of the region between *nodD1* and *nodA* which constitutes *nodY* in slow-growing soybean rhizobia is unknown. Based on the no correlations between RFLPs of *nodY* and levels of nodulation and nitrogen fixation potential obtained from this research, *nodY* may not have an essential role in nodulation and nitrogen fixation processes.

สารบัญเรื่อง

		หน้า
1.	คำนำ	10
2.	วัตถุประสงค์	27
3.	วิธีการวิจัย	28
4.	ผลการวิจัย	31
5.	วิจารณ์และสรุปผล	44
	เอกสารอ้างอิง	46
	ภาคผนวก ก	52

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ปริมาณการนำเข้าถั่วเหลืองและปริมาณการผลิตถั่วเหลืองในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2550-2553	11
ตารางที่ 2	ผลผลิตเฉลี่ยและราคาขายเฉลี่ยต่อไร่ของพืชเศรษฐกิจชนิดต่างๆในปี พ.ศ. 2553/2554	11
ตารางที่ 3	พื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองในฤดูฝนและฤดูแล้งในประเทศไทย รวมทั้งผลผลิตเฉลี่ย	11
ตารางที่ 4	ความแตกต่างระหว่างไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วและประเภทเพิ่มจำนวนช้า	20
ตารางที่ 5	โครงสร้างทางเคมีของ Nod factors	24
ตารางที่ 6	สมบัติของไพร์เมอร์ *nodY*F และ *nodY*R	28
ตารางที่ 7	น้ำหนักแห้งของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดโดยเติมไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆ	42

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	ส่วนประกอบของโหลเลียวนาร์ด	16
รูปที่ 2	โหลเลียวนาร์ดที่ใช้ปลูกเมล็ดถั่วเหลืองในโรงปลูกพืชทดลอง	16
รูปที่ 3	การหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไรโซเบียมถั่วเหลืองโดยวิธี RAPD-PCR	17
รูปที่ 4	กลไกการสร้างปมในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า	22
รูปที่ 5	โครงสร้าง C_6-C_3-C_6	22
รูปที่ 6	สูตรโครงสร้างทางเคมีของเฟลโวนอยด์บางชนิดที่ขับออกจากรากถั่วเหลือง	23
รูปที่ 7	การสังเคราะห์ Nod factor	24
รูปที่ 8	ไดอะแกรมแสดงโพรโมเตอร์ของ *nodD1*	25
รูปที่ 9	แผนที่แสดงยีนที่เกี่ยวข้องกับการเข้าสร้างปมของไรโซเบียมถั่วเหลือง	26
รูปที่ 10	รากของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดที่เติมแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็วที่แยกจากปมรากถั่วเหลือง	31
รูปที่ 11	ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าทำให้เกิดปมที่รากถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60	32
รูปที่ 12	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หาโดยวิธี RAPD-PCR ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าสายพันธุ์ D509 และของแบคทีเรียไอโซเลต 509-1 ถึง 509-8	35
รูปที่ 13	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วน *nodY* โดยใช้ดีเอ็นเอจากไรโซเบียมประเภทเพิ่มจำนวนช้าสายพันธุ์ D121, D176, D221 และ D263	35
รูปที่ 14	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nodY* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า สายพันธุ์ D121 แสดงตำแหน่ง restriction site ของ *SphI* จำนวน 1 ตำแหน่ง	36
รูปที่ 15	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nodY* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า สายพันธุ์ D176 แสดงตำแหน่ง restriction site ของ *SphI* จำนวน 1 ตำแหน่ง	37
รูปที่ 16	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nodY* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า สายพันธุ์ D221 ไม่พบ restriction site ของ *SphI*	38
รูปที่ 17	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nodY* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า สายพันธุ์ D263 ไม่พบ restriction site ของ *SphI*	39

รูปที่ 18	ผลการหา RFLPs ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า จำนวน 58 สายพันธุ์	40
รูปที่ 19	ตัวอย่างไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าที่มี RFLPs แบบ A B และ C	45

1. คำนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีประโยชน์ เช่น ใช้บริโภคหรือแปรรูปเป็นน้ำมันถั่วเหลือง น้ำเต้าหู้ เต้าเจี้ยว ซีอิ๊วและใช้เป็นเมล็ดถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองอาหารสัตว์ นอกจากนี้ที่ปมรากถั่วเหลืองมีแบคทีเรียตรึงหรือเปลี่ยนไนโตรเจนในอากาศให้เป็นแอมโมเนีย ซึ่งเป็นรูปแบบสารประกอบไนโตรเจนที่ถั่วเหลืองนำไปใช้ในการเจริญ ในขณะเดียวกันถั่วเหลืองให้พลังงานแก่แบคทีเรียเหล่านี้ในรูปของเอทีพี (ATP) จึงเป็นการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาระหว่างถั่วเหลืองและแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้นซึ่งเรียกว่าไรโซเบียมถั่วเหลือง (soybean rhizobia) ในปัจจุบันผลผลิตเฉลี่ยของถั่วเหลืองในประเทศไทย ประมาณ 200-250 กิโลกรัมต่อไร่ (http://production.doae.go.th) ซึ่งมีค่าประมาณครึ่งหนึ่งของผลผลิตถั่วเหลืองในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่นผลผลิตถั่วเหลืองในสหรัฐอเมริกาเท่ากับ 458 กิโลกรัมต่อไร่ (http://www.feedusers.com) ในประเทศที่เป็นผู้นำด้านการผลิตและส่งออกถั่วเหลือง เช่น สหรัฐอเมริกา บราซิล และอาร์เจนตินา นอกจากจะใช้เมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ดีแล้ว ยังใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมถั่วเหลืองเพื่อเพิ่มผลผลิตถั่วเหลือง โดยปุ๋ยชีวภาพเหล่านี้มีสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลือง ซึ่งเข้าไปสร้างปมที่รากถั่วเหลืองและเปลี่ยนไนโตรเจนในอากาศให้เป็นแอมโมเนียให้ถั่วเหลือง เป็นการลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีประเภทไนโตรเจน การใช้ปุ๋ยเคมีอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลายาวนาน มีผลเสียต่อคุณภาพของดิน จะทำให้เกิดปัญหาความเสื่อมโทรมของโครงสร้างดินและดินขาดความอุดมสมบูรณ์ เนื่องจากการใช้ปุ๋ยเคมีไม่ใช่การบำรุงดิน แต่เป็นการอัดแร่ธาตุอาหารให้แก่พืช โดยไม่มีการเติมอินทรียวัตถุเพิ่มลงในดิน และการใช้ปุ๋ยเคมียังเร่งอัตราการสลายตัวของอินทรียวัตถุในดิน ทำให้โครงสร้างของดินเสื่อมลง ดินจึงกระด้างมีการอัดตัวแน่น ไม่อุ้มน้ำในฤดูแล้ง (อานัฐ ตันโช, 2550) นอกจากนี้ ปุ๋ยเคมีเหล่านี้มักถูกชะลงแหล่งน้ำ เป็นปุ๋ยให้พืชน้ำรวมถึงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายขนาดเล็กเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว จนแหล่งน้ำมีสีเขียว มลภาวะที่เพิ่มธาตุอาหารแก่พืชน้ำรวมถึงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายขนาดเล็ก เรียกว่า eutrophication ทำให้ใช้ประโยชน์จากแหล่งน้ำไม่ได้เต็มที่ ดังนั้นการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมถั่วเหลืองนอกจากจะเพิ่มผลผลิตถั่วเหลืองแล้ว ยังเป็นการอนุรักษ์แหล่งน้ำทางอ้อม

ในปัจจุบันประเทศไทยผลิตถั่วเหลืองไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ภายในประเทศ เป็นผลให้ประเทศไทยนำเข้าถั่วเหลืองประมาณ 85% ของปริมาณที่ต้องการใช้ ส่วนที่เหลือ 15% ของปริมาณถั่วเหลืองที่ต้องการใช้ในประเทศได้จากการผลิตภายในประเทศ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณการนำเข้าถั่วเหลืองและปริมาณการผลิตถั่วเหลืองในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2550-2553

ปี พ.ศ.	ปริมาณการนำเข้าถั่วเหลือง (ล้านตัน)	มูลค่าการนำเข้าถั่วเหลือง (ล้านบาท)	ปริมาณการผลิตถั่วเหลืองในประเทศไทย (ล้านตัน)
2550	1.54	19,456	0.21
2551	1.72	32,225	0.20
2552	1.53	23,812	0.19
2553	1.82	25,795,	0.19

แหล่งที่มา : http://www.agriinfo.doae.go.th/

นอกจากนี้ ในปัจจุบัน ชาวนาในประเทศไทยไม่นิยมปลูกถั่วเหลืองเป็นพืชหมุนเวียนสลับกับพืชชนิดอื่น เช่น ข้าวหรือข้าวโพด ทั้งนี้เหตุผลส่วนหนึ่งเป็นเพราะราคาขายเฉลี่ยต่อไร่ของเมล็ดถั่วเหลืองอยู่ในระดับต่ำ เมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่น ดังแสดงในตารางที่ 2 ประกอบกับความยากลำบากในการดูแล เช่น ดายหญ้าในแปลงถั่วเหลือง การปลูกถั่วเหลืองจึงไม่คุ้มค่าแก่การลงทุนและค่าเหนื่อย เกษตรกรจึงไม่นิยมปลูกถั่วเหลืองหมุนเวียนกับการปลูกข้าวหรือข้าวโพด ดังจะเห็นได้จากพื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองในประเทศไทยลดลงทุกปี ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ผลผลิตเฉลี่ยและราคาขายเฉลี่ยต่อไร่ของพืชเศรษฐกิจชนิดต่างๆในปี พ.ศ. 2553/2554

พืชเศรษฐกิจ	ผลผลิตเฉลี่ย (กิโลกรัมต่อไร่)	ราคาขายเฉลี่ยต่อกก. (บาท)	ราคาขายเฉลี่ยต่อไร่ (บาท)
ข้าว	530	30.00	15,900.00
ข้าวโพด	800	8.13	6,504.00
ถั่วเหลือง	250	16.18	4,045.00

แหล่งที่มา : http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=9704

ตารางที่ 3 พื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองในฤดูฝนและฤดูแล้งในประเทศไทย รวมทั้งผลผลิตเฉลี่ย

ปี พ.ศ.	พื้นที่เพาะปลูก (1000ไร่)	ผลผลิตเฉลี่ย (กก./ไร่)
2541	1,467	234
2542	1,451	227
2543	1,396	232
2544	1,154	236
2545	1,130	238

2546	961	246
2547	945	238
2548	929	250
2549	886	250
2550	831	253

แหล่งที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2552. http://www.oae.go.th/statistic/yearbook50/section2/sec2table26.pdf

ดังนั้น การที่ชาวนาไม่นิยมปลูกถั่วเหลืองเป็นพืชหมุนเวียนสลับกับการปลูกข้าวหรือข้าวโพด นอกจากจะทำให้ประเทศไทยขาดดุลการค้าแล้ว ยังทำให้ชาวนาขาดโอกาสที่จะทำนุบำรุงดินอย่างยั่งยืน เพราะที่ปมรากถั่วเหลืองมีแบคทีเรียไรโซเบียม ซึ่งเปลี่ยนไนโตรเจนจากบรรยากาศให้เป็นแอมโมเนียให้ถั่วเหลืองใช้แทนปุ๋ยยูเรีย และหลังจากเก็บเกี่ยวลำต้น ใบ และเมล็ดถั่วเหลือง รากและปมถั่วเหลืองจะถูกไถคราดลงดิน เป็นการเพิ่มธาตุอาหารประเภทไนโตรเจน ทำให้ชาวนาใช้ปุ๋ยยูเรียน้อยลงในการปลูกข้าว crop ต่อไป

ตารางที่ 1 ถึง ตารางที่ 3 แสดงให้เห็นถึงปัญหาประการหนึ่งของสถานการณ์การเพาะปลูกและการนำเข้าถั่วเหลืองในประเทศไทย กล่าวคือ ประเทศไทยนำเข้าถั่วเหลืองในปริมาณมากกว่า 5 เท่าของความสามารถของประเทศในการปลูกถั่วเหลือง เหตุผลประการหนึ่งได้แก่ ผลผลิตถั่วเหลืองในประเทศต่ำดังกล่าวแล้วข้างต้น ดังนั้นจึงควรมีการวิจัยและพัฒนาใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมถั่วเหลืองในการเพิ่มผลผลิตถั่วเหลือง จะเห็นได้จากตัวอย่างบทความวิจัยในต่างประเทศว่ามีการวิจัยและพัฒนามากด้านไรโซเบียมถั่วเหลือง และการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมถั่วเหลือง (Abaidoo et al., 2007;; Aguilar et al., 2001; Appunu et al., 2008; Bala et al., 2011; Brutti et al., 1998; Chen et al., 2000; Chen et al., 2004; de Jensen et al., 2004; Hungria et al., 2001; Minamisawa et al., 1999; Thomas-Oates et al., 2003) ในประเทศไทยยังมีการวิจัยน้อยมากด้านไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลือง (Ando et al., 1999; Chanaseni and Kongngoen, 1992; Emampaiwong, 2006; Maruekarajtinplaeng, 2010; Nuntagij et al., 1997; Teaumroong and Boonkerd, 1998; Thompson et al., 1991; Yokoyama et al., 1996, 1999) งานวิจัยต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 ของผู้วิจัย ได้แก่การวิจัยและการพัฒนาเพื่อผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลือง ซึ่งเป็นปุ๋ยชีวภาพฯ ที่เก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิห้องโดยเซลล์ไรโซเบียมไม่เพิ่มจำนวน และมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอประจำสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลือง เพื่อใช้ควบคุมคุณภาพระหว่างกระบวนการผลิต และใช้ตรวจความสามารถของไรโซเบียมในการแข่งขันกับไรโซเบียมท้องถิ่นเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลือง เป็นงานวิจัยที่ได้ขอจดสิทธิบัตรฉบับแรกเกี่ยวกับวิธีคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองเพื่อผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพฯ ที่เก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยดำเนินการขอจดสิทธิบัตรแล้วเมื่อวันที่ 25 มิถุนายน 2552 เลขที่ขอจดสิทธิบัตร 0901002866 (กาญจนา ชาญสง่าเวช, 2552) สิทธิบัตรฉบับนี้เป็นสิทธิบัตรที่อยู่ระหว่างการดำเนินการให้บริษัทแห่งหนึ่งที่ผลิตปุ๋ย

ชีวภาพขออนุญาตใช้สิทธิ์เทคโนโลยี (Technology Licensing) โดยผ่านทางสถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัจจุบันประเทศไทยปลูกถั่วเหลืองในภาคเหนือ ภาคกลางตอนบน และภาคตะวันออกเฉียงเหนือบางส่วน วิธีการหนึ่งที่จะเพิ่มผลผลิตถั่วเหลืองให้เพียงพอต่อการบริโภคภายในประเทศ เพื่อลดปริมาณการนำเข้า และการขาดดุลการค้า นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มรายได้ให้ชาวไร่ถั่วเหลือง บำรุงดินอย่างยั่งยืนและลดการเกิดมลภาวะทางน้ำประเภท eutrophication ได้แก่ การเพิ่มผลผลิตถั่วเหลืองต่อไร่ ด้วยการปรับปรุงดินให้เหมาะสมแก่การปลูกถั่วเหลือง การคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองที่เหมาะแก่การปลูกในดินและภูมิอากาศของท้องถิ่นต่างๆและการพัฒนาปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมถั่วเหลืองโดยคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนในปมรากถั่วเหลืองเพื่อนำมาวิจัยและพัฒนาวิธีการผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพฯ ซึ่งประกอบด้วยตัวพา (carrier) เช่นดินเพาะต้นกล้าหรือดินพีต (peat) กับไรโซเบียมถั่วเหลืองในปริมาณ 10^8 เซลล์ต่อกรัมพีต โดยคลุกเมล็ดถั่วเหลืองกับปุ๋ยไรโซเบียมก่อนปลูก (Somasegaran and Hoben, 1994) ไรโซเบียมถั่วเหลืองในปุ๋ยชีวภาพควรมีความสามารถตรึงไนโตรเจนสูงและมีความหนาแน่นของเซลล์ไรโซเบียมเหมาะสมต่อความสามารถในการแข่งขันกับไรโซเบียมที่มีอยู่เดิมในดินในการเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลือง ทั้งนี้เพราะความหนาแน่นที่มากเกินพอของเซลล์ไรโซเบียมจะทำให้เกิดการยับยั้งการเข้าสร้างปมโดยกลไกโควรัมเซ็นซิ่ง (quorum sensing) ซึ่งเป็นกลไกการสื่อสารระหว่างแบคทีเรีย ที่เชื่อมโยงความหนาแน่นของเซลล์กับการแสดงออกของยีน (Sharma et al., 2003) ในระหว่างปี ค.ศ. 2001-2003 Loh และ คณะ (Loh et al., 2001; 2002a; 2002b; 2003; Jitacksorn, 2006) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงไรโซเบียมถั่วเหลือง *Bradyrhizobium japonicum* ในอาหารสูตร minimum medium จนกระทั่งความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เซลล์จะขับออโตอินดิวเซอร์ (autoinducer) เบรดิออกซิติน (Bradyoxetin) หรือ [2-[4-[[4-(3-aminooxetan-2yl)phenyl](imino)methyl]phenyl] oxetan-3-ylamine] ซึ่งเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนเช่น $nodD_2$ โปรตีน $NodD_2$ ยับยั้งการแสดงออกของยีน *nodYABC* ซึ่งระบุรหัสการสังเคราะห์เอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์ Nod factor ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลืองของ *B. japonicum* ดังนั้นหากความหนาแน่นของ *B. japonicum* ในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม อยู่ในระดับที่ทำให้เกิดโควรัมเซ็นซิ่ง จะนำไปสู่การสังเคราะห์เบรดิออกซิติน ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ *nodD2* ซึ่งโปรตีน NodD2 ยับยั้งการแสดงออกของ *nodYABC* ทำให้ปริมาณการสังเคราะห์ Nod factor ลดลง ทำให้ลดความสามารถของ *B. japonicum* ในการเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลือง ดังนั้น บนซองบรรจุปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลืองที่มีจำหน่ายในท้องตลาดในปัจจุบัน จึงระบุให้เก็บรักษาในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำหรือในตู้เย็น ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้ไรโซเบียมถั่วเหลืองในปุ๋ยชีวภาพฯ แบ่งเซลล์จนกระทั่งมีจำนวนเกิน 10^8 เซลล์ต่อกรัมปุ๋ยฯ ซึ่งอาจลดความสามารถของเซลล์ในการเข้าสร้างปมโดยกลไกโควรัมเซ็นซิ่งดังกล่าวข้างต้น

ในประเทศไทยยังมีการวิจัยน้อยมากด้านไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลืองดังได้รายงานแล้วข้างต้น ในปี พ.ศ. 2552 ธันปภา จันทเพ็ชรและกาญจนา ชาญสง่าเวช ใช้น้ำหนักแห้งลำต้นถั่วเหลืองซึ่งเลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดที่ใช้ทรายแทนดิน (Somasegaran and Hoben, 1994) และเติมไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์เป็นบรรทัดฐานในการคัดเลือกไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพคลุกกับเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 และทดลองปลูกภาคสนามในแปลงทดลองขนาด 15 เมตร x 24 เมตร ที่ต. น้ำมวบ อ. เวียงสา จ.น่าน ผลการทดลองได้ผลผลิตเฉลี่ยของถั่วเหลือง 223.2 กิโลกรัมต่อไร่ คิดเป็นการเพิ่มผลผลิตเพียง 4% ทั้งนี้ได้แยกแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลืองหลังการเพาะปลูก 1 เดือน และนำมาหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยวิธี RAPD-PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ RPO1 หรือ CRL-7 เพื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ NA7 หากตรวจพบลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังกล่าวจากแบคทีเรียที่แยกได้จากปมราก แสดงว่าไรโซเบียมสายพันธุ์ NA7 สามารถแข่งขันกับไรโซเบียมท้องถิ่นในการเข้าสร้างปมภาคสนาม ผลการทดลองได้แยกแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง 198 ไอโซเลต แบ่งเป็นแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว 147 ไอโซเลต และแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนช้า 51 ไอโซเลต เนื่องจากสายพันธุ์ NA7 เป็นไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า จึงหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนช้า 51 ไอโซเลต และพบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ NA7 ในสัดส่วน 25.5% นอกจากนี้ Chansa-ngavej et al. (2010) ใช้ไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพคลุกกับเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 และทดลองปลูกภาคสนามในแปลงทดลองขนาด 12 เมตร x 15 เมตร ที่ต. ส้าน อ. เวียงสา จ. น่าน ผลการทดลองได้ผลผลิตเฉลี่ยของถั่วเหลือง 245.8 กิโลกรัมต่อไร่ คิดเป็นการเพิ่มผลผลิต 15% ผลการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรวจความสามารถของไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 ในการเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลืองในแปลงทดลองที่ ต.ส้าน พบว่าแบคทีเรียบางไอโซเลตที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองที่ปลูกในแปลงทดลองที่ ต.ส้าน มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 แสดงว่าไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 สามารถเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลืองและเพิ่มผลผลิตถั่วเหลือง 15% ในแปลงทดลองที่ ต.ส้าน

จากผลการทดลองข้างต้น จะเห็นได้ว่า การใช้น้ำหนักแห้งลำต้นถั่วเหลืองซึ่งเลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดที่เติมไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์เป็นบรรทัดฐานในการคัดเลือกไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 เป็นบรรทัดฐานที่ไม่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีความสามารถในการเข้าสร้างปมสูง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนในการค้นหาวิธีรวดเร็วที่จะใช้ระบุความสามารถของไรโซเบียมถั่วเหลืองในการแข่งขันกับไรโซเบียมที่มีอยู่เดิมในดินในการเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลืองและความสามารถตรึงไนโตรเจนสูง การตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมถั่วเหลือง หมายถึง การที่ไรโซเบียมถั่วเหลืองเข้าไปในรากถั่วเหลืองและก่อให้เกิดปม ไรโซเบียมถั่วเหลืองในปมรากถั่วเหลืองเปลี่ยนไนโตรเจนที่ได้จากอากาศ เป็นแอมโมเนีย ซึ่งถั่วเหลืองนำไปใช้ในการเจริญ เป็นการตรึงไนโตรเจนแบบพึ่งพา (symbiotic nitrogen fixation) โดยถั่วเหลืองให้ที่พักในปมและให้พลังงานในรูปเอทีพี (ATP) แก่ไรโซเบียมถั่วเหลือง และไรโซเบียมถั่ว

เหลืองให้แอมโมเนียที่ได้จากการตรึงไนโตรเจนสำหรับถั่วเหลืองนำไปใช้ในการเจริญ ไนโตรจีเนสเป็นเอนไซม์ในกระบวนการตรึงไนโตรเจนดังแสดงในสมการที่ (1)

ไนโตรจีเนส

$$N_2 + 8H + 8e + 16\ ATP \longrightarrow 2NH_3 + H_2 + 16\ (ADP + inorganic\ phosphate) \quad (1)$$

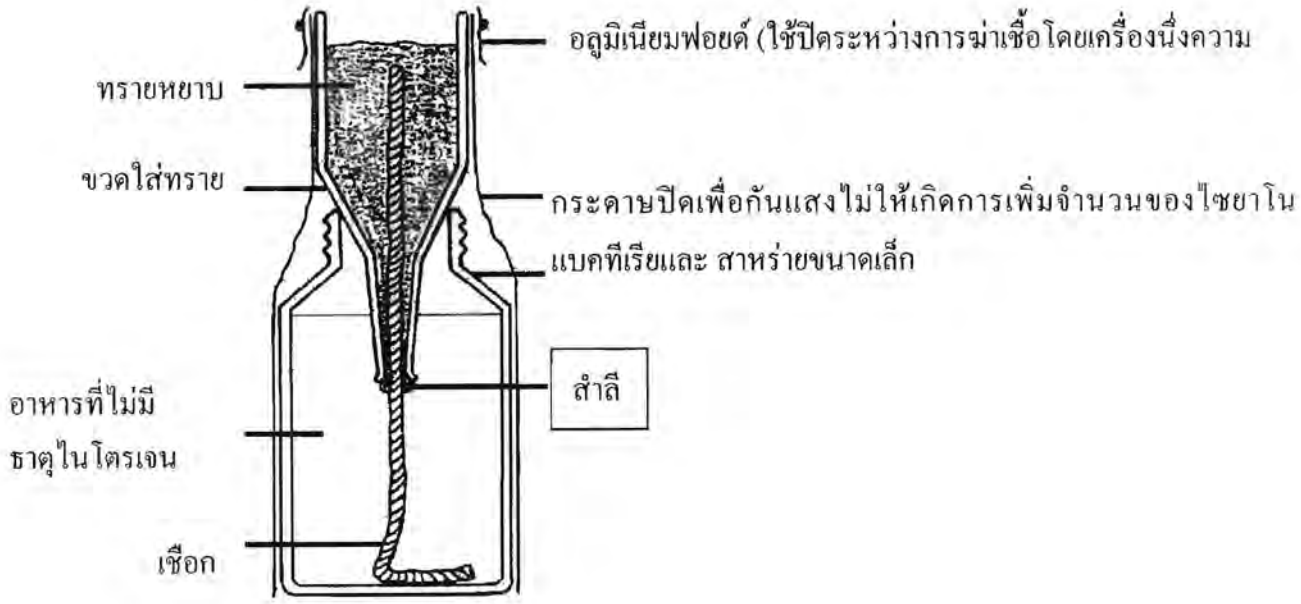
จากสมการข้างต้น จะเห็นได้ว่า ในการตรึงไนโตรเจนหนึ่งโมเลกุล มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้หนึ่งโมเลกุล ดังนั้นจึงอาจใช้การตรวจวัดแอคติวิตีของ hydrogen uptake hydrogenase ของไรโซเบียมถั่วเหลือง ในการวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังสามารถใช้หลายวิธีในการวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมถั่วเหลือง เช่น ใช้น้ำหนักลำต้นแห้ง น้ำหนักปมแห้ง จำนวนปม ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในลำต้นที่วัดโดยใช้วิธีเคดัล (Kjeldahl) การนำรากที่มีปม มาทำ acetylene reduction assay วิธีหาศักยภาพของไรโซเบียมถั่วเหลืองในการตรึงไนโตรเจนเหล่านี้แต่ละวิธีต้องใช้เวลานาน และเปลืองค่าใช้จ่าย ดังนั้นจึงควรมีวิธีลดจำนวนไรโซเบียมถั่วเหลืองที่จะนำไปหาศักยภาพการตรึงไนโตรเจน ตัวอย่างเช่น การวิจัยหาวิธีรวดเร็วเพื่อใช้ตรวจหาสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีประสิทธิภาพสูงในการเข้าสร้างปม โดยสามารถใช้วิธีตรวจหานี้ คัดกรองไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปม จากจำนวนไอโซเลตที่แยกได้นับพันไอโซเลต ก่อนนำไปหาศักยภาพการตรึงไนโตรเจน ดังนั้นหากค้นพบวิธีรวดเร็วที่คัดกรองไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปม จะทำให้จำนวนไรโซเบียมถั่วเหลืองที่นำไปหาศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนลดลง และในอนาคต หากมีการพิสูจน์ว่าไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปม มีศักยภาพตรึงไนโตรเจนสูงด้วย วิธีการคัดกรองนี้ก็จะใช้ระบุศักยภาพการตรึงไนโตรเจนได้ วิธีระบุศักยภาพการตรึงไนโตรเจนที่ใช้ในปัจจุบันมีหลายวิธี เช่น การใช้น้ำหนักลำต้นหรือปมแห้ง และ/หรือการใช้จำนวนปมที่ราก (Somasegaran and Hoben, 1994) การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปม ราก ลำต้นและใบโดยวิธีเคดัล (Kjeldahl method) (Pomeranz and Meloan, 1971; Chang, 2003) การทำ acetylene reduction assay (Somasegaran and Hoben, 1994) และ การหาแอคติวิตีของ hydrogen uptake hydrogenase (Albrecht et al., 1979 ; Carter et al., 1977 ; Fuhrmann, 1990 ; Lambert et al., 1987 ; van Berkum and Saloger, 1991) แต่ละวิธีต้องใช้เวลานาน (ณิชานันท์ กาบเกษร และ กาญจนา ชาญสง่าเวช, 2552)

การชั่งน้ำหนักแห้งของลำต้น ปม รวมถึงการนับจำนวนปม

วิธีดั้งเดิมในการคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลือง ได้แก่การใส่เมล็ดถั่วเหลืองงอกราก (germinating soybean seeds) ลงในทรายที่บรรจุใน โหลเลียวนาร์ด (Leonard jars , Somasegaran & Hoben, 1994) และเติมไรโซเบียมถั่วเหลืองแต่ละสายพันธุ์ หลังจากนั้นเลี้ยงถั่วเหลืองด้วย Nitrogen- free medium และตัดส่วนลำต้นไปชั่งน้ำหนักแห้ง เนื่องจากสารอาหารที่ใช้เลี้ยงถั่วเหลืองไม่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ถั่วเหลืองจึงได้ธาตุไนโตรเจนจากการที่ไรโซเบียมถั่วเหลืองตรึงไนโตรเจนในอากาศ ให้เป็นแอมโมเนียซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ถั่วเหลืองนำไปใช้ในการเจริญ สายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่ทำให้น้ำหนักแห้งลำต้นถั่วเหลืองสูงกว่า

น้ำหนักแห้งของ positive control ซึ่งเป็นถั่วเหลืองที่ได้รับธาตุไนโตรเจนโดยเติม 0.05% KNO_3 ใน Nitrogen-free medium จัดว่าเป็นสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีศักยภาพสูงในการตรึงไนโตรเจน

วิธีเหล่านี้ง่าย ทำโดยปลูกถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ ในโหลเลียวนาร์ด (Leonard jars) ซึ่งประกอบด้วยโหลใส่สารอาหารที่ไม่มีธาตุไนโตรเจนสำหรับถั่วเหลือง (nitrogen-free medium) ปลูกถั่วเหลืองงอกราก (germinating seeds) ในทรายหยาบ (coarse sand) โดยเติมไรโซเบียมถั่วเหลืองแต่ละสายพันธุ์ เลี้ยงถั่วเหลืองในโรงปลูกพืชทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิ 28°C ± 2°C เป็นเวลา 28 วัน ตัดส่วนลำต้นเหนือแผลเป็นของใบเลี้ยงคู่ (cotyledon scar) นำส่วนลำต้นหรือปมไปอบแห้งที่ 80°C เป็นเวลา 3 วัน จนน้ำหนักแห้งคงที่และชั่งน้ำหนักแห้งของส่วนลำต้น หรือปม หลังจากนั้นนับจำนวนปม รูปที่ 1. แสดงส่วนประกอบของโหลเลียว นาร์ด รูปที่ 2. แสดงโหลเลียวนาร์ดที่ใช้เลี้ยงถั่วเหลืองในโรงปลูกพืชทดลองในการทดลองนี้

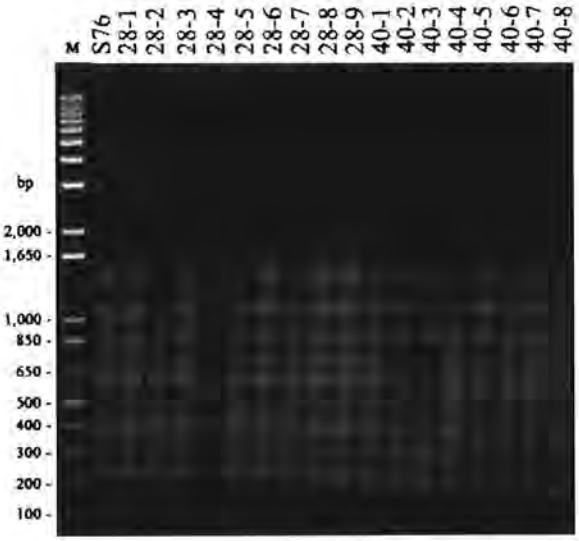


รูปที่ 1 ส่วนประกอบของโหลเลียวนาร์ด (Somasegaran and Hoben, 1994)

รูปที่ 2 โหลเลียวนาร์ดที่ใช้ปลูกเมล็ดถั่วเหลืองในโรงปลูกพืชทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิ 28° ± 4°C เติมไรโซเบียมถั่วเหลืองหนึ่งสายพันธุ์ในโหลเลียวนาร์ดแต่ละใบ

สารอาหารที่ใช้เลี้ยงถั่วเหลืองไม่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ถั่วเหลืองจึงได้ธาตุไนโตรเจนจากการที่ไรโซเบียมถั่วเหลืองตรึงไนโตรเจนในอากาศ ให้เป็นแอมโมเนียซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ถั่วเหลืองนำไปใช้ในการเจริญ สายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่ทำให้น้ำหนักแห้งลำต้นถั่วเหลืองสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกว่าน้ำหนักแห้งของ positive control ซึ่งเป็นถั่วเหลืองที่ได้รับธาตุไนโตรเจนโดยเติม 0.05% KNO_3 ใน nitrogen-free medium จัดเป็นสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีศักยภาพสูงในการตรึงไนโตรเจน

ข้อเสียของวิธีนี้คือ บางครั้งไม่สามารถใช้น้ำหนักลำต้นแห้ง น้ำหนักปมแห้งหรือจำนวนปมที่ได้จากการทดลองโดยใช้โหลเลียวนาร์ดในโรงปลูกพืชทดลองในการระบุศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลืองภาคสนาม ทั้งนี้เพราะในไร่ถั่วเหลือง มีการแข่งขันเข้าสร้างปมระหว่างไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ที่ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ และไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีอยู่เดิมในไร่ถั่วเหลือง (Rodriguez-Navarro et al., 2010) นอกจากนี้ยังต้องแยกแบคทีเรียจากปมทุกปมในรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดเพื่อนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ เช่น หาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อพิสูจน์ว่าในแต่ละปม ไม่มีไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่สายพันธุ์ที่เติมลงในโหลเลียวนาร์ด ทั้งนี้เพราะบางการทดลองมีการวางโหลเลียวนาร์ดหลายโหลในโรงปลูกพืชทดลอง หากขาดความระมัดระวังในการเติมสารอาหารลงในโหลเลียวนาร์ด อาจทำให้ไรโซเบียมถั่วเหลืองจากโหลเลียวนาร์ดโหลหนึ่งกระเด็นไปในโหลเลียวนาร์ดอีกโหลหนึ่ง ทำให้ปมรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดนั้นมีไรโซเบียมถั่วเหลืองหลายสายพันธุ์ รูปที่ 3 แสดงตัวอย่างการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์ว่ามีไรโซเบียมถั่วเหลืองเพียง 1 สายพันธุ์ในปมรากถั่วเหลืองในโหลเลียวนาร์ด



รูปที่ 3 การหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไรโซเบียมถั่วเหลืองโดยวิธี RAPD-PCR โดยใช้ CRL-7 เป็นไพรเมอร์ เลนที่ 1 เป็นขนาดโมเลกุลมาตรฐาน เลนที่ 2 เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ S76 เลนที่ 3-11 เป็นไรโซเบียมถั่วเหลืองหลายไอโซเลตที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองในโหลเลียวนาร์ดที่บ่มที่ $28^{\circ}C$ เลนที่ 12-19 เป็นไรโซเบียมถั่วเหลืองหลายไอโซเลตที่แยกจาก

ปมรากทุกปมของถั่วเหลืองที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดที่บ่มที่ 28°C สลับกับ 40°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ รูปนี้เป็นตัวอย่างผลการทดลองเพื่อแสดงให้เห็นว่าในปมรากแต่ละปมของถั่วเหลืองที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดเดียวกัน มีไรโซเบียมถั่วเหลืองเพียง 1 สายพันธุ์คือสายพันธุ์ S76 ในกรณีนี้ ไม่มีการปนเปื้อนของไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์อื่นในปมราก (กาญจนา ชาญสง่าเวช, ผลการทดลองที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์)

การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในลำต้น หรือปมโดยวิธีเคดัล

การหาศักยภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีนี้ ใช้สมมติฐานที่ระบุว่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในลำต้นหรือปมรากถั่วเหลือง ได้มาจากแอมโมเนียซึ่งเป็นสารประกอบผลลัพธ์ของกระบวนการตรึงไนโตรเจนดังระบุในสมการที่ (1) Chang (2003) ระบุว่าวิธีเคดัลประกอบด้วยการใช้กรดซัลฟูริกย่อยโปรตีนทั้งหมดให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเติมผงโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต หลังจากนั้นใช้น้ำเจือจางสารละลายที่ได้จากการย่อย และทำให้เป็นกลางโดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ กลั่นแอมโมเนียที่เกิดขึ้นลงในกรดบอริกที่กำหนดปริมาตรและมี indicator คือ methylene blue และ methyl red ไตเตรต borate ion (ซึ่งมีปริมาณเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณไนโตรเจน) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{โปรตีน} \xrightarrow[\text{ความร้อนและ } KMnO_4]{\text{กรดซัลฟูริก}} \text{แอมโมเนียมซัลเฟต}$$

$$(NH_4)_2SO_4 + 2\,NaOH \longrightarrow 2NH_3 + Na_2SO_4 + 2H_2O$$

$$NH_4 + H_3BO_3 \longrightarrow NH_4 + H_2BO_3^-$$

(borate ion)

$$H_2BO_3^- + H^+ \longrightarrow H_3BO_3$$

วิธีคำนวณปริมาณร้อยละของไนโตรเจน

โมลของกรดไฮโดรคลอริก = โมลของแอมโมเนีย = โมลของไนโตรเจนในตัวอย่าง

$$\%\,N = NHCl \times \frac{\text{ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \times \frac{\text{น้ำหนักอะตอมของไนโตรเจน}}{\text{โมล}} \times 100$$

โดย $NHCl$ = normality ของ HCl มีหน่วยเป็น โมล/1000 มล.

น้ำหนักอะตอมของไนโตรเจน = 14

ข้อดีของวิธีนี้คือวิธีทำค่อนข้างง่าย ข้อเสียคือใช้เวลาในการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างประมาณ 3 ชั่วโมง ซึ่งถ้ามีหลายตัวอย่าง จะใช้เวลาในการวิเคราะห์นานมาก จึงไม่ใช่วิธีรวดเร็วที่จะใช้ระบุความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลือง

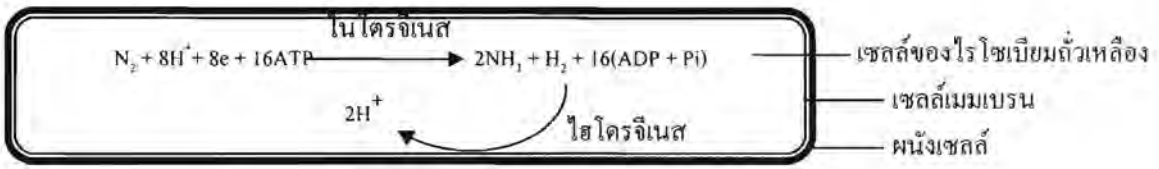
การทำ acetylene reduction assay

วิธีดั้งเดิมที่ใช้คัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีประสิทธิภาพตรึงไนโตรเจน ได้แก่ การทำ acetylene reduction assay (Somasegaran and Hoben, 1994) โดยตัดรากที่ติดปมและนำไปใส่ในภาชนะเช่น ขวดปิดฝายางที่ไม่ให้อากาศเข้า-ออก หลังจากนั้นใช้เข็มฉีดก๊าซ acetylene ที่กำหนดปริมาตร และใช้ gas chromatography ตรวจปริมาณ ethylene ที่เกิดขึ้นจากการรีดิวซ์ acetylene โดยเร่งด้วยเอนไซม์ไนโตรจีเนสของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในปมรากถั่วเหลือง ใช้ acetylene ซึ่งมี triple bonds แทนก๊าซไนโตรเจนซึ่งมี triple bonds สายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีแอคติวิตีไนโตรจีเนสสูง จัดว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูง

ข้อดีของวิธีนี้คือเป็นวิธีที่ใช้แพร่หลาย ข้อเสียคือต้องบรรจุรากที่ติดปมในภาชนะที่ไม่ให้อากาศเข้า-ออก และต้องมีก๊าซ acetylene ซึ่งในกรณีที่มีตัวอย่างน้อย อาจมีปัญหาในการซื้อและเก็บก๊าซ acetylene ปริมาตรน้อย นอกจากนี้ในปมที่ใช้ทำ acetylene reduction assay ยังอาจมีการปนเปื้อนของไรโซเบียมสายพันธุ์อื่นในปม

การหาแอคติวิตีของ hydrogen uptake hydrogenase

ในปี ค.ศ. 1979 Albrecht และคณะ เสนอว่า ไรโซเบียมถั่วเหลือง ที่มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพิ่มการตรึงไนโตรเจนในปมรากถั่วเหลือง เพราะไฮโดรจีเนสหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ไฮโดรเจนอัพเทคไฮโดรจีเนส (hydrogen uptake hydrogenase) ซึ่งอยู่บนเซลล์เมมเบรน จะออกซิไดซ์ไฮโดรเจน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ จากปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน กลับเป็น $2H^+$ ที่เซลล์นำกลับเข้าไปใช้ใหม่ในปฏิกิริยารีดอกซ์ต่างๆภายในเซลล์ ดังแสดงในไดอะแกรมต่อไปนี้(van Berkum and Saloger,1991)



ต่อมามีผลงานวิจัยหลายชิ้นเกี่ยวกับไฮโดรเจนอัพเทคไฮโดรจีเนส และยีน *hup* ที่ระบุรหัสการสังเคราะห์เอนไซม์นี้ แต่ยังไม่มีการสรุปผลการทดลองอย่างแน่ชัดว่า ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีการแสดงออกของยีน *hup* ตรึงไนโตรเจนได้ประสิทธิภาพสูงกว่าสายพันธุ์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *hup* หรือไม่ (Albrecht et al.,1979; Carter et al., 1977, Fuhrmann, 1990; Lambert et al., 1987) ดังนั้นในรายงานการวิจัยฉบับนี้จึงเสนอแนวคิดที่จะใช้ RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) บริเวณ spacer region ระหว่างยีน *nodD1* และ *nodA* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองในการระบุศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลือง แนวเหตุผลในรายงานการวิจัยฉบับนี้คือ *nodD1* และ *nodA* เป็นยีนของไรโซเบียมถั่วเหลืองที่เกี่ยวข้องกับการเข้าไปสร้างปมที่รากถั่วเหลือง ดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีนทั้งสองนี้แตกต่างกันในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทต่างๆ เพียงพอที่จะใช้ความแตกต่างของดีเอ็นเอบริเวณนี้ ซึ่งสะท้อนให้เห็นได้จาก RFLPs คือรูปแบบการเรียง

ตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอกาโรสเจลหลังจากตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ (restriction enzyme) ในการทำนายศักยภาพการเข้าสร้างปมซึ่งอาจนำไปสู่ศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลือง

ประเภทของไรโซเบียมถั่วเหลือง

ในปัจจุบัน วงการไรโซเบียมถั่วเหลืองทั่วโลก ยอมรับการแบ่งประเภทไรโซเบียมถั่วเหลืองเป็นประเภทเพิ่มจำนวนเร็วและประเภทเพิ่มจำนวนช้า โดยไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วมี 2 ชนิด ได้แก่ *Sinorhizobium fredii* และ *S. xinjiangense* (Chen et al, 1988 ; Peng et al, 2002) ส่วนไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้ามี 3 ชนิด ได้แก่ *Bradyrhizobium elkanii, B. japonicum* และ *B. liaoningense* (Jordan, 1982; Kuykendall et al, 1992, Xu et al, 1995) ไรโซเบียมถั่วเหลืองทั้งสองประเภทแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความแตกต่างระหว่างไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วและประเภทเพิ่มจำนวนช้า (Elkan and Bunn, 1992)

สมบัติ	ไรโซเบียมถั่วเหลือง	
	ประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว	ประเภทเพิ่มจำนวนช้า
1. เวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า	น้อยกว่า 6 ชั่วโมง	มากกว่า 6 ชั่วโมง
2. จำนวนและชนิดของแฟลกเจลลา	2-6 เส้นอยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella)	1 เส้นอยู่ด้านข้างบริเวณใกล้ปลายเซลล์ (subpolar flagella)
3. ตำแหน่งของยีน *nifH* และ *nifDK* ซึ่งระบุรหัสการสังเคราะห์ Fe protein และ α , β subunits ของ Mo-Fe protein ตามลำดับ โปรตีนทั้งสามชนิดประกอบกันเป็นเอนไซม์ไนโตรจีเนส	อยู่บนโอเปอรอนเดียวกัน	อยู่ต่างโอเปอรอน
4. ตำแหน่งของยีนที่ระบุรหัสการสังเคราะห์โปรตีนเกี่ยวกับการเข้าสร้างปม	อยู่บน pSym ซึ่งเป็นพลาสมิดขนาดใหญ่ประมาณ 350 kb	อยู่บนโครโมโซม

ในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนและบนหมู่เกาะโอกินาวา ประเทศญี่ปุ่น มีรายงานการพบไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว ทั้งนี้เพราะดินในพื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองมีค่าพีเอชอยู่ในช่วงด่าง (Camacho et al., 2002 ; Dowdle and Bohlool, 1985; Suzuki et al., 2008) แต่ Han et al. (2008) รายงานการพบไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วและไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า *Bradyrhizobium liaoningense* ในมลฑลซิงเจียง (Xinjiang) ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ซึ่งพื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองมีค่าพีเอชอยู่ในช่วงด่าง ในประเทศไทย

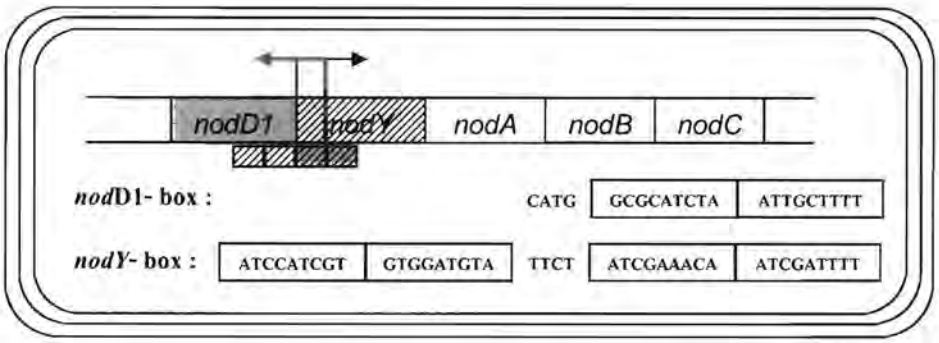
Chansa-ngavej et al., (2009) และ Maruekarajtinplaeng, (2010) รายงานการพบเฉพาะไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะดินในพื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองในประเทศไทยมีค่าพีเอชในช่วงกรด (pH 5.0-6.5 กาญจนา ชาญสง่าเวช, ผลงานวิจัยที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์)

Duteau และคณะ (1986) รายงานว่า ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว 4 สายพันธุ์ สามารถเข้าสร้างปมและตรึงไนโตรเจนในถั่วเหลือง (*Glycine max*) พันธุ์ Peking, Virginia, Hardee และถั่วเหลือง *Glycine soja* ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว 3 ใน 4 สายพันธุ์นี้เข้าสร้างปมที่ไม่มีการตรึงไนโตรเจน (ineffective nodules) ในถั่วเหลืองอีก 11 พันธุ์ ในขณะที่ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วอีก 1 สายพันธุ์ (*Rhizobium fredii* USDA 191) สามารถเข้าสร้างปมที่ตรึงไนโตรเจนที่รากถั่วเหลือง 14 พันธุ์ ไรโซเบียมถั่วเหลืองทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่สร้างปมในถั่วเหลืองพันธุ์ Harosoy rjl rjl นอกจากนี้ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว *R.fredii* USDA191 ตรึงไนโตรเจนได้ดีเทียบเท่าไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า *Bradyrhizobium japonicum* USDA 61A76 เมื่อใช้ถั่วเหลืองพันธุ์ Peking, Virginia, Harsoy63, Rampage, และ *Glycine soja* พันธุ์ PI 342622A และ PI 101404B แต่ตรึงไนโตรเจนน้อยกว่า *B. japonicum* USDA61A76 เมื่อใช้ถั่วเหลืองพันธุ์ Evans, Williams, Hardee, Itill และ *Glycine soja* PI 407217 และ P1 81762

ผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ประเภทของไรโซเบียมถั่วเหลือง (เพิ่มจำนวนเร็วหรือเพิ่มจำนวนช้า) และพันธุ์ถั่วเหลือง มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน ในการทดลองที่เสนอรายงานฉบับนี้จะใช้ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่กรมส่งเสริมการเกษตรแนะนำให้เกษตรกรไร่ถั่วเหลืองเพาะปลูกในจังหวัดทางภาคเหนือของประเทศไทย เช่น จังหวัดพิษณุโลกและจังหวัดน่าน เพราะพันธุ์นี้มีจุดเด่นคือทนทานต่อโรคราสนิมดีกว่าถั่วเหลืองพันธุ์อื่นๆ มีการแตกกิ่งน้อย จึงสามารถเพิ่มจำนวนต้นต่อไร่อันเป็นการเพิ่มผลผลิต สามารถปลูกได้ทั้งในฤดูแล้งและฤดูฝน ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 เป็นผลงานการวิจัยของศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ กรมวิชาการเกษตร ได้ผสมพันธุ์ถั่วเหลืองจำนวน 22 คู่ เมื่อปี 2518 ณ สถานที่ทดลองพืชไร่แม่โจ้ ซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ Williams มีลำต้นแข็งแรง จำนวนฝักต่อต้นมาก กับพันธุ์ สจ. (F10 7019) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ทนทานต่อโรคราสนิม คุณภาพเมล็ดดี และคณะกรรมการวิจัยกรมวิชาการเกษตร ได้มีมติรับรองสายพันธุ์นี้ เมื่อวันที่ 30 เดือนกันยายน พ.ศ.2530 โดยใช้ชื่อถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 มีอายุถึงวันออกดอก 35 วัน อายุถึงวันเก็บเกี่ยว 97 วัน (สุรัตน์ อัตตะ http://www.komchadluek.net/detail/20100817/70065/) สำหรับไรโซเบียมถั่วเหลืองที่ใช้ในรายงานการวิจัยนี้ ได้แก่แบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็วที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองจำนวน 7 สายพันธุ์ที่แยกโดย Emampaiwong (2006) และต้องพิสูจน์ว่าเป็นไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว และใช้ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า จำนวน 58 สายพันธุ์ รวมเป็น 65 สายพันธุ์ ที่รายงานโดย Emampaiwong (2006) โดยใช้จำนวนปมที่รากของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เลี้ยง

โครงสร้างของ Nod factor ของ *B. japonicum* ประกอบด้วย N-acetyl glucosaminyl 5 units เชื่อมกันด้วย β 1, 4 linkages (Stacey, 1995; Wang & Stacey, 1991) Nod factor อาจมีส่วนช่วยในการม้วนตัวของรากขนอ่อนและการทำให้เซลล์ในชั้น cortex ของรากขนอ่อนแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วจนเกิดเป็นปมดังนี้ เมื่อ *B. japonicum* เข้าใกล้รากขนอ่อนของถั่วเหลือง จะเกาะบนรากขนอ่อนบริเวณ lectin ซึ่งเป็นโปรตีนบนรากขนอ่อนที่เฉพาะเจาะจงให้พอลิแซ็กคาไรด์ของ *B. japonicum* เกาะ หลังจากนั้นปลายรากขนอ่อนม้วนตัวและ *B. japonicum* เข้าไปใน infection sac ซึ่งเป็นถุงที่เกิดจากเซลล์เมมเบรนของรากขนอ่อน ซึ่งจะยืดยาวเป็น infection thread ลำเลียงเซลล์ของ *B. japonicum* ไปยังเซลล์ในชั้น cortex ของรากถั่วเหลือง หลังจากนั้นส่วนปลายของ infection thread ที่บรรจุเซลล์ของ *B. japonicum* ถูกตัดออก กลายเป็น symbiosome ซึ่งประกอบด้วยเซลล์เมมเบรนของรากถั่วเหลืองหุ้ม *B. japonicum* ในรูปของ bacteroids ซึ่งมีรูปร่างไม่แน่นอนและไม่มีแฟลกเจลลา สามารถตรึงไนโตรเจน (Haeze and Holsters, 2002)

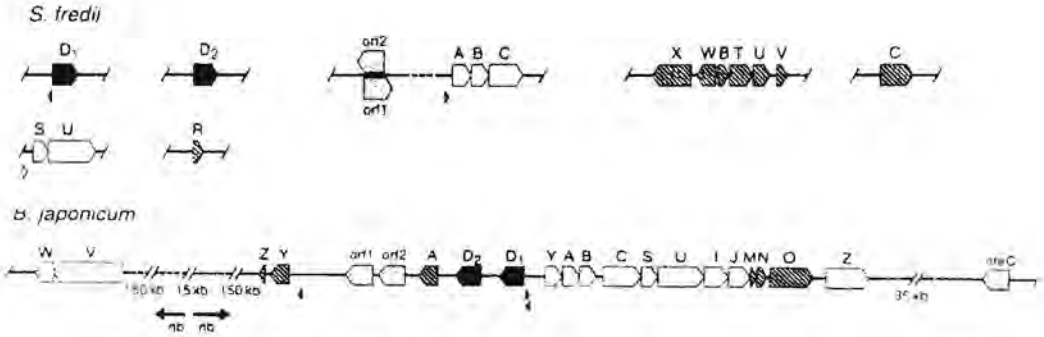
โพรโมเตอร์ของ *nodD*1 และโพรโมเตอร์ของ *nodYABC* ใน *B. japonicum* อยู่ทับกันบางส่วน (partially overlapping promoters) ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 ไดอะแกรมแสดงให้เห็นว่าบางส่วนของโพรโมเตอร์ของ *nodD*1 ซึ่งแทนด้วยกล่องสี่เหลี่ยมสองกล่อง ▨ อยู่ทับกับโพรโมเตอร์ของ *nodYABC* ซึ่งแทนด้วยกล่องสี่เหลี่ยมสี่กล่อง ▨ โพรโมเตอร์ของ *nodD1* หรือ *nodD1* box ของ *B. japonicum* ประกอบด้วย 9 นิวคลีโอไทด์ อยู่เรียงต่อกันสองครั้ง ซึ่งแทนด้วยกล่อง 2 กล่องในไดอะแกรม โพรโมเตอร์ของ *nodYABC* เรียกว่า *nodY* box ประกอบด้วย 9 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเรียงต่อกันสี่ครั้ง ลูกศรแสดงทิศทางทรานสคริพชั่นของยีน *nodD1* และของ *nodY*ABC operon ใน *B. japonicum* (Wang and Stacey, 1991)

Pueppke และคณะ (1998) รายงานว่ารากขนอ่อนของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วขับเฟลโวนอยด์ Coumestrol ในขณะที่ Kosslak และคณะ (1987) รายงานว่ารากขนอ่อนของไรโซเบียมถั่วเหลือง ประเภทเพิ่มจำนวนช้า ขับเฟลโวนอยด์ Genistein หรือ Daidzein ซึ่งมีโครงสร้างแตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 6 เฟลโวนอยด์เหล่านี้ทำปฏิกิริยากับบริเวณปลาย C ของโปรตีน NodD1 ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nodD1* ซึ่งระบุรหัสลำดับกรดอะมิ

โนที่ปลาย C ของ NodD1 จะต่างกัน ภาคผนวก ก แสดง multiple alignments ของยีน *nodD1* ในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว (*Sinorhizobium fredii)* และไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า (*B. japonicum*, *B. elkanii*) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ดาวน์โหลด จาก GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ผลการทำ multiple alignments พบว่าลำดับนิว คลีโอไทด์ของ *nodD1* ของไรโซเบียมทั้งสองประเภทต่างกัน ดังแสดงในภาคผนวก ก นอกจากนี้ Schlaman และคณะ (1992) ไม่รายงานการมี *nodY* ในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว *Sinorhizobium fredii* ดังแสดงในรูปที่ 9



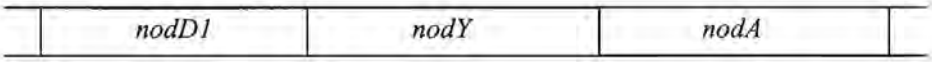
รูปที่ 9 แผนที่แสดงยีนที่เกี่ยวข้องกับการเข้าสร้างปมของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว (*S. fredii*) และไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า (*B. japonicum*) ลูกศรขนาดกว้าง (wide arrows) แสดงยีนและทิศทางของทรานสคริพชั่นของยีนเหล่านั้น (Schlaman et al., 1992)

แนวเหตุผลในการวิจัย

จากการตรวจเอกสารดังรายงานข้างต้น พบว่ายังไม่มีรายงานการพบ *nodY* ในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว ในขณะที่ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้ามี *nodY* (Schlaman et al., 1992) ดังแสดงในไดอะแกรมต่อไปนี้

ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว

ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า



นอกจากนี้ *nodD1* และ *nodA* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการเข้าไปสร้างปม ดังรายละเอียดที่รายงานแล้วในคำนำ ประกอบกับในปัจจุบันยังไม่มีผู้รายงานหน้าที่ของผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ระบุรหัสโดย *nodY* ดังนั้นบริเวณระหว่าง *nodD1* และ *nodA* จึงเป็นบริเวณที่น่าสนใจ ในด้านของความสามารถเข้าไปสร้างปมและความแตกต่างเชิงวิวัฒนาการของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วและประเภทเพิ่มจำนวนช้า งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะหาความเป็นไปได้ของการใช้

ความแตกต่างของบริเวณระหว่าง *nodD1* และ *nodA* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองทั้งสองประเภทในการระบุศักยภาพการเข้าสร้างปมและศักยภาพการตรึงไนโตรเจน โดยใช้ RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) ระบุความแตกต่างของบริเวณดังกล่าว

RFLPs หมายถึงรูปแบบต่างๆการเรียงตัวบนแผ่นอกาโรสเจลหลังการทำ agarose gel electrophoresis ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วย restriction enzyme(s) ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอต่างกัน จะมี restriction sites ต่างกันทำให้รูปแบบการเรียงตัวบนแผ่นอกาโรสเจลหลังการทำ agarose gel electrophoresis ต่างกันเกิดเป็น RFLPs

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

หาความสัมพันธ์ระหว่าง RFLPs ของชิ้นส่วนบริเวณ *nodD1* และ *nodA* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองกับศักยภาพการเข้าสร้างปมและศักยภาพการตรึงไนโตรเจนเพื่อใช้ประกอบการพิจารณาเสนอใช้ RFLPs ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าว ในการระบุศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลือง

3. วิธีการวิจัย

3.1. ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่ใช้ในการวิจัย

ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่ใช้ในการวิจัย เป็นแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็วจำนวน 7 สายพันธุ์ และประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 58 สายพันธุ์รวมเป็น 65 สายพันธุ์ที่แยกจากปมรากถั่วเหลือง 15 ตำบลใน 3 อำเภอ (อ.ชาติตระการ อ.บางระกำ และ อ.พรหมพิราม) จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งแยกโดย Emampaiwong (2006) สาเหตุที่เลือกแบคทีเรียเหล่านี้เพราะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หาโดยวิธี RAPD-PCR โดยใช้ RPO1 หรือ CRL-7 เป็นไพร์เมอร์ ซึ่งเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่างกัน แสดงว่าแบคทีเรียเหล่านี้ต่างสายพันธุ์ (Emampaiwong, 2006)

เก็บแบคทีเรียในอาหารวุ้นเอียงที่ 4°C ซึ่งบรรจุ YMA (Yeast extract mannitol agar) ที่เติมสี Congo red ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 25 $\mu g.ml^{-1}$ โดยปลูกเชื้อ (inoculate) ในอาหาร YMA ที่เตรียมใหม่ (subculture) ทุกๆ 6 เดือน นอกจากนี้เก็บรักษาเซลล์เหล่านี้ในระยะยาว (6 เดือนขึ้นไป) ใน 10% กลีซีรอลที่ -80°C อาหาร YMA มีสูตรอาหารดังที่ระบุโดย Somasegaran & Hoben (1994) ดังนี้ (หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร) : mannitol 10.0 ; K_2HPO_4 0.5 ; $MgSO_4$ 0.2 ; Nacl 0.1 ; yeast extract 0.5 ; วุ้น 15 ; พีเอช 6.8 น้ำกรอง 1 ลิตร

3.2. การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนระหว่าง *nodD1* และ *nodA*

3.2.1 ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอระหว่าง *nodD1* และ *nodA* ในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าได้แก่ *nodY* ดังนั้นในการเพิ่มจำนวน *nodY* จึงใช้ไพร์เมอร์ *nodY*F และ *nodY*R ที่ออกแบบโดย Emampaiwong (2006) ซึ่งมีสมบัติตามที่ปรากฏในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สมบัติของไพร์เมอร์ *nodY*F และ *nodY*R (Emampaiwong, 2006)

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (จำนวนคู่เบส)	GC (%)	Tm (°C) *
*nodY*F	5'TGTACGCGGGTAAACC3'	340	56.3	55.1
*nodY*R	5'AGCGCAACGAGAAGAT3'		50.0	52.6

*ใช้สูตรคำนวณ melting point temperature (Tm) ตามที่รายงานโดย Pastorino และคณะ (2003) ดังนี้

$$Tm = 63.3 + (0.41 \times GC\%) - \frac{500}{\text{จำนวนคู่เบสของไพร์เมอร์}}$$

เหลว YMB (Yeast extract mannitol broth) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรใน Erhenmeyer flasks ที่มีความจุ 250 มิลลิลิตร เลี้ยงที่ 30°C ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน สำหรับไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว และ 4 วันสำหรับไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า หลังจากนั้นเติมสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 5 มล. ลงในโหลเลี้ยวนาร์ดที่บรรจุถั่วเหลืองงอกราก พันธุ์เชียงใหม่ 60 จำนวน 3 เมล็ดต่อโหล วิธีเตรียมโหลเลี้ยวนาร์ดดังปรากฏใน Somasegaran and Hoben (1994) ดังนี้ นำขวดเบียร์ขนาด 1 ลิตร มาตัดปลายขวดออกให้เหลือปริมาตรขวด 700 มิลลิลิตร นำไปคว่ำลงในขวดเนสกาแฟขนาดจุ 1 ลิตร ปากขวดเบียร์จะอยู่ห่างจากก้นขวดเนสกาแฟประมาณ 2-3 เซนติเมตร ใช้สำลีอุดปากขวดเบียร์โดยมี cotton rope wick ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตร ยาว 50 มิลลิเมตร หลังจากนั้นเททรายหยาบสำหรับเลี้ยงต้นไม้ซึ่งเป็นทรายที่ซื้อมาใหม่ลงในขวดเบียร์ และเติมสารอาหารเลี้ยงถั่วเหลืองที่ไม่มีธาตุไนโตรเจน (nitrogen-free medium) พีเอช 6.8 ลงในขวดเนสกาแฟปริมาตร 600 มิลลิลิตรต่อขวด นำขวดเลียวนาร์ดที่ประกอบเสร็จแล้วไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอสูงที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เตรียม negative control โดยเลี้ยงถั่วเหลืองด้วยสารอาหารที่ไม่มีธาตุไนโตรเจนและไม่เติมแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน เตรียม positive control โดยเลี้ยงถั่วเหลืองด้วยสารอาหารที่มี 0.05% โปตัสเซียมไนเตรตใน nitrogen-free medium เตรียมตัวอย่าง (treatment samples) โดยเติมเซลล์แขวนลอย แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนระยะมิดล็อคปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อหนึ่งเมล็ด เลี้ยงถั่วเหลืองด้วยสารอาหารที่ไม่มีธาตุไนโตรเจน พีเอช 6.8 ซึ่งมีสูตรอาหารตามที่ระบุโดย Somasegaran and Hoben (1994)

หลังจากเลี้ยงต้นถั่วเหลืองได้ 14 วัน ถอนต้นถั่วเหลืองทิ้งไว้ให้เหลือ 2 ต้นต่อขวด รดด้วยสารอาหารเลี้ยงถั่วเหลืองทุกวันจนกระทั่งถั่วเหลืองทุกพันธุ์ออกดอก (28 วัน) ถ่ายภาพรากที่ติดปมและชั่งน้ำหนักแห้งลำต้น

4. ผลการวิจัย

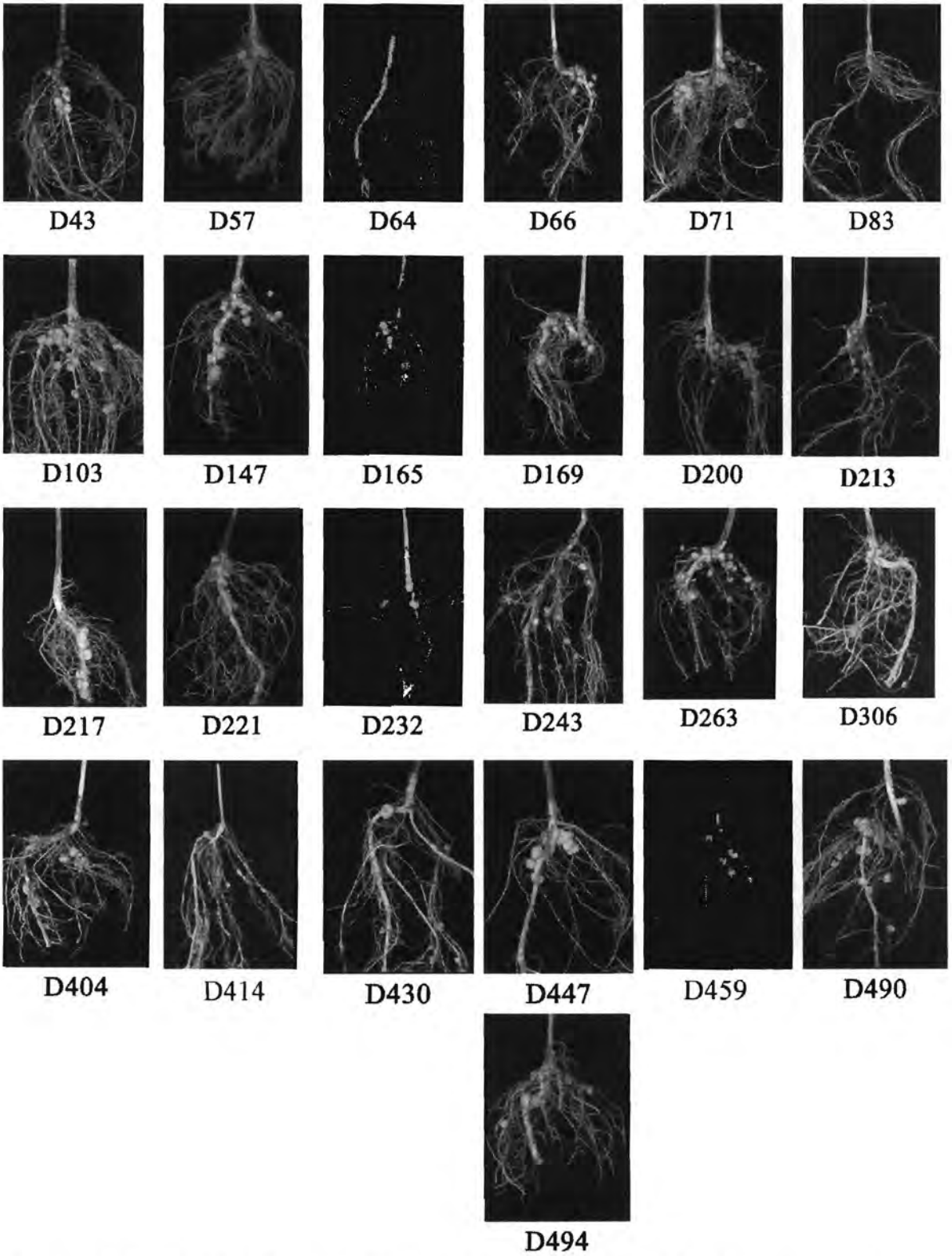
4.1 การพิสูจน์ว่าแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนเร็วเป็นไรโซเบียมถั่วเหลือง

ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็วที่แยกจากอำเภอชาติตระการ อำเภอพรหมพิราม และอำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 7 สายพันธุ์ที่แยกได้พร้อมกับการแยกแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนช้า และเติมลงในโหลเลี้ยวนาร์ดที่เลี้ยงถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์จำนวน 7 พันธุ์ได้แก่ สุโขทัย 1, สุโขทัย 2, สุโขทัย 3, สจ. 4, สจ. 5, เชียงใหม่2, และเชียงใหม่ 60 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ไม่สร้างปมที่รากถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ดังกล่าว รูปที่ 10 แสดงตัวอย่างผลการทดลองแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็วทั้ง 7 สายพันธุ์ไม่สร้างปมที่รากถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 แบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็วทั้ง 7 สายพันธุ์จึงไม่ใช่ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว (ผลการทดลองเมื่อใช้ถั่วเหลืองพันธุ์อื่นเป็นเช่นเดียวกับที่แสดงในรูปที่ 10)

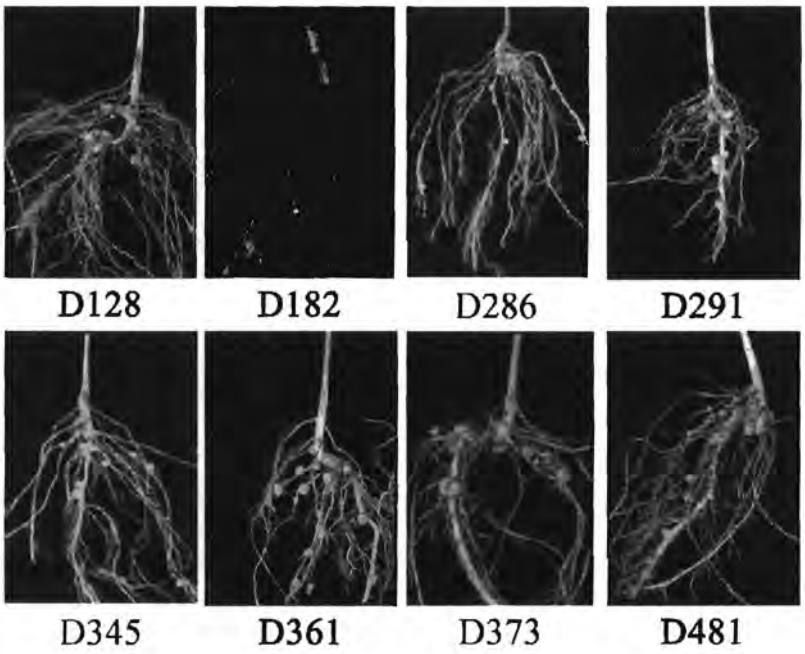
รูปที่ 10 รากของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดที่เติมแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็วที่แยกจากปมรากถั่วเหลือง ผลการทดลองไม่พบปมที่ราก

4.2 การพิสูจน์ว่าแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนช้าเป็นไรโซเบียมถั่วเหลือง

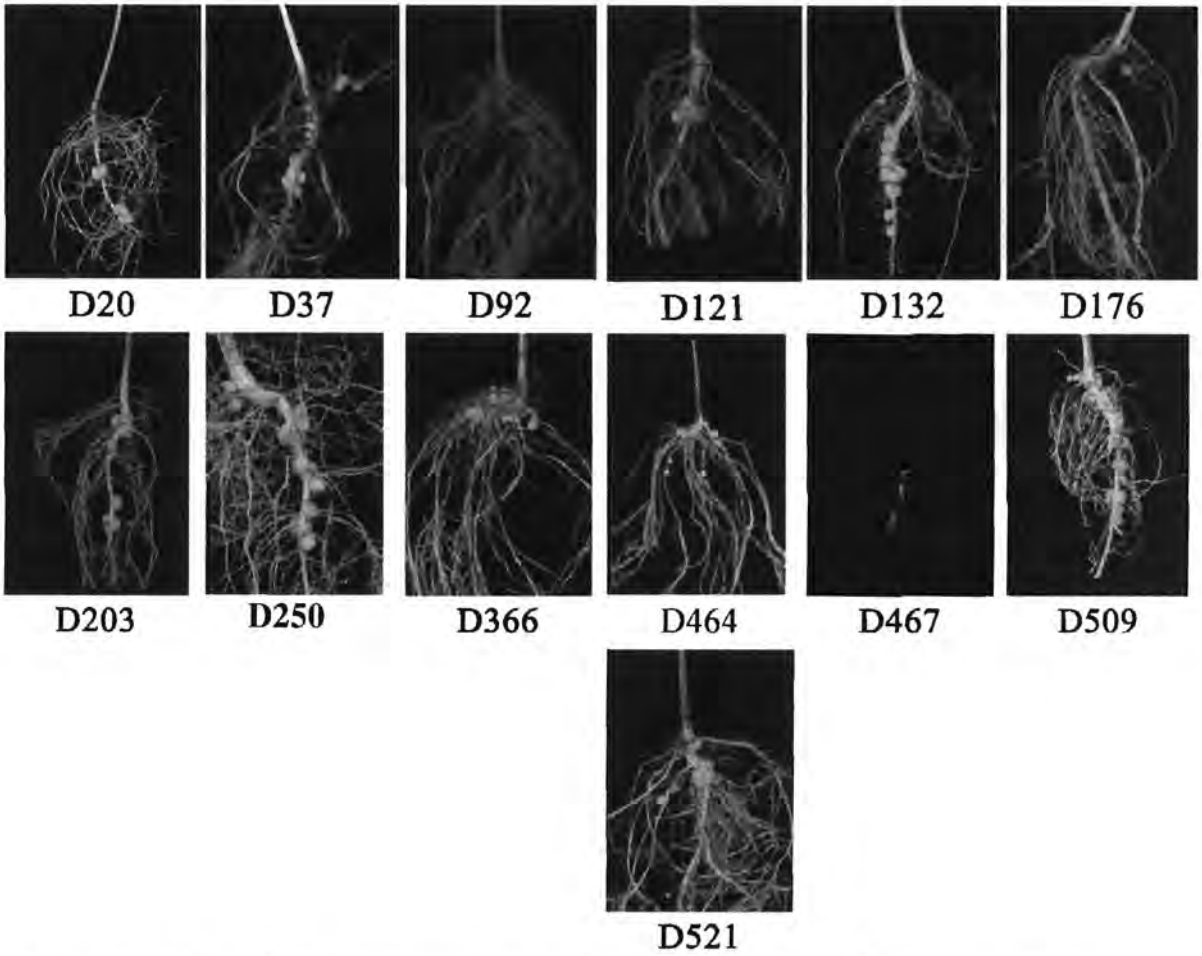
ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนช้าที่แยกจากอำเภอชาติตระการ อำเภอพรหมพิราม และอำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 58 สายพันธุ์ โดยเติมแต่ละสายพันธุ์ลงในโหลเลียวนาร์ดที่เลี้ยงถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 58 สายพันธุ์สร้างปมที่รากถั่วเหลืองดังแสดงผลการทดลองบางส่วนในรูปที่ 11 แบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนช้าทั้ง 58 สายพันธุ์จึงเป็นไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า ซึ่งมีรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *nodD1* และยีน *nodA* หลังจากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *sphI* สามรูปแบบ A, B, และ C ดังแสดงในรูปที่ 18



รูปที่ 11 (ก) ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 30 สายพันธุ์ที่มีรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอระหว่าง *nodD1* และ *nodA* หรือ RFLP แบบ A ทำให้เกิดปมที่รากถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 (หมายเหตุ : ไม่มีภาพปมถั่วเหลืองที่เกิดจากการเติมไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ต่อไปนี้ D54, D120, D267, D273, และ D408)

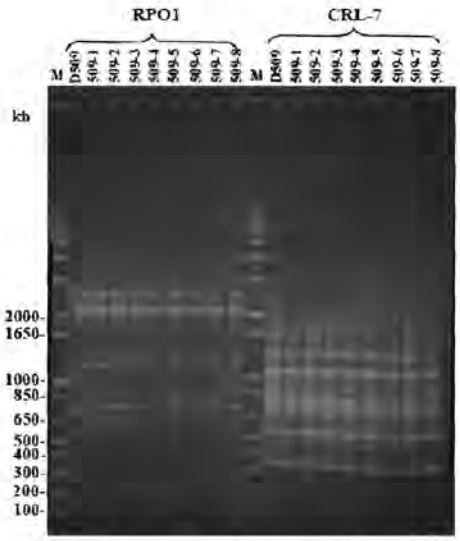


รูปที่ 11 (ข) ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 12 สายพันธุ์ที่มีรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอระหว่าง *nodD1* และ *nodA* หรือ RFLP แบบ B ทำให้เกิดปมที่รากถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 (หมายเหตุ : ไม่มีภาพปมถั่วเหลืองที่เกิดจากการเติมไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ต่อไปนี้ D97, D188, D423, และ D455)



รูปที่ 11 (ค) ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 16 สายพันธุ์ที่มีรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอระหว่าง *nodD1* และ *nodA* หรือ RFLP แบบ C ทำให้เกิดปมที่รากถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 (หมายเหตุ : ไม่มีภาพปมถั่วเหลืองที่เกิดจากการเติมไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ต่อไปนี้ D106, D195 และ D426)

รูปที่ 12 เป็นตัวอย่างแสดงการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดที่เติมไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าสายพันธุ์ D509 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองทุกไอโซเลตมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเช่นเดียวกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ D509 แสดงว่าปมรากถั่วเหลืองในโหลเลียวนาร์ดเกิดจากการเข้าสร้างปมโดยไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าสายพันธุ์ D509 ซึ่งไม่เกิดการปนเปื้อนจากไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าสายพันธุ์อื่น



รูปที่ 12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หาโดยวิธี RAPD-PCR ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าสายพันธุ์ D509 และของแบคทีเรียไอโซเลต 509-1 ถึง 509-8 ที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดที่เติมไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าสายพันธุ์ D509 แถว M คือขนาดโมเลกุลมาตรฐาน (1 Kb plus DNA Ladder, Invitrogen)

4.3 การหา RFLPs ของชิ้นส่วนระหว่าง *nodD1* และ *nodA* (*nodY*) ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า

การเพิ่มจำนวน *nodY* และการหาเรสทริกชั่นเอนไซม์ที่เหมาะสมในการหา RFLPs

รูปที่ 13 แสดงผลิตภัณฑ์ *nodY* ขนาดประมาณ 370 คู่เบส ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ *nodY*F และ *nodY*R เป็นไพร์เมอร์ และใช้ดีเอ็นเอจากไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าสายพันธุ์ D121, D176, D221 และ D263 รูปที่ 14, 15, 16 และ 17 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และตำแหน่ง restriction sites ของ *nodY* ของสายพันธุ์ D121, D176, D221 และ D263 ตามลำดับ

รูปที่ 13 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วน *nodY* โดยใช้ดีเอ็นเอจากไรโซเบียมประเภทเพิ่มจำนวนช้าสายพันธุ์ D121, D176, D221 และ D263

```
BioEdit version 7.0.0 (7/2/04) Restriction Mapping Utility
(c)1998,  Tom Hall

D121 Restriction Map
19/5/2008 17:06:16
372 base pairs
Translations:  none

Restriction Enzyme Map:

1       TTAGCGCAAACGGGTAGAATTTAGATCGAGTCCTTTGAACCGCATGTTGTCAGTCTATCCATCGTGTGGATGTGTTCTAT   80
1       AATCGCGTTTGCCCATCTTAAATCTAGCTCAGGAAACTTGGCGTACAACAGTCAGATAGGTAGCACACCTACACAAGATA   80
                     ApoI                PleI       NspI                BslI      BstF5I
                                         MlyI                           PflMI


81      CGAAACAATCGATTTTACCAAATTGCGGGATGTTGGATAGCAAACTGAAGTTTGAAAAAGTAACCAGGCACACCACAACG   160
81      GCTTTGTTAGCTAAAATGGTTTAACGCCCTACAACCTATCGTTTGACTTCAAACTTTTTCATTGGTCCGTGTGGTGTTGC   160
         FokI      ClaI       FauI   BslI       BstF5I                            Eco57I
                     MmeI                           FokI                         Eco57MI


161     GATTTTGGTCGTTCAGGTGAGCTCAGAGGAAAGCTCCTGGACGTGCGAGCGCGCCGCCGAGTCCGTTTCATGGCCGTCTA   240
161     CTAAAACCAGCAAGTCCACTCGAGTCTCCTTTCGAGGACCTGCACGCTCGCGCGGCGGCTCAGGCAAAGTACCGGCAGAT   240
                  TspGWI   EcoICRI         BspCNI        Cac8I       TspDTI      PleI        AccI
                       BplI   BanII         BseMII         BplI       BceAI       MlyI         Hpy8I
                         MnlI       HphI            BmgBI   BssHII                 BslI       SfcI
                              BsiHKAI                        Cac8I                  EaeI
                              Bsp1286I                        TspGWI
                              SacI


241     CAGGCGCGGCATGCGAGCCGTGTTGCGCTTCCGTGCGAAGTGCGCATCGTTTGGTCGGCCAAGCGGCGTCCCGATAAAAC   320
241     GTCCGCGCCGTACGCTCGGCACAACGCGAAGGCACGCTTCACGCGTAGCAAACCAGCCGGTTCGCCGCAGGGCTATTTTG   320
        BslI       NwoI       TspGWI                 NwoI        SfaNI        BsaHI
          BceAI      HpyF10VI                          HpyF10VI    BsmFI           Hpy188III
                   Cac8I                               FspAI       HgaI
                     NspI                              FspI         EaeI
                     SphI
                       Cac8I


321     CCATGGTAATGGGGATGCCATCCGTTTCCATATTCGAGTTAACCCGCGTACA   372
321     GGTACCATTACCCCTACGGTAGGCAAAGGTATAAGCTCAATTGGGCGCATGT   372
         BsaJI     TspGWI         FokI         HincII
          BtgI   BstXI     BstF5I               HpaI
          NcoI              BstF5I               Hpy8I
          StyI
             SfaNI
              FokI
               MslI
```

รูปที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nodY* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า สายพันธุ์ D121 แสดงตำแหน่ง restriction site ของ *SphI* จำนวน 1 ตำแหน่ง

```
BioEdit version 7.0.0 (7/2/04) Restriction Mapping Utility
(c)1998,  Tom Hall

D176 Restriction Map
19/5/2008 17:09:33
365 base pairs
Translations:  none

Restriction Enzyme Map:

1       TGTACGCGGGTAAACCTCGAATATGGAAACGGATGGCATCCCCATACCAAGGTTTATCGGACGCCGCTTGCCGACCAAAC   80
1       ACATGCGCCCATTTGGAGCTTATACCTTTGCCTACCGTAGGGGTATGGTTCCAAATAGCCTGCGGCGAACGGCTGGTTTG   80
                  Hpy8I       FokI          BstF5I   TspGWI            BsaHI   Cac8I
                               MnlI          BstF5I   SfaNI                    HgaI
                                                    FokI
                                                     BsaJI
                                                     StyI
                                                      BslI


81      GAGCGCACTTCGCACGGAGGCGCAACACGGCTCGCATGCCGCGCCTGTAGACGGCCATGAAACGGACTCGGCGGCGCGCT   160
81      CTCGCGTGAAGCGTGCCTCCGCGTTGTGCCGAGCGTACGGCGCGGACATCTGCCGGTACTTTGCCTGAGCCGCCGCGCGA   160
              MwoI                  TspGWI    NspI    SfcI    EaeI    MlyI     BceAI   BssHII
                HpyF10VI               Cac8I    MwoI     AccI       PleI          TspDTI
                MnlI                      Cac8I   BceAI   BslI       BslI            Cac8I
                                          SphI       Hpy8I                          TspGWI
                                             HpyF10VI


161     CGCACGTCCAGGAGCTTTCCTCTGAGCTCACCTGAACGACCAAAATCCGTTGTGGTGTGCCTGGTTACTTTTTCAAACTT   240
161     GCGTGCAGGTCCTCGAAAGGAGACTCGAGTGGACTTGCTGGTTTTAGGCAACACCACACGGACCAATGAAAAAGTTTGAA   240
        Cac8I         BseMII        EcoICRI   BplI                          Eco57I
            BplI        BspCNI         BanII    TspGWI                        Eco57MI
              BmgBI           HphI     BsiHKAI
                                      Bsp1286I
                                      SacI
                                       MnlI


241     CAGTTTGCTATCCAACATCCCGCAATTTGGTAAAATCGATTGTTTCGATAGAACACATCCACACGATGGATAGACTGACA   320
241     GTCAAACGATAGGTTGTAGGGCGTTAAACCATTTTAGCTAACAAAGCTATCTTGTGTAGGTGTGCTACCTATCTGACTGT   320
          FokI          BstF5I      BslI       MmeI    FokI          BstF5I     BslI
                                    FauI       ClaI                          PflMI


321     ACATGCGGTTCAAAGGACTCGATCTAAATCTTCCTCGTTGCGCTA   365
321     TGTACGCCAAGTTTCCTGAGCTAGATTTAGAAGGAGCAACGCGAT   365
            NspI          MboII                MnlI
                  MlyI          BsaBI
                  PleI
```

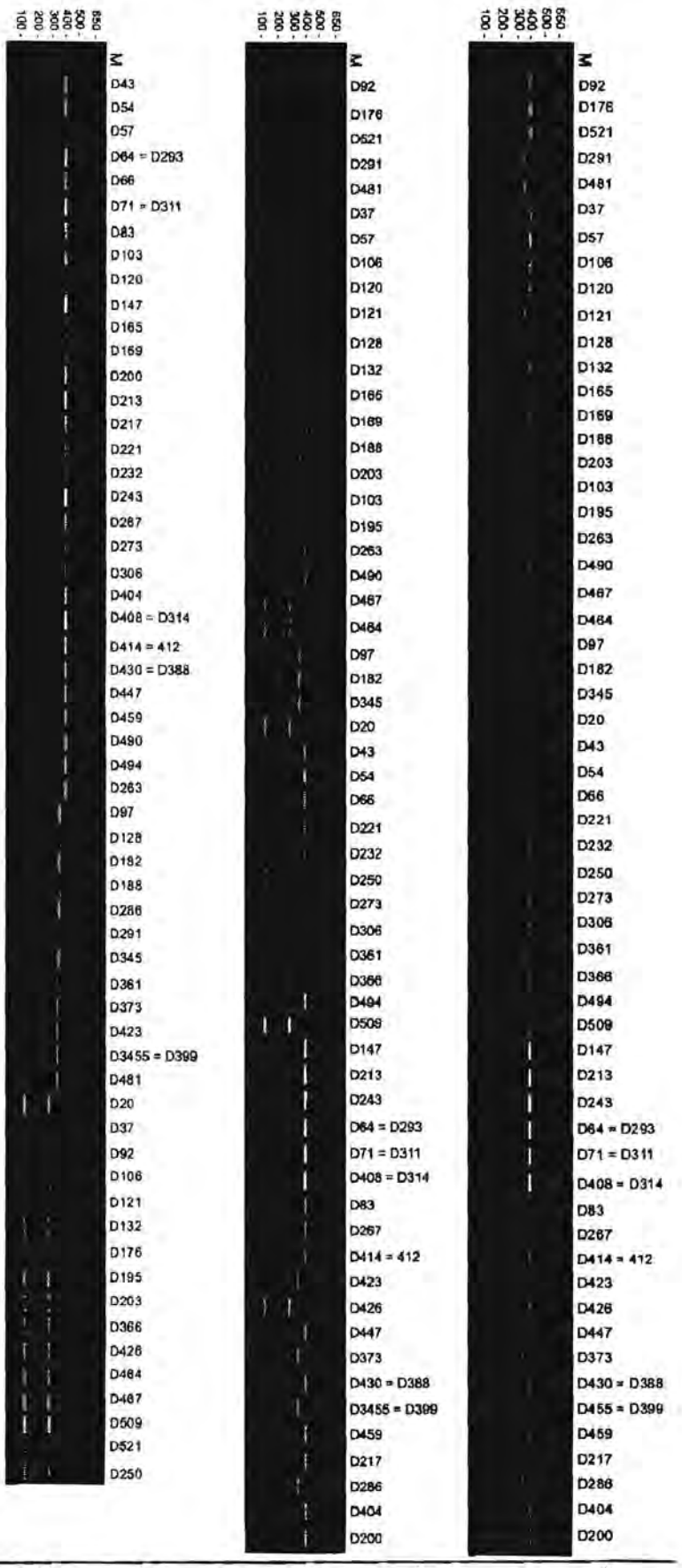
รูปที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nodY* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า สายพันธุ์ D176 แสดงตำแหน่ง restriction site ของ *SphI* จำนวน 1 ตำแหน่ง

```
BioEdit version 7.0.0 (7/2/04) Restriction Mapping Utility
(c)1998,  Tom Hall

D221 Restriction Map
19/5/2008 17:27:36
370 base pairs
Translations:  none

Restriction Enzyme Map:

1       TAGCGCAACGAATAAAATTTAGATCGAGTCCCTTGAACCGCATGTTGTGAGTCTATCCATCGTGTGGATGTGTTCTATCG   80
1       ATCGCGTTGCTTATTTTAAATCTAGCTCAGGGAACTTGGCGTACAACACTCAGATAGGTAGCACACCTACACAAGATAGC   80
                  BsmFI                 PleI       NspI          PleI   BslI      BstF5I
                    ApoI                 MlyI                     MlyI                   FokI
                                                                  PflMI


81      AAACAATCGATTTTACCAAATTGCGGGATGTTGGATAGCAAACTGAAGTTTGAAAAAGTAACCAGGCACACCACAATGCT   160
81      TTTGTTAGCTAAAATGGTTTAACGCCCTACAACCTATCGTTTGACTTCAAACTTTTTCATTGGTCCGTGTGGTGTTACGA   160
            ClaI      FauI   BslI       BstF5I                          Eco57I    MslI
                MmeI                       FokI                       Eco57MI


161     TTATGGTCGTTCAGGTGAGCTCAGAGGAAAGCTCCTGGACGTGCGAGCGCGCCGCCGATTCCGTTTCATGGGCGTCTACA   240
161     AATACCAGCAAGTCCACTCGAGTCTCCTTTCGAGGACCTGCACGCTCGCGCGGCGGCTAAGGCAAAGTACCCGCAGATGT   240
                    BplI   BanII        BspCNI       Cac8I      TspDTI       BslI   HgaI
                      MnlI      HphI     BseMII       BplI          HgaI         BsaHI
                        EcoICRI              BmgBI   BssHII                      AccI
                          BsiHKAI                    Cac8I                       Hpy8I
                          Bsp1286I                    TspGWI                     SfcI
                          SacI


241     GGCGCGTCATGCGAGCCGTGTTGCGTCTCCGTGCGAAGTGCGCTCGTTTGGTCGGCCTAGCGGGGTCCCGATAAACCCAT   320
241     CCGCGCAGTACGCTCGGCACAACGCAGAGGCACGCTTCACGCGAGCAAACCAGCCGGATCGCCCCAGGGCTATTTGGGTA   320
        BceAI    MwoI       TspGWI       BsmBI     MwoI        BsmFI         Eco0109I      BsaJI
                 HpyF10VI                BsmAI     HpyF10VI      FauI        PpuMI         BtgI
                   HgaI                                                    SanDI         NcoI
                    Cac8I                                                  NlaIV         StyI
                                                                           NlaIV
                                                                            Hpy188III


321     GGTAATGGGACCGCCCTCTGTTTCCATATTCGAGGTTTACCCGCGTACAA   370
321     CCATTACCCTGGCGGGAGACAAAGGTATAAGCTCCAAATGGGCGCATGTT   370
          MslI   NlaIV       BsmFI           Hpy8I
             BstXI                MnlI
                                  MnlI
```

รูปที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nodY* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า สายพันธุ์ D221 ไม่พบ restriction site ของ *SphI*

```
BioEdit version 7.0.0 (7/2/04) Restriction Mapping Utility
(c)1998,  Tom Hall

D263 Restriction Map
19/5/2008 17:25:09
371 base pairs
Translations:  none

Restriction Enzyme Map:

1       TAGCGCAACGGAAGAGATTTAGATCGAGTCCCTTGAACCGCATGTTGTGAGTCTATCCATCGTGTGGATGTGTTCTATCG   80
1       ATCGCGTTGCCTTCTCTAAATCTAGCTCAGGGAACTTGGCGTACAACACTCAGATAGGTAGCACACCTACACAAGATAGC   80
             EarI    BsmFI   BseBI          PleI       NspI          PleI   BslI      BstF5I
                             TspGWI         MlyI                     MlyI                 FokI
                             MboII                                      PflMI


81      AAACAATCGATTTTACCAAATTGCGGGATGTTGGATAGCAAACTGAAGTTTGAAAAAGTAACCAGGCACACCACAATGCT   160
81      TTTGTTAGCTAAAATGGTTTAACGCCCTACAACCTATCGTTTGACTTCAAACTTTTTCATTGGTCCGTGTGGTGTTACGA   160
           ClaI      FauI   BslI       BstF5I                              Eco57I    MslI
                MmeI                        FokI                          Eco57MI


161     TTATGGTCGTTCAGGTGAGCTCAGAGGAAAGCTCCTGGACGTGCGAGCGCGCCGCCGATTCCGTTTCATGGGCGTCTACA   240
161     AATACCAGCAAGTCCACTCGAGTCTCCTTTCGAGGACCTGCACGCTCGCGCGGCGGCTAAGGCAAAGTACCCGCAGATGT   240
                   BplI   BanII        BspCNI       Cac8I      TspDTI       BslI   HgaI
                     MnlI      HphI     BseMII       BplI          HgaI          BsaHI
                       EcoICRI             BmgBI   BssHII                       AccI
                         BsiHKAI                     Cac8I                       Hpy8I
                         Bsp1286I                     TspGWI                     SfcI
                         SacI


241     GGCGCGTCATGCGAGCCGTGTTGCGTCTCCGTGCGAAGTGCGCTTCGTTTGGTCGGCAGAGGCGGGGTCCCGATAAACCC   320
241     CCGCGCAGTACGCTCGGCACAACGCAGAGGCACGCTTCACGCGAAGCAAACCAGCCGTCTCCGCCCCAGGGCTATTTGGG   320
        BceAI    MwoI       TspGWI       BsmBI     MwoI       Hin4I           Eco0109I      BsaJI
                  HpyF10VI                BsmAI     HpyF10VI    MnlI            PpuMI        StyI
                    HgaI                                       BsmFI          SanDI
                     Cac8I                                       FauI          NlaIV
                                                                               NlaIV
                                                                                Hpy188III


321     TTGGTATGGGACCGCCATCCGTTTCCATATTCGAGGTTTACCCGCGTACAA   371
321     AACCATACCCTGGCGGTAGGCAAAGGTATAAGCTCCAAATGGGCGCATGTT   371
          Hin4I   NlaIV       BsmFI          Hpy8I
           FokI         BstF5I     MnlI
              BslI
                TspGWI
```

รูปที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nodY* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า สายพันธุ์ D263 ไม่พบ restriction site ของ *SphI*



รูปที่ 18 ผลการหา RFLPs ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 58 สายพันธุ์

ผลการหา RFLPs ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 58 สายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 18 พบว่าไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 45 สายพันธุ์ มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *nodD1* และยีน *nodA* ซึ่งแยกโดยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ *nodYf* (5'TGTACGCGGGTAAACC3') และ *nodYr* (5'AGCGCAACGAGAAGAT3') เป็นไพร์เมอร์ขนาด 395 คู่เบส และไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 13 สายพันธุ์ มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวขนาด 350 คู่เบส ทั้งนี้เมื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากอกาโรสเจลและทำให้ดีเอ็นเอปราศจากสิ่งปนเปื้อนโดยใช้ชุดสำเร็จรูป Nucleospin®และตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ *sphI* ผลการทดลองพบรูปแบบ RFLPs จำนวน 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบ A ประกอบด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 395 คู่เบส รูปแบบ B ประกอบด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 350 คู่เบส และรูปแบบ C ประกอบด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 120 และ 275 คู่เบส โดยไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 30, 12, และ 16 สายพันธุ์มี RFLPs รูปแบบ A, B และ C ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าที่มี RFLPs แต่ละรูปแบบ มีแนวโน้มที่มีจำนวนปมทั้งหมดที่รากในระดับน้อย (1-10 ปมต่อต้น) ถึงระดับปานกลาง (11-20 ปมต่อต้น) ดังนั้นผลการทดลองจึงไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบ RFLPs ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *nodD1* และยีน *nodA* ซึ่งคือยีน *nodY* ในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 58 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง

4.4 การหาน้ำหนักแห้งของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60

ตารางที่ 7 แสดงน้ำหนักแห้งของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ด โดยเติมไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆ อักษร a-j แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากวิเคราะห์ผลการทดลองด้วย Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows ผลการทดลองไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า ซึ่งหาโดยการใช้น้ำหนักแห้งของลำต้น กับรูปแบบ RFLPs ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *nodD1* และยีน *nodA* ซึ่งคือยีน *nodY* ในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 58 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 7 น้ำหนักแห้งของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดโดยเติมไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆ อักษร a, b, c, d, e ... แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test

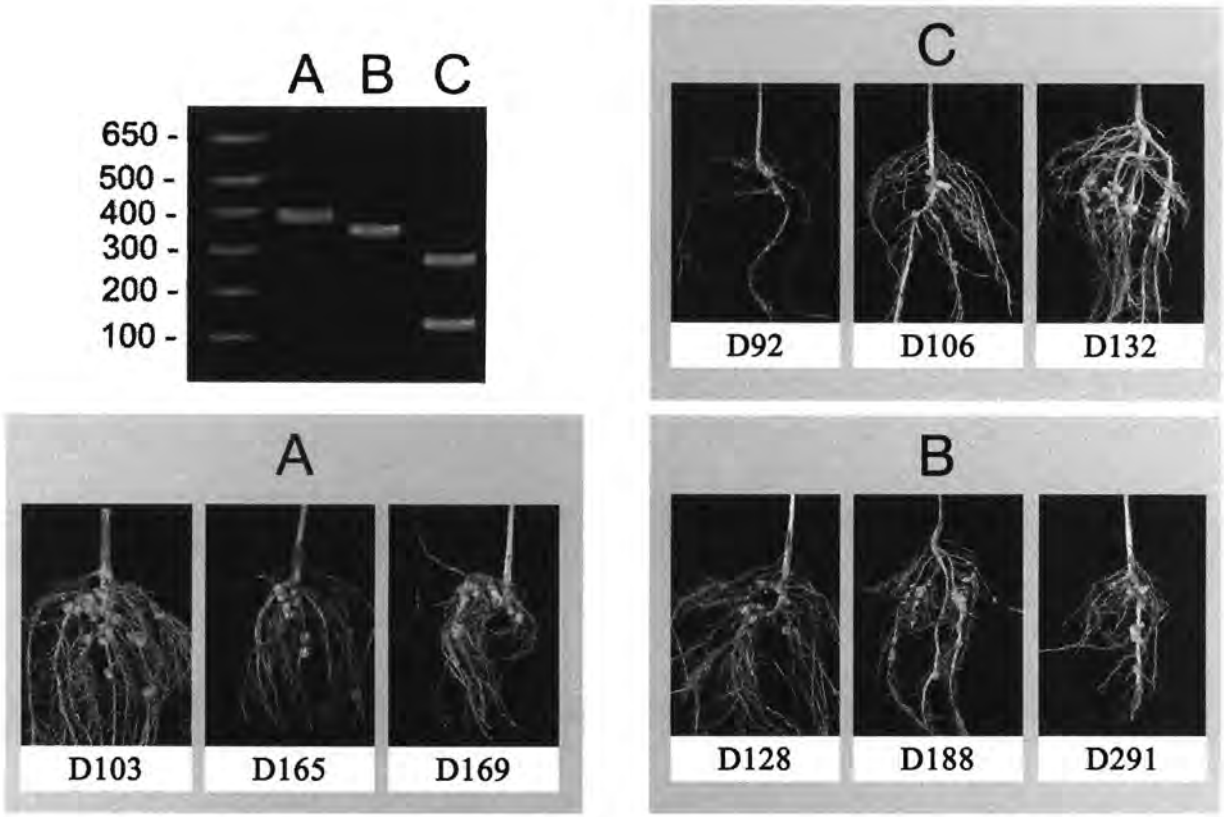
สายพันธุ์ไรโซเบียม	น้ำหนักลำต้นแห้ง (กรัมต่อต้น)	รูปแบบ RFLPs	ระดับการสร้างปม*
D306	1.74[a]	A	น้อย
D404	1.67[b]	A	น้อย
D263	1.62[c]	A	ปานกลาง
D494	1.61[c]	A	น้อย
D221	1.52[d]	A	ปานกลาง
D120	1.52[d]	A	น้อย
D103	1.44[e]	A	ปานกลาง
D521	1.29[f]	C	น้อย
D200	1.24[g]	A	ปานกลาง
D169	1.23[h]	A	น้อย
D447	1.22[h]	A	น้อย
D165	1.16[i]	A	น้อย
D121	1.16[i]	C	น้อย
D490	1.08[i]	A	ปานกลาง
D481	1.04[i]	A	ปานกลาง
D71	1.03[i]	A	ปานกลาง
D373	1.03[i]	B	ปานกลาง
D509	0.86[i]	C	น้อย
D203	0.83[i]	C	น้อย
D43	0.81[i]	A	น้อย
D128	0.81[i]	B	ปานกลาง
D92	0.79[i]	C	น้อย
D132	0.75[i]	C	น้อย
D361	0.66[i]	B	ปานกลาง
D176	0.65[i]	C	น้อย
D467	0.65[i]	C	น้อย

สายพันธุ์ไรโซเบียม	น้ำหนักลำต้นแห้ง (กรัมต่อต้น)	รูปแบบ RFLPs	ระดับการสร้างปม*
D182	0.60[i]	B	ปานกลาง
D37	0.57[i]	C	น้อย
D64	0.54[i]	A	น้อย
D243	0.53[i]	A	น้อย
D366	0.52[i]	C	ปานกลาง
D232	0.52[i]	A	น้อย
D217	0.51[i]	A	น้อย
D291	0.48[i]	B	น้อย
D430	0.39[i]	A	น้อย
D83	0.38[i]	A	น้อย
D66	0.35[i]	A	น้อย
D20	0.31[i]	C	น้อย

*ระดับน้อย (1-10 ปมต่อต้น) ระดับปานกลาง (11-20 ปมต่อต้น)

5. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ผลการทดลอง พบว่า หลังจากการใช้วิธีพีซีอาร์โดยใช้ *nodY*F และ *nodY*R เป็นไพรเมอร์เพิ่มจำนวนชิ้นส่วน *nodY* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าที่แยกจาก 15 ตำบลใน 3 อำเภอ ในจังหวัดพิษณุโลก (อ.ชาติตระการ อ.บางระกำ อ.พรหมพิราม) จำนวน 58 สายพันธุ์ที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่างกัน สามารถใช้รูปแบบการเรียงตัวของแถบดีเอ็นเอของชิ้นส่วนระหว่าง *nodD1* และ *nodA* หรือ RFLPs แบ่งไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มี RFLP แบบ A ซึ่งมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 395 กิโลเบสที่ไม่มีบริเวณที่เรสทริกชั่นเอ็นไซม์ *sphI* ตัด และกลุ่มที่มี RFLP แบบ B ซึ่งมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 350 กิโลเบส ที่ไม่มีบริเวณที่เรสทริกชั่นเอ็นไซม์ *sphI* ตัด และกลุ่มที่มี RFLP แบบ C ซึ่งประกอบด้วยไรโซเบียมถั่วเหลืองซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีบริเวณที่เรสทริกชั่นเอ็นไซม์ *sphI* ตัดได้จำนวน 1 แห่ง ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลังการทำ agarose gel electrophoresis จำนวน 2 แถบได้แก่ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 120 และ 275 คู่เบส ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าทั้ง 3 กลุ่ม มีประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปมในระดับต่ำ (1-10 ปมต่อต้น) ถึงระดับปานกลาง (11-20 ปมต่อต้น) ดังตัวอย่างผลการทดลองสรุปในรูปที่ 19 ผลการทดลองไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบ RFLPs กับศักยภาพการเข้าสร้างปมและศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า ซึ่งหาโดยการใช้น้ำหนักแห้งของลำต้น ในปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่ของดีเอ็นเอซึ่งอยู่ระหว่าง *nodD1* และ *nodA* ซึ่งได้แก่ *nodY* ในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า ดังนั้นผลการทดลองที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบ RFLPs ของ *nodY* กับศักยภาพการเข้าสร้างปมและศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า อาจชี้ให้เห็นว่า *nodY* อาจไม่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเข้าสร้างปมและกระบวนการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า อย่างไรก็ตาม ผลการจำแนกชนิดไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ตามที่รายงานโดยณิชานันท์ กาบเกษรและกาญจนา ชาญสง่าเวช (2552) พบว่าสายพันธุ์ D388 คือ *Bradyrhizobium japonicum* สายพันธุ์ HMS 02 ซึ่งในรายงานการวิจัยนี้พบว่า มี RFLP แบบ A สายพันธุ์ D361, D373, และ D481 คือ *Bradyrhizobium japonicum* สายพันธุ์ USDA 110 ซึ่งในรายงานการวิจัยนี้พบว่า มี RFLP แบบ B และ สายพันธุ์ D467 คือ *Bradyrhizobium liaoningense* สายพันธุ์ LYG2 ซึ่งในรายงานการวิจัยนี้พบว่า มี RFLP แบบ C ดังนั้นจึงอาจทำการทดลองต่อไปโดยใช้ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าส่วนที่เหลือ ในการหารูปแบบการเรียงตัวของแถบดีเอ็นเอของ *nodY* หลังจากตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *sphI* เพื่อใช้รูปแบบ RFLP ของ *nodY* ระบุความหลากหลายของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า



รูปที่ 19 ตัวอย่างไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า (D103, D165 และ D169) ที่มี RFLP แบบ A ซึ่งมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 395 กิโลเบสที่ไม่มีบริเวณที่เรสทริกชั่นเอ็นไซม์ *sphI* ตัด และไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า (D128, D188, และ D291) ที่มี RFLP แบบ B ซึ่งมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 350 กิโลเบสที่ไม่มีบริเวณที่เรสทริกชั่นเอ็นไซม์ *sphI* ตัด และไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า ที่มี RFLP แบบ C (D92, D106, และ D132) ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีบริเวณที่เรสทริกชั่นเอ็นไซม์ *sphI* ตัดได้จำนวน 1 แห่ง ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลังการทำ agarose gel electrophoresis จำนวน 2 แถบได้แก่ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 120 และ 275 คู่เบส ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าที่มี RFLP แต่ละรูปแบบมีประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปมระดับต่ำ (1-10 ปมต่อต้น) ถึงระดับปานกลาง (11-20 ปมต่อต้น)

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา ชาญสง่าเวช. 2552. วิธีคัดเลือกไรโซเบียมถั่วเหลืองเพื่อผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับถั่วเหลืองที่เก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิห้อง (สถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยขอจดสิทธิบัตรเมื่อวันที่ 25 มิถุนายน 2552 เลขที่คำขอจดสิทธิบัตร 0901002866)

ณิชานันท์ กาบเกษร และ กาญจนา ชาญสง่าเวช. 2552. การใช้มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ทำนายศักยภาพการเข้าสร้างปมของไรโซเบียมถั่วเหลือง **บทความวิจัยตีพิมพ์ในหนังสือรวมบทความการประชุมวิชาการระบบเกษตรแห่งชาติ ครั้งที่ 5 "พลังงานขาดแคลนและความมั่นคงทางอาหารเพื่อมนุษยชาติ"** วันที่ 2-4 กรกฎาคม 2552 ณ โรงแรมอุบลอินเตอร์เนชั่นแนล จ. อุบลราชธานี. หน้า 481-458.

ธันปภา จันทเพ็ชร และ กาญจนา ชาญสง่าเวช. 2552. การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรวจความสามารถของไรโซเบียมถั่วเหลืองในการแข่งขันเข้าสร้างปมภาคสนาม **บทความวิจัยตีพิมพ์ในหนังสือรวมบทความการประชุมวิชาการระบบเกษตรแห่งชาติ ครั้งที่ 5 "พลังงานขาดแคลนและความมั่นคงทางอาหารเพื่อมนุษยชาติ"** วันที่ 2-4 กรกฎาคม 2552 ณ โรงแรมอุบลอินเตอร์เนชั่นแนล จ. อุบลราชธานี. หน้า 234-243.

อานัฐ ตันโช. **2550. ระบบเกษตรในประเทศไทย : การเกษตรแผนปัจจุบันหรือเกษตรเคมี.** ศูนย์ข้อมูลเกษตรกรรมแม่โจ้ ภาควิชาทรัพยากรดินและสิ่งแวดล้อม คณะผลิตกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (www.macjonaturalfarming.org).

Abaidoo, R.C., Keyser, H.H., Singleton, P.W., Dashiell, K.E., Sanginga, N., 2007. Population size, distribution, and symbiotic characteristics of indigenous *Bradyrhizobium* spp. that nodulate TGx soybean genotypes in Africa. ***Appl. Soil Ecol.*** 35 : 57-67.

Aguilar, D.M., Lopez, M.V., and Riccillo, P.M. 2001. The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. ***J. Biotechnol.*** 91: 181-188.

Albrecht, S.C., Maier, R.J., Hanus, F.J., Russell, S.A., Emerich, D.W. and Evans, H.J. 1979. Hydrogenase in *Rhizobium japonicum* increases nitrogen fixation by nodulated soybeans. ***Science*** 203 : 1255-1257.

Ando, S. and Yokoyama, T. 1999. Phylogenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulationg soybean (*Glycine max*) in Thailand with reference to the USDA strains of *Bradyrhizobium*. ***Can. J. Microbiol.*** 45(8): 639-645.

Appunu, C., N' Zoue, A., and Laguerre, G. 2008. Genetic diversity of native bradyrhizobia isolated from soybeans (*Glycine max* L.) in different agricultural-ecological-climatic regions of India. ***Appl. Environ. Microbiol.*** 74(19): 5991-5996.

Bala, A., Karanja, N., Murwira, M., Lwimbi, L., Abaidoo, R., and Giller, K. 2011. Production and use of rhizobial inoculants in Africa. WWW.N2Africa.org, 21 pp.

Brutti, L., Rivero, E., Basurco, J. C. P., Nicolas, M., Iriarte, L., Abbiati, N., Ljunggren, H. and Martensson. A. 1998. Persistence of *Bradyrhizobium japonicum* in arable soils of Argentina. ***Appl. Soil Ecology.*** 10: 87-94.

Camacho, M., Santamaría, C., Temprano, F., Rodríguez-Navarro, D.N., Daza, A., Espuny, R., Bellogín, R., Ollero, F. J., Lyra de,. M.C.C.P., Buendía-Clavería, A., Zhou, J., Li, F.D., Mateos, C., Velázquez, E., Vinardell, J M., and Ruiz-Sainz. J. E. 2002. Soils of the Chinese Hubei province show a very high diversity of *Sinorhizobium fredii* strains. ***Syst. Appl. Microbiol.*** 25(4): 592-602.

Carter, K.R., Jennings, N.T., Hanus, J., and Evans, H.J. 1977. Hydrogen evolution and uptake by nodules of soybeans inoculated with different strains of *Rhizobium japonicum*. ***Can. J. Microbiol.*** 23 : 307-311.

Chanaseni, C., and Kongngoen, S. 1992. Extension programs to promote rhizobial inoculants for soybean and groundnut in Thailand. ***Can. J. Microbiol.*** 38: 594-597.

Chansa-ngavej, K. 2005. Molecular mechanisms for heat tolerance in soybean rhizobia. In. Mamoru Yamada (ed.) Death and Survival in Bacteria. Kerala : Research Signpost. India. p. 247-254.

Chansa-ngavej, K., Chongfuengprinya, W., and Udomchotipruet, S. 2010. Soybean rhizobium technology for sustainable agriculture. Proceedings of the Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference. March 4-6, 2010. Nongkhai, Thailand, p. 285-289.

Chansa-ngavej. K., Ly, K.P., and Chongfuengprinya, W. 2009. Research and development for commercial production of soybean rhizobium biofertilizers with DNA fingerprints and can be kept at room temperature. Proceedings of Thailand Research Symposium 2009. p. 12-22.

Chang, S. K. C. 2003. Protein analysis. In: Nielsen, S.S. (ed.) ***Food Analysis.*** 3rd Edition. Springer-Verlag. p.134-135.

Chen, L.S., Figueredo, A., Pedrosa, F.O., and Hungria, M. 2000. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. ***Appl. Environ. Microbiol.*** 66: 5099-5103.

Chen, W., Huang, Q., and Xiong, X. 2004. Distribution and biodiversity of soybean rhizobia in the soils of Shennongjia forest reserve, China. ***Biol. Fertil. Soils.*** 40: 306-312.

Chen, W.X., Yan, G.H., and Li, I. L. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. ***Int. J. Syst. Bacteriol.*** 38 :392-397

de Jensen, C.E., Kurle, J.E., and Percich, J.A. 2004. Integrated management of edaphic and biotic factors limiting yield of irrigated soybean and dry bean in Minnesota. ***Field Crops Res.*** 86: 211-224.

Dowdle, S., F., and Bohlool, B.B. 1985. Predominance of fast-growing *Rhizobium japonicum* in a soybean field in the People's Republic of China. ***Appl. Environ. Microbiol.*** 56: 1171-1176.

Duteau, N.M., Palmer, R.G., and Atherly, A.G. 1986. Fast-growing *Rhizobium fredii* are poor nitrogen-fixing symbionts of soybean. ***Crop Sci.*** 26: 884-889.

Edie, S.A. and Phillips, D.A. 1983. Effect of the host legume on acetylene reduction and hydrogen evolution by *Rhizobium* nitrogenase. ***Plant Physiol.*** 72(1): 156-160.

Elkan, G.H., and Bunn, C.R. 1992. The Rhizobia. In Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K-H (eds). *The Prokaryotes. 2nd Edition. Chapter 107.* New York : Springer Verlag.

Emampaiwong, D. 2006. Development of primers for identification of fast-or slow-growing bacteria isolated from soybean root nodules. *M.Sc. thesis, Industrial Microbiology program.* Chulalongkorn University. 90 pp.

Fisher, R.F. and Long, S.R. 1993. Interactions of NodD at the *nod* box: Nod D binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. ***J. Mol. Biol.*** 233: 336-346.

Fuhrmann, J. 1990. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. ***Appl. Environ. Microbiol.*** 56(1) : 224-229.

Gil-Serrano, A. M., Franco-Rodriguez, G., Tejero-Mateo, P., Thomas- Oates, J., Spaink, H. P., Ruiz-Sainz, J. E., Megías, M., and Lamrabet, Y. 1997. Structural determination of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals produced by *Rhizobium fredii* HH103. ***Carbohydr. Res.*** 303 : 435-443.

Goodwin, T.W. and Mercer, E.I. 2005. Introduction to Plant Biochemistry. 2nd Edition. Delhi: CBS Publishers and Distributors. 359 pp.

Haeze, W. D., and Holsters, M. 2002. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. ***Glycobiology.*** 12 (6) : 79-105.

Han, L.L., Wang, E.T., Han, T.X., Liu, J., Sie, X.H., Chen, W.F., and Chen, W.X. 2008. Unique community structure and biogeography of soybean rhizobia in the saline-alkaline soils of Xinjiang, China. ***Plant and Soil.*** 324(1-2): 291-305.

Hungria, M., Campo, R.J., Chueire, L.M.O., Grange, L., and Megias, M. 2001. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. ***Biol. Fertil. Soils.*** 33: 387-394.

Jitacksorn, S. 2006. Bradyoxetin and *nodD2* control nodulation efficiency of *Bradyrhizobium japonicum* in a density dependent manner. Ph.D. Dissertation. University of Minnesota, USA.

Jordan, D.C. 1982. Transfer of *Rhizoium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing, root nodule bacteria from leguminous plants. ***Int. J. Syst. Bacteriol.*** 32 : 136-139.

Kosslak, R. M., Bookland, R., Barkai, J., Paaren, H. E., and Applebaum, E. R., 1987. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. ***Proc. Natl. Sci USA.*** 84 : 7428-7432.

Kuykendall, L.D., Saxena, B., Devine, T.E., and Udell, S.E. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. ***Can. J. Microbiol.*** 38 : 501-505.

Lambert, G.R., Harker, A.R., Cantrell, M.A. Hanus, F.S., Russell, S.A., Haugland, R.A., and Evans, H.J. 1987. Symbiotic expression of cosmid-borne *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase genes. ***Appl. Environ. Microbiol.*** 53(2) : 422-428.

Loh, J., Yuen-Tsai, J.P.Y., Stacey, M.G., Lohar, D., Welborn, A., and Stacey, G. 2001. Population density-dependent regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. ***Mol. Microbiol.*** 42(1) : 37-66.

Loh, J., Carlson, R.W., York, W.S. and Stacey, G. 2002a. Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA*** 99(22) : 14446-14451.

Loh, J., Pierson, E.A., Pierson, L.S., Stacey, G. and Chatterjee, A. 2002b. Quorum sensing in plant-associated bacteria. ***Curr. Opin. Plant Biol.*** 5 : 285-290.

Loh, J. and Stacey, G. 2003. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum* : a unique integration of global regulatory circuits. ***Appl. Environ. Microbiol.*** 69(1) : 10-17.

Machado, D., Pueppke, S.G., Vinordel, J. M., Ruiz-Saing-S.E., and Krishnan, H.B. 1998. Expression of *nodD1* and *nodD2* in *Sinorhizobium fredii*, a nitrogen-fixing symbiont of soybean and other legumes. ***Mol. Plant Microbe Interactions.*** 11(5) : 375-384.

Maruekarajtinplaeng, S. 2010. Diversity of soybean rhizobia in 16 subdistricts of Phitsanulok province. Ph.D. thesis. Microbiology program. Chulalongkorn University. 176 pp.

Minamisawa, K., Nakatsuka, Y., and Isawa, T. 1999. Diversity and field site variation of indigenous populations of soybean bradyrhizobia in Japan by fingerprints with repeated sequences RSα and RSβ. ***FEMS Mirobiol. Ecol.*** 29: 171-178.

Nuntagij, A., Abe, M., Uchiumi, T., Seki, Y., Boonkerd, N., and Higashi, S. 1997. Characterization of 187 *Bradyrhizobium* strains isolated from soybean cultivation in Thailand. ***J. Gen. Appl. Microbiol.*** 43: 183-187.

Peng, G.X., Tan, Z.Y., Wang, E.T., Reinhold-Hurek, B., Chan, W.F., and Chen, W.X. 2002. Identification of isolates from soybean nodules in Xinjiang region as *Sinorhizobium xinjiangense* and genetic differentiation of *S. xinjiangense* from *Sinorhizobium fredii*. ***Int. J. Syst. Evol. Mirobiol.*** 52 : 457-462.

Pomeranz, Y. and Meloan, C.E. 1971. Food Analysis : Theory and Practice. Westport : AVI Pub. Co. p. 632-636.

Pueppke, S.G., Bolanos-Vasquez, M.C., Werner, D., Bec-ferte, M., Prome, J-C., and Krishnan, H. B. 1998. Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and their perception as signals by nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*. ***Plant Physiol.*** 117 : 599-608.

Rodriguez-Navarro, D.N., Oliver, I.M., Contreras, M.A., and Ruiz-Sainz, J.E. 2010. Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects. Agron. Sustain. Dev. 001 10 1051/agro/2010023. Published online September 2. 2010.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning : A Laboratory Manual, 2nd Edition. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press. Book 1. p. A3.

Schlaman, H.R.M., Okkar, R.J.H., and Lugtenberg, B.J.J. 1992. Minireview: Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. ***J. Bacteriol.*** 174(6) : 5177-5182.

Sharma, A., Sahgal, M., and Johri, B.N. 2003. Microbial communication in the rhizosphere : operation of quorum sensing. ***Curr. Sci.*** 85(8) : 1164-1172.

Somasegaran, P. and Hoben, H. 1994. Handbook for Rhizobia ; Methods in legume-*Rhizobium* Technology. p. 340, 370-1, New York : Springer Verlag.

Stacey, G., 1995. *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genetics. ***FEMS Microbiol. Letters.*** 127 : 1-9.

Suzuki, K., Oguro, H., Yamakawa, T., Yamamoto, A., Akao, S., and Saeki, Y. 2008. Diversity and distribution of indigenous soybean-nodulating rhizobia in the Okinawa islands, Japan. ***Soil Sci. & Pl. Nutri.*** 54(2): 237-246.

Teaumroong, N. and Boonkerd, N. 1998. Detection of *Bradyrhizobium* spp. and *B. japonicum* in Thailand by primer-based technology and direct DNA extraction. ***Plant and Soil.*** 204: 127-134.

Thomas-Oates, J. et al. (36 co-authors). 2003. A catalogue of molecular, physiological and symbiotic properties of soybean-nodulating rhizobial strains from different soybean cropping areas of China. ***Syst. Appl. Microbiol.*** 26: 453-465.

Thompson, J.A., Bhromsiri, A., Shutsrirung, A., and Lillakan, S. 1991. Native root-nodule bacteria of traditional soybean growing areas of northern Thailand. ***Plant and Soil.*** 135: 53-65.

van Berkum, P., and Saloger, C. 1991. Hydrogen oxidation by the host-controlled uptake hydrogenase phenotype of *Bradyrhizobium japonicum* in symbiosis with soybean host plants. ***Appl. Environ. Microbiol.*** 57(6) : 1863-1865.

Wang, S-P., and Stacey, G. 1991. Studies of the *Bradyrhizobium japonicum nodD1* promoter : A repeated structure for the *nod* box. ***J. Bacteriol.*** 173 (11) : 3356-3365.

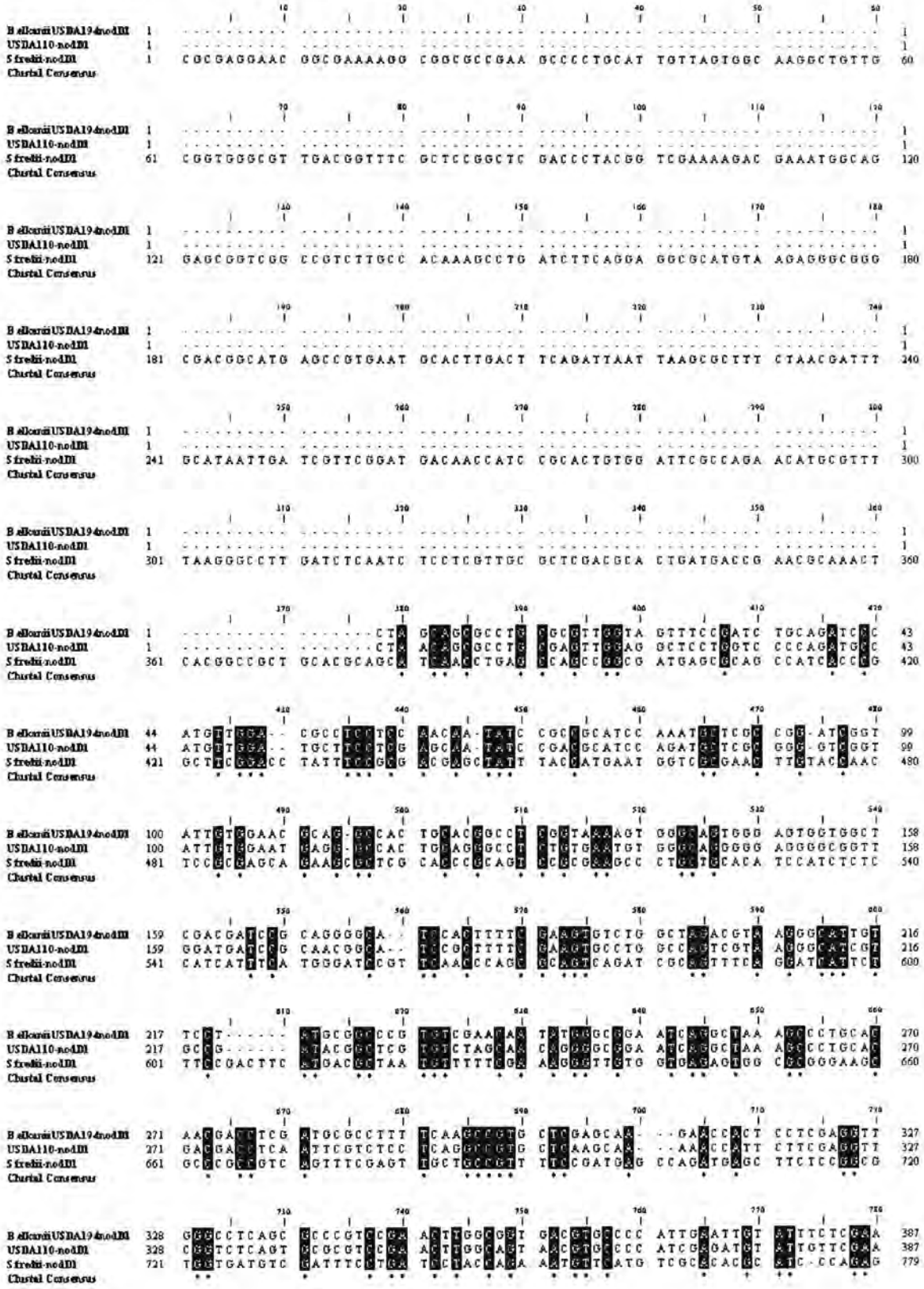
Xu, L.M., Ge, C., Cui, Z. Li, J., and Fan, H. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans. ***Int. J. Syst. Bacteriol.*** 45 (4) : 706-711.

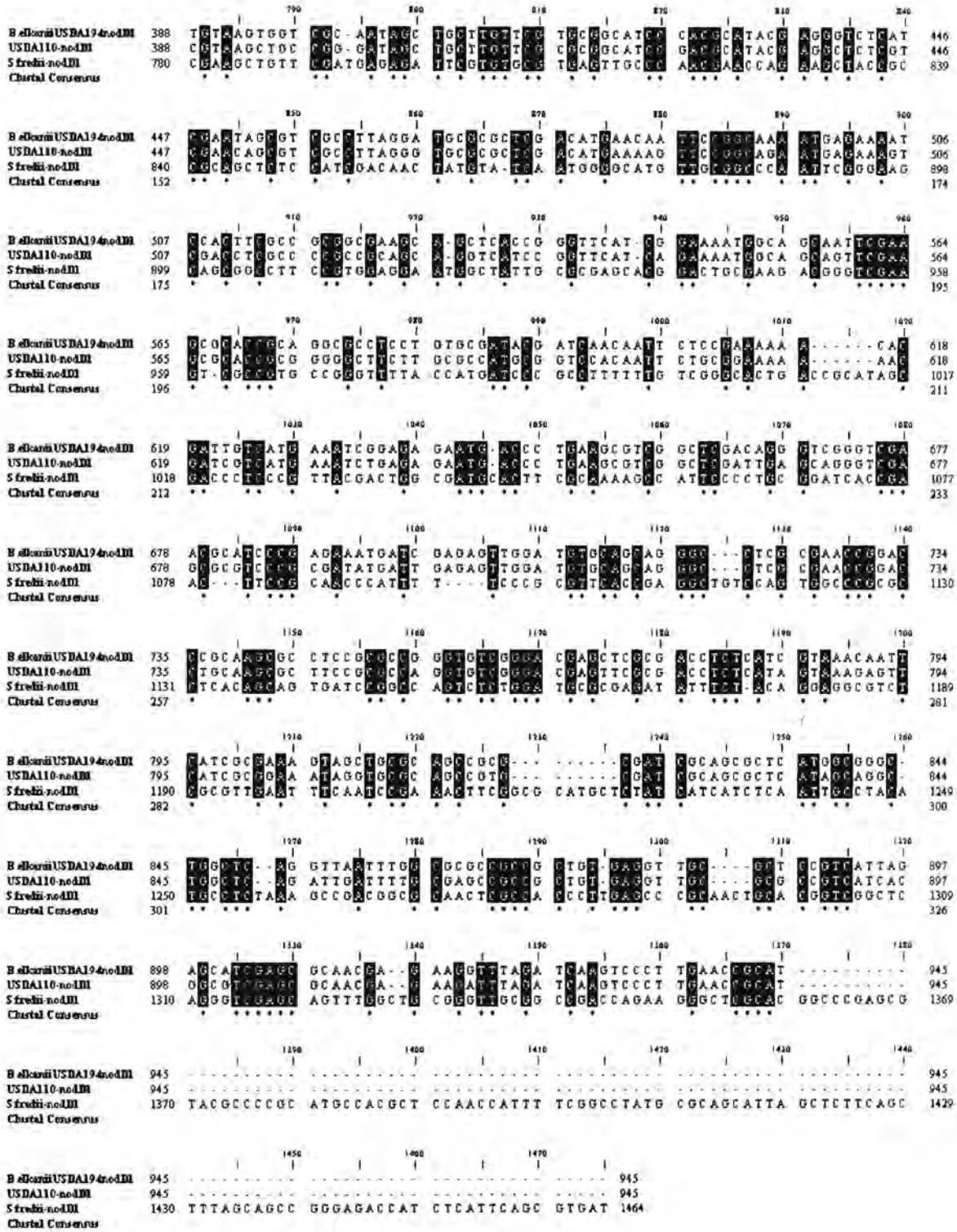
Yokoyama, T., Ando, S., Murakami, T., and Imai, H. 1996. Genetic variability of the common *nod* gene in soybean bradyrhizobia isolated in Thailand and Japan. ***Can. J. Microbiol.*** 42: 1209-1218.

Yokoyama, T., Ando, S., and Tsuchiya, K. 1999. Serological properties and intrinsic antibiotic resistance of soybean bradyrhizobia isolated in Thailand. ***Soil Sci. Plant Nutri.*** 45: 505-515.

ภาคผนวก ก

Multiple alignments of *nodD1* of fast-growing (*S. fredii*) and slow-growing soybean rhizobia. (*B. elkanii* USDA 194 and *B. japonicum* USDA110).





หมายเหตุ

1. เครื่องหมาย * แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วและประเภทเพิ่มจำนวนช้า

2. ผลการทำ multiple alignments พบลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันของ *nodD1* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วและเพิ่มจำนวนช้า