BRT 542080

พลาสมิดโพรไฟล์ของไรโซเบียมในถั่วเขียว *Vigna radiata* (L.) Wilczek จากพื้นที่โครงการสร้างป่าและป่าพันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา

นางสาว รัตนวดี หอมจันทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-13-1358-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

19 มิ.ย. 2544

โครงการ BRT ชั้น 15 อาคารมหานครยิบซั่ม
539/2 ถนนศรีอยุธยา เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

พลาสมิดโพรไฟล์ของไรโซเบียมในถั่วเขียว *Vigna radiata (L.) Wilczek* จากพื้นที่โครงการสร้างป่า และป่าพันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา

นางสาว รัตนวดี หอมจันทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-13-1358-6.

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PLASMID PROFILES OF *Rhizobium sp.* IN MUNGBEAN *Vigna radiata (L.) Wilczek* AT FOREST-REVIVING AND PLANT GERMPLASM FOREST PROJECT, NAKHONRATCHASIMA PROVINCE

Miss Rattanavadee Homjun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-13-1358-6.

หัวข้อวิทยานิพนธ์	พลาสมิดโพรไฟล์ของไรโซเบียมในถั่วเขียว *Vigna radiata (L.) Wilczek* จากพื้นที่โครงการสร้างป่า และป่าพันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา
โดย	นางสาว รัตนวดี หอมจันทร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ อรทิพา เศรษฐบุตร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน)

....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ อรทิพา เศรษฐบุตร)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ โก้สกุล)

5ST 645110

รัตนวดี หอมจันทร์ : พลาสมิดโพรไฟล์ของไรโซเบียมในถั่วเขียว *Vigna radiata (L.) Wilczek* จากพื้นที่โครงการสร้างป่า และป่าพันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์. ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล , อ. ที่ปรึกษาร่วม : อรทิพา เศรษฐบุตร. 171 หน้า. ISBN 974-13-1358-6.

การศึกษาประชากร *Rhizobium sp.* (cowpea) ในดินของพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งประกอบด้วยพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าอำเภอครบุรี และพื้นที่ป่าเต็งรังผสมเบญจพรรณ (NT1R2) ตำบลหนองระเวียง ดำเนินการเก็บตัวอย่างดินทั้งสิ้น 4 ครั้ง ระหว่างเดือนมิถุนายน 2541 ถึงเดือนมีนาคม 2542 ผลการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ยประชากรไรโซเบียมในดินมีความแตกต่างกันทางสถิติ ในแต่ละพื้นที่ โดยค่าเฉลี่ยพบมากในสองแปลงที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLDP และ GLP) การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยประชากรไรโซเบียมกับคุณสมบัติทางกายภาพดินที่ศึกษา

การจัดจำแนกความแตกต่าง และศึกษาความสัมพันธ์ของไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็ว 32 ไอโซเลท ที่แยกจากปมถั่วเขียว 2 สายพันธุ์ จากดินในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) และพื้นที่ป่าเบญจพรรณ (NT1R2) โดยใช้คุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะและพลาสมิดโพรไฟล์ของเชื้อสามารถจำแนกความต่างได้เป็น 11 และ 9 กลุ่มที่มีขนาดพลาสมิดอยู่ในช่วง 164-600 Mdal และเกือบร้อยละ 70 ของไอโซเลททั้งหมดมีกลุ่มของการจัดจำแนกที่เหมือนกันโดยพลาสมิดโพรไฟล์และคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ แต่ไม่พบลักษณะเด่นของการจัดจำแนกตามแบบแผนพลาสมิดที่สัมพันธ์กับสายพันธุ์พืชและแหล่งที่มาของเชื้อ สำหรับผลการจัดจำแนกตามคุณสมบัติทางจีโนไทป์ด้วยเทคนิค RAPD ร่วมกับ 5 ไพรเมอร์ ให้ผลผลิตดีเอ็นเอที่หลากหลายมีขนาดอยู่ในช่วง 0.29 – 3.0 กิโลเบส สามารถจำแนกประชากรไรโซเบียมออกเป็น 5 กลุ่ม โดยชนิดดินที่ต่างกันเป็นปัจจัยสำคัญทำให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมได้มากกว่าสายพันธุ์พืช ซึ่งการจัดจำแนกด้วยเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์ พบว่ามีความสอดคล้องกับเทคนิค RAPD แต่ในบางกรณีให้ผลการจัดจำแนกในระดับที่สูงมากเกินไป ซึ่งเป็นข้อเสียของเทคนิคนี้หากนำมาใช้จัดจำแนกเพียงลำพังเทคนิคเดียว อย่างไรก็ตามพลาสมิดโพรไฟล์ร่วมกับเทคนิค RAPD นี้ นอกจากสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อที่มีจีโนไทป์ใกล้ชิดกันมากออกจากกันได้แล้ว ยังแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายที่เกิดภายในพลาสมิดโพรไฟล์กลุ่มเดียวกันอีกด้วย โดยข้อมูลจาก 2 เทคนิค นำมายืนยันความสัมพันธ์ได้ร่วมกับคุณสมบัติต้านสารปฏิชีวนะ แสดงให้เห็นรายละเอียดของความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการภายในประชากร และประสิทธิภาพการจัดจำแนกที่เพิ่มมากยิ่งขึ้น

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน พบว่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของเชื้อทั้ง 32 ไอโซเลท ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าไอโซเลทส่วนใหญ่ให้น้ำหนักของต้นแห้งที่สัมพันธ์ กับค่า ARA (Acetylene Reduction Assay) และน้ำหนักปมแห้ง ลักษณะการเกิดปมที่พบ คือ เกิดปมการกระจายตามรากแก้ว ลักษณะที่ 2 และ3 เกิดปมการกระจายตามรากแขนง และรากแขนงกับรากแก้ว

ภาควิชา ......พฤกษศาสตร์......	ลายมือชื่อนิสิต......รัตนวดี หอมจันทร์......
สาขาวิชา......พันธุศาสตร์......	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา......
ปีการศึกษา......2543......	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม......

4072361523 : MAJAR GENETICS

KEY WORD: PLASMID PROFILES / *Rhizobium* / MUNGBEAN

RATANAVADAA HOMJUN : PLASMID PROFILES OF *Rhizobium sp.* IN MUNGBEAN *Vigna radiata (L.) Wilczek* AT FOREST-REVIVING AND PLANT GERMPLASM FOREST PROJECT, NAKHONRATCHASIMA PROVINCE. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL,Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ORNTIPA SATHABULR., THESIS 171 pp. ISBN 974-13-1358-6.

Studies on cowpea *Rhizobium* population in soil of revived forests at the Royal suggestions and plant germplasm forest project in Nakhon Ratchasima province, that included grassland regrown forest at Kornburi district and, decidous mix with dipterocarp forest at Nongrawieng subdistrict were carried out. Soil sampling was conducted 4 times between June 1998 to Mar 1999. Results showing the averages of *Rhizobium* population were significantly different among all area. There are a lot of *Rhizobium* population in two grassland plots, which were grassland checkdam planting (GLDP) and grassland planting (GLP). No correlation were found between the mean of *Rhizobium* population and physical properties of soil.

Antibiotic resistance and plasmid profiles were determined for 32 fast – growing Rhizobia isolates recovered from nodules of two varieties of *Vigna radiata (L.) Wilczek* grown on soil of grassland checkdam planting (GLPD) and Decidous mix with dipterocarp forest (NT1R2). A total of 11 antibiotic profile groups and 9 plasmid profile groups were identified, with a plasmid size in range 164-600 Mdal. Nearly 70% of all isolates were grouped similarly by the plasmid profiles and antibiotic profiles. No correlation were found between plasmid profiles and origin of them. Genotypic properties of all isolates were identified by RAPD analysis of 5 primers which provided the varies profile of RAPD in range 0.29 – 3.0 kilobase. A dendrogram based on similarity of RAPD profiles obtained by neighbour-joining method were divided into 5 clusters. The result indicated that the different of soil types were the principle factor causing genetic variation rather than variety of plant. It was found that results of RAPD correlated with plasmid profiles except in some case of plasmid profiles showing high power of discrimination which was disadvantage of this technique, when used discrimination alone. However, RAPD analysis in combination with plasmid profiles was not only discriminate to enable grouping of closely related isolates but also provided more detailed picture of diversity within same plasmid groups. These techniques could be confirmed with antibiotic profiles, increased the details relationship and efficiency of isolate discrimination.

Nitrogen fixation efficiency were tested on mungbean kampeangsan 2. It was found that enzyme nitrogenase activities from nodules as measured by acetylene of 32 isolates were not significantly different. Most isolates showed relationship between plant dry weight, ARA and nodule dry weight. The characteristics of nodulation were found, nodulation were scattered along tap roots. second and third, nodulations were formed along lateral roots and tap roots include lateral roots, respectively.

Department......Botany...... Student 's signature......Rattanavadee Homjun......

Field of study......Genetics...... Advisor's signature......[signature]......

Academic year......2000...... Co-Advisor's signature......[signature]......

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีโดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์. ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์รวมทั้งตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ อรทิพา เศรษฐบุตร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเอาใจใส่ให้ความรู้ คำแนะนำทางชีวโมเลกุล และเทคนิคต่างๆ ที่เป็นประโยชน์รวมถึงช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน ประธานกรรมการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ โก้สกุล กรรมการร่วมสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารบก (ฝ่ายสหรัฐ) ที่ได้อนุญาตให้ใช้เครื่องมือและสถานที่ในการศึกษาและทดลองทางชีวโมเลกุล ขอขอบคุณหัวหน้าและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยทางการแพทย์ทหารบก (ฝ่ายสหรัฐ) แผนก Enteric disease ทุก ๆ ท่านที่ให้กำลังใจ และช่วยเหลือจนทำงานวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี

ขอขอบพระคุณกลุ่มวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร ที่ได้เอื้ออำนวยความสะดวกเกี่ยวกับสถานที่สำหรับการทดลอง

ผลงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรทางชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT 542080 จึงขอบพระคุณมา ณ.โอกาสนี้

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ได้สนับสนุนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย..	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..	จ
กิตติกรรมประกาศ...	ฉ
สารบัญตาราง...	ซ
สารบัญภาพ..	ฌ
บทที่	
1. บทนำ...	1
2. ตรวจเอกสาร..	4
- ความสำคัญของทรัพยากรป่ากับบทบาทจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในดิน............	4
- คุณสมบัติทั่วไปของไรโซเบียม..	5
- การจัดจำแนกสกุลและอนุกรมวิธานของไรโซเบียม..................................	6
- ถั่วเขียวและชนิดของไรโซเบียมถั่วเขียว...	7
- ไรโซเบียมในฐานะแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน..	10
- กระบวนการเข้าสู่ราก...	10
- ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปม..	13
- ชีวเคมีการตรึงไนโตรเจน..	15
- การศึกษาประชากรไรโซเบียมในดิน..	17
- ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อประชากรไรโซเบียมในดิน.....................................	19
- ศึกษาคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ของเชื้อ..	20
- ศึกษา พลาสมิดโพรไฟล์ (Plasmid profile) ของไรโซเบียม..........................	24
-การจัดจำแนกและศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมระดับโมเลกุล..................	28
3. อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี..	34
4. วิธีดำเนินการศึกษา...	38
5. ผลการศึกษา...	63
6. อภิปรายผลการศึกษา..	120
7. สรุปผลและข้อเสนอแนะ..	135
รายการอ้างอิง..	138
ภาคผนวก...	148
ประวัติผู้เขียน..	171

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของไรโซเบียมและกลุ่มพืชตระกูลถั่วต่างๆ ที่เข้าอยู่อาศัย......................	8
2	การจำแนกไรโซเบียมในระบบใหม่..	9
3	ลักษณะการทดลองปลูกถั่วเขียว 2 สายพันธุ์ โดยใช้ดินจากพื้นที่โครงการศึกษา...	52
4	แผนการเก็บตัวอย่างเชื้อไรโซเบียมจากปมถั่วเขียว 2 สายพันธุ์......................	53
5	ผังการแปรปริมาณ Taq DNA polymerase 3 ระดับที่สภาวะ annealing และปริมาณไพรเมอร์ที่ต่างกัน..	58
6	แสดงไพรเมอร์ที่นำมาศึกษาขนาดความยาว 10-15 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 7 ชนิด...	60
7	ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความเป็นกรดด่างในดินของพื้นที่โครงการฯ..	65
8	ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินในพื้นที่โครงการศึกษา จังหวัดนครราชสีมา..........	65
9	ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินในพื้นที่โครงการฯ..	68
10	เปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินในพื้นที่โครงการศึกษา จังหวัดนครราชสีมา............	68
11	ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุของดินในพื้นที่โครงการฯ..	71
12	เปอร์เซนต์อินทรียวัตถุของดินในพื้นที่โครงการศึกษาจังหวัดนครราชสีมา.........	71
13	ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยประชากรไรโซเบียมในดินจากพื้นที่โครงการฯ..	75
14	ปริมาณไรโซเบียมในดินจากพื้นที่โครงการศึกษา จังหวัดนครราชสีมา.............	75
15	ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติทางกายภาพของดินกับปริมาณไรโซเบียม..	78
16	ผลการต้านสารปฏิชีวนะของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท............................	82
17	ผลการศึกษาพลาสมิดโพรไฟล์ของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท......................	85
18	แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการแปรปริมาณเอนไซม์และอุณหภูมิ annealing 3 ระดับ....	90
19	แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการแปรปริมาณ $MgCl_2$ ร่วมกับอุณหภูมิ annealing 3 ระดับ.	95
20	จำนวนและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ ทั้ง 7 ชนิด......................	99
21	จำนวนและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ ทั้ง 5 ชนิดที่เหมาะสม.........	101
22	ผลการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม 32 ไอโซเลท.........	116

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	การเข้าสู่รากและการเกิดปม..	12
2	กลไกการควบคุมการแสดงออกของกลุ่ม nod gene..................................	14
3	กลไกการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในกระบวนการตรึงไนโตรเจน.........	16
4	ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยวิธี PCR........................	30
5	ผังพื้นที่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพื้น อ. ครบุรี จ.นครราชสีมา................	38
6	ตัวอย่างของแผนผังการจัดแปลงศึกษาในแนวที่ 7..	39
7	แผนผังที่ทำการศึกษาแต่ละจุดในแนวทแยงมุม..	40
8	แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้และขุดคันดินกั้นน้ำ (GLPD)	42
9	แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLP)............................	42
10	จุดศึกษาที่เป็นเส้นทางการสัญจร (way)...	43
11	แปลงศึกษาในแนวที่ 10 มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLD)..	44
12	แปลงศึกษาแนวที่ 10-11 มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่ปล่อยให้ฟื้นสภาพตามธรรมชาติ	44
13	แปลงศึกษาในพื้นที่ป่าหนองระเวียง (NT1R2)..	45
14	ขั้นตอนการศึกษาทั้งหมด..	47
15	การศึกษาปริมาณของไรโซเบียมในดิน โดยเทคนิค MPN-plant infect method.....	51
16	การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมในขวด Leonard jar.	62
17	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างของดินแต่ละแปลงศึกษา............................	66
18	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างของดินในแต่ละแปลงศึกษาในรอบ 1 ปี....	66
19	การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างของดินในแต่ละช่วงเดือนในรอบ 1 ปี..	67
20	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินในแต่ละแปลงศึกษา............................	69
21	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินในแต่ละแปลงศึกษาในรอบ 1 ปี....	69
22	การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินในแต่ละช่วงเดือนในรอบ 1 ปี.	70
23	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุของดินในแต่ละแปลงศึกษา........................	72
24	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุของดินในแต่ละแปลงศึกษาในรอบ 1 ปี	72
25	การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุของดินแต่ละช่วงเดือน ในรอบ 1 ปี	73
26	เปรียบเทียบปริมาณไรโซเบียมในดิน แต่ละแปลงศึกษา..................................	76
27	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณไรโซเบียมในดิน แต่ละแปลงศึกษาในรอบ 1 ปี.........	76
28	การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยปริมาณไรโซเบียมในดินแต่ละช่วงเดือนในรอบ 1 ปี.......	77
29	ผลการแยกเชื้อและตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเชื้อไรโซเบียม........................	79

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

30 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นเชื้อไรโซเบียม.. 80

31 แสดงการตอบสนองของเชื้อไรโซเบียมต่อการต้านสารปฏิชีวนะ........................ 83

32 พลาสมิดขนาดใหญ่ของไรโซเบียม {*Rhizobium sp.* (ถั่วเขียว)} ที่แยกจากดินในพื้นที่โครงการฯ.. 86

33 การสกัดแยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากไรโซเบียม.. 88

34 ผลการแปรปริมาณ Taq DNA polymerase 3 ระดับ โดยใช้อุณหภูมิการ annealing ที่ 32 °C.. 91

35 ผลการแปรปริมาณ Taq DNA polymerase 3 ระดับ โดยใช้อุณหภูมิการ annealing ที่ 36 °C.. 92

36 ผลการแปรปริมาณ Taq DNA polymerase 3 ระดับ โดยใช้อุณหภูมิการ annealing ที่ 40 °C.. 93

37 ผลของปริมาณ $MgCl_2$ 3 ระดับ ร่วมกับการใช้ Taq DNA polymerase 0.025 unit..... 96

38 ผลของปริมาณ $MgCl_2$ 3 ระดับ ร่วมกับการใช้ Taq DNA polymerase 0.030 unit..... 97

39 ผลการศึกษาหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดรูปแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เหมาะสมจากเชื้อ 4 ไอโซเลท ที่ต่างกัน.. 100

40 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 1 ร่วมกับไรโซเบียม 32 ไอโซเลท... 102

41 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 2 ร่วมกับไรโซเบียม 32 ไอโซเลท... 103

42 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 4 ร่วมกับไรโซเบียม 32 ไอโซเลท... 104

43 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 6 ร่วมกับไรโซเบียม 32 ไอโซเลท... 105

44 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 7 ร่วมกับไรโซเบียม 32 ไอโซเลท... 106

45 จัดจำแนกกลุ่มไรโซเบียมถั่วเขียว 32 ไอโซเลทในลักษณะ dendrogram................ 108

46 จัดจำแนกกลุ่มไรโซเบียมตามคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่สัมพันธ์กับกลุ่มพลาสมิด.. 110

47 จัดจำแนกกลุ่มไรโซเบียมในลักษณะ dendrogram ที่เชื่อมโยงกับการจัดจำแนกตามกลุ่มพลาสมิดโพรไฟล์และคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ.............................. 113

48 แสดงการทดสอบ 4 คุณสมบัติการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท... 118

49 ตำแหน่งการเกิดปมของเชื้อไรโซเบียมกับถั่วเขียวกำแพงแสน 2 119

บทที่ 1

บทนำ

ป่าธรรมชาติ เป็นแหล่งอุดมด้วยสิ่งมีชีวิต และความหลากหลายทางพันธุกรรมรูปแบบใหม่ที่มีประโยชน์ต่อการนำมาพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ เพื่อเพิ่มศักยภาพในการประยุกต์ใช้ (วิสุทธิ์ ใบไม้, 2532) ปัจจุบันป่าไม้ในหลายพื้นที่ถูกทำลายเป็นเหตุให้ระบบนิเวศป่าเปลี่ยนแปลงไป แหล่งอาหารเสื่อมโทรมลง เกิดการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นผลเสียต่อมนุษย์ในระยะยาว (กรรณิการ์ ว่องวุฒิญาณ, 2536) การวางแผนจัดการเพื่อปรับปรุงพื้นที่ป่าให้คืนสภาพ อาจทำได้โดยการปลูกป่าทดแทนร่วมกับการปรับปรุงคุณภาพดิน โดยเพิ่มธาตุอาหารที่จำเป็นให้กับดิน ธาตุอาหารหลักที่มีปริมาณน้อยในดิน แต่มีความจำเป็นต่อการเจริญของพืชมากที่สุด คือธาตุไนโตรเจน ดังนั้น วิธีการหนึ่งที่อาจทำได้ในการปรับปรุงคุณภาพดินในพื้นที่ป่า คือ การเพิ่มธาตุไนโตรเจนให้กับดินด้วยการปลูกพืชตระกูลถั่ว เสมือนทดแทนการใช้ปุ๋ยที่มีราคาแพง เพราะพืชตระกูลถั่วมีกระบวนการตรึงไนโตรเจนแบบชีวสัมพันธ์ (symbiosis) ที่เกิดขึ้นร่วมกับจุลินทรีย์ไรโซเบียม (*Rhizobium*) กลุ่ม Symbiotic nitrogen fixation ซึ่งเป็นกระบวนการหนึ่งที่เกิดขึ้นเพื่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตที่สัมพันธ์กับผลผลิตพืช และความอุดมสมบูรณ์ของดิน เนื่องจากได้ไนโตรเจนปริมาณมากจากกระบวนการนี้เมื่อเทียบกับการตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ การตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมจะเกิดขึ้นบริเวณปม และการเกิดปมขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้าสู่รากของพืชที่เกิดขึ้นอย่างจำเพาะเจาะจง ดังนั้น ข้อมูลการศึกษาประชากรไรโซเบียมในดินที่จำเพาะต่อพืชจากแต่ละสภาพป่าต่างกัน สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางการจัดการปรับปรุงฟื้นฟูสภาพป่า และเป็นสิ่งจำเป็นที่จะก่อให้เกิดความเข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศโดยใช้ปริมาณจุลินทรีย์ที่ผันแปรไป เป็นดัชนีบ่งชี้ความอุดมสมบูรณ์ และประสิทธิภาพการฟื้นฟูป่า เพื่อหาแนวทางแก้ไขและปรับปรุงคุณภาพดิน

ถั่วเขียว (*Vigna radiata (L.) Wilczek*) เป็นพืชตระกูลถั่วในกลุ่ม cowpea ที่ทำรายได้ให้กับประเทศ เชื้อไรโซเบียมที่แยกจากถั่วเขียวจัดอยู่ใน cowpea group และชนิดของไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็วที่แยกจากถั่วเขียว คือ *Rhizobium sp.* (*Vigna radiata (L.) Wilczek*) ซึ่งประกอบด้วยหลายสายพันธุ์ (strain) ที่ต่างกัน (สมศักดิ์ วังใน, 2525) ซึ่งการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรม การจัดจำแนกสายพันธุ์ และศึกษาสายวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของเชื้อ สามารถศึกษาได้จากรูปแบบดีเอ็นเอ (Laguerre et al., 1994; Nuswantara et al., 1996) รายงานการศึกษาส่วนใหญ่ พบความหลากหลายทางพันธุกรรมเกิดขึ้นภายในประชากรจุลินทรีย์ในระดับความถี่สูง โดยที่ระดับ

ความหลากหลายที่ตรวจพบได้ภายในประชากรขึ้นอยู่กับเทคนิคที่เลือกใช้ ซึ่งความผันแปรทางพันธุกรรมอาจเกิดจากกระบวนการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรม ในลักษณะการมีสิ่งกีดขวางการแลกเปลี่ยนยีน การแยกกันทางภูมิศาสตร์ ชนิดของดิน หรือชนิดของพืชอาศัย (Paffett et al., 1996) นอกจากนี้แล้วสิ่งสำคัญอีกอย่างหนึ่ง คือ การมีพลาสมิดขนาดใหญ่ที่บรรจุยีนที่เกี่ยวข้องกับ Symbiotic function (Sym) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อวิวัฒนาการของโครงสร้างประชากรไรโซเบียมในกลุ่มพวกเจริญเร็ว โดยพลาสมิดนี้มีความถี่สูงในการเกิด transformation และ rearrangement ระหว่างต่างสายพันธุ์ หรือต่างชนิดได้ ซึ่งจะเพิ่มระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมให้มีมากขึ้น การศึกษาความสัมพันธ์และจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ สามารถศึกษาได้จากแบบแผนพลาสมิดโพรไฟล์ และคุณสมบัติทางจีโนไทป์ของเชื้อ ร่วมกับคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายในการจัดจำแนก และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกันกับการวิเคราะห์บนพื้นฐานทางดีเอ็นเอ

งานวิจัยนี้ศึกษาปริมาณไรโซเบียม (*Rhizobium sp.* (cowpea)) ในดินจากพื้นที่โครงการสร้างป่า และป่าพันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและแนวทางในการจัดการปรับปรุงพื้นที่ป่า พร้อมทั้งเปรียบเทียบข้อมูลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็วจากถั่วเขียว 2 สายพันธุ์ โดยใช้ดินในพื้นที่โครงการศึกษา ตามแบบแผนพลาสมิดโพรไฟล์ คุณสมบัติทางฟีโนไทป์ของเชื้อ ร่วมกับการจัดจำแนกโดยเทคนิค PCR โดยศึกษาความสัมพันธ์และปัจจัยที่มีอิทธิพลทำให้เกิดวิวัฒนาการที่แตกต่างทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์รูปแบบ RAPD รวมทั้งศึกษาความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ เพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณไรโซเบียม (*Rhizobium sp.* (cowpea)) ในดินจากพื้นที่โครงการสร้างป่า และป่าพันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา
2. เก็บรวบรวมและจัดจำแนกความแตกต่างของเชื้อไรโซเบียมถั่วเขียว ตามแบบแผนพลาสมิดโพรไฟล์ คุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะของเชื้อ ร่วมกับการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยเทคนิค RAPD
3. ศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมถั่วเขียว ที่แยกจากดินในพื้นที่ในโครงการ ฯ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ข้อมูลแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณไรโซเบียมที่เปลี่ยนแปลงไปในระยะเวลา 1 ปี สำหรับใช้เป็นแนวทางการปรับปรุงและฟื้นฟูสภาพป่า

2. ข้อมูลความสัมพันธ์ของการจัดจำแนกทางพันธุกรรมของเชื้อจากเทคนิค RAPD ที่เชื่อมโยงกับคุณสมบัติการด้านสารปฏิชีวนะ และแบบแผนพลาสมิดโพรไฟล์ของเชื้อ ร่วมกับตัดสินบางปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อวิวัฒนาการโครงสร้างพันธุกรรมภายในประชากร จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD

3. ข้อมูลการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน เพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีมาใช้ประโยชน์ต่อไป

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ห้องปฏิบัติการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ทหารบก (ฝ่ายสหรัฐ)

3. ห้องปฏิบัติการวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ความสำคัญของทรัพยากรป่ากับบทบาทจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในดิน

ป่าไม้ เป็นศูนย์รวมแหล่งทรัพยากรทางธรรมชาติและความหลากหลายทางชีวภาพที่สำคัญ โดยเฉพาะป่าชื้นเขตร้อน เป็นแหล่งอุดมด้วยปัจจัยสี่ ปัจจุบันป่าไม้ในหลายพื้นที่ของประเทศไทยถูกทำลายจากการตัดไม้ทำลายป่า และการใช้ทรัพยากรทางธรรมชาติอย่างไม่ถูกต้องของมนุษย์ การลดลงของพื้นที่ป่าอย่างรวดเร็ว ย่อมมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตหลายชนิดโดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตที่นับวันจะหาได้ยากและใกล้จะสูญพันธุ์เข้าไปทุกที ทำให้ขาดโอกาสที่จะศึกษาและเรียนรู้การใช้ประโยชน์จากธรรมชาติอย่างถูกต้อง และไม่สามารถอนุรักษ์ทรัพยากรอันมีค่ายิ่งเหล่านี้เอาไว้ได้ การฟื้นฟูสภาพป่าให้กลับคืนมาเหมือนเดิมจึงมีความจำเป็น ทั้งนี้เพื่อคงไว้ซึ่งความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งอาหาร และรักษาไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศป่า (วิสุทธิ ใบไม้, 2538)

โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริและป่าพันธุกรรมพืช อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี เป็นโครงการศึกษาค้นคว้า และทดลองเพื่อเก็บรวบรวมข้อมูลในการนำไปประยุกต์ใช้แก้ปัญหาการใช้ทรัพยากรที่เกิดขึ้นในปัจจุบัน ทางโครงการได้ดำเนินการเก็บรวบรวมสายพันธุ์พืช ปรับปรุงคุณภาพดิน โดยการปลูกกล้าไม้ทดแทน และขุดคันดินกั้นน้ำเพื่อชะลอการพังทลายของหน้าดิน และรักษาความชุ่มชื้นภายในดินเอาไว้ (วิฑูร ชินพันธุ์, 2537) สิ่งเหล่านี้จะช่วยให้ป่าสามารถเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ และสามารถกลับคืนสู่สภาพป่าที่มีความอุดมสมบูรณ์เหมือนเดิมได้อย่างรวดเร็วกว่าที่จะปล่อยให้ฟื้นสภาพเองตามธรรมชาติ (secondary succession) ในการปรับปรุงฟื้นฟูสภาพป่า อาจเป็นการยากที่จะตัดสินว่าป่าที่ได้รับการปรับปรุงและฟื้นฟูสภาพนั้นมีความอุดมสมบรูณ์หรือไม่เพียงใด เพราะป่าส่วนใหญ่ในประเทศไทย ยังขาดการสำรวจและศึกษาวิจัยอย่างละเอียด การศึกษาชนิดพันธุ์ของพืชที่ขึ้นในป่าเป็นสิ่งที่ทำได้ง่าย แต่อาจจะไม่เพียงพอที่จะยืนยันถึงสภาพที่แท้จริงของป่า จึงต้องมีการศึกษากลุ่มสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่อาศัยอยู่ร่วมด้วย จึงจะเพียงพอที่จะประเมินได้ว่าสภาพป่านั้นมีความอุดมสมบรูณ์อย่างไร

จุลินทรีย์ในดิน เป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญมากในระบบนิเวศป่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่พบเป็นปริมาณมากที่สุด เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ในดินกลุ่มอื่นๆ แบคทีเรียในดินกลุ่มที่มีบทบาทสำคัญต่อการฟื้นฟูระบบนิเวศ คือ แบคทีเรียในกลุ่มย่อยสลาย และ

กลุ่มตรึงไนโตรเจน การปรับปรุงดินเพื่อฟื้นฟูสภาพป่า จึงอาจทำได้โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ช่วยเพิ่มธาตุอาหารในดิน (สมศักดิ์ วังใน, 2528) เป็นที่ทราบกันดีว่าธาตุไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่มีในปริมาณน้อย แต่มีความจำเป็นต่อการเจริญของพืชมากที่สุด และแหล่งกำเนิดของธาตุไนโตรเจนก็มีอยู่มากมายในอากาศแต่มีปริมาณน้อยมากในดิน ประกอบกับธาตุไนโตรเจนสามารถถูกชะล้าง และสูญเสียไปจากดินได้โดยง่าย จึงทำให้กระบวนการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติเป็นกระบวนการหนึ่งที่สำคัญต่อการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ กระบวนการตรึงไนโตรเจนส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นได้ จำเป็นต้องอาศัยกิจกรรมของกลุ่มจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน ซึ่งมีทั้งพวกดำรงชีวิตแบบอิสระ (non symbiotic bacteria) และดำรงชีวิตแบบพึ่งพา (symbiotic bacteria) กระบวนการตรึงไนโตรเจนที่เกิดจากการทำงานร่วมกันระหว่างพืชตระกูลถั่วกับจุลินทรีย์ไรโซเบียม มีบทบาทเพิ่มธาตุไนโตรเจนในดินได้ในปริมาณมากๆ เสมือนทดแทนการใช้ปุ๋ยที่มีราคาแพง

ไรโซเบียม (*Rhizobium*) ถูกจัดไว้ในกลุ่ม symbiotic nitrogen fixation ที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้วัฏจักรการตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ โดยสามารถเปลี่ยนไนโตรเจนที่มีอยู่มากมายในอากาศให้กลับคืนสู่ดิน หรือเปลี่ยนให้อยู่ในรูปอนุมูลของสารประกอบที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ และเนื่องจากการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ไรโซเบียมนี้ มีความเกี่ยวพันโดยตรงกับพืช ดังนั้น การศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ไรโซเบียมที่จำเพาะกับพืชกลุ่ม cowpea ที่มีมากในพื้นที่ป่าร่วมกับการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของดินรวมไปถึงชนิดของพืชที่ปลูก อาจทำให้เข้าใจและสามารถอธิบายกระบวนการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศในป่า โดยใช้ปริมาณจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนไปในแต่ละพื้นที่ป่า เป็นดัชนีบ่งชี้ในการตัดสินความอุดมสมบูรณ์ของดินในป่าที่กำลังได้รับการฟื้นฟูว่าจะมีแนวโน้มที่จะเปลี่ยนแปลงและพัฒนาไปในทางดีขึ้นได้หรือไม่ การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ในพื้นที่ที่ต่างกัน จะเป็นประโยชน์ในการตัดสินประสิทธิภาพการฟื้นฟูสภาพป่า เพื่อเป็นแนวทางการปรับปรุงแก้ไขและพัฒนาพื้นที่ป่าต่อไป (สมศักดิ์ วังใน, 2528)

คุณสมบัติทั่วไปของไรโซเบียม

ตาม Burgey 's Manual of Systematic Bacteriology (Jordan, 1984) ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Rhizobiaceae, สกุล (genus) ไรโซเบียม ไม่สร้างสปอร์ โดยทั่วไปมีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ย้อมติดสีแกรมลบ (gram negative) ต้องการอากาศ (aerobic bacteria) บางครั้งในที่มีออกซิเจนน้อยประมาณ 0.01 บรรยากาศก็สามารถอาศัยอยู่ได้

มีขนาดประมาณ 0.5-0.9x1.2-3.0 ไมครอน อาจจะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่เป็นคู่ เคลื่อนไหวได้เมื่ออายุน้อยโดยใช้แส้ (flagellum) มีทั้งแบบ monotrichous หรือ peritrichous ไม่มี endospore คุณสมบัติที่สำคัญของไรโซเบียม คือ สามารถทำให้รากของพืชในวงศ์ Leguminosae หรือ พืชตระกูลถั่วเกิดปมได้ โดยเข้าไปอาศัยในรากพืชตระกูลถั่วแบบพึ่งพาซึ่งจะได้ประโยชน์ร่วมกัน โดยไรโซเบียมสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้มาอยู่ในรูปของสารประกอบไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ขณะเดียวกันไรโซเบียมก็ได้รับอาหารจากต้นพืช

เมื่อไรโซเบียมเข้าไปอยู่ในเซลล์รากพืช จะเกิดการเปลี่ยนแปลงในรูปร่าง (differentiate) กลายเป็นแบคทีรอยด์ (bacteroid) ภายในเซลล์แบคทีรอยด์สร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase enzyme ; N_2ase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญยิ่งในกระบวนการตรึงไนโตรเจน เอนไซม์นี้จะเสื่อมสภาพในสภาวะที่มีออกซิเจน ดังนั้น จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน จึงต้องมีกลไกการป้องกันเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากออกซิเจน โดยไรโซเบียมจะกระตุ้นให้รากพืชสังเคราะห์สารเลกฮีโมโกลบิน (leghaemoglobin) ที่มีหน้าที่จับกับออกซิเจน เพื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่จะเข้าไปถึงแบคทีรอยด์ให้อยู่ในระดับที่พอเหมาะ (Cuttin, 1971; Applery, 1974) ปริมาณของเลกฮีโมโกลบินนี้ มีความสัมพันธ์กับปริมาณของไนโตรเจนที่ตรึงได้ และสารสีแดงสดจะถูกตรวจพบภายในปมที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

การจัดจำแนกสกุลและอนุกรมวิธานของไรโซเบียม

การจำแนกชนิด (species) ของไรโซเบียมมีเกณฑ์การจัดจำแนกแตกต่างกันไป หลายวิธีดังนี้ (สมศักดิ์ วังใน, 2525) (1) จำแนกตามสัณฐาน และคุณสมบัติทางสรีระของเชื้อจากปฏิกิริยาการทำให้ limus milk เป็นด่างหรือเป็นกรด (2) จำแนกโดยอาศัยความสามารถในการสร้างกรดหรือด่างของเชื้อบนอาหารที่มี bromthymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ (3) จำแนกโดยวิธี numerical technique อาศัยการนำลักษณะ และคุณสมบัติหลายประการของเชื้อมาเปรียบเทียบกัน แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลักษณะและคุณสมบัติของจุลินทรีย์เหล่านั้น (4) จำแนกโดยอาศัยลักษณะเบสในดีเอ็นเอเป็นเกณฑ์ (5) จำแนกโดย วิธี cross - inoculation group หรือ plant inoculation group ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน อันเป็นการจัดจำแนกชนิด ตามความสามารถของไรโซเบียมในการทำให้รากพืชตระกูลถั่วแต่ละกลุ่มเกิดปม โดยไรโซเบียมแต่ละชนิดเลือกเกิดปมได้เฉพาะกับถั่วบางชนิดหรือบางกลุ่มเท่านั้น วิธีนี้สามารถจำแนกชนิดของไรโซเบียมตามกลุ่มถั่วที่เข้าสร้างปมได้ 6 กลุ่ม ดังตารางที่ 1 (Burton, 1965) แต่การจำแนกโดยวิธีนี้ในบางครั้งมีความไม่แน่นอน เพราะเชื้อไรโซเบียมบางชนิดอาจทำให้เกิดปมกับถั่วนอกกลุ่มของตนเองได้

เรียก symbiotic promiscuity การจำแนกไรโซเบียมโดยวิธีต่าง ๆ ยังมีปัญหาอีกมาก เนื่องจากแต่ละวิธีมีข้อบกพร่องอย่างไรก็ตามวิธีการจำแนกแบบ cross-inoculation group นี้ มีผู้นิยมใช้มากที่สุด แม้จะมีความไม่แน่นอนเกิดขึ้นบ้างก็ตาม (Burton, 1965)

ต่อมามีผู้ค้นคว้าและศึกษาสรีรวิทยาและพันธุกรรมของไรโซเบียมมากขึ้น พบว่าไรโซเบียมที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันยังมีความแตกต่างกันอยู่มาก จึงได้จำแนกไรโซเบียมออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามความสามารถในการเจริญ (growth characteristics) ที่สัมพันธ์กับการผลิตกรดด่าง ประกอบกับระบบการจัดจำแนกแบบ cross-inoculation group ได้ ดังนี้ คือ กลุ่มไรโซเบียมที่เจริญเร็ว และผลิตกรด (fast-growing, acid-producing rhizobia) ใช้เวลา 3-5 วัน ขนาดโคโลนีประมาณ 1-5 มิลลิเมตร และกลุ่มไรโซเบียมที่เจริญช้า และผลิตด่าง (slow-growing, alkali- producing rhizobia) ใช้เวลา 5-10 วัน ขนาดโคโลนีใหญ่สุด ประมาณ 1 มิลลิเมตร ดังตารางที่ 2 (พรพรรณ จงสันติกุล, 2528)

ถั่วเขียวและชนิดของไรโซเบียมถั่วเขียว

ถั่วเขียว (*Vigna radiata (L.) Wilczek*) เป็นพืชตระกูลถั่วอายุสั้น มีความสำคัญทางเศรษฐกิจให้ผลผลิตเมล็ดที่มีโปรตีนสูง ใช้เป็นอาหารมนุษย์ เลี้ยงสัตว์ หรือใช้เป็นปุ๋ยพืชสด เพื่อปรับปรุงโครงสร้างและความอุดมสมบูรณ์ของดิน สามารถปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมได้ค่อนข้างกว้าง ถั่วเขียวมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนร่วมกับแบคทีเรียไรโซเบียม ที่มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มธาตุไนโตรเจนให้กับดินในพื้นที่เขตร้อน ซึ่งตามปกติแล้วดินในสภาพป่าเสื่อมโทรมมีธาตุชนิดนี้อยู่น้อยมาก (เศรษฐา ศิริพินท์, 2535)

เชื้อไรโซเบียมถั่วเขียว ตามวิธีการจัดจำแนกแบบ cross-inoculation group อยู่ในกลุ่ม cowpea และชนิดไรโซเบียมที่แยกจากถั่วเขียว แบ่งได้ 2 ชนิด ตามอัตราการเจริญ และความสามารถในการผลิตกรด และด่างบนอาหาร Yeast-Mannitol Agar (YMA) ที่มี bromthymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ ได้แก่ กลุ่มไรโซเบียมที่เจริญเร็วผลิตกรด (fast-growing, acid-producing rhizobia) คือ *Rhizobium sp.* และกลุ่มไรโซเบียมที่เจริญช้าผลิตด่าง (slow-growing, alkali-producing rhizobia) คือ *Bradyrhizobium sp.* และเนื่องจากไรโซเบียมในพวก cowpea group ประกอบด้วยถั่วหลายชนิด (Burton, 1965; Bergey, 1983) ดังนั้น ปฏิกิริยาระหว่างไรโซเบียมกับถั่วจึงกว้างไม่แคบเหมือน *Rhizibium japonicum* ซึ่งทำให้เกิดปมที่มีประสิทธิภาพกับถั่วเหลืองเท่านั้น แต่ไรโซเบียมในกลุ่ม cowpea นี้ สามารถทำให้เกิดปมในถั่วหลายชนิด เช่น ไรโซเบียมถั่วเขียว สามารถทำให้ถั่วลิสง และถั่วฝักยาวเกิดปมได้ (สมศักดิ์ วังใน, 2525)

ตารางที่ 1 ชนิดของไรโซเบียม และกลุ่มพืชตระกูลถั่วต่าง ๆ ที่เข้าอยู่อาศัย (burton, 1965)

ชนิดของไรโซเบียม (*Rhizobium* species)	พืชตระกูลถั่วที่เข้าอยู่อาศัย (Scientific name)
R. meliloti	**Alfalfa group**
	Medicago sativa (อัลฟัลฟา)
	M.orbicularis
	Melilotus alba
	Trigonella foenumgraceum
R. trifolii	**Clover Group**
	Trifolium hybridum
	T. repens
	T. arvense
	T. reflexrum
R. leguminosarum	**Pea and Vetch Group**
	Pisum arvense
	Pisum sativum (ถั่วลันเตา)
	Vicia sativa
	V. faba
	Lathyrus odoratus
	Len culinaris
R. phaseoli	**Bean Group**
	Phaseolus vulgaric (ถั่วแดงหลวง)
	P. coccinenus
R. japonicum	**Soybean Group**
	Glycine max (ถั่วเหลือง)
R. spp.	**Cowpea Group**
	Vigna radiata (ถั่วเขียว)
	Vigna sinensis (ถั่วฝักยาว)
	V. sesquipededalis
	Lespedez striata
	Crotalaria junceae
	Desinodium lorluosum
	Pueraria thunbergiana

ตารางที่ 2 การจำแนกไรโซเบียมในระบบใหม่ (กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา (2535) และ Bergey (1983))

พวกเจริญเติบโตเร็ว (fast growers)

ชนิดไรโซเบียม	**พืชตระกูลถั่วที่อยู่อาศัย**
Rhizobium meliloti	*Medicago sativa* (อัลฟัลฟา) *Trigonella foenumgraccum Meliloti alba*
Rhizobium leguminosarum	
biovar. *trifolii*	*Trifolium spp.* (ถั่วโคลเวอร์)
biovar. *phasaoli*	*Phaseolus vulgaris* (ถั่วแดงหลวง) *Phaseolus multifolis* (ถั่วแขก)
biovar. *viceae*	*Vigna sinensis* (ถั่วลันเตา) *Vigna faba* (ถั่วปากอ้า) *Lens* (ถั่วเลนส์) *และ* *Lathyru odoratus*
Rhizobium loti	*Lupinus Lolus Anthyllis Ornithopus*
Rhizobium fredii	*Glycine max* (ถั่วเหลือง)

พวกเจริญเติบโตช้า (slow growers)

ชนิดไรโซเบียม	**พืชตระกูลถั่วที่อยู่อาศัย**
Bradyrhizobium japonicum	*Glycine max* (ถั่วเหลือง)
Bradyrhizobium spp.	
-sp. (Vigna)	*Vigna radiata* (ถั่วเขียว) *Arachis hypogaea* (ถั่วลิสง) *Vigna sisensis* (ถั่วฝักยาว) ฯลฯ
-sp. (Lupinus)	*Lupinus sp. Lotus peduncIalus*

ไรโซเบียมในฐานะแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน

แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ตามสภาวะการเจริญที่สัมพันธ์กับการตรึงไนโตรเจน (ศุภมาศ พนิชศักดิ์, 2529) ดังนี้

ก. พวกที่ตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ (free-living bacteria) คือ แบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยไม่ต้องอาศัยสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น *Klebsiella spp.* และ *Clostridium spp.*

ข. พวกที่อยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น แบบหลวม ๆ (associative symbiotic bacteria) แบคทีเรียพวกนี้ เจริญหรือแบ่งตัวได้ในเซลล์เจ้าเรือน (host) แต่มีปริมาณการแบ่งตัวที่น้อยมาก เช่น *Azotobacter paspali*

ค. พวกที่อยู่รวมกับพืชแบบพึ่งพากันและกัน (obligatory symbiotic bacteria) แบคทีเรียพวกนี้จะไม่ตรึงหรือตรึงไนโตรเจนได้น้อยเมื่ออยู่อย่างอิสระ ในทางตรงกันข้ามจะมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงเมื่ออยู่ร่วมกับเจ้าเรือน ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียไรโซเบียม ไรโซเบียมเกิดการตรึงไนโตรเจนแบบพึ่งพากับพืชในวงศ์ Leguminoseae การตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้นภายในปมราก จากนั้นไรโซเบียมภายในเซลล์ราก จึงมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงกลายเป็นแบคทีรอยด์ (Ausubel, 1984) ซึ่งจะเปลี่ยนรูปร่างเป็นหลายแบบ เช่น club-shape pear-shape X-shape Y-shape star-shape และ coccoid (Somasegaran, Hoben and Halliday, 1985) เกิดการรีดิวซ์ nitrogen (N_2) เป็นแอมโมเนีย (amonia) (Ausebel, 1984) กระบวนการดังกล่าวประกอบด้วยหลายขั้นตอน ซึ่งต้องการพลังงานจากทั้งแบคทีเรียและพืชตระกูลถั่ว (Vincent, 1980; Verma and Iong, 1983) ดังนั้น ไรโซเบียมที่อยู่อย่างอิสระจะไม่มีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงกลายเป็นแบคทีรอยด์ และไม่สามารถใช้ N_2 เป็นแหล่งสร้างไนโตรเจนในรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Ausubel, 1984) แบคทีเรียให้สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนแก่พืช ส่วนพืชเป็นผู้ให้แหล่งคาร์บอนและแหล่งของพลังงานแก่แบคทีเรีย

กระบวนการเข้าสู่รากและการเกิดปม

ศุภมาศ พนิชศักดิ์ (2529) อธิบายกระบวนการเข้าสู่รากและการเกิดปม ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. การขับสารจากราก (root exudate) รากของถั่วปล่อยสารทริปโตรเฟน ออกมากระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์

2. เกิดดีฟอร์มเมชั่น (deformation) ไรโซเบียมเข้าสู่เซลล์พืช พร้อมกันนั้นก็เกิดการม้วนตัวของรากขนอ่อน เนื่องมาจากสารสังเคราะห์ที่ไรโซเบียมขับออกมากระตุ้น สารที่ขับออกมานี้มี

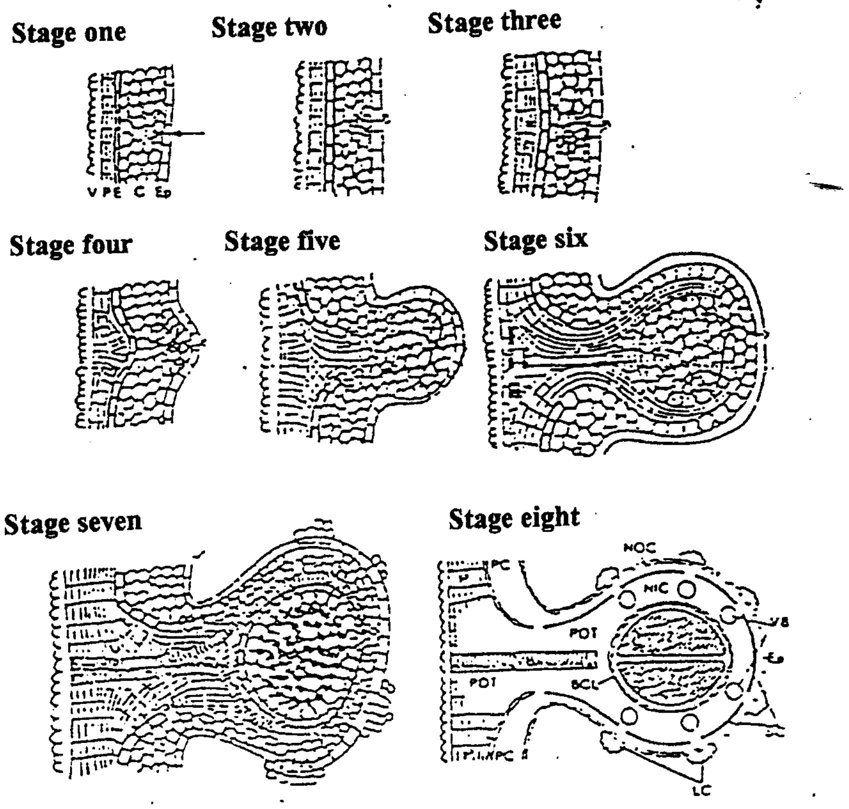
อยู่หลายชนิด เช่น กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) และ พอลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) เป็นต้น

3. เกิดอินเฟคชัน (infection) ไรโซเบียมอาจผลิตสารอื่นๆ อีก เช่น จิบเบอร์ริลลิน (giberellin) และ อาร์เอ็นเอ พอรีแซคคาไรด์ (RNA polysaccharide) อาร์เอ็นเอ พอรีแซคคาไรด์ที่ไรโซเบียมผลิต จะควบคุมให้พืชผลิตเอนไซม์พวกเซลลูเลส (cellulase) และเพคติเนส (pectinase) ซึ่งจะย่อยผนังเซลล์รากขนอ่อน เมื่อไรโซเบียมเข้าสู่รากขนอ่อนได้แล้วจะสร้าง infection thread ผ่านเซลล์คอร์ติเคิลเข้าสู่ราก จากนั้นพืชจะสังเคราะห์เซลลูโลสห่อหุ้ม infection thread

4. การเกิดปม (nodulation) ไรโซเบียมผลิตสารพวกไคติเนส กระตุ้นการแบ่งเซลล์ของรากทำให้รากพองเกิดปม พร้อมกันนั้นไรโซเบียมเริ่มเปลี่ยนสภาพกลายเป็นแบคทีรอยด์เซลล์ จากนั้นเซลล์ชั้นเพอริไซเคิลเพิ่มจำนวนมากขึ้นเกิดเป็นปมขยายขนาดขึ้นเรื่อยๆ เซลล์ชั้นวาสคูลาร์ถูกสร้างขึ้นมาล้อมรอบบริเวณนั้น และสร้างเซลล์ที่มีผนังเซลล์หนาล้อมรอบบริเวณปมนั้นอีกชั้นหนึ่ง (Vincent, 1980; Bauer, 1981) โดยปมรากที่มีแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพตรึงไนโตรเจนปมจะมีลักษณะเต่ง และมีสีชมพู เนื่องจากมีสารเลกฮีโมโกลบินซึ่งทำหน้าที่จับออกซิเจนไม่ให้ออกซิเจนไปลดกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในกระบวนการตรึงไนโตรเจน โดยถ้ามีออกซิเจนสูงจะไม่ให้พลังงาน และถ้าไม่มีเลกฮีโมโกลบินและพลังงาน ไรโซเบียมก็จะตรึงไนโตรเจนไม่ได้ (ธงชัย คัมภีร์, 2530)

Vincent (1980) อธิบายกลไกการเกิดปมว่า มี 8 ขั้นตอน ด้วยกัน (ภาพที่1)

ขั้นตอนที่ 1 ถั่วหลั่งสารจำพวก flavanoid ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณที่ทำให้ไรโซเบียมสร้างสารที่ช่วยกระตุ้นการเกิดปม (nodulation factor) ที่เป็นสารจำพวก lipo-oligosaccharide นี้จะช่วยให้ไรโซเบียมเข้าสู่เซลล์พืชได้ (ตรงลูกศรชี้) ขั้นตอนที่ 2 ไรโซเบียมเพิ่มจำนวนและเข้าสู่เซลล์ในชั้นคอร์เท็กซ์ ในขั้นตอนที่ 3 ชั้นเพอร์ริไซเคิลเริ่มแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ขั้นตอนที่ 4 เมื่อไรโซเบียมแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นส่งผลให้ชั้นเพอร์ริไซเคิลแบ่งตัวเพิ่ม และในขั้นตอนที่ 5 ไรโซเบียมเริ่มเปลี่ยนสภาพกลายเป็นแบคทีรอยด์ ชั้นเพอร์ริไซเคิลเพิ่มจำนวนมากขึ้นเกิดปมขยายขนาดขึ้นเรื่อย ๆ ขั้นตอนที่ 6 เซลล์ชั้นวาสคูลาร์ถูกสร้างขึ้น และในขั้นตอนที่ 7 พืชสร้างเซลล์ที่มีผนังหนาพร้อมกับเลนติเคิลมาล้อมรอบผนังเซลล์รอบ ๆ บริเวณปมในขั้นตอนที่ 8



ภาพที่ 1 แสดงการเข้าสู่รากและการเกิดปม (Vincent, 1980)

(V= vasculas tissue; P= pericycle; E=endodermis; C=cortex; Ep= epidermis)

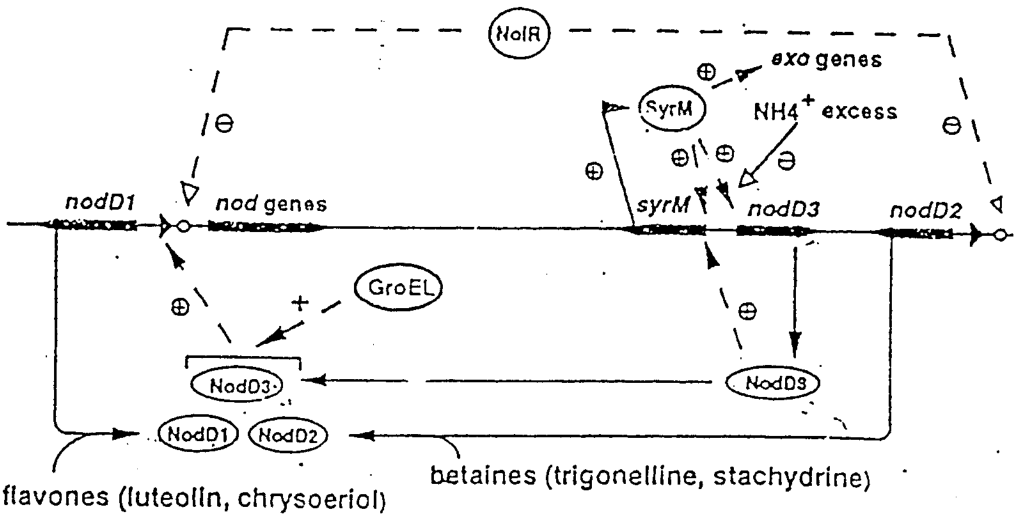
1. แบคทีเรียเข้าสู่เซลล์
2. ไรโซเบียมเพิ่มจำนวนในชั้นคอร์เท็กซ์
3. รากแบ่งตัวเพิ่มขึ้น
4. ชั้นเพอร์ริไซเคิล แบ่งตัวเพิ่ม ชั้นอิพิเดอร์มิสเริ่มแตกออก
5. ไรโซเบียมเปลี่ยนสภาพเป็นแบคทีรอยด์
6. เพอร์ริไซเคิล มีการแบ่งตัวเพิ่มและพืชสร้างเซลล์วาสคูลาร์ ขึ้นมารอบล้อมบริเวณนั้น
7. พืชสร้างผนังเซลล์หนามาล้อมรอบปมอีกชั้นหนึ่งเกิดปมขนาดใหญ่
8. มีการสร้างสเคอรอยด์ เซลล์ ล้อมรอบปมอีกชั้นหนึ่ง

(P = plant cortex ; Lc =Lenticel; Sc= scleroid cell; NIC=nodule inner cortex ;PDT= pericycle derived tissue)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปม (Nodulation genes)

ยีนที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดปมของไรโซเบียม คือ Nodulation genes (nod gene) โดยพบว่าไรโซเบียมพวกเจริญช้ารวมทั้ง *B. japonicum* มี nod gene อยู่บนโครโมโซม ส่วนไรโซเบียมพวกเจริญเร็ว เช่น *R. meliloti, R. trifoli* มี nod gene อยู่ทั้งบนโครโมโซมและพลาสมิดที่เรียกว่า Sym plasmid (pSym) (ณัฐพร สุนทรวิจารณ์, 2534) หน้าที่สำคัญของ nod gene เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ nodulation factor ที่เป็นสารประกอบจำพวก lipo-oligosaccharide

จากการศึกษากลไกการควบคุมการเกิดปมในระดับโมเลกุล พบกลุ่ม nod gene มี 2 ส่วน คือ regulatory nod gene และ structural nod gene โดย ขั้นแรก regulatory nod gene ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณ จากสาร flavanoid ซึ่งกระตุ้นการทำงานของกลุ่ม nod gene ตรงบริเวณ nod D gene ให้สร้างโปรตีน regulatory nod D ที่มีหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน (transcriptional activator) ที่จะเป็นตัวกำหนดการให้ไรโซเบียมแต่ละตัวเข้าสู่รากถั่วแต่ละชนิด ไรโซเบียมบางชนิดมี nod D gene เพียง 1 ชุด แต่บางชนิดมีมากกว่า 1 ชุด เช่น *R. meliloti* มี nod D gene 3 ชุด คือ nod D1 nod D2 และ nod D3 โปรตีน nod D1 มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของ nod genes ในสภาพมี inducer พวก flavanoids betaines ส่วนโปรตีน nod D3 ทำหน้าที่กระตุ้น nod gene ในสภาวะไม่มี inducer ซึ่งการทำงานถูกยับยั้งโดยปริมาณไนโตรเจนที่มากเกินพอ (ภาพที่ 2) ขั้นที่ 2 เมื่อ structural nod gene ได้รับสัญญาณกระตุ้น จาก regulatory nod gene ทำให้ nod gene ผลิตเอนไซม์ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร lipo-oligosaccharide (nod factor) ซึ่งเป็นตัวทำให้รากพืชเกิดการเปลี่ยนแปลงออกมารอบผิวราก พร้อมกับการที่เซลล์ไรโซเบียมเคลื่อนที่เข้าสัมผัสบริเวณผิวราก เมื่อไรโซเบียมเข้าอยู่ในเซลล์รากพืช รากพืชเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงโค้งงอโดยอิทธิพลของโปรตีนที่สร้างจาก nod factor ขณะเดียวกันถั่วจะสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า infection thread เป็นท่อออกไปตามราก ผ่านชั้นอิพิเดอร์มิส ผ่านเอนโดเดอร์มิส ไปถึงเนื้อเยื่อชั้นคอร์เท็กซ์ จากนั้นเซลล์ไรโซเบียมจะเปลี่ยนรูปร่างเป็นแบคทีรอยด์ เริ่มแบ่งตัวแบบไมโทซีสเพิ่มจำนวนมากขึ้น ขณะเดียวกันเซลล์ชั้นคอร์ติเคิลแบ่งตัวเพิ่มขึ้นเช่นกัน มีผลให้เซลล์รากพืชเปลี่ยนรูปเกิดการโค้งงอและเปลี่ยนเป็นปมในที่สุด (Hirsch, 1992)



ภาพที่ 2 กลไกการควบคุมการแสดงออกของกลุ่ม nod genes (Hirsch, 1992)

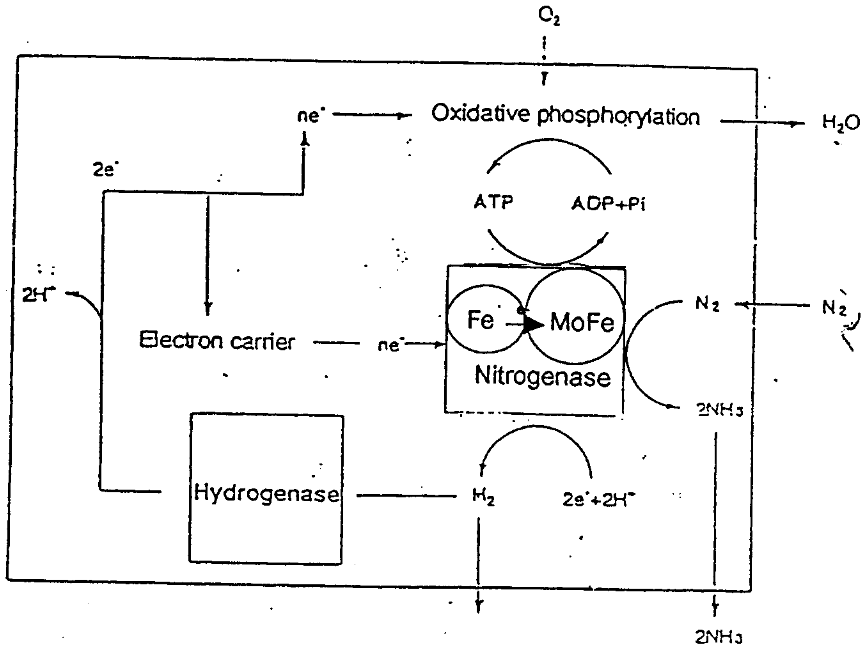
ชีวเคมีของการตรึงไนโตรเจน (Brill, 1977)

เมื่อเซลล์ไรโซเบียมเข้าสู่เซลล์พืช และเปลี่ยนสภาพเป็นแบคทีรอยด์ โดยแบคทีรอยด์เป็นตัวสร้างเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการตรึงไนโตรเจน คือ เอนไซม์ไนโตรจีเนส (N_2ase) คุณสมบัติของเอนไซม์นี้ คือ สามารถเปลี่ยนไนโตรเจนจากอากาศให้เป็นแอมโมเนียม หรือแอมโมเนียไอออน ซึ่งอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ เอนไซม์นี้ประกอบด้วยโปรตีนที่ซับซ้อน 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 (Component 1) ประกอบด้วย Molybdenum-Fe protein (Mo-Fe protein) ที่มีขนาดใหญ่ประกอบด้วยโปรตีน 4 โมเลกุล และมีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 24 อะตอม รวมทั้งมีโมลิบดีนั่มเป็นโคแฟกเตอร์อีก 2 อะตอม ส่วนที่ 2 (Component 2) ประกอบด้วย Fe-protein ที่มีขนาดเล็กกว่า ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน และมีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบอยู่ 4 อะตอม

กลไกการทำงาน เริ่มจากอิเล็กตรอน ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้มาจากกระบวนการสลายก๊าซไฮโดรเจนโดยเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ถูกนำส่งผ่านไปให้กับ Fe-protein จากนั้น Fe-protein จะจับกับ ATP ที่ได้มาจากการส่งถ่ายอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ (oxidative phosphorylation) ทำให้ redox potential ของเอนไซม์เพิ่มจาก -0.29 เป็น +0.40 มีผลทำให้ Fe-protein สามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนต่อไปให้กับ Mo-Fe protein และเกิดการรีดิวซ์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมต่อไป (ภาพที่ 3)

คุณสมบัติประการหนึ่งของเอนไซม์ไนโตรจีเนส คือ การเสื่อมสภาพในสภาวะมีออกซิเจนแบบไม่สามารถกลับคืนสภาพได้ (irreversible) ดังนั้น จุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศ จึงต้องมีกลไกปกป้องเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากออกซิเจน กระบวนการปกป้อง คือ เซลล์พืชสร้างเลกฮีโมโกลบินมาจับออกซิเจน โดยเลกฮีโมโกลบินนี้ถูกชักนำให้สร้างเมื่อมีไรโซเบียมเข้าไปเจริญอยู่ภายในเซลล์เท่านั้น โดยปมรากถั่วที่ตรึงไนโตรเจนได้ดีนั้น ภายในปมจะมีสีแดงสด ซึ่งเป็นสีของเลกฮีโมโกลบิน

กลไกที่ควบคุมกระบวนการตรึงไนโตรเจนเกี่ยวโยงกับเมทาบอลิซึมของเซลล์ โดยที่แอมโมเนียมไอออนที่ได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนเข้าทำปฏิกิริยากับ α - Ketoglutarate ที่อยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์กลูตาเมทดีไฮโดรจีเนส (glutamate dehydrogenase) ได้ผลผลิตเป็นกลูตาเมท ดังปฏิกิริยาที่ 1 ส่วนผลของกลูตามีน เกิดจากการทำงานของเอนไซม์กลูตามีนซินเทส ดัง ปฏิกิริยาที่ 2



ภาพที่ 3 แสดงการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Brill, 1977)

$NH_4^+ + \alpha$-Ketoglutarate + NADPH + $4H^+ \rightarrow$ L-glutamate + $NADP^+ + H_2O$ ....(1)

glutamate + NH_4^+ + ATP $\rightarrow$ glutamine + ADP + Pi + H^+ ....(2)

เอนไซม์กลูตาเมท และกลูตามีนนี้ เป็นกรดอะมิโนที่ถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนตัวอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญต่อไป โดยอาศัยการทำงานของอะมิโน ทรานสเฟอเรส (amino transferase) เนื่องจากการตรึงไนโตรเจนต้องการพลังงาน ATP มาก ดังนั้น เอนไซม์ไนโตรจีเนส จึงถูกควบคุมไม่ให้ตรึงไนโตรเจนโดยไม่จำเป็น เช่น ในกรณีของไรโซเบียมกับถั่ว ถ้าปลูกในดินอุดมสมบูรณ์มีไนเตรท (NO_3^-) ต่อเกลือแอมโมเนียม (NH_4^+) มากเพียงพอ จะมีผลไปยับยั้งการสร้างปมที่รากและการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม กระบวนการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมร่วมกับพืชตระกูลถั่วโดยวิธีนี้ให้ปริมาณไนโตรเจนที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ ดังรายงานของ Allen และ Allen (1981) ได้ทำการศึกษาการตรึงไนโตรเจนแบบชีวสัมพันธ์ พบว่าปริมาณของไนโตรเจนที่คำนวณได้ต่อหน่วยเซลล์ที่ทำการตรึงไนโตรเจนจะเป็น 100-200 เท่าของที่คำนวณได้จากจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ เช่น *Azotobacter*

การศึกษาประชากรไรโซเบียมในดิน

การประเมินประชากรไรโซเบียมในดินเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยากเนื่องจากในดินมีจุลินทรีย์อยู่จำนวนมาก โดยเฉพาะพวกที่มีลักษณะทางสรีระในด้านความต้องการสารอาหารที่คล้ายคลึงกับไรโซเบียม ทั้งยังไม่สามารถค้นพบอาหารที่จำเพาะกับไรโซเบียม จึงทำให้การประเมินประชากรโดยใช้ วิธี total plate count ให้ผลไม่แน่นอน ปัจจุบันนิยมใช้ วิธี MPN-plant infection test ในการประเมินปริมาณไรโซเบียมทั้งหมดในดิน ซึ่งจำเป็นต้องใช้พืชทดสอบที่มีความจำเพาะเจาะจงต่ำๆ คือ ต้องเป็นพืชที่สามารถให้ชนิด หรือสายพันธุ์ต่างๆ ของไรโซเบียมที่มีอยู่ในดินเข้าสู่รากแล้วทำให้เกิดปมได้ ส่วนการประเมินหาประชากรไรโซเบียมเฉพาะสายพันธุ์ ทำได้โดยใช้พืชทดสอบที่มีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของไรโซเบียมที่ต้องการศึกษา (สมศักดิ์ วังใน, 2525)

พิกุล หรรษานิมิตกุล, 2530 ได้ศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการทางระบบนิเวศต่อการเปลี่ยนแปลงของประชากรไรโซเบียม โดยแบ่งพื้นที่ศึกษาออกเป็น 3 ภาค คือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ โดยนับปริมาณไรโซเบียมด้วยวิธี MPN plant infection ใช้ถั่วซิราโต้เป็นพืชทดสอบ ระยะเวลาดำเนินงาน 1 ปี พบว่าภาคกลางมีปริมาณไรโซเบียมน้อยจนถึงน้อยมากในพื้นที่ยอดเขา และพื้นที่ที่มีระบบการปลูกข้าวแบบต่อเนื่อง

ส่วนพื้นที่ราบที่ทำการปลูกพืชไร่ พืชหมุนเวียน และพื้นที่ว่างเปล่า พบไรโซเบียมในปริมาณสูง ส่วนพื้นที่ป่ารวมทั้งป่าเปิด พบปริมาณไรโซเบียมสูงด้วยเช่นกัน ส่วนภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่าปริมาณไรโซเบียมในดินโดยทั่วไปค่อนข้างต่ำ และไม่มีความแตกต่างกันของจำนวนประชากรทั้งในที่ราบและพื้นที่ภูเขา ส่วนภาคเหนือพบปริมาณไรโซเบียมมากบริเวณเชิงเขาและพื้นที่ที่ใช้ปลูกพืชหมุนเวียนตลอดจนที่รกร้างว่างเปล่า ส่วนพื้นที่ป่าพบปริมาณไรโซเบียมค่อนข้างน้อยและไม่แตกต่างกัน ซึ่งจำนวนประชากรไรโซเบียมที่ต่างกันในแต่ละพื้นที่ อาจเนื่องมาจากฤดูกาล สภาพแวดล้อม ที่เปลี่ยนแปลงไปมีผลกระทบต่อระบบนิเวศของไรโซเบียม

Beatrice และคณะ (1995) ทำการศึกษาความหลากหลายของไรโซเบียม (*Phaseolus vulgaris L.)*ในดิน 2 ชนิด จากทุ่งนาบริเวณใกล้ ๆ กันในประเทศเคนยา (Kenya) ซึ่งเคยปลูกข้าวและพืชหมุนเวียนเหมือนกัน และเป็นดินที่อยู่ในระดับความสูงเดียวกัน แต่มี pH ของดินต่างกัน คือ 4.5 กับ 6.8 พบว่ามีปริมาณไรโซเบียมไม่แตกต่างกัน

ปี ค.ศ. 1993 มีรายงานการสำรวจปริมาณเชื้อไรโซเบียมถั่วลิสงในดินในประเทศไทยที่มีระบบการปลูกพืชต่างกัน โดยเทคนิค MPN-plant infect technique โดยใช้ถั่วลิสง เป็นพืชทดสอบ พบว่า ระบบการปลูกพืชและอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม มีผลต่อจำนวนประชากรไรโซเบียมในดิน โดยในดินที่มีการปลูกพืชหลายชนิดร่วมกับพืชตระกูลถั่วอย่างต่อเนื่อง หรือปลูกพืชอื่นสลับกับถั่วลิสง หรือถั่วเขียว มีประชากรไรโซเบียมอยู่มาก และมากกว่าดินที่มีระบบการปลูกข้าวโพด อ้อย รวมถึงบริเวณที่ว่างเปล่า ซึ่งพบไรโซเบียมในปริมาณน้อยถึงน้อยมาก (นันทกร บุญเกิด ปรีชา วดีศิริศักดิ์ และ วิทยา ธนานุสนธิ์, 2536) การที่เชื้อไรโซเบียมชนิดหนึ่งชนิดใดมีปริมาณมากหรือน้อยในดินนั้น ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น การมีชีวิตรอดของเชื้อและพืชอาศัย โดย Boonkerd และ Weaver (1982) พบว่า การที่เชื้อไรโซเบียมจะมีชีวิตอยู่ในดินได้ดีเพียงใด ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความชื้นของดิน ถ้าดินมีอุณหภูมิสูงเกิน 45°C และมีความแห้งแล้ง ไรโซเบียมโดยทั่วไปจะไม่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ นอกจากนี้ Weaver, Morris และ Boonkerd (1987) อธิบายว่า การมีเชื้อไรโซเบียมในปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยร่วมกัน เช่น สภาวะแวดล้อมภายในดิน ปริมาณน้ำฝน รวมไปถึงสภาวะความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณก๊าซออกซิเจนภายในดิน ซึ่งสิ่งเหล่านี้มีผลทำให้จำนวนไรโซเบียมมีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ และฤดูกาล

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อประชากรไรโซเบียมในดิน

ไรโซเบียมจะสามารถเจริญเติบโตมีกิจกรรม และมีชีวิตอยู่ในดินได้ดีหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมภายในดินหลาย ๆ ประการด้วยกัน แต่ที่สำคัญได้แก่ (กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน, 2529)

1. สายพันธุ์ของไรโซเบียม (strain of *Rhizobium*)

ไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ย่อมมีความสามารถในการเจริญ และมีชีวิตอยู่ในดินได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม สายพันธุ์ที่ปรับตัวได้ง่ายจะมีชีวิตอยู่ในดินได้ดีกว่า นอกจากนี้ความเหมาะสมระหว่างสายพันธุ์ของไรโซเบียมกับชนิดถั่วยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่ง ซึ่งถ้าสายพันธุ์ไรโซเบียมไม่เหมาะสมกัน รากถั่วจะเกิดเพียงปมที่ไม่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน จึงพบอยู่เสมอว่าไรโซเบียมชนิดเดียวกัน จะมีความแตกต่างด้านความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้

2. ความเป็นกรดเป็นด่างของดิน (soil pH)

ไรโซเบียมบางสายพันธุ์ชอบความเป็นกรด บางสายพันธุ์ชอบความเป็นด่าง ส่วน pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 6.5-7.5 คือ ดินที่ค่อนข้างเป็นกลางหรือกรดอ่อน ซึ่งโดยทั่วไปไรโซเบียมไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในดินที่มี pH ต่ำ ๆ เพราะทนความเป็นพิษของอนุภาคอลูมินัม แมงกานิส และเหล็กไม่ได้

3. อุณหภูมิและความชื้นของดิน (soil temperature and moisture)

สภาวะแวดล้อมที่อุณหภูมิสูงและความชื้นในดินต่ำ มีผลทำให้ปริมาณไรโซเบียมลดลงอย่างรวดเร็ว

4. ปริมาณของจุลินทรีย์อื่นในดิน (soil microorganism)

ถ้าในดินมีจุลินทรีย์อื่นๆ ที่สามารถผลิตสารที่เป็นพิษเป็นอันตรายต่อการเจริญของเชื้อไรโซเบียมอยู่มากย่อมจะกระทบกระเทือนต่อการดำรงชีพของไรโซเบียม โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวก bacteriophage ที่กินเชื้อไรโซเบียม ปริมาณโปรโตซัวที่มีอยู่ในปริมาณมากก็ย่อมทำให้ปริมาณของไรโซเบียมลดลงอย่างรวดเร็วด้วยเช่นกัน นอกจากนี้แล้วยังมีจุลินทรีย์ในดินอีกจำนวนมากที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของไรโซเบียม แต่อาจมีไรโซเบียมบางพันธุ์ที่สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะนั้นได้ เช่น ไรโซเบียมที่ขึ้นร่วมกับถั่วในกลุ่ม cowpea จะมีความทนทานต่อสารปฏิชีวนะเป็นพิเศษ ในทางกลับกันก็อาจมีจุลินทรีย์ในดินบางชนิดที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของไรโซเบียมอีกด้วยเช่นกัน

5. ปริมาณอินทรียวัตถุในดิน (organic matter content) อินทรียวัตถุมีอิทธิพลต่อการดำรงชีพของไรโซเบียมที่อยู่อย่างอิสระในดิน โดยเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ซึ่งตามปกติไรโซเบียมที่อยู่ในปมจะได้แหล่งคาร์บอนและพลังงานจากสารประกอบอินทรีย์ที่พืชสร้างจากกระบวนการสังเคราะห์แสง

6. อาณาเขตบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) ในดินบริเวณโดยรอบรากพืช ไรโซเบียมจะมีปริมาณมากและเจริญได้ดีกว่าในดินบริเวณที่ไม่มีรากพืช ทั้งนี้เพราะดินบริเวณรากพืชมีอินทรียวัตถุในปริมาณมากกว่า และมีสารอินทรีย์บางอย่างถูกปลดปล่อยออกมาจากรากด้วย ซึ่งสารอินทรีย์ดังกล่าวนี้จะช่วยให้ไรโซเบียมเจริญดีขึ้น แต่อาจมีพืชบางชนิดซึ่งแทนที่จะปล่อยสารที่ช่วยกระตุ้น กลับปล่อยสารที่มีพิษต่อการเจริญของไรโซเบียมออกมารอบๆ ราก

7. อิทธิพลอื่น ๆ อีกหลายประการ ที่มีผลต่อการมีชีวิตและการเจริญของไรโซเบียมในดิน เช่น คุณสมบัติทางเคมี ฟิสิกส์ และชีวภาพของดิน ฤดูกาล การแก่งแย่งระหว่างสายพันธุ์ รวมถึงปริมาณก๊าซออกซิเจน โดยไรโซเบียมในดินร่วนซุยจะเจริญเติบโต และมีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนที่ดีกว่าในดินเหนียวหรือดินที่มีน้ำขัง

การศึกษาคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ของไรโซเบียม

ในดินมีไรโซเบียมจำนวนมาก ทั้งที่อาศัยอยู่อย่างอิสระ และที่อยู่ภายในปมราก ต้นถั่วต้นเดียวกันแต่ต่างปมกัน อาจมีไรโซเบียมที่มีสายพันธุ์แตกต่างกัน ซึ่งการที่ไรโซเบียมชนิดหนึ่งประกอบด้วยหลายสายพันธุ์เหล่านี้ เนื่องมาจากความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) หรือการปรับตัว(adaptation) ของเชื้อไรโซเบียม ตามปกติความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์มักแสดงออกได้ในหลาย ๆ ด้าน เช่น ความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อม การต้านสารปฏิชีวนะ และความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (สมศักดิ์ วังใน, 2525)

Laguerre, Mazurier และ Amarger (1992) ทำการสำรวจประชากรไรโซเบียมชนิดเดียวกัน พบความผันแปรทางพันธุกรรมและการเกิดสายพันธุ์ใหม่ในระดับความถี่สูง ซึ่งความหลากหลายที่เกิดอาจพิจารณาได้จากความแตกต่างของสมบัติทางกายภาพ และสามารถตรวจสอบได้จากคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ เช่น ความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรท ความสามารถในการทนกรด คุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ และความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ซึ่งความสามารถที่ต่างกันของเชื้อในด้านการตรึงไนโตรเจน นับว่ามีความสำคัญมากที่สุด และมักใช้เป็นเครื่องชี้ความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ โดยลักษณะความโดดเด่นของไรโซเบียมชนิดหนึ่งๆ สามารถนำมาใช้

เป็นมาตรฐานในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีมีประสิทธิภาพมาใช้ให้เกิดประโยชน์ได้สูงสุด (สมศักดิ์ วังใน, 2525)

Somasegaran และ Hoben (1994) กล่าวว่า คุณสมบัติทางฟีโนไทป์ที่แสดงออกมาในด้านความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อที่มักจะพบเสมอว่า ประชากรไรโซเบียมชนิดเดียวกันมีความสามารถในการเข้าสร้างปม และตรึงไนโตรเจนได้แตกต่างกันไป ซึ่งคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ของเชื้อที่แตกต่างกันนี้ จะเกิดขึ้นได้เสมอในกลุ่มของประชากรจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกับพืชตระกูลถั่ว ดังเช่น การศึกษาของ สมศักดิ์ วังใน (2525) ได้ทำการศึกษาความแตกต่างของเชื้อบริสุทธิ์ไรโซเบียมที่แยกจากปมถั่วเหลือง (*Bradyrhizobium japonicum*) ซึ่งไม่ว่าจะเป็นเชื้อที่แยกจากปมถั่วต้นเดียวกันแต่ต่างปมกัน หรือจากปมถั่วที่ปลูกในสภาวะแวดล้อมที่ต่างกัน เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน มักพบเสมอว่า *B. japonicum* สายพันธุ์ต่าง ๆ เหล่านั้น มีความสามารถในการสร้างปมและตรึงไนโตรเจนได้ไม่เท่ากัน ซึ่งความแตกต่างกันของความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อนี้เอง จึงได้มีการแบ่งไรโซเบียมออกเป็นพวกๆ ตามความสามารถ หรือประสิทธิภาพของเชื้อ เช่นที่ Brockwell และ Katznelson (1976) ได้แบ่งประสิทธิภาพของเชื้อที่ใช้ในการทดลองออกเป็นพวก ๆ คือ พวกที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงมาก (highly effective) มีประสิทธิภาพสูง (effective) มีประสิทธิภาพปานกลาง (intermediate effective) มีประสิทธิภาพต่ำ (poorly effective) และพวกไม่มีประสิทธิภาพ (ineffective) เป็นต้น กระบวนการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกับปมรากเป็นกระบวนการที่เกิดแบบซับซ้อน มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกันทั้งระหว่างพันธุกรรมของพืช สายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียม และสภาวะแวดล้อม (เศรษฐา ศิริพินท์, 2535) ปัจจัยที่แตกต่างกันเหล่านี้ทำให้เกิดความหลากหลายของคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นมาตรฐานสำหรับจำแนกความแตกต่างภายในประชากรของเชื้อชนิดเดียวกันได้เป็นหลาย ๆ กลุ่ม (ณัฐพร สุนทรวิจารณ์, 2534)

นอกจากนี้คุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะของเชื้อก็จัดได้ว่าเป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญ ซึ่งสามารถตรวจพบได้เสมอ ๆ จากหลาย ๆ รายงานการวิจัยศึกษาประชากรไรโซเบียม

Cole และ Elkan (1973) กล่าวว่า การจำแนกความแตกต่างภายในประชากรไรโซเบียมชนิดเดียว อาจพิจารณาได้จากคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ของเชื้อที่ต่างกันโดยเฉพาะอย่างยิ่งความต่างกันทางพันธุกรรมของเชื้อ มีผลอย่างมากต่อการแสดงออกของรูปแบบการต้านสารปฏิชีวนะ ซึ่งความหลากหลายของคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ที่ต่างกัน สามารถนำมาใช้เป็นมาตรฐานในการแยกสายพันธุ์ของเชื้อได้ดี โดยจะมีความจำเพาะสูงในแต่ละสายพันธุ์

Abdel Basit, Kotob และ Van Berkum (1991) ศึกษาความหลากหลายทางฟีโนไทป์ของเชื้อที่แยกจากปมรากถั่ว พบความแตกต่างของรูปแบบการต้านสารปฏิชีวนะที่มักจะเกิดขึ้นได้เสมอในประชากรของเชื้อที่แยกจากปมราก Teaumroong, Murooka และ Boonkerd (1995) กล่าวว่าคุณสมบัติทางฟีโนไทป์บนพื้นฐานการต้านสารปฏิชีวนะที่ต่างกันของเชื้อไรโซเบียม สามารถนำมาใช้ยืนยันผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อชนิดเดียวกัน หรือต่างชนิดกันได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพเมื่อวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิค PCR ดังการทดลองของ Achara และคณะ (1996) ศึกษาลักษณะของ *Bradyrhizobium* ที่แยกจากปมถั่วเหลืองในประเทศไทย พบความแตกต่างของลักษณะการผลิตเอนไซม์ การผลิตออกซิน (IAA) รวมถึงการเจริญในสภาวะ pH ที่ต่างกัน พบว่าแต่ละไอโซเลทที่ศึกษามีความสามารถผลิตเอนไซม์ได้ชนิดเดียวกัน แต่ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้มีความแตกต่างกัน โดยการสร้างเอนไซม์จะลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเป็นกรดสูง ยกเว้นสายพันธุ์ที่ทนกรด ยังคงให้ผลผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่สูงเหมือนเดิม ดังนั้นจึงสามารถนำคุณสมบัติทางกายภาพเหล่านี้ มาใช้จำแนกความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ได้ โดยอาศัยลักษณะการผลิตเอนไซม์ การเจริญในสภาวะ pH ที่ต่างกัน ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวสามารถนำมาใช้ยืนยันผลได้ร่วมกับเทคนิค PCR โดยในการทดลองนี้ พบว่า เทคนิค PCR ที่ศึกษาร่วมกับ 5 ไพรเมอร์ ให้รูปแบบจำเพาะของแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งรูปแบบของผลผลิตดีเอ็นเอที่ต่างกันนี้ สามารถนำมาใช้จัดจำแนกความแตกต่างของเชื้อที่มีคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ที่เหมือนกันออกจากกันได้ นอกจากนี้แล้วยังพบว่าคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่ต่างกันของเชื้อ จัดว่าเป็นลักษณะที่สำคัญมากอีกลักษณะหนึ่งที่นำมาซึ่งความเข้าใจถึงความผันแปรที่เกิดขึ้นเสมอๆ ในธรรมชาติ โดยรูปแบบการต้านสารปฏิชีวนะมีความจำเพาะสูงในแต่ละสายพันธุ์และสามารถนำมาใช้ยืนยันผลการจำแนกสายพันธุ์ร่วมกับเทคนิค PCR ได้ ซึ่งในบางกรณีอาจให้ผลที่สอดคล้องกัน เช่นเดียวกับการทดลองของ Teaumroong, Boonkerd และ Murooka (1996) ศึกษาและจัดจำแนกสายพันธุ์ของ *Bradyrhizobium* โดยใช้เทคนิคทาง PCR และยืนยันผลร่วมกับคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ (antibiotic profile) 7 ชนิด พบความสอดคล้องกันของผลการทดลอง โดยแบบแผน PCR ให้ผลที่แน่นอน และแม่นยำกว่าในสภาวะการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นการศึกษาลึกลงไปถึงระดับยีน โดยพบว่า สายพันธุ์ E-7-1 และ E171 ของ *Bradyrhizobium sp.* ให้ลักษณะการจัดจำแนกทางจีโนไทป์ที่เหมือนกัน แต่ให้รูปแบบการต้านสารอีริโทรไมซินที่ต่างกัน ซึ่งก็ยังเป็นที่น่าสงสัยอยู่และขณะเดียวกันก็พบว่า สายพันธุ์ USDA117 และ THA5 ให้ผลการจัดจำแนกทางจีโนไทป์ที่เหมือนกันมากกว่าแล้วยังให้รูปแบบการต้านสารปฏิชีวนะที่เหมือนกันอีกด้วย ซึ่งก็เป็นสิ่งที่น่าสนใจมากที่แสดงให้เห็นว่าข้อมูลที่ได้จากการจัดจำแนกโดยคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ สามารถนำมาใช้ยืนยันผลควบคู่กับการศึกษาคุณสมบัติทางจีโนไทป์ของเชื้อ และอาจมีประโยชน์สำหรับใช้ยืนยันความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ละเอียดมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามการศึกษาคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ อาจให้ผลไม่แน่นอนขึ้นกับสภาวะ

แวดล้อมและสามารถเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับพื้นที่ซึ่งแบคทีเรียอาศัยอยู่ (Brockman and Bezdicek, 1989) และการที่เชื้อไรโซเบียมมีจำนวนหลากหลายของ สายพันธุ์ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการเข้าสร้างปมตรึงไนโตรเจนที่แตกต่างกัน และยิ่งความหลากหลายของแหล่งพันธุกรรมมีมากเท่าไร ก็ยิ่งเพิ่มโอกาสในการคัดเลือกเชื้อได้มากขึ้นเท่านั้น (วิสุทธิ ใบไม้, 2532)

การวัดอัตราตรึงไนโตรเจนโดยวิธีอะเซทิลีน รีดักชั่น (Acetylene Reduction Assay)

ในการวัดการตรึงไนโตรเจนสามารถกระทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่แม่นยำ สะดวก สิ้นเปลืองเวลาน้อย และนิยมใช้กันมากที่สุด คือวิธีการวัดการตรึงไนโตรเจนโดย วิธีอะเซทิลีน รีดักชั่น ซึ่งเป็นการวัดปริมาณก๊าซเอทิลีน (ethylene) (H_2C = CH_2) ที่เกิดขึ้นจากอะเซติลีน (acetylene) (HC = CH) โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในจุลินทรีย์ โดย ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา (2529) Dilworth (1966) รายงานว่า อะเซทิลีน (C_2H_2) สามารถถูกรีดิวซ์เป็นเอทิลีน (C_2H_4) ได้โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ดังเช่น ปฏิกิริยาของ Hardy และคณะ (1973)

$$N_2 + 3H_2 + 6e^- \xrightarrow{\text{nitrogenase enzyme}} 2NH_3 \qquad \text{.........................(1)}$$

$$C_2H_2 + H_2 + 2e^- \xrightarrow{\text{nitrogenase enzyme}} C_2H_4 \qquad \text{.........................(2)}$$

การวัดอัตราการตรึงไนโตรเจน โดยวิธีนี้อาศัยหลักการที่ว่า เอนไซม์ไนโตรจีเนสกระตุ้นการลดออกซิเจนของก๊าซไนโตรเจนจากอากาศ (N_2) โดยในขั้นแรกของการตรึงไนโตรเจนสามารถลดออกซิเจน หรือ ถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้กับอะเซทิลีน (C_2H_2) และผลที่ได้ คือ เอทีลีน (C_2H_4) ดังเช่น ปฏิกิริยาที่ 1 และที่ 2 ของ Hardy และคณะ (1973) หรืออาศัยการวัดความสามารถของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในการที่จะเปลี่ยนจากก๊าซอะเซทิลีนไปเป็นเอทิลีนได้ด้วยการหาปริมาณอะเซทิลีนที่เหลือ และเอทิลีนที่เกิดขึ้นได้ จากเทคนิคก๊าซโครมาโตกราฟฟี (gas chromatography) โดยปริมาณอะเซทิลีนจะเป็น 3 เท่าของปริมาณ หรือความเข้มข้นของไนโตรเจนที่ถูกรีดิวซ์ไปเป็นแอมโมเนียม ทั้งนี้เนื่องจากการรีดิวซ์จากอะเซทิลีนไปเป็นเอทิลีนนั้นใช้อิเลคตรอนเพียง 2 อนุภาค ส่วนการรีดิวซ์จากไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนียมต้องใช้อิเลคตรอนถึง 6 อนุภาค ดังนั้นการเปลี่ยนค่าอะเซทิลีนที่ถูกรีดิวซ์ไปเป็นค่าของไนโตรเจนที่ถูกรีดิวซ์ จึงต้องหารด้วย 3 และจากรายงานของ Hardy และคณะ (1973) พบว่า อัตราส่วนระหว่างการตรึงไนโตรเจนกับอะเซทิลีน

รีดักชัน มีค่าเท่ากับ 1:3.9 และ 1:4.3 ในพืชตระกูลถั่วและจุลินทรีย์ตามลำดับ (สมศักดิ์ วังใน, 2525; Hardy, Burns and Holsten, 1973 ; Burns and Hardy, 1975)

การศึกษาพลาสมิดโพรไฟล์ (plasmid profiles) ของไรโซเบียม

การศึกษาพันธุศาสตร์ของคุณสมบัติด้านชีวสัมพันธ์ของเชื้อไรโซเบียมกลุ่มที่เจริญเร็ว (fast growers) มักจะเป็นการศึกษาพลาสมิด เนื่องจากไรโซเบียมกลุ่มที่เจริญเร็วมีพลาสมิดที่ควบคุมการเจริญแบบชีวสัมพันธ์ (symbiotic plasmid) ซึ่งบรรจุยีนที่เกี่ยวข้องกับการอยู่ร่วมกันกับพืชแบบพึ่งพา (symbiotic gene) ได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตรึงไนโตรเจน (nif and fix gene) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการจดจำและทำให้เกิดปมกับพืชที่เป็น host (nod gene) ยีนเหล่านี้บางสายพันธุ์อยู่บนพลาสมิด บางสายพันธุ์อยู่บนโครโมโซม ในขณะที่ไรโซเบียมกลุ่มที่เจริญช้าไม่มีพลาสมิดที่ทำหน้าที่ดังกล่าว (Padmanabhan, Hirtz and Broughton, 1990) แต่มียีนที่ควบคุมการเจริญแบบชีวสัมพันธ์ปรากฏอยู่บนโครโมโซม

การศึกษาพลาสมิดโพรไฟล์ หมายถึง การศึกษาจำนวนและขนาดของพลาสมิดที่ต่างกันในแต่ละไอโซเลท สามารถใช้เป็นลักษณะในการจัดกลุ่มไอโซเลทของไรโซเบียมได้ ดังที่ Bromfield และคณะ (1987) ได้ทำการตรวจสอบ พบความหลากหลายของพลาสมิดในกลุ่มของ *R. meliloti* โดยรูปแบบของการมีพลาสมิดโพรไฟล์ที่ต่างกันในส่วนของจำนวน และขนาดของพลาสมิดในแต่ละไอโซเลท ซึ่งการศึกษาพลาสมิดโพรไฟล์ทำได้โดยการวิเคราะห์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) เพื่อให้ได้ข้อมูลของ

1. จำนวนพลาสมิด โดยทั่วไปสายพันธุ์ไรโซเบียมจะมีพลาสมิดมากกว่า 1 ขึ้นไป เช่น ใน *R. leguminosarum* ต่างสายพันธุ์ ก็พบว่ามีจำนวนพลาสมิดต่างกัน ตั้งแต่ 2 (Brewin et al., 1982) ถึง 8 ชิ้น (Prakash, Schilperoort and Nuti, 1981, Djorduevic, Zurkowski and Rolft, 1981) ในไรโซเบียมกลุ่มที่มีการเจริญช้า พบสายพันธุ์ทั้งที่มี (Nuti et al., 1977) และไม่มีพลาสมิด เช่น *B. japonicum* บางสายพันธุ์ (Denarie et al., 1981) อย่างไรก็ตามไรโซเบียมสายพันธุ์เดียวกันอาจพบจำนวนพลาสมิดที่แตกต่างกันได้ เช่น *B. japonicum* USDA 205 ซึ่ง Bohlool และ Schmidt (1983) รายงานว่า มีพลาสมิด 2 ชิ้น และ Masterson, Russell และ Atherly (1982) รายงานว่ามี 4 ชิ้น

2. ขนาดของพลาสมิด พลาสมิดจากไรโซเบียมส่วนมากมีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) อยู่ระหว่าง 50-500 เมกกะดาลตัน (Mdal) (Long, 1984) Masterson, Prakash และ Atherly (1985) รายงานว่า ในสายพันธุ์ต่างๆ ของ *B. japonicum* มีพลาสมิดขนาดต่าง ๆ กัน คือ

USDA 191 มี พลาสมิดขนาดประมาณ 30 69 195 และ มากกว่า 600 เมกกะดาลตัน

USDA 193 มี พลาสมิดขนาดประมาณ 186 และ มากกว่า 600 เมกกะดาลตัน

USDA 201 มี พลาสมิดขนาดประมาณ 117, 195 และมากกว่า 600 เมกกะดาลตัน เป็นต้น

ได้มีการศึกษา พบว่าพลาสมิดโพรไฟล์ สามารถใช้จำแนกความต่างของกลุ่มไรโซเบียมที่มีคุณลักษณะทางฟีโนไทป์เดียวกันออกจากกันได้ Gross, Vidivar และ Klucas (1979) รายงานว่า *B. japonicum* 135 ซึ่งมีคุณลักษณะต่าง ๆ (อัตราการเจริญ ความไว (sensitivity) ต่อฟาจ (phage) Rhj 781 การถูกยับยั้งโดยสารปฏิชีวนะ ลักษณะของโคโลนีและอัตราการตรึงไนโตรเจนต่อต้นเหมือนกันจะถูกแบ่งออกได้ เป็น 4 กลุ่มตามจำนวนและขนาดของพลาสมิดที่แตกต่างกัน โดยใช้วิธีของ Currier และ Nester (1976) แต่ละไอโซเลท มีพลาสมิด 1-4 ชิ้น ขนาดตั้งแต่ 49 -118 เมกกะดาลตัน Hartmann และ Amarger (1991) ทำการศึกษาหาพลาสมิดของ *R. meliloti* 125 ไอโซเลท โดยใช้วิธีของ Eckhardt (1978) ที่ปรับปรุงโดย Rosenberg และคณะ (1982) ได้พลาสมิดโพรไฟล์ ถึง 24 รูปแบบ ประกอบด้วย พลาสมิด 1-5 ชิ้นต่อไอโซเลทที่มีขนาดตั้งแต่ 45 ถึง 600 เมกกะดาลตัน

Maria และคณะ (1991) กล่าวว่า การจัดการภายในจีโนมขึ้นอยู่กับ 2 สิ่งที่ต่างกันบน replicon คือ โครโมโซม และพลาสมิดขนาดใหญ่ (large plasmid) ซึ่งตามปกติยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดปมและการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ บรรจุอยู่บนพลาสมิดขนาดใหญ่ ที่เรียกว่า Symbiotic plasmid (pSym)

Masterson และคณะ (1982) ได้รายงานว่า ในกลุ่มไรโซเบียมที่เจริญเร็วมียีนควบคุมการเกิดปม (nod genes) และการตรึงไนโตรเจน (nif genes) อยู่บนพลาสมิดที่ควบคุมการเจริญแบบชีวสัมพันธ์ ส่วนไรโซเบียมกลุ่มเจริญช้ามียีนเหล่านี้อยู่บนโครโมโซม

Thurman, Lewis และ Jones (1985) นำไอโซเลทของ *R. trifolii* จากพื้นที่ต่างกัน 21 แหล่งมาทดสอบหาอัตราการเจริญ การทนกรดและด่าง ประสิทธิภาพในด้านชีวสัมพันธ์ และจำนวนพลาสมิด โดยใช้วิธีของ Rosenberg และคณะ (1982) พบว่ามี พลาสมิด 2-10 ชิ้นต่อไอโซเลท แต่ไม่สัมพันธ์กับ pH ของดิน และการเจริญในสภาวะกรดหรือด่าง แต่จำนวนพลาสมิดมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Bromfield และคณะ (1987) และ Boughton และคณะ (1987) กล่าวว่า พลาสมิดขนาดใหญ่ในไรโซเบียมมักบรรจุยีนที่เกี่ยวข้องกับการอยู่ร่วมกันกับพืชแบบพึ่งพา ซึ่งรูปแบบของพลาสมิดที่ต่างกัน สามารถนำมาใช้บอกความหลากหลายที่เกิดภายในประชากรไรโซเบียมชนิดเดียวกันได้ การทดลองนี้ พบเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์ สามารถจำแนกกลุ่มประชากรไรโซเบียมชนิดเดียวกันออกเป็นกลุ่มย่อยหลาย ๆ กลุ่ม โดยเทคนิคนี้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายที่เกิดขึ้นภายในประชากรในระดับที่สูงมากกว่าปกติ

Flores และคณะ (1988) พบว่า ข่าวสารทางพันธุกรรมของไรโซเบียมโดยปกติมักกระจายอยู่บนโครโมโซมและพลาสมิดขนาดใหญ่ ซึ่งการจัดเรียงตัวใหม่ของยีน (rearrangement) บนพลาสมิดมักเกิดขึ้นได้เสมอ ๆ ทุกสภาวะกาล และเกิดได้ในระดับความถี่สูง

Mozo, Cabrera และ Ruiz-Argueso (1988) ศึกษาพลาสมิดของไรโซเบียม 45 สายพันธุ์ ที่แยกจาก *Hedyrarum coronarim* ที่ปลูกในบริเวณที่ต่างกัน ผลการตรวจสอบพลาสมิด พบความหลากหลายในการจัดเรียงตัวของ nif gene และ nod gene sequence และพบความหลากหลายของจำนวน และขนาดของ พลาสมิด สามารถจำแนกความแตกต่างได้ 19 กลุ่ม

Brockman และ Bezdicek (1989) กล่าวว่า การวิเคราะห์พลาสมิดเป็นวิธีหนึ่งที่เชื่อกันว่ามีความสำคัญ และสามารถนำมาใช้ในการจำแนกความหลากหลายของไรโซเบียมที่มีคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยา (serology) เหมือนกันออกจากกันได้ เนื่องจากคุณสมบัติการมีพลาสมิดขนาดใหญ่ของเชื้อไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็วบรรจุยีนที่ควบคุมลักษณะที่สำคัญหลายลักษณะรวมถึงการสร้างปม (Johnston et al., 1978) การตรึงไนโตรเจน (Nuti et al., 1979) การผลิตสาร bacteriocin (Hirsch, 1979) hydrogen recycling (Brewin et al., 1980) และความสามารถในการเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือนที่จำเพาะ (host specificity) (Johnston et al., 1978) ซึ่งในการทดลองนี้ศึกษาคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยา พลาสมิดโพรไฟล์ และคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะของเชื้อ *R. leguminosarum biovar viceae* 192 ไอโซเลท ที่ได้แยกจากปมถั่วลั่นเตา (*Pisum sativum L.*) ซึ่งมาจากหลายๆ แหล่งในรัฐวอชิงตัน โดยการทดลองนี้สามารถจัดจำแนกประชากรของเชื้อเป็น 3 กลุ่มตามคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยา (serogroup) และ 18 กลุ่มตามพลาสมิดโพรไฟล์ (plasmid profile group) โดยไอโซเลทของเชื้อภายในซีโรกรุปเดียวกัน พบว่าให้กลุ่มของพลาสมิดโพรไฟล์และคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่หลากหลาย ซึ่งความต่างของเชื้อที่อยู่ในซีโรกรุปเดียวกันนี้ อาจสะท้อนให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างไอโซเลท ที่อาจมีผลมาจากสภาวะแวดล้อมภายนอก หรือสภาวะทางภูมิศาสตร์ที่ต่างกันรวมถึงชนิดของดิน และจีโนไทป์ของพืช ซึ่งความผันแปรที่เกิดขึ้นภายในซีโรกรุปเดียวกัน อาจตรวจสอบได้ด้วยการศึกษา พลาสมิดโพรไฟล์ (Gross, Vidivar and

Klucas, 1979) พลาสมิดตัดจำเพาะ (symbiotic plasmid restriction analysis) รูปแบบโปรตีน (Dughre and Bottomley, 1983) และคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่ต่างกันของเชื้อ (intrinsic antibitic resistance : IAR) (Beynon and Josey, 1981) โดยที่เทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์ เคยประสบความสำเร็จในการใช้จัดจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียมที่มีคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาเดียวกันออกจากกันได้ (Broughton et al., 1987; Glynn et al., 1985)

Brom และคณะ (1991) กล่าวว่า ความผันแปรที่เกิดภายในจีโนมในระดับความถี่สูง มีผลกระทบต่อพลาสมิดขนาดใหญ่ ของ *R. leguminosarum bv. phaseoli CFN 42* เป็นสายพันธุ์ที่บรรจุ 6 พลาสมิดขนาดใหญ่ที่อยู่ในช่วง 200 – 600 กิโลเบส (Kb) โดยผลการจำแนก 320 ไอโซเลทของไรโซเบียม พบ พลาสมิดโพรไฟล์ 11 กลุ่ม ซึ่งปรากฏการณ์ของรูปแบบพลาสมิดที่แตกต่างกันนี้ อาจเป็นผลเนื่องมาจากมีการจัดเรียงตัวใหม่ของยีนบนพลาสมิดในลักษณะของการเกิด amplification deletion cointegration และการสูญหายของพลาสมิด แต่ไม่พบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

Hartmann และ Amarger (1991) ศึกษาความหลากหลายของไรโซเบียม 125 ไอโซเลท ที่แยกจากพืช *Medicago sativa* ในยุโรป โดยใช้ 32 ไอโซเลท เป็นตัวแทนของ 12 กลุ่มพลาสมิดโพรไฟล์ นำมาจำแนกความแตกต่างได้ 20 กลุ่มจากการวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (total DNA restriction patter) และ 16 กลุ่มจาก IS fingerprint (insertion sequence fingerprint) โดยผลการจำแนกความแตกต่างด้วยพลาสมิดโพรไฟล์ มีความสอดคล้องกับรูปแบบดีเอ็นเอตัดจำเพาะ และ IS fingerprint ซึ่งยืนยันได้ชัดเจนว่าเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์ อาจใช้เป็นตัวแทนการศึกษาความผันแปรภายในจีโนม และใช้ประเมินความหลากหลายภายในประชากรไรโซเบียมได้ แม้ว่าพลาสมิดโพรไฟล์ในบางกรณีจะให้ผลการจัดจำแนกในระดับที่ต่ำกว่าเทคนิคทั้ง สอง แต่ก็เป็นอีกวิธีที่สามารถนำมาใช้ได้เมื่อมีตัวอย่างจำนวนมาก

Laguerre, Mazurier และ Amarger (1992) กล่าวว่า พลาสมิดดีเอ็นเอ อาจใช้เป็นตัวแทนการศึกษาภายในจีโนมได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์นี้ สามารถแยกความแตกต่างภายในประชากรไรโซเบียมได้ดีกว่าเทคนิคไอโซไซม์และเซรุ่มวิทยา

Hashem และคณะ (1996) ศึกษาและจำแนกทางพันธุกรรมของ *Sinorhizobium* โดยศึกษาจากแบบแผนพลาสมิดโพรไฟล์ และความไวต่อการถูกบุกรุกของฟาจ (phase susceptibility) ซึ่งผลการศึกษาพลาสมิด พบ 1 – 6 พลาสมิด ที่มีขนาดใหญ่กว่า 1000 เมกกะดาลตัน จำแนกได้ 18 กลุ่มตามพลาสมิดโพรไฟล์ และ 23 กลุ่มตามความไวต่อการถูกบุกรุกของฟาจ ซึ่งการศึกษา

ความไวต่อการถูกบุกรุกของฟาจ และพลาสมิดโพรไฟล์ มีประโยชน์อย่างมากสำหรับการศึกษาพันธุกรรมของแบคทีเรีย การจำแนกทางอนุกรมวิธาน และศึกษานิเวศวิทยาของไรโซเบียมได้ดี นอกจากนี้ พลาสมิดขนาดใหญ่ (น้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 300 เมกกะดาลตัน) ของไรโซเบียม นอกจากมียีนที่ควบคุมการเจริญแบบชีวสัมพันธ์แล้ว บางครั้งยังพบว่ามียีนที่ควบคุมการสร้าง bacteriocin (Hirsch, 1979) การสร้างเม็ดสี (pigment) (Beynon, Beringer and Johnston, 1980) หรือความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะด้วย (Cole and Elkan, 1973) ในการศึกษาระยะแรกการสกัดพลาสมิดของไรโซเบียม ยังไม่มีวิธีที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาพลาสมิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเช่นนี้ ซึ่งการใช้วิธีการทำให้เซลล์แตกและทำการแยกขนาดโดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซิสทันที ตามวิธีของ Harrison, Young และ Jones (1989) นำมาปรับปรุงใช้ได้สำเร็จ

การจัดจำแนกและศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมระดับโมเลกุล

อดีตการจำแนกความแตกต่างในระดับชนิดของไรโซเบียม นิยมใช้การทดสอบการติดปมกับรากถั่ว และสมบัติทางสรีระวิทยาของเชื้อ และนิยมแบ่งกลุ่มย่อยระหว่างชนิด โดยอาศัยคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาไอโซไซม์ และลักษณะแบบแผนโปรตีน โดยเทคนิคเหล่ามีข้อจำกัดตรงที่สามารถแยกความแตกสิ่งมีชีวิตภายในชนิดเดียวกันได้ไม่ดีพอ หรือไม่สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากๆ ได้ นอกจากนี้แล้วการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์โดยอาศัยคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ของเชื้อเป็นหลักในการจำแนก อาจมีอิทธิพลจากสภาวะแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องจึงทำให้การจำแนกสายพันธุ์ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างเดียวไม่เพียงพอ และอาจเกิดความคาดเคลื่อนได้ง่าย ปัจจุบันเทคโนโลยีพัฒนามากขึ้น มีการนำเทคนิคใหม่ๆ มาใช้ในการหาความสัมพันธ์จัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตและแยกสายพันธุ์ของเชื้อ โดยอาศัยความแตกต่างในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ ได้แก่ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (ณัฐพร สุนทรวิจารณ์, 2534) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) (Welsh and McCelland, 1990; 1991) รวมไปถึงเทคนิคการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดย PCR ซึ่งเทคนิคเหล่านี้ทำให้เห็นความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอที่ช่วยในการจำแนกความแตกต่าง และบอกความสัมพันธ์ของเชื้อภายในประชากรเดียวกันได้ โดยชิ้นดีเอ็นเอจะถูกนำมาใช้เป็นตัวแทน หรือเครื่องหมายระดับโมเลกุล (molecular marker) ของลักษณะใดลักษณะหนึ่ง และใช้ประโยชน์จากความต่างของรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น (DNA polymorphism) สำหรับการบ่งชี้ และจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ

<u>PCR (Polymerase Chain Reaction)</u>

Saiki และคณะ (1985) ได้เสนอผลงานการค้นพบเทคนิค PCR เทคนิคนี้ได้นำความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับกระบวนการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ (DNA replicate) ของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัย

เอนไซม์ DNA polymerase และ RNA primer โดยที่กระบวนการ PCR อาศัยหลักของการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอหลายๆ รอบ ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนในหลอดทดลอง (in vitro) จะได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก ปฏิกิริยา PCR ในแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (ภาพที่ 4) ดังนี้

1. Denaturation ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90 – 95 องศาเซลเซียส

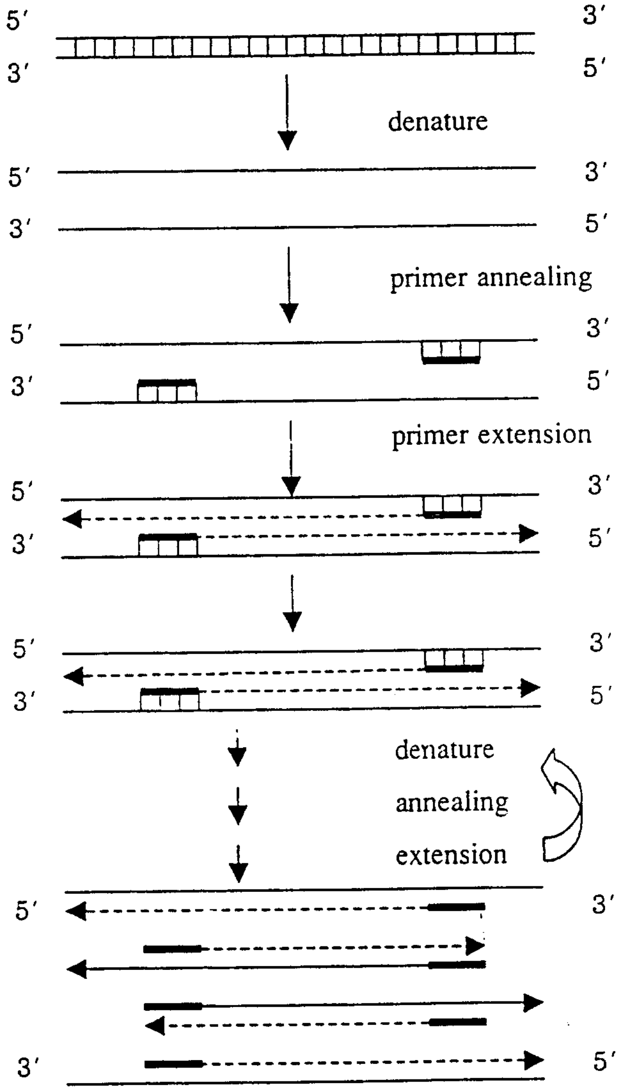
2. Primer annealing ไพรเมอร์เข้าไปจับตรงบริเวณที่มีเบสคู่สมบนดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ใช้เป็นต้นแบบที่อุณหภูมิ 40 – 60 องศาเซลเซียส

3. Primer extension ต่อสายดีเอ็นเอให้ยาวขึ้น โดยเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3 – OH ของไพรเมอร์ ใช้เอนไซม์ Klenow fragment เมื่อทำซ้ำจำนวนหลายรอบทำให้มีการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอจากเดิมได้อย่างทวีคูณแบบ exponential โดยมีผลผลิตที่เป็นจำนวนชิ้นดีเอ็นเอคำนวณได้เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบ) แต่เอนไซม์ Klenow fragment ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR นั้นไม่ทนความร้อนในขั้นตอน denaturation ซึ่งต้องใช้อุณหภูมิสูงเอนไซม์จะสูญเสียสภาพธรรมชาติ ต่อมามีการค้นพบเอนไซม์ DNA polymerase ชนิดทนความร้อนสูง โดยแยกสกัดจากแบคทีเรียที่ทนความร้อนชื่อ Thermus aquaticus (Taq) จึงได้เริ่มนำเอนไซม์ Taq DNA polymerase มาใช้ในปฏิกิริยา PCR หลังจากนั้นได้มีการพัฒนาเทคนิคนี้มาเป็นลำดับ โดยมีการประดิษฐ์เครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เข้ามาช่วยในการออกแบบไพรเมอร์ ตลอดจนเครื่องสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ได้ ทำให้เทคนิค PCR ถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยต่างๆ ที่ต้องใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายระดับโมเลกุลในการหาความสัมพันธ์หรือจัดจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต

<u>RAPD (Ramdom Amplified Polymorphic DNA)</u>

RAPD เป็นเทคนิคดัดแปลงมาจากเทคนิค PCR ทำได้ โดยการสุ่มใช้ไพรเมอร์ที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ เพียงหนึ่งสาย โดยทั่วไปไพรเมอร์สายสั้น ๆ จะเกาะกับดีเอ็นเอบนโครโมโซมได้หลายตำแหน่ง และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างสุ่มจากดีเอ็นเอแม่แบบที่ซับซ้อน โดยไพรเมอร์ที่เกาะกับดีเอ็นเอในทิศทางตรงกันข้ามกัน และห่างกันในระยะหนึ่งจะทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนได้ จำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR จะขึ้นอยู่กับความยาวไพรเมอร์ ขนาดของจีโนมและตำแหน่งของการเกาะของไพรเมอร์บนจีโนม ไพรเมอร์ที่เลือกใช้ส่วนใหญ่มีความยาว 8 – 15 นิวคลีโอไทด์ และไพรเมอร์ที่ใช้ควรมีปริมาณ G + C 60 เปอร์เซ็นต์เป็นอย่างน้อย (Lance et al., 1992) การใช้ไพรเมอร์เพียง 1 สาย ในการทำให้เกิดลายพิมพ์จากจีโนมที่ซับซ้อน โดยไพรเมอร์ที่ใช้นั้น ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสมาก่อน วิธีนี้เรียกอีกอย่างว่า arbitary primer (AP – PCR)

(Welsh and McCelland, 1990) ผลผลิตที่เกิดขึ้นนำมาวิเคราะห์ด้วย เทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีส ข้อดีของวิธีนี้ ทำง่าย สะดวกรวดเร็ว ต้องการดีเอ็นเอปริมาณน้อย และไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสี ประยุกต์ใช้กับงานการจัดจำแนกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกัน หรืออยู่ภายในกลุ่มประชากรชนิดเดียวกันได้ดี



ภาพที่ 4 แสดงขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการโดยวิธี PCR (Saiki et al., 1985)

งานวิจัยที่เกี่ยวกับการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการและจำแนกสายพันธุ์ออกเป็นกลุ่มโดยเทคนิคพันธุโมเลกุล มีดังนี้

Wac Cleland และคณะ (1990) พบความสำเร็จในการจัดจำแนกลักษณะกลุ่มประชากรของไรโซเบียม โดยศึกษาพันธุโมเลกุลและโครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของประชากรด้วยเทคนิคการเพิ่มผลผลิตดีเอ็นเอ ซึ่งจัดได้ว่าเป็นเครื่องมือที่นิยมใช้ศึกษาและจำแนกความแตกต่างภายในประชากรไรโซเบียม โดยการศึกษานี้ อาศัยพื้นฐานการเลือกใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มที่มีปริมาณ G + C มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป โดยอาศัยหลักความเข้าใจที่ว่าสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกัน ย่อมต้องมีรูปแบบการจัดเรียงตัวของยีนบนจีโนมที่ต่างกัน ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR สามารถนำมาใช้อธิบายความแตกต่างที่เกิดขึ้นภายในประชากรไรโซเบียมชนิดเดียวกันได้ดี

Sukiman และคณะ (1996) ทดลองนำเทคนิค RAPD มาใช้จำแนกความแตกต่างภายในกลุ่มประชากรไรโซเบียมที่แยกจากกระถินยักษ์ในประเทศอินโดนีเซีย พบว่า ผลผลิตจากปฏิกิริยาที่ได้ของแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน และความแตกต่างกันนี้สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนก และศึกษาความผันแปรของโครงสร้างประชากร เทคนิคนี้ให้ผลรวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการจัดจำแนก ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับเทคนิคการตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และเทคนิค RFLP โดยไม่ต้องเสียเวลาทำ probe หรือ hybridization

Laguerre, Mazurier และ Amarger (1992) ได้ ทดลองนำ R. *leguminosarum* biovar *viciae* จากแหล่งกำเนิดเดียวกัน 56 ไอโซเลท มาจัดจำแนกและศึกษาสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับการวิเคราะห์ของ 3 เทคนิค คือ พลาสมิดโพรไฟล์ วิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และ RFLP ของ 2 บริเวณบนโครโมโซม และของ symbiotic plasmid พบระดับความเหมือนของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่แตกต่าง โดยการทดลองนี้กำหนดให้ระดับของผลการวิเคราะห์รูปแบบการจัดการบนพื้นฐานโครโมโซมที่เหมือนกันทั้งหมดเป็นระดับชนิด (type) และเหมือนกันบางส่วนเป็นระดับกลุ่ม (class) พบความสอดคล้องกันระหว่างเทคนิคในการจัดจำแนกระดับกลุ่มมากกว่า 80% ของจำนวนไอโซเลททั้งหมด ยกเว้นผลการวิเคราะห์ RFLP ของ symbiotic probe ที่มีเพียงกลุ่มของไอโซเลทจำพวก non symbiotic gene เท่านั้น ที่ให้รูปแบบการจัดการบนพื้นฐานโครโมโซมที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งจะแสดงให้เห็นว่าเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์ รูปแบบดีเอ็นเอตัดจำเพาะ และการศึกษา RFLP โดยใช้โครโมโซมอลโพรบ (chromosomal probe) สามารถนำมาใช้เป็นตัวแทนการศึกษาของทั้งจีโนม โดยความผันแปรที่เกิดบนพลาสมิดจะไม่ เกี่ยวข้องกับความผันแปรบนโครโมโซมจีโนไทป์ (chromosomal genotype)

Laguerre และคณะ (1994) ได้รายงานการจัดจำแนกและแยกความแตกต่างของกลุ่มประชากร ไรโซเบียมหลายชนิดในวงศ์ Rhizobiaceae โดยวิเคราะห์จากเทคนิค PCR-RFLP ของ 16S rRNA gene เชื่อมกับ 9 endonuclease จากการทดลองนี้ พบจีโนไทป์ต่างกัน 21 รูปแบบ จาก 48 สายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียม

Nuswantara และคณะ (1996) ทำการศึกษา Repetitive DNA sequences และรูปแบบ RAPD ของไรโซเบียมชนิดที่แยกจากกระถินเทพา (*Acacia manigium*) เนื่องจากลักษณะของแบคทีเรียชนิดนี้ ปกติมีระบบของ nod gene และ nif gene ที่ซับซ้อนหลายระบบ จึงทำให้เป็นที่น่าสนใจและศึกษาเป็นอย่างยิ่ง ในการทดลองนี้พบปรากฏการณ์ของลักษณะเด่นที่สำคัญมากในด้านความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ซึ่งจะตรวจพบได้เสมอๆ ในประชากรไรโซเบียมในการทดลองนี้ตรวจสอบความหลากหลาย และศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมภายในกลุ่มประชากรไรโซเบียมที่มีคุณสมบัติบางอย่างที่ต่างกันในด้านของการต้านสารปฏิชีวนะ คุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยา รวมไปถึงการทดสอบทาง ELISA (enzyme linked imunosorbent assay) ของแต่ละสายพันธุ์ โดยเน้นศึกษาและตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมจาก 3 เทคนิคใหม่บนพื้นฐานทาง PCR ได้แก่ เทคนิค RAPD REP (repetitive extragenic palindromic) และ ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) ใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอแม่แบบที่แยกจากไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็วในรากกระถินเทพา พบความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอ ซึ่งก็แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ ทั้ง 3 ชนิดให้ผลผลิตของการเพิ่มดีเอ็นเอที่ต่างกัน โดยผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มดีเอ็นเออยู่ในช่วง 0.5 – 5.0 กิโลเบส ซึ่งผลที่ได้จากทั้ง 3 เทคนิค สามารถนำมาใช้ตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรไรโซเบียมสายพันธุ์ที่แยกมาจากพืชอาศัยชนิดเดียวกันได้ เทคนิคนี้สะดวกรวดเร็ว และให้ผลที่แน่นอนในการจัดจำแนก (classified taxonomic)ไรโซเบียมได้ในระดับสกุล ชนิด และสายพันธุ์ ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับหลาย ๆ รายงานการศึกษาและจัดจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยอาศัยเทคนิค RFLP และ DNA hybridization (Paffti et al., 1996 ; Laguerre et al., 1994)

Paffett และคณะ (1996) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร *Rhizobium meliloti* 96 สายพันธุ์ที่แยกจาก *Medicago sativa* 4 สายพันธุ์ ที่ปลูกในดิน 2 บริเวณที่แตกต่างกันทางภูมิศาสตร์ โดย 96 สายพันธุ์ ที่แยกได้นี้มีลักษณะภายนอกที่คล้ายกันไม่สามารถแยกความแตกต่างได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่สามารถแยกความแตกต่างได้บนพื้นฐานการวิเคราะห์ความต่างของรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจาก 3 เทคนิค คือ RAPD RFLP ของ บริเวณ 16S-23S ribosomal operon spacer และวิเคราะห์ RFLP บริเวณ 25 กิโลเบส ของ symbiotic plasmid ที่บรรจุ nod gene พบผลการทดลองคล้ายกัน คือ พบความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ

เกิดขึ้นภายในประชากรของไรโซเบียม อันเนื่องมาจากสายพันธุ์พืช และชนิดของดินที่ต่างกัน นอกจากนี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในประชากร อาจได้รับอิทธิพลเนื่องมาจากสภาวะแวดล้อมในลักษณะของการมีสิ่งกีดขวางการแลกเปลี่ยนยีน การแยกกันทางภูมิศาสตร์ ชนิดดิน หรือจีโนไทป์ของพืชอาศัย รวมถึงคุณสมบัติการมีพลาสมิดขนาดใหญ่ที่มีบทบาทสำคัญต่อวิวัฒนาการโครงสร้างประชากรไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็ว ซึ่งสามารถเกิดกระบวนการ transformation rearrangement และ recombination ระหว่างต่างสายพันธุ์ หรือต่างชนิดได้ในระดับความถี่สูง ช่วยเพิ่มระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรไรโซเบียมให้มีมากยิ่งขึ้น (Brom et al., 1991)

Kishinevsky และคณะ (1996) ได้ศึกษาความหลากหลายของประชากรไรโซเบียม 23 สายพันธุ์ ที่แยกจากพืชพวก *Hedysarum* หลาย ๆ ชนิด และจากหลายแหล่งที่ต่างกัน โดยการทดสอบคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยา พลาสมิดโพรไฟล์ และจัดจำแนกความแตกต่างของเชื้อโดยเทคนิค RAPD ผลการทดลองนี้ พบมากกว่า 1 ซีโรกรุป โดยเทคนิค RAPD สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาเดียวกันออกจากกันได้ และไม่พบจุดเด่นจำเพาะของพลาสมิดโพรไฟล์ที่สัมพันธ์กับชนิดพืชหรือแหล่งที่มาของเชื้อ นอกจากนี้เทคนิค RAPD สามารถใช้ในงานการจัดจำแนกหรือศึกษาความผันแปรในระดับชนิดและสายพันธุ์ รวมถึงรูปแบบโครงสร้างทางพันธุกรรมภายใน และระหว่างประชากรของพืชและสัตว์ได้อีกมากมาย (พรรณราย ขันธรักษา, 2541; Williams et al., 1990)

บทที่ 3

อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างดิน ได้แก่ ถุงอย่างหนาขนาดใหญ่ 1 x 1 ฟุต พลั่วสำหรับขุดดิน ปากกาสำหรับเขียน

2. อุปกรณ์สำหรับการทดลองทางจุลชีววิทยาได้แก่ เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) ปากคีบ (forcep) แท่งแก้วคนสาร บีกเกอร์ (beaker) หลอดทดลอง (test tube) ปิเปต (pipette) ขวดรูปชมพู่ (flask) กระบอกตวง (cylinder) จานเพาะเชื้อ (petridish)

3. อุปกรณ์สำหรับปลูกพืช ได้แก่ แร็ค (rack)

4. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางดีเอ็นเอ ได้แก่ ไมโครปิเปต (ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ml) ไมโครทิวป์ (ขนาด 0.1, 0.5 และ 1.5 ml)

5. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ อะเซทิลิน รีดักชั่น (Acetylene Reduction Assay) เช่น ขวดรูปชมพู่ จุกสำหรับเก็บก๊าซหลอดฉีดยา (syringe) หลอดเก็บก๊าซ

เครื่องมือที่ใช้

1. เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างดิน
   - เครื่องชั่งไฟฟ้า
   - เครื่องเขย่า (shaker)
   - ตู้อบ (dry oven)
   - เครื่องวัด pH (pH meter)

2. เครื่องมือสำหรับเลี้ยงเชื้อและทดลองทางจุลชีววิทยา
   - หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
   - ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
   - ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow)
   - เครื่องชั่งไฟฟ้า

3. เครื่องมือสำหรับการศึกษาทางดีเอ็นเอ
   - เครื่องปั่น (centrifuge)
   - เครื่องวัดการดูดแสง (spectrophotometer)

- เครื่องอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ประกอบด้วย เครื่องจ่ายไฟกระแสไฟฟ้า (power supply) อิเลคโตรโฟรีซิสแชมเบอร์ (electrophoresis chamber) ของ Bio-RAD power PAC 3000 เจลแชมเบอร์ ขนาด 12 x 15 นิ้ว และ 11x 15 เซนติเมตร เครื่องกำเนิดแสงอุลตร้าไวโอเลต (U.V. transilluminator) ของ Bio-RAD
- กล้องถ่ายรูป PENTEX Super A Soft case 32650
- กล้องโพลารอยด์
- ตู้แช่แข็ง (Freezer -70°C และ –20°C)
- เครื่อง PCR: Gene Amp PCR System 9700 (Perkin Elmer)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath 37°C)

4. เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน
   - เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) ของ Perkin Elmer model F17

สารเคมีและเคมีภัณฑ์

1. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและปลูกพืช

1.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม

สูตร Yeast-Mannitol Agar (YMA)

สูตร Tryptone Yeast Extract (TYE)

สูตร Lauri Bertini (LB)

1.2 สารเคมีเตรียมอาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจน (N-free nutrient solution) สำหรับเลี้ยงต้นกล้า (Somasegaran et al., 1985)

2. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ทางดีเอ็นเอ

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาและสกัดดีเอ็นเอ (chromosomal DNA และ plasmid)

agarose (Fluka)

boric acid (HBr) (Merck)

bromophenol blue (Sigma)

bromthymol blue

chloroform (Merck)

ethanol (C_2H_5OH) (Merck)

ethidium bromide (Sigma)

Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 2H_2O$) (Sigma)

hydrochloric acid (HCl) (Merck)

isoamyl alcohol (2-Propanol) (Merck)

n-luryl sarcosin (Sigma)

phenol crystal (Fluka)

sodium acetate (CH_3COONa)(Merck)

sodium chloride (NaCl) (Merck)

sodium dodecylsulphate (SDS) (Sigma)

sodium hydroxide (NaOH) (Merck)

sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Sigma)

tris base ($C_4H_{11}NO_3$) (Sigma)

<u>เอนไซม์ที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ</u>

lysozyme (from Chicken Egg White) (Sigma)

proteinase K (Sigma)

RNaseA (Sigma)

<u>ดีเอ็นเอมาตรฐาน</u>

λ DNA ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Hind III เป็น size maker

1 kilobase DNA ladder

φ x 174 RF DNA ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Hae III

2.2. สารเคมีสำหรับปฏิกิริยา PCR ได้แก่

deoxynucleoside triphosphate 4 ชนิด คือ (dNTP: dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ของ Perkin Elmer Cetus

10 x PCR buffer (0.1 M Tris-HCl; pH8.3, 0.5 M KCl)

25 mM $MgCl_2$

Ampli Taq polymerase gold concentration: 5 units / µl ของ PerKin Elmer Cetus

arbitrary primer (10-mers) ที่มีลำดับเบส ดังนี้

Primer 1. (SPH) 5' GACGACGACGACGAC 3' (Harrison, Mytton and Cresswell, 1992)

Primer 2. (RF) 5' CGGCCCCTGT 3' (Paffetti et al., 1996)

Primer 3. (1247) 5' AAGAGCCCGT 3' (Paffetti et al., 1996)

Primer 4. (OPA 11) 5' AGCGCCATTG 3' (Kishinevsky, Sen and Yang, 1996)

Primer 5. (OPA 9) 5' GTCGCCGTCA 3' (Kishinevsky et al., 1996)

Primer 6. 5' GGAAGTCGCC 3' (Teaumroong, Boonkerd and Murooka, 1996)

Primer 7. 5' GTAGACCCGT 3' (Achara et al., 1997)

2.3 สารเคมีสำหรับทำอิเลคโตรโฟรีซิส

agarose (Sigma)

boric acid (HBr) (Sigma)

ethidium bromide (aqueous solution 10 mg/ml) (Sigma)

Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 2H_2O$) (Sigma)

tris base ($C_4H_{11}NO_3$) (Sigma)

3. สารเคมีสำหรับทดสอบความสามารถต้านสารปฏิชีวนะและการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ

3.1 แผ่นดิสค์ (antibiotic standard disc) ของ BBL

streptomycin 10 μg tetracycline 10 μg carbenicillin 100 μg kanamycin 30 μg

erythromycin 15 μg penicillin 10 μg rifampin 5 μg

3.2 ก๊าซเอทิลีน (ethylene) ก๊าซอะเซทิลีน (acetylene) สำหรับศึกษาการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ

เมล็ดพันธุ์พืชที่ใช้

ถั่วเขียวสายพันธุ์กำแพงแสน 1 (ก.พ.ส 1) และกำแพงแสน 2 (ก.พ.ส 2) ที่ได้จากกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

สายพันธุ์แบคทีเรีย

B. japonicum USDA 193 ใช้เป็นสายพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบขนาดพลาสมิดของไอโซเลทไรโซเบียมที่ศึกษา (*B. japonicum* USDA193) เป็นไรโซเบียมที่มีพลาสมิด 2 ชนิด ได้แก่ พลาสมิดขนาดประมาณ 186 เมกกะดาลตัน และพลาสมิดขนาดมากกว่า 600 เมกกะดาลตัน (Masterson, Prekash and Atherly, 1985)

แบคทีเรีย *E. coli* No.2 และ *E. coli* 39R ใช้เป็นสายพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ ซึ่งทราบว่าประกอบด้วย พลาสมิด 1 ชนิด ขนาดประมาณ 140 เมกกะดาลตัน และ ประกอบด้วยพลาสมิด 4 ชนิด ขนาดประมาณ 7, 36, 63, และ 147 กิโลเบส ตามลำดับ

บทที่4

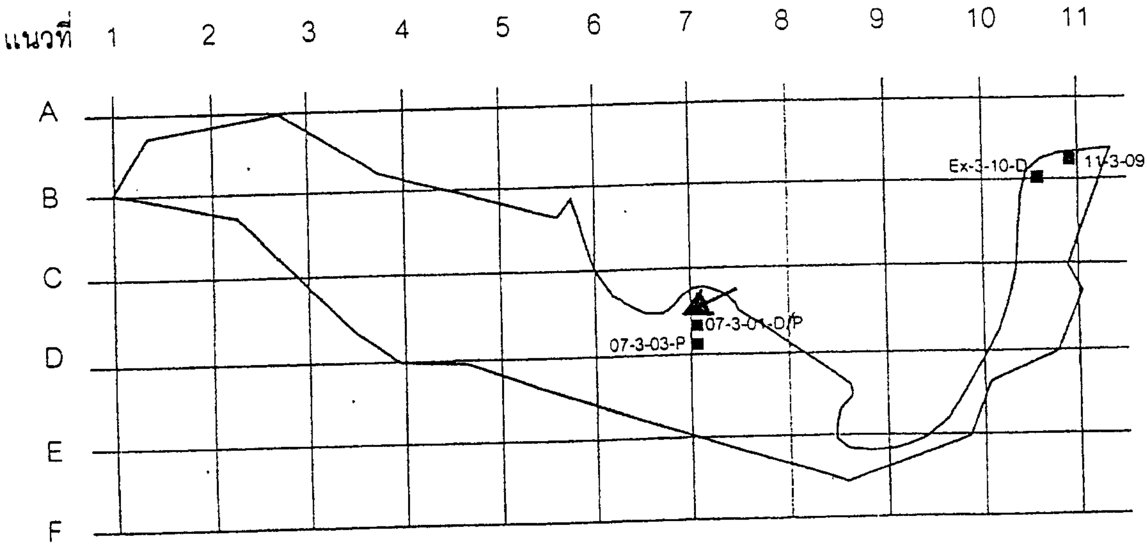
วิธีดำเนินการศึกษา

ลักษณะทั่วไปของพื้นที่ที่ศึกษา

พื้นที่ศึกษา คือพื้นที่โครงการสร้างป่า และป่าพันธุกรรมพืช ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อำเภอครบุรี และพื้นที่ป่าเต็งรังผสมเบญจพรรณ ตำบลหนองระเวียง จังหวัดนครราชสีมา

1. ลักษณะพื้นที่โครงการศึกษา เขตอำเภอครบุรี

พื้นที่โครงการเป็นพื้นที่อยู่ในอุทยานแห่งชาติทับลาน ในเขตอำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา รูปลักษณะของพื้นที่คล้ายปลาวาฬ (ภาพที่ 5) ภายในพื้นที่โครงการฯ ประกอบด้วย 11 แนว (L1-L11) การเก็บตัวอย่างดินมาศึกษาเลือกเก็บเฉพาะ แนวที่ 7 (L7) แนวที่ 10 (L10) แนวที่ 11 (L11) เนื่องจากมีลักษณะพื้นที่เป็นป่าทุ่งหญ้า



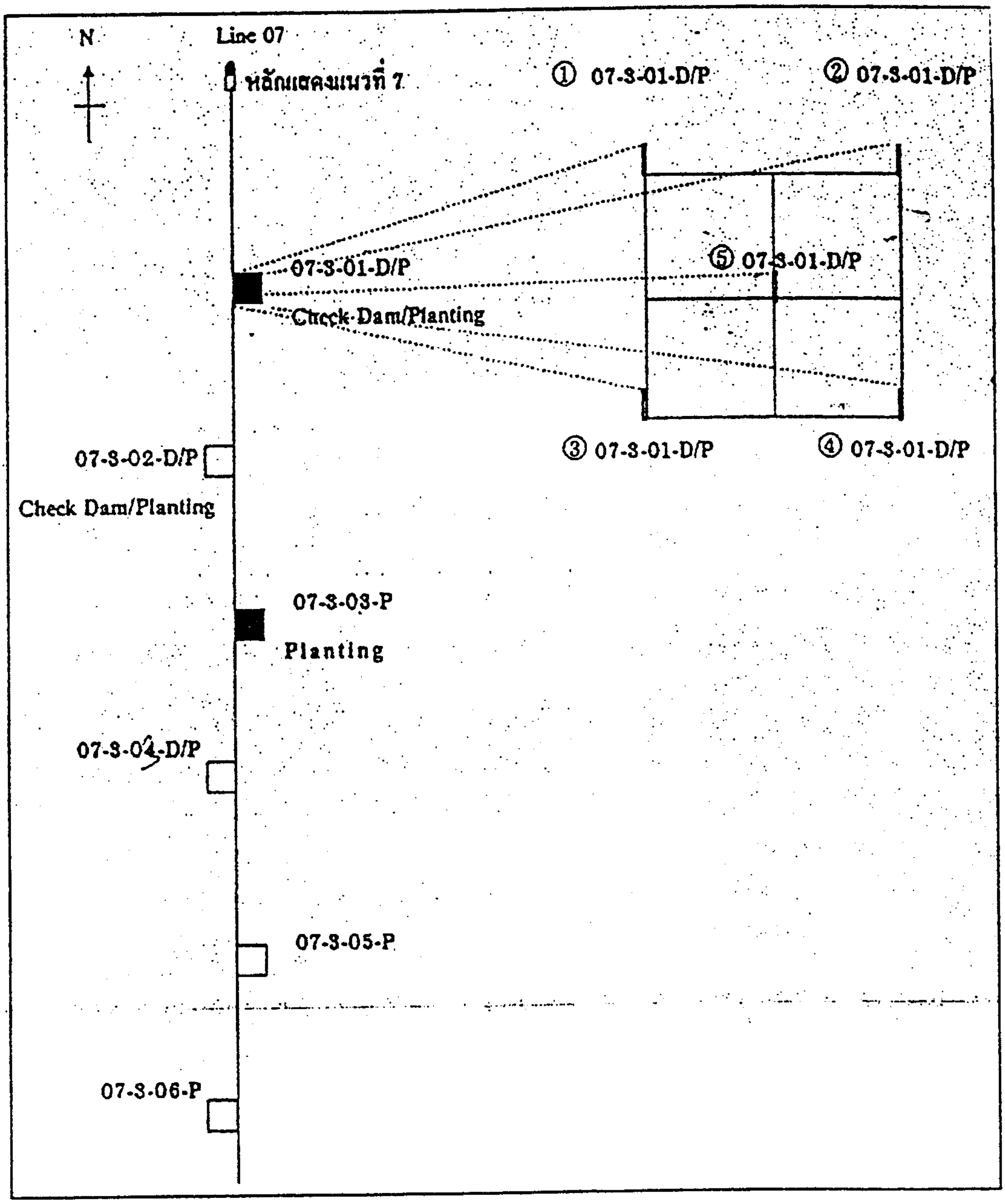
■ แทนตำแหน่งของแปลงทดลองในแนวที่ 7 และระหว่างแนวที่ 10-11

→ แสดงจุดที่มีการเก็บตัวอย่างดินในบริเวณทางที่ใช้สัญจรแนวที่ 7

ภาพที่ 5 ผังพื้นที่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา

2. การกำหนดแปลงศึกษา

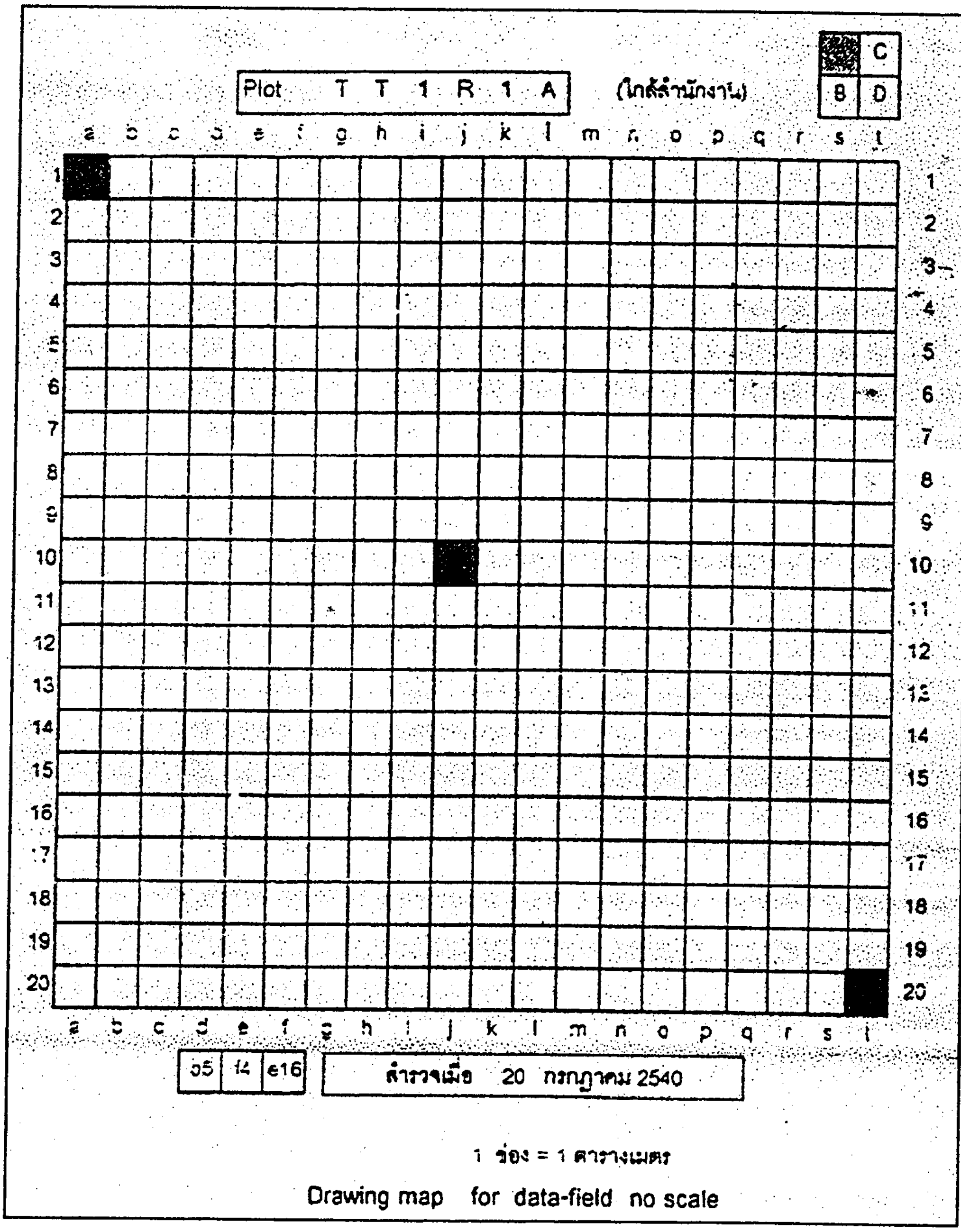
แต่ละแนว (ภาพที่ 6 แสดงแนวที่ 7) แบ่งเป็นแปลงย่อย 6 แปลง อันได้แก่ แปลงปลูกกล้าไม้ และแปลงปลูกกล้าไม้ร่วมกับการขุดคันดินกั้นน้ำ ซึ่งแต่ละแปลงมีขนาด 20x20 เมตร



ภาพที่ 6 ตัวอย่างของแผนผังการจัดแปลงศึกษาในแนวที่ 7

3. วางแปลงทดลองสำหรับเก็บตัวอย่างดิน

วางแปลงกำหนดพื้นที่ ในการศึกษาขนาด 20 x 20 ตารางเมตร แบ่งออกเป็นแปลงย่อยขนาด 1 x 1 ตารางเมตร สุ่มเก็บตัวอย่างดินจาก 3 แปลงย่อยในแนวทแยงมุม โดยเก็บดินที่ระดับความลึก 1-20 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างดินทุก 3 เดือน ตลอดระยะเวลา 1 ปี (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 แผนผังที่ทำการศึกษาแต่ละจุดได้ทำการเก็บตัวอย่างดินในลักษณะทแยงมุม

ลักษณะของแต่ละแนวพื้นที่

พื้นที่ที่ทำการศึกษาในโครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริ และป่าพันธุกรรมพืช อำเภอครบุรี และพื้นที่ป่าเต็งรังผสมป่าเบญจพรรณ ตำบลหนองระเวียง จังหวัดนครราชสีมา

แบ่งการเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ป่า อำเภอครบุรี ออกเป็น 4 แปลง กับอีก 1 จุด ตามเส้นแบ่งเขตพื้นที่ที่มีทั้งหมด 11 แนว เลือกเก็บเฉพาะ แนวที่ 7 (L7) แนวที่ 10 (L10) แนวที่ 11 (L11) และอีก 1 แปลงในพื้นที่ป่าเต็งรังผสมป่าเบญจพรรณ ตำบลหนองระเวียง

โดยรายละเอียดเกี่ยวกับแต่ละแปลงที่ทำการศึกษามีดังนี้

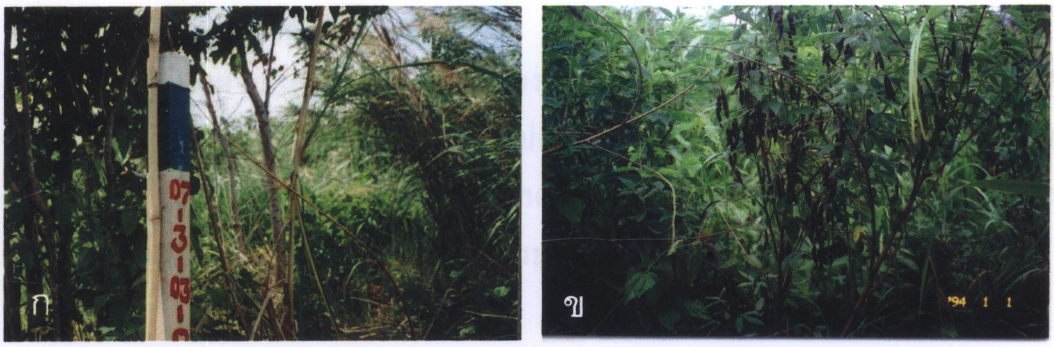
1. แนวที่ 7 ประกอบด้วย 2 แปลงศึกษากับอีก 1 จุด คือ

1.1. แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้และมีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) รหัสแปลงศึกษา 07-3-01-D/P (07= แนวแปลงที่ 7, 3= ป่าหญ้าคา, 01=แปลงทดลองที่ 1, D/P = checkdam-planting) ภายในแปลงมีลักษณะเป็นป่าหญ้า ดินมีสีแดง เนื้อดินละเอียด พืชส่วนใหญ่เป็นไม้ล้มลุกและไม้พุ่มขนาดเล็ก มีซากหญ้าทับถมกันเป็นจำนวนมาก ลักษณะดินมีความชุ่มชื้น แปลงนี้ได้ปลูกกล้าไม้ที่เพาะขึ้นตามโครงการฯ โดยการปลูกถั่วมะแฮะเป็นพืชพี่เลี้ยงซึ่งช่วยในการตรึงไนโตรเจนเพื่อเพิ่มความอุดมสมบรูณ์ให้แก่ดิน และมีการขุดคันดินกั้นน้ำ (check dam) เพื่อป้องกัน และชะลอการพังทลายของหน้าดิน (ภาพที่ 8)

1.2. แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLP) มีรหัสแปลงศึกษา 07-3-03-P (07= แนวแปลงที่ 7, 3= ป่าหญ้าคา, 03=แปลงทดลองที่ 3) ภายในแปลงมีลักษณะเป็นป่าหญ้า ดินมีสีแดง พืชส่วนใหญ่เป็นไม้ล้มลุกและไม้พุ่มขนาดเล็ก แปลงทดลองนี้มีเฉพาะการปลูกกล้าไม้ โดยมีการปลูกถั่วมะแฮะเป็นพืชพี่เลี้ยง เช่นดียวกับข้อ 1.1 (ภาพที่ 9)

1.3. เป็นจุดศึกษาที่มีลักษณะเป็นทางที่ใช้สัญจร (way) เป็นเส้นทางที่ใช้เดินทางเข้าสู่แปลงในเส้นทางที่ 7 ของโครงการฯ มีลักษณะเป็นป่าหญ้าทั้งสองข้างทาง ลักษณะดินเป็นดินเหนียวสีแดง และเนื่องจากเป็นเส้นที่ใช้ในการสัญจรไปมา ดินจึงถูกอัดแน่นในหน้าแล้ง มีลักษณะเป็นดินที่แห้ง ไม่ค่อยชุ่มชื้น ไม่มีพืชขึ้น (ภาพที่ 10)

ภาพที่ 8 แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้และมีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) (ก) ลักษณะทั่วไปเป็นป่าหญ้า (ข) การปลูกกล้าไม้ที่เพาะขึ้นตามโครงการฯ (ค) การปลูกถั่วมะแฮะเป็นพี่เลี้ยง (ง) การขุดคันดินกั้นน้ำ



ภาพที่ 9 แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLP) (ก) ลักษณะทั่วไปของแปลงศึกษานี้ (ข) การปลูกถั่วมะแฮะเป็นพี่เลี้ยง

ภาพที่ 10 จุดศึกษาที่เป็นเส้นทางการสัญจร (way) และเป็นเส้นทางที่ใช้เดินเข้าสู่แปลงในแนวที่ 7

2. แนวที่10 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLD) มีรหัสแปลงศึกษา Ex-3-10-D {Ex= Extra (แปลงที่เพิ่มขึ้นเพื่อการศึกษากรณีพิเศษ), 3=ป่าหญ้าคา, 10= แปลงทดลองที่ 10, D= check dam} ภายในแปลงมีลักษณะเป็นป่าหญ้า ดินมีสีแดง พืชส่วนใหญ่เป็นพวกหญ้าและไม้พุ่มขนาดเล็ก มีเศษซากหญ้าทับถมบริเวณผิวดินเป็นจำนวนมาก ดินมีความชุ่มชื้นแปลงนี้มีการขุดคันดินกั้นน้ำ ซึ่งสามารถเก็บกักน้ำไว้ได้ (ภาพที่ 11)

3. ระหว่างแนวที่ 10-11 เป็นแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นทุ่งหญ้า (GLC) มีรหัสเป็น 11-3-09 (11 แปลงที่ 11 , 3= หญ้าคา, 09=แปลงทดลองที่ 9) ภายในแปลงมีลักษณะเป็นป่าหญ้า ดินมีสีแดงเนื้อละเอียด แปลงนี้ไม่มีการปลูกกล้าไม้หรือขุดคันดินกั้นน้ำเลย ซึ่งใช้เป็นแปลงควบคุมให้มีการเปลี่ยนแปลงและฟื้นตัวเองตามธรรมชาติ (ภาพที่ 12)

ภาพที่ 11 แปลงศึกษาในแนวที่ 10 มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLD) (ก) ลักษณะทั่วไป (ข) คันดินกั้นน้ำ

ภาพที่ 12 แปลงศึกษาระหว่างแนวที่ 10-11 มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่ปล่อยให้มีการฟื้นสภาพเองตามธรรมชาติ (GLC)

4) พื้นที่ป่าหนองระเวียง ลักษณะป่าเป็นป่าเต็งรังผสมกับป่าเบญจพรรณบางส่วน ดินมีสีแดง เนื้อดินเป็นดินทราย งานวิจัยนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินมาศึกษาเพียง 1 แปลง คือ NT1R2 ซึ่งเป็นแปลงที่ค่อนข้างมีความอุดมสมบูรณ์สูง แปลงนี้พืชส่วนใหญ่เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ (ภาพที่ 13)

ภาพที่ 13 แปลงศึกษาในพื้นที่ป่า ต. หนองระเวียง ซึ่งมีลักษณะป่าเป็นป่าเต็งรังผสมกับป่าเบญจพรรณ พืชส่วนใหญ่เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่

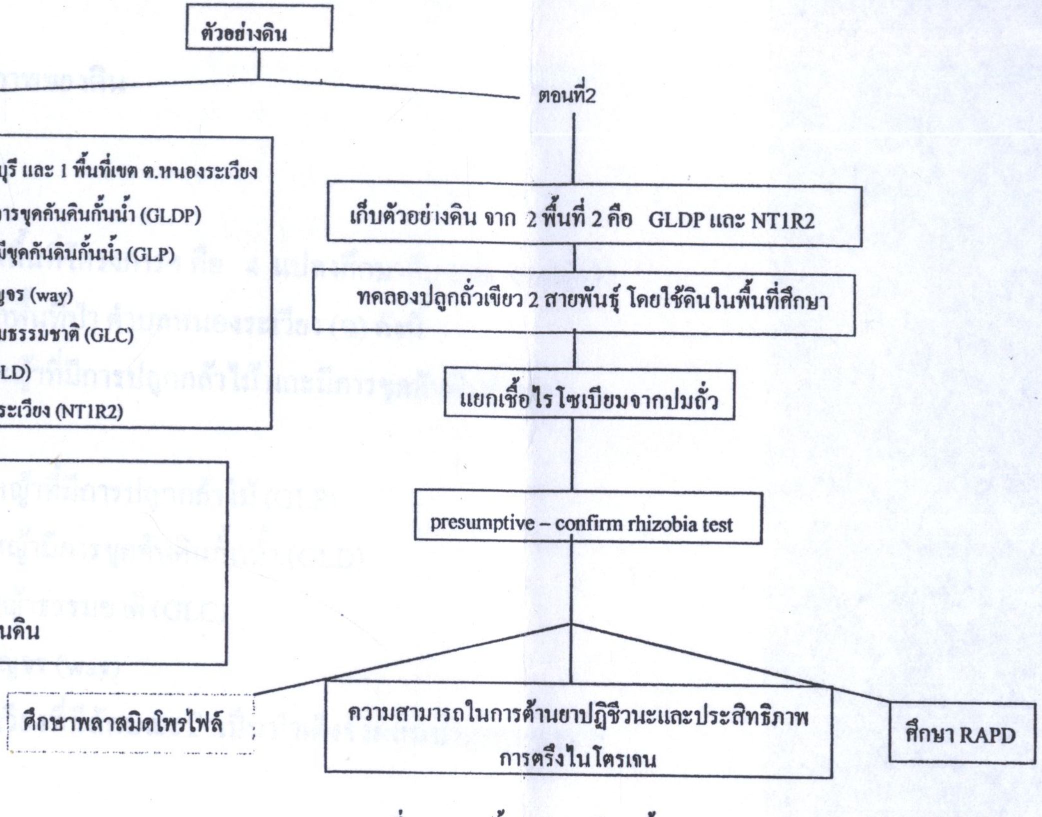
ขั้นตอนดำเนินการศึกษาทั้งหมด แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ ดังนี้ (ภาพที่ 14)

<u>ตอนที่ 1</u> การศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของดิน

1. เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ศึกษา คือ 4 แปลงศึกษาจากพื้นที่ป่า อำเภอครบุรี และ 7 แปลงศึกษาจากพื้นที่ป่า ตำบลหนองระเวียง
2. วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของดิน ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณความชื้น และอินทรียวัตถุ
3. วิเคราะห์ลักษณะทางชีวภาพของดิน ได้แก่ ปริมาณไรโซเบียมในดิน

<u>ตอนที่ 2</u> การคัดแยก และจำแนกความแตกต่างของไรโซเบียมจากคุณสมบัติทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์

1. เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่โครงการฯ สำหรับปลูกถั่วเขียว
2. การเก็บตัวอย่างปม และคัดแยกเชื้อไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็วจากปมถั่วเขียว ภายหลังการปลูก 4 สัปดาห์
3. การทดสอบ presumptive-confirm Rhizobia test
4. การศึกษาคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะของเชื้อ
5. การศึกษาพลาสมิดโพรไฟล์ของเชื้อไรโซเบียม
6. การสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์รูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อ โดยเทคนิค RAPD
7. การศึกษาความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมไอโซเลทต่างๆ



ภาพที่ 14 แสดงขั้นตอนการศึกษาทั้งหมด

วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1 ศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของดิน

1. การเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ศึกษา

1.1 เก็บตัวอย่างดินจาก 5 แปลงศึกษาในพื้นที่โครงการฯ คือ 4 แปลงศึกษากับ 1จุด จากพื้นที่ป่าอำเภอครบุรี (ก-จ) และ 1 แปลงศึกษาจากพื้นที่ป่า ตำบลหนองระเวียง (ฉ) ดังนี้

ก. แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ และมีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP)

ข. แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLP)

ค. แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้ามีการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLD)

ง. แปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าธรรมชาติ (GLC)

จ. จุดศึกษาที่มีลักษณะเป็นทางที่ใช้สัญจร (way)

ฉ.แปลงศึกษาในพื้นที่ป่าหนองระเวียงที่มีลักษณะป่าเป็นป่าเต็งรังผสมป่าเบญจพรรณ (NT1R2)

1.2. การเก็บตัวอย่างดินในการทดลองนี้กระทำทั้งหมด 4 ครั้ง คือ

ครั้งที่ 1 วันที่ 6 มิถุนายน 2541

ครั้งที่ 2 วันที่ 19 กันยายน 2541

ครั้งที่ 3 วันที่ 5 มกราคม 2542

ครั้งที่ 4 วันที่ 21 มีนาคม 2542

1.3. วิธีการเก็บตัวอย่างดิน การเก็บตัวอย่างดินแต่ละแปลงทดลองเก็บ 3 จุด ในแนวทแยงมุมที่ระดับความลึก 0-20 เซนติเมตร โดยใช้เสียมที่สะอาดขุดเก็บดินประมาณ 1 กิโลกรัม จากนั้นจึงกระทำการเก็บใส่ถุงและมัดยางให้แน่น นำตัวอย่างดินมาวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และชีวภาพของดิน

2. วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของดิน

2.1 การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง ของดิน (ดัดแปลงจาก Jackson, 1956)

เติมน้ำ 100 มิลลิลิตร ในดิน 20 กรัม ซึ่งเป็นอัตราส่วน 1:5 (ดิน:น้ำ) นำไปเขย่า เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน วัด pH ของส่วนที่เป็นสารละลายแขวนลอยด้วย pH meter

2.2. การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดิน (Jackson, 1956)

เริ่มจากการอบถ้วยอลูมิเนียม ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักบันทึกไว้ หลังจากนั้นใส่ดิน 10 กรัม ชั่งน้ำหนักรวมของดินและถ้วยอลูมิเนียม อบตัวอย่างดินในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็น เวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ ให้เย็นใน desiccator จนกระทั่งนำไปชั่ง อบตัวอย่างดินอีกครั้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำมาชั่งอีกครั้งจนน้ำหนักคงที่เก็บดินที่อบจนแห้งไว้ใน desiccator สำหรับการทดลองใน ข้อ 2.3 นำค่าที่ได้ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นจากสูตร

กำหนดให้ A = น้ำหนักภาชนะ

B = น้ำหนักภาชนะรวมกับน้ำหนักดินเปียก

C = น้ำหนักภาชนะรวมกับน้ำหนักดินอบแห้ง

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{B-C}{C-A} \times 100$$

2.3. การหาเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุในดิน

เผาถ้วยกระเบื้อง (crucible porcelain) ที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง ใส่ใน desiccator รอให้เย็น บันทึกน้ำหนักของถ้วยกระเบื้องหลังเผา แล้วนำดินใน desiccator จากข้อ 2.2 ใส่ใน ถ้วยกระเบื้อง บันทึกน้ำหนักรวมของถ้วยกระเบื้องกับดินอบแห้ง นำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ใน desiccator จนเย็น บันทึกน้ำหนักรวมของดินกับถ้วยกระเบื้องหลังเผา แล้วนำค่าที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุตามสูตร ดังนี้

A = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องหลังเผา

B = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องรวมกับ ดินอบแห้ง

C = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องรวมกับดินอบแห้งหลังเผา

$$\text{เปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุ} = \frac{B-C}{B-A} \times 100$$

3. การวิเคราะห์ลักษณะทางชีวภาพของดิน

การตรวจหาปริมาณไรโซเบียม (*Rhizobium sp.*(cowpea)) ในดิน 6 บริเวณในโครงการฯ โดย เทคนิค MPN-plant infect method แบบ Fourfold dilution series (Somasegaran และคณะ, 1985 ; นันทกร และคณะ, 2536)

3.1. ชั่งตัวอย่างดินจากแต่ละพื้นที่ ประมาณ 50 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 150 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่านาน 10 นาที จะได้สารละลายดินในสัดส่วนเท่ากับ 1:4 จากนั้นนำสารละลายดิน 10 มิลลิลิตรละลายต่อไปในน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้สารละลายดินที่มีสัดส่วนเท่ากับ 1:16 ทำเช่นเดียวกันนี้เรื่อยๆ จนกระทั่งสารละลายดินมีสัดส่วนความเข้มข้นเท่ากับ 4^{-8} ทำทั้งหมด 8 ระดับความเข้มข้น คือ ที่ระดับความเจือจาง 4^{-1} 4^{-2} 4^{-3} 4^{-4} 4^{-5} 4^{-6} 4^{-7} และ 4^{-8} ระดับความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ

3.2 เพาะเมล็ดถั่วเขียวบนจานแก้ว โดยทำความสะอาดพื้นผิวของเมล็ดตามวิธีของ ณัฐพร สุนทรวิจารณ์ (2534) ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ตามด้วย 70% แอลกอฮอล์ นาน 1 นาที 20% คลอรอกซ์ นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 6 ครั้ง วางบนจานแก้วที่มีสำลีชุ่มน้ำไว้ในที่มืด 1-2 วัน เมื่อเมล็ดงอกรากยาวประมาณ 1 เซนติเมตร (ภาพที่ 15 ข) จึงนำไปปลูกในขั้นตอนต่อไป

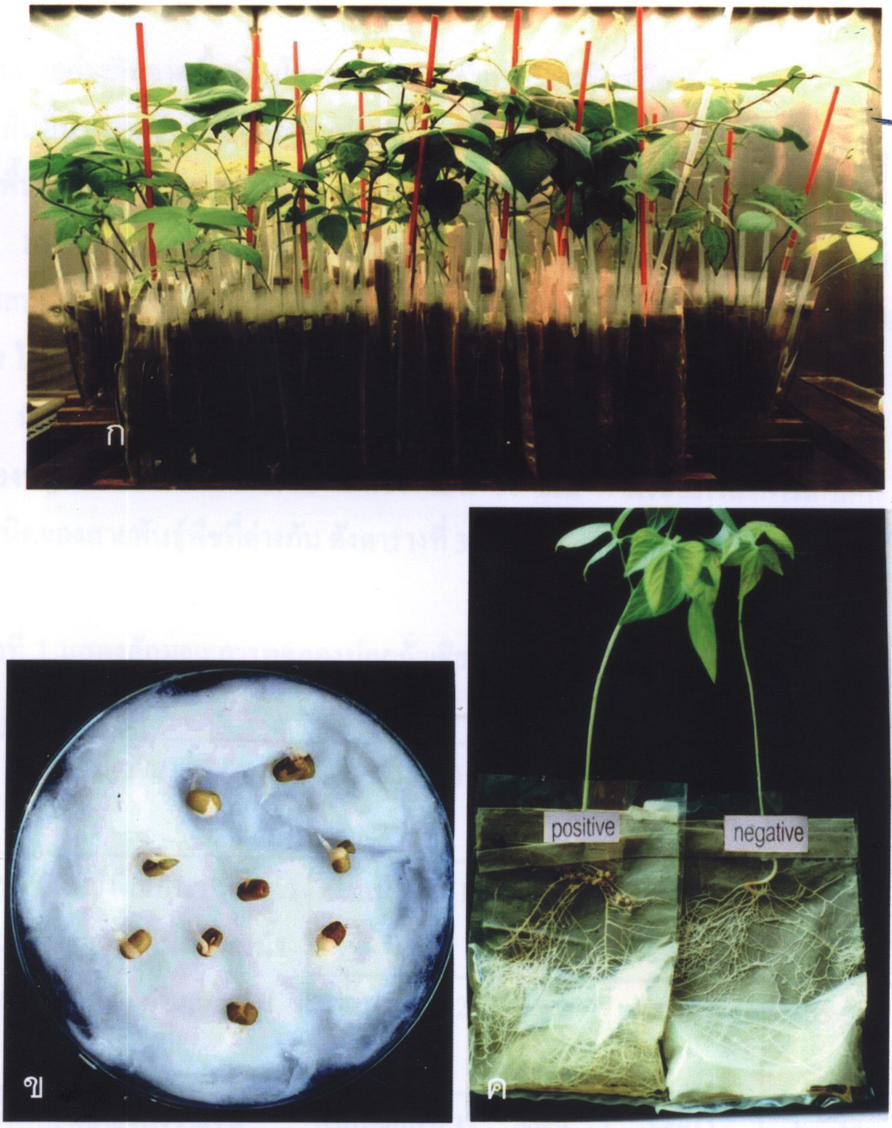
3.3 เตรียมถุงเลี้ยงกล้า (growth pouch) และแร็ค (rack) สำหรับวางถุงเลี้ยงกล้า

ถุงเลี้ยงกล้าทำจากกระดาษสา ใส่ถุงพลาสติก ขนาด 5x8 นิ้ว โดยใส่หลอดพลาสติกทางด้านหนึ่งของถุงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ส่วนแร็คที่ใช้วางถุงเลี้ยงกล้าทำจากเส้นลวดสเตนเลส (stainless) ขดเป็นกรอบตอกลงบนแผ่นไม้ (Somasegaran et al., 1985) ช่องห่างระหว่างกรอบลวดควรอยู่ระหว่าง 1.0 -1.5 เซนติเมตร

3.4 inoculate สารละลายดินลงบนรากถั่ว โดยแถวแรกใช้ปิเปตดูดสารละลายดินมา 4 มิลลิลิตร จากนั้นจึง inoculate สารละลายดินในแต่ละระดับความเข้มข้นลงบนรากพืช 4 ถุง สำหรับ 4 ซ้ำ (1 ถุง / 1 ต้น/ 1 มิลลิลิตร) ปฏิบัติเช่นเดียวกันนี้จนถึงระดับความเข้มข้นที่ 4^{-8}

3.5 วางถุงปลูกถั่วเขียวบนแร็ค ภายในห้องบ่มพืชที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (ภาพที่15 ก)

3.6 อ่านผล โดยนับจำนวนถุงที่ให้ผล positive (ถุงที่เกิดปม) (ภาพที่ 15 ค) นำค่าที่ได้มาเปิดตาราง MPN (Four-fold dilution) (ตารางภาคผนวก ข) อ่านผลเป็นจำนวนเซลล์ต่อกรัมดินแห้ง



ภาพที่ 15 การศึกษาปริมาณ ของไรโซเบียม (*Rhizobium sp*. (cowpea)) ในดิน โดยเทคนิค MPN-plant infect method (ก) ลักษณะการศึกษาปริมาณไรโซเบียมภายในห้องทดลอง โดยใช้ถั่วเขียวเป็นพืชทดสอบ (ข) แสดงการเพาะเมล็ดถั่วเขียวบนจานแก้ว (ค) การประเมินปริมาณไรโซเบียมในดิน โดยนับจำนวนถุงที่ให้ผล positive (ถุงที่เกิดปม)

ตอนที่ 2 **การคัดแยกและจำแนกความแตกต่างของไรโซเบียมจากคุณสมบัติทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์**

1. เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ในโครงการฯ สำหรับปลูกถั่วเขียว คือ

- พื้นที่ป่าทุ่งหญ้า อำเภอครบุรีแปลงที่มีการปลูกกล้าไม้ และขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP)
- พื้นที่ป่าเบญจพรรณ ตำบลหนองระเวียง (NT1R2)

1.1 การเก็บตัวอย่างดินในแต่ละแปลงทดลองเก็บ 3 จุดตามแนวเส้นทแยงมุม จากนั้นจึงทำการผสมดินดังกล่าวรวมกัน แล้วจึงนำมาปลูกถั่วเขียว 2 สายพันธุ์ กระทำการเก็บดินเช่นเดียวกันนี้ 4 ครั้ง ในช่วงระยะเวลา 1ปี ตามที่ กล่าวไว้ใน ตอนที่ 1 ข้อ 1.2. หน้า 48

1.2 ทดลองปลูกถั่วเขียว 2 สายพันธุ์ โดยใช้ดินที่เก็บจาก 2 พื้นที่ในโครงการฯ โดยแบ่งการทดลองปลูกถั่วเขียวและเก็บตัวอย่างปมออกเป็น 16 box ตามระยะเวลาการเก็บดิน ชนิดของดิน และชนิดของสายพันธุ์พืชที่ต่างกัน ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะการทดลองปลูกถั่วเขียว 2 สายพันธุ์ โดยใช้ดินจาก 2 พื้นที่ในโครงการฯ

ชนิดดิน	สายพันธุ์ถั่ว	มิถุนายน 2541	กันยายน 2541	มกราคม 2542	มีนาคม 2542
พื้นที่ป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับการขุดคันดินกั้นน้ำ (07-3-01 D/P) อำเภอครบุรี (GLDP)	กำแพงแสน 1	box1	box3	box5	box7
	กำแพงแสน 2	box2	box4	box6	box8
พื้นที่ป่าเบญจพรรณในโครงการฯ ตำบลหนองระเวียง (NT1R2)	กำแพงแสน 1	box9	box11	box13	box15
	กำแพงแสน 2	box10	box12	box14	box16

หมายเหตุ 1 box ประกอบด้วย 9 กระถางของถั่วเขียว 1 สายพันธุ์ที่ปลูกในดิน 1 ชนิด

2. การเก็บตัวอย่างปมและคัดแยกเชื้อไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็ว จากปมถั่วภายหลังการปลูก 4 สัปดาห์

2.1. สุ่มเก็บเชื้อไรโซเบียมจากตัวอย่างปมถั่วเขียว 2 สายพันธุ์ ที่ได้จากดินอำเภอครบุรี และดินตำบลหนองระเวียง ระหว่างช่วงการตัดเก็บตัวอย่างปม ครั้งแรกในเดือนกรกฎาคม 2541 ครั้งที่สอง

ในเดือนตุลาคม 2541 ครั้งที่สามในเดือนกุมภาพันธ์ 2542 ครั้งที่สี่ในเดือนเมษายน 2542 ซึ่งการเก็บตัวอย่างเชื้อไรโซเบียมในการศึกษานี้ คัดเลือกเก็บเชื้อจากปมที่มีลักษณะสมบรูณ์ และมีขนาดใหญ่ (ภายในปมควรมีสีแดง) นำมาใช้เป็นตัวแทนในการศึกษานี้ โดยที่ไอโซเลทไรโซเบียมที่แยกได้จากปมถั่วเขียวสายพันธุ์กำแพงแสน 1 (ก.พ.ส 1 : KPS1) หรือถั่วเขียวสายพันธุ์กำแพงแสน 2 (ก.พ.ส 2 : KPS2) ที่ปลูกในดินครบุรี ให้สัญลักษณ์ เป็น P1-P16 และไอโซเลทไรโซเบียมที่แยกได้จากปมถั่วเขียวสายพันธุ์ ก.พ.ส 1 หรือถั่วเขียวสายพันธุ์ ก.พ.ส 2 ที่ปลูกในดินหนองระเวียง ให้สัญลักษณ์ เป็น N1- N16 แสดงการเก็บตัวอย่างเชื้อไรโซเบียมในการศึกษานี้กระทำดัง ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงแผนการเก็บตัวอย่างเชื้อไรโซเบียม (sampling procedure) จากปมถั่วเขียว 2 สายพันธุ์ ที่ได้มาจากการปลูกในดินอำเภอครบุรี และดินตำบลหนองระเวียง (Paffetti et al., 1996)

ตัวอย่าง	ชนิดดิน	สายพันธุ์พืช ถั่วเขียว	Box	ช่วงเวลาตัดเก็บตัวอย่างปม
P1 through P2	GLDP	ก.พ.ส. 1	1	7 กรกฎาคม 2541
P3 through P4	GLDP	ก.พ.ส. 2	2	7 กรกฎาคม 2541
P5 through P6	GLDP	ก.พ.ส. 1	3	12 ตุลาคม 2541
P7 through P8	GLDP	ก.พ.ส. 2	4	12 ตุลาคม 2541
P9 through P10	GLDP	ก.พ.ส. 1	5	9 กุมภาพันธ์ 2542
P11 through P12	GLDP	ก.พ.ส. 2	6	9 กุมภาพันธ์ 2542
P13 through P14	GLDP	ก.พ.ส. 1	7	17 เมษายน 2542
P15 through P16	GLDP	ก.พ.ส. 2	8	17 เมษายน 2542
N1 through N2	NT1R2	ก.พ.ส. 1	9	7 กรกฎาคม 2541
N3 through N4	NT1R2	ก.พ.ส. 2	10	7 กรกฎาคม 2541
N5 through N6	NT1R2	ก.พ.ส. 1	11	12 ตุลาคม 2541
N7 through N8	NT1R2	ก.พ.ส. 2	12	12 ตุลาคม 2541
N9 through N10	NT1R2	ก.พ.ส. 1	13	9 กุมภาพันธ์ 2542
N11 through N12	NT1R2	ก.พ.ส. 2	14	9 กุมภาพันธ์ 2542
N13 through N14	NT1R2	ก.พ.ส. 1	15	17 เมษายน 2542
N15 through N16	NT1R2	ก.พ.ส. 2	16	17 เมษายน 2542

GLDP : แปลงศึกษาในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้า อำเภอครบุรี ที่มีการปลูกกล้าไม้และขุดคันดินกั้นน้ำ
NT1R2 :แปลงศึกษาในพื้นที่ป่า ตำบลหนองระเวียง มีลักษณะป่าเป็นป่าเต็งรังผสมป่าเบญจพรรณ

2.2 การแยกเชื้อไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็วจากตัวอย่างปมถั่วเขียว (Somasegaran and Hoben, 1994)

นำตัวอย่างปมถั่วที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว มาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ตามด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 5 วินาที แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 1 นาที และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ $HgCl_2$ 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำปมแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที จนปมพอง บดปมในน้ำกลั่น 1 หยด นำสารละลายปม streak บน YMA ที่ผสม congo red บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน เลือกโคโลนีเดียวที่ไม่ดูดสี congo red หรือ ดูดเพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่มีสีหรือมีขาวขุ่น ลักษณะกลมนูน และขอบเรียบ ถ่ายเชื้อจนกระทั่งแน่ใจว่าได้โคโลนีบริสุทธิ์

2.3 ตรวจสอบสัณฐานวิทยาและความบริสุทธิ์ขั้นต้นของเชื้อ

การย้อมแกรม (gram stain) นำเชื้อที่เจริญใน YMB ระยะ log phase หยดลงบนสไลด์ 1 หยด จากนั้นจึงทำการสเมียร์และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน หยด crystal violet 1 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปาแล้วหยด สารละลาย Gram's iodine ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลาย Gram's iodine ออก แล้วล้างทันทีด้วย ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ล้างออกด้วยน้ำประปา จากนั้นย้อมทับด้วย safranin O นาน 1 นาที จากนั้นล้างสีออกด้วยน้ำ ปล่อยให้แห้ง แล้วจึงตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า แบคทีเรียที่เป็นแกรมลบ (gram negative) ติดสีแดง

3. การทดสอบ presumptive –confirm Rhizobia test (Somasegaran and Hoben, 1994)

3.1 presumptive test อาศัยคุณสมบัติการสร้างกรด โดยการ streak เชื้อไรโซเบียมของแต่ละไอโซเลท ลงอาหารแข็งสูตร YM ซึ่งมี 0.1 เปอร์เซ็นต์ bromthymol blue บ่มนาน 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงสังเกตการสร้างกรดจากสีเหลืองที่ปรากฏบนอาหาร

3.2 confirm test อาศัยคุณสมบัติการเข้าสร้างปมของไรโซเบียมบนรากถั่วเขียว

3.2.1 เตรียมกล้าเชื้อ (inoculant) ทำโดยเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม แต่ละไอโซเลทให้เจริญในอาหารเหลวสูตร YM โดยเขย่าขวดรูปชมพู่บนเครื่องเขย่า 10 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เชื้อจะเจริญ เกิดความขุ่นในอาหารเหลว ปิเปตตัวอย่างเชื้อใส่ใน cuvette นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (nm) โดยค่า OD_{600} ประมาณ 0.45-0.60 และประเมินว่ามีไรโซเบียม 10^9 CFU/มิลลิลิตร ขึ้นไป ซึ่งเพียงพอที่จะนำไปเป็นกล้าเชื้อ

3.2.2 การเพาะเมล็ดถั่วเขียวบนจานแก้ว ทำความสะอาดพื้นผิวของเมล็ดตามวิธีที่กล่าวไว้ใน ตอนที่ 1 ข้อ 3.2 หน้า 50

3.2.3 เตรียมถุงเลี้ยงกล้า (growth pouch) และแร็ค สำหรับวางถุงเลี้ยงกล้า ตามวิธีที่กล่าวไว้ใน ตอนที่ 1 ข้อ 3.3 หน้า 50

3.2.4 การใส่เชื้อไรโซเบียมลงในถุงเลี้ยงกล้าถั่วเขียว ถุงเลี้ยงกล้าต้องนึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้ทุกครั้ง วางถุงเลี้ยงกล้าในแร็ค เติมสารอาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจน ตามสูตรของ Broughton และ Dillworth (1970) แต่ใช้สาร FeNaEDTA 6.9266 กรัม/ลิตร แทน Fe-citrate ที่อยู่ในสูตร โดยเติมอาหารเหลวนี้ 50 มิลลิลิตรต่อถุง (Turk and Keyser, 1992) ใส่เมล็ดถั่วเขียวที่งอกแล้วถุงละ 1 เมล็ด แล้วใส่เชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์ 1 มิลลิลิตร/เมล็ด (10^9 CFU/มิลลิลิตร) ที่บริเวณราก (Hartmann and Amerger, 1991) ทำการทดลองควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ (uninoculated control) ด้วยเพื่อใช้เป็นผลเปรียบเทียบวางบนชั้นในห้องเลี้ยงกล้า (growth room) ให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซ็นต์ (fluorescent lamp) 40 วัตต์ ความยาว 48 นิ้ว โดยมีระยะห่างเหนือปากถุง 17 เซนติเมตร ช่วงเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน (Shishido and Pepper, 1991) ห้องที่ใช้ทดลองควบคุมอุณหภูมิ ที่ 28 องศาเซลเซียส

4. การศึกษาคุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อ

เลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลทในอาหารเหลว YM บ่มบนเครื่องเขย่าที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อเหลวปริมาณเซลล์เริ่มต้น 10^4 เซลล์ (Shishido and paper, 1990) ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง YM ของแต่ละจานเลี้ยงเชื้อ ทดสอบคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะด้วยการวาง antibiotic disc มาตรฐาน 7 ชนิด คือ streptomycin 10 µg tetracycline 10 µg carbenicillin 100 µg kanamycin 30 µg erythromycin 15 µg penicillin 10 µg rifampin 5 µg จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน อ่านผลโดยวัดความกว้างของ inhibition zone แปลผลตามตารางของ Nation Committee for Clinical Laboratory Standards (1992) (ตารางภาคผนวก ค)

5. การศึกษาพลาสมิดโพรไฟล์ของเชื้อไรโซเบียม

5.1 ทดลองตรวจหาพลาสมิดขนาดใหญ่จากเซลล์แขวนลอยของเชื้อระยะ log phase ในอาหารเหลว TY โดยการทำให้เซลล์แตก (cell lysis) ตามวิธีของ Hirsch และคณะ (1989) ซึ่งเคยประสบความสำเร็จในการศึกษาขนาดของพลาสมิดจากเชื้อ *Rhizobium leguminosarum* {(One ml of cell culture was centrifuged and to the pellet was added 50 µl of lysis mixture (1mg lysozyme ml^{-1} and 1 mg RNase ml^{-1} in 25% sucrose, 0.025 M Tris/HCl)} โดยเชื้อไรโซเบียมที่ได้ทำการ

ศึกษาขนาดพลาสมิดในการทดลองนี้ใช้ *B. japonicum* USDA 193 เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ ซึ่งทราบว่ามี พลาสมิด 2 ขนาด ประมาณ 186 และ มากกว่า 600 เมกกะดาลตัน (Masterson et al., 1985) ร่วมกับพลาสมิดดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สกัดจาก *E.coli* 39R และ *E. coli* No.2 โดยวิธี Rapid alkaline extraction (Brinboim and Doly, 1979) ซึ่งทราบว่ามีพลาสมิดขนาดประมาณ 7, 36, 63, 147 กิโลเบส และ 140 เมกกะดาลตัน ตามลำดับ จากนั้น นำสารละลายพลาสมิดที่ต้องการศึกษาภายหลังการทำให้เซลล์แตก มาหาขนาดโดยอากาโรสเจล อิเลคโตรโฟรีซิส

5.2 การแยกขนาดดีเอ็นเอ โดย อากาโรสเจล อิเลคโตรโฟรีซิส

หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผสมสีติดตาม (Tracking dry) ลงในช่องซีหวีของแผ่นอะกาโรสเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแช่อยู่ในแชมเบอร์ที่บรรจุ Tris- Borate Buffer (TBE) สูงท่วมเจลประมาณ 2 มิลลิลิตร ที่ต่อเข้ากับ power supply ให้กระแสไฟฟ้าผ่านขั้วลบไปยังขั้วบวก ใช้ความต่างศักย์ 55 โวลต์ 27 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium Bromide : EtBr) 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 15 นาที ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออก โดยแช่ในน้ำกลั่น 15 นาที ตรวจแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตจากเครื่อง UV-transilluminator บันทึกภาพหาขนาดของแถบดีเอ็นเอ โดยการใช้วิธีของ Rochelle และคณะ (1985) เป็นการสร้างกราฟมาตรฐาน ด้วยการใช้กราฟ semmilog (log/log) ในการเปรียบเทียบระยะทางการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอ (แกน X) และขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (แกน Y)

6. การสกัดดีเอ็นเอและวิเคราะห์รูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อ โดยเทคนิค RAPD

6.1 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ (Achara et al., 1997)

เลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว TY เป็นเวลา 3 วัน

▼

ปั่นเก็บเซลล์ ด้วยความเร็วรอบ 6000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

▼

ละลายเซลล์ใน SET buffer (20% sucrose (w/v) , 50 mM Tris – HCl; pH 7.6, 50 mM EDTA)
จำนวน 400 ไมโครลิตร เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

▼

ละลายเซลล์ทันที ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

▼

เติมเอนไซม์ไลโซไซม์ (5 mg /ml TEN buffer) จำนวน 50 ไมโครลิตร

▼

เติม RNaseA (10 mg/ml in sterile water) จำนวน 25 ไมโครลิตร

และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

▼

เติม SDS เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 20 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง

▼

เติม proteinase K (1 mg/mlTEN buffer) จำนวน 75 ไมโครลิตร เขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง

▼

เติม phenol {ที่อิ่มตัวใน 0.1mM Tris-HCl ; pH8 และ 0.1% Hydroxyquinoline (W/V)} จำนวน 1 เท่าของปริมาตรสารที่ต้องการสกัด กลับหลอดไปมาเบา ๆ 10 ครั้งต่อนาที

▼

ปั่นด้วยความเร็วรอบ 4,000 rpm นาน 15 นาที

▼

ดูดสารละลายใสส่วนบน (ชั้นน้ำ) โดยใช้ พลาสเจอร์ปิเปตปากกว้างใส่ลงหลอดใหม่

▼

เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) จำนวน 1 เท่า ของปริมาตรสารที่ต้องการสกัด กลับหลอดไปมา 10 ครั้งต่อนาที (สกัด 2 ครั้ง)

▼

เติม sodium acetate 3 โมลาร์ ลงไป 1/9 ของปริมาตรสารละลายทั้งหมดกลับหลอดไปมา

▼

เติม isopropanol 60 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรเดิม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

▼

ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย Ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร

▼

ปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

▼

ทำให้ตะกอนแห้งและละลายตะกอนในสารละลายบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl; pH8 , 1 mM Na_2EDTA)

▼

เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

6.2 ตรวจวัดคุณภาพปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (Maniatis, Fritsch and Sambrook, 1982)

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอและทดสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยทำอิเลคโตรโฟรีซีส และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร ใช้ TE บัฟเฟอร์เป็น blank ถ้าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 เทียบกับ 280 มากกว่าหรือเท่ากับ 1.8 ถือว่าดีเอ็นเอนั้นมีความบริสุทธิ์เพียงพอสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค RAPD

6.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD

6.3.1 การศึกษาภาวะและปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย PCR

สภาวะและปฏิกิริยาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR เป็นภาวะที่ดัดแปลงมาจาก Teaumroong, Boonkerd และ Murooka (1996) และ Paffeti และคณะ (1996) และ Nuswantara และคณะ (1996) และ Achara และคณะ (1997) ซึ่งเคยประสบความสำเร็จในการเพิ่มประมาณดีเอ็นเอและทำให้เกิดรูปแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในไรโซเบียมหลาย ๆ ชนิด โดยสภาวะการเพิ่มดีเอ็นเอ มีดังนี้

heat activation ที่	95	องศาเซลเซียส	10	นาที
denaturation ที่	94	"	1	"
annealing ที่	36	"	1	"
extension ที่	72	"	2	"
		(45 รอบปฏิกิริยา)		
complete nascent product	72	"	5	"

องค์ประกอบของปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตรประกอบด้วย

ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA Template)	50	ng
10 x PCR buffer	2.5	ไมโครลิตร
deoxynucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0.2	mM
Tag DNA polymerase	0.25-0.50	unit
$MgCl_2$	2-3	mM
Arbitrary primer (primer 6)	12.5-25	pmol

6.3.2 ศึกษาผลของปริมาณ Taq DNA polymerase และอุณหภูมิที่ใช้ในการ annealing ที่มีผลต่อรูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ

จากภาวะ และปฏิกิริยาตั้งต้นในข้อ 6.3.1 จะถูกนำมาใช้ในการศึกษาหาปริมาณ Taq DNA polymerase ที่เหมาะสมกับปริมาณไพรเมอร์และอุณหภูมิที่ใช้ในการ annealing โดยแปรปริมาณ Ampli Taq polymerase เป็น 3 ระดับ คือ 0.015, 0.025 และ 0.035 unit/reaction ที่สภาวะการใช้อุณหภูมิในการ annealing 3 ระดับ ร่วมกับความเข้มข้นของไพรเมอร์ 2 ระดับ ดังตารางที่ 5

<u>ตารางที่ 5</u> แสดงการแปรปริมาณ Taq DNA polymerase 3 ระดับที่สภาวะการใช้อุณหภูมิในการ annealing และปริมาณของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 3 และ 2 ระดับ ดังนี้

อุณหภูมิในการ annealing (°C)	ปริมาณความเข้มข้นไพรเมอร์ (pmol)		Ampli Taq DNA polymerase (unit/reaction)		
32	12.5,	25	0.015	0.025	0.035
36	12.5,	25	0.015	0.025	0.035
40	12.5,	25	0.015	0.025	0.035

การทดลองนี้ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท P2 และ P3 ที่แยกได้จากดินอำเภอครบุรี และไอโซเลท N3 ที่แยกจากดินตำบลหนองระเวียง

6.3.3 ศึกษาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมกับปริมาณ Taq DNA polymerase ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

จากสภาวะที่เหมาะสมในข้อ 6.3.2 ถูกนำมาทำการศึกษาหาระดับของปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสม โดยแปรปริมาณ $MgCl_2$ เป็น 3 ระดับ คือ 2, 3 และ 4 มิลลิโมลาร์ /reaction การศึกษาขั้นตอนนี้ ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ 3 ไอโซเลท เช่นเดียวกับข้อ 6.3.2

6.3.4 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการนำไปใช้สังเคราะห์ดีเอ็นเอของไรโซเบียมถั่วเขียว

จากสภาวะและปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ที่ได้จากการทดลองข้อ 6.3.2. และ 6.3.3. ถูกนำมาใช้ในการทดสอบ เพื่อคัดเลือกว่าไพรเมอร์ชนิดใดให้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาก หรือก่อให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่หลากหลาย ซึ่งสามารถจำแนกความแตกต่างและแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายที่เกิดขึ้นภายในประชากรของไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็วที่แยกได้จากต่างสายพันธุ์พืชจากดินต่างชนิดกันได้ การทดลองนี้ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ 4 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท P2 และ P3 เป็นตัวแทนจากต่าง box และไอโซเลท N3 และ N4 เป็นตัวแทนจาก box เดียวกัน โดยไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทดสอบนี้ทั้ง 7 ชนิด (ตารางที่ 6) เคยประสบความสำเร็จในการเพิ่มประมาณดีเอ็นเอ และทำให้เกิดรูปแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในเชื้อไรโซเบียมหลาย ๆ ชนิด

ตารางที่ 6 แสดงไพรเมอร์ที่ศึกษาขนาดความยาว 10-15 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 7 ชนิด

ชนิดของไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์
Primer 1	5' GACGACGACGACGAC 3'
Primer 2	5' CGGCCCCTGT 3'
Primer 3	5' AAGAGCCCGT 3'
Primer 4	5' AGCGCCATTG 3'
Primer 5	5' GTCGCCGTCA 3'
Primer 6	5' GGAAGTCGCC 3'
Primer 7	5' GTAGACCCGT 3'

6.3.5 ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท ที่แยกจากดินในพื้นที่โครงการฯ ด้วย เทคนิค RAPD

จากสภาวะและปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย PCR ที่ได้จากข้อ 6.3.2 และ 6.3.3 ร่วมกับชนิดของไพรเมอร์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่าเหมาะสมจากข้อ 6.3.4 ถูกนำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไรโซเบียมทั้ง 32 ไอโซเลท ใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม ภายหลังปฏิกิริยา PCR สิ้นสุด นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์จำนวน 15 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเลกโตรโฟรีซิส เทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย DNA ladder marker ขนาด 1 กิโลเบส (บริษัท BRL ประเทศสหรัฐอเมริกา) ตรวจดูแถบดีเอ็นเอบนเจลด้วยการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ และถ่ายภาพภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต บันทึกผลและวิเคราะห์ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน แปลผลออกมาในรูปตัวเลขสัญลักษณ์ "1" กับการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้น และตัวเลขสัญลักษณ์ "0" กับการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้น (แสดงดังภาคผนวก ง) จากนั้นจึงวิเคราะห์ข้อมูลโดยการเปรียบเทียบความเหมือนหรือความต่างด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ วิเคราะห์ข้อมูลเกี่ยวกับการเกิด หรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอในแต่ละไอโซเลท ทั้ง 32 ไอโซเลท ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ jaccard คำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อในรูปของแผนภูมิ ที่เรียก dendrogram

7. การศึกษาความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมไอโซเลทต่างๆ

7.1 การเตรียมกล้าเชื้อของไรโซเบียม ตามวิธี ตอนที่ 2 ข้อ 3.2.1. หน้า 54

7.2 เตรียมขวด Leonard jar นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

7.3 การเพาะเมล็ดถั่วเขียว ตามวิธี ตอนที่ 1 ข้อ 3.2 หน้า 50

7.4 การใส่เชื้อไรโซเบียมลงในขวด Leonard jar

หยอดเชื้อไรโซเบียมที่เลี้ยงในอาหารเหลว YM ในระยะ late log phase 1 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้น 10^8 -10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร กลบด้วยทรายและกรวดละเอียด (ที่ฆ่าเชื้อ) วางแผนการทดลองปลูกแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (replicate) เปรียบเทียบกับผลการทดลองควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ (uninoculated control) นำตัวอย่างทั้งหมดไว้ในเรือนทดลอง (green house) (ดังภาพที่ 16) คอยเติมอาหารเหลวที่ปราศจากไนโตรเจน เก็บผลภายหลังปลูก 4 สัปดาห์

7.5 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

หลังจากการเลี้ยงต้นถั่วเขียว เป็นเวลานาน 1 เดือน จึงทำการเก็บตัวอย่างเพื่อประเมินประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน โดยนับจำนวนปม หาน้ำหนักแห้งของต้นพืช โดยอบเฉพาะส่วนต้น และใบในตู้อบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งที่ได้ และวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน โดย วิธีอะเซทิลีน รีดักชั่น

วิธีการหาอัตราการตรึงไนโตรเจนของปมถั่วเขียว โดยวิธี อะเซทิลีน รีดักชั่น (Acetylene Reduction Assay)

เก็บตัวอย่างพืช โดยตัดตรงบริเวณรอยต่อระหว่างต้นกับรากพร้อมปม นำส่วนรากใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง (double stopper) ให้แน่น ซึ่งปริมาตรอากาศในขวดรูปชมพู่หลังปิดจุก จะเป็น 250 มิลลิลิตร หลังจากนั้น ใช้หลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 50 มิลลิลิตร ดูดอากาศภายในขวดรูปชมพู่ออก 25 มิลลิลิตร (ซึ่งเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอากาศภายในขวด) จากนั้นฉีดก๊าซอะเซทิลีน 25 มิลลิลิตร ลงไปในขวดรูปชมพู่ แล้วจับเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงดูด reduced gas ออกมา (ซึ่งมีทั้งก๊าซอะเซทีลีนและเอทิลีนรวมกัน) 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดสูญญากาศ แล้ววัดกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยวัดอะเซทิลีนรีดักชั่น หาพื้นที่ใต้กราฟของก๊าซเอทิลีนมาตรฐาน (standard ethylene) โดยฉีดก๊าซเอทิลีนบริสุทธิ์ 1 มิลลิลิตรที่เก็บอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 2200 มิลลิลิตร แล้วจึงฉีดก๊าซตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph: GC) ใช้เครื่อง GC ของ Perkin Elmer Model F17 ซึ่งมี Detector เป็นแบบ Hydrogen Flame Ionization Detector (FID) คอลัมน์บรรจุสาร Porapak N ขนาดของคอลัมน์ 0.6x4.5 เซนติเมตร และใช้ก๊าซไนโตรเจนเป็นก๊าซนำพา (carrier gas) ด้วยความเร็ว 55 มิลลิเมตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 55 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ injector 100 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ detector 100 องศาเซลเซียส ก๊าซที่ต้องการวิเคราะห์เป็นก๊าซเอทิลีนที่เกิดจากการรีดิวส์อะเซทิลีน ซึ่งเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนโตรจีเนส คำนวณหาปริมาณเอทิลีนได้โดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของเอทิลีนมาตรฐานจากสูตร

อัตราการตรึงไนโตรเจนของพืชตัวอย่าง $= \frac{10^3 \text{ x}}{2200} \frac{\text{BxV}}{\text{std x A x 22.4}}$

หน่วยเป็นไมโครโมลของเอทิลีน (C_2H_4) ต่อต้นพืช ต่อชั่วโมง

เมื่อใช้เอทิลีนมาตรฐานที่ทราบปริมาตรที่แน่นอน เป็น 2200 มิลลิลิตร

B = พื้นที่ใต้กราฟของพีค (peak) ตัวอย่าง

V = ปริมาตรของขวดรูปชมพู่ที่ใช้เก็บตัวอย่างเป็นมิลลิลิตร

Std. = พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยของก๊าซเอทิลีนมาตรฐาน

A = เวลาที่ใช้ในการีดิวซ์ก๊าซอะเซทิลีน เป็นชั่วโมง

รายละเอียดและหลักการคำนวณอัตราการตรึงไนโตรเจน ดัดแปลงจากวิธีของ Somasegaran และคณะ (1985)

7.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลประกอบด้วยน้ำหนักแห้งพืช (มิลลิกรัม) และค่า Acetylene Reduction Activity (ARA) (ไมโครโมล/ต้นพืช/ชั่วโมง) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลที่ได้จากถั่วเขียวที่ได้รับเชื้อไรโซเบียมไอโซเลทต่าง ๆ และต้นควบคุม ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT (Duncan's new Multiple Range Test)

ภาพที่ 16 ศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมถั่วเขียวในขวด Leonard jar

บทที่ 5

ผลการศึกษา

จากการศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ปริมาณของ *Rhizobium sp.* (cowpea) ในดินจากพื้นที่โครงการสร้างป่าและป่าพันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา ร่วมกับสมบัติทางกายภาพของดินบางประการ รวมทั้งเก็บรวบรวมเชื้อไรโซเบียมที่แยกจากถั่วเขียว 2 สายพันธุ์ โดยใช้ดินในพื้นที่โครงการฯ เพื่อการศึกษาจำแนกความแตกต่างของเชื้อ ตามแบบแผนพลาสมิดโพรไฟล์และคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะร่วมกับการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจากเทคนิค RAPD กำหนดระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง ตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2541 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2542 แบ่งผลการศึกษาออกเป็น 2 ตอนใหญ่ ดังนี้

<u>ตอนที่ 1</u> ผลการศึกษาสมบัติทางกายภาพ และทางชีวภาพของดิน

1. ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของดิน
2. ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางชีวภาพของดิน
3. ความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างปัจจัยกายภาพบางประการของดินในพื้นที่โครงการศึกษากับปริมาณไรโซเบียมในดิน

<u>ตอนที่ 2</u> ผลการคัดแยกและจำแนกความแตกต่างของเชื้อไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็วจากคุณสมบัติทาง จีโนไทป์และฟีโนไทป์

1. ผลการแยกเชื้อไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็วจากปมถั่วเขียวและทดสอบ presumptive-comfirm rhizobia test
2. ผลการศึกษาคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะของเชื้อ
3. ผลการศึกษาพลาสมิดโพรไฟล์ของเชื้อ
4. ผลการศึกษาและวิเคราะห์รูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อ โดยเทคนิค RAPD
5. ผลการเปรียบเทียบข้อมูลการจำแนกความแตกต่างของ ไรโซเบียมจาก 3 เทคนิค คือ พลาสมิดโพรไฟล์ คุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ และวิเคราะห์รูปแบบ RAPD
6. ผลการศึกษาความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม 32 ไอโซเลท จากพื้นที่โครงการฯ

ตอนที่ 1 ผลการศึกษาทางกายภาพและทางชีวภาพของดิน

1. ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของดิน

ปัจจัยทางกายภาพของดินที่ทำการศึกษานี้ ได้แก่ ความเป็นกรดเป็นด่างของดิน เปอร์เซ็นต์ความชื้นในดิน และเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุในดิน ซึ่งได้แสดงผลไว้ดังตารางที่ 7 ถึง 12 และภาพที่ 17 ถึง 25

1.1 ค่าความเป็นกรด – ด่าง

การหาค่าความเป็นกรด–ด่างของดินในพื้นที่โครงการฯ พบค่าความเป็นกรด–ด่างของดินในพื้นที่โครงการฯ อยู่ในช่วง 5.8 – 7.36 โดยค่าความเป็นกรด–ด่างมีค่าสูงสุดในพื้นที่ป่า อ. ครบุรี แปลงที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) และมีค่าต่ำสุดบริเวณเส้นทางการสัญจร (way) เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด–ด่างเฉลี่ยของแต่ละแปลงศึกษาในรอบ 1 ปี พบความแปรปรวนของค่าความเป็นกรด-ด่าง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยในพื้นที่ป่า อ. ครบุรี แปลงที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) มีค่าความเป็นกรด–ด่างเฉลี่ยในดินสูงที่สุด คือ 6.95 ซึ่งแตกต่างจากแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าแปลงอื่น ๆ รวมถึงแปลงศึกษาในพื้นที่ป่า ต. หนองระเวียง (NT1R2) ที่มีค่าความเป็นกรด–ด่างเฉลี่ยต่ำที่สุด คือ 6.11 (ตารางที่ 7-8, ภาพที่ 17 – 18) และเมื่อพิจารณาเฉพาะแปลงศึกษาที่เป็นป่าทุ่งหญ้าครบุรีแปลงที่มีการดำเนินงานตามวิธีการดำเนินงานของโครงการฯ พบว่าแต่ละแปลงศึกษามีค่าความเป็นกรด–ด่างเฉลี่ยของดินไม่แตกต่างจากป่าทุ่งหญ้าธรรมชาติ (GLC) มีเพียงเฉพาะแปลงศึกษาที่เป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) มีค่าเฉลี่ยของความเป็นกรด–ด่างที่แตกต่างออกไป โดยค่าความเป็นกรด–ด่างเฉลี่ยของทุกแปลงศึกษาในพื้นที่ป่า อ. ครบุรี อยู่ในระดับที่สูงกว่าพื้นที่ป่า ต. หนองระเวียง

ตารางที่ 7 ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินในพื้นที่โครงการฯ จังหวัดนครราชสีมา

แปลงทดลอง	ค่าความเป็นกรด-ด่าง				
	มิ.ย - 41	ก.ย - 41	ม.ค - 42	มี.ค - 42	เฉลี่ย
พื้นที่ทุ่งหญ้า control (07-3-01 D/P) อ. ครบุรี Line 10-11(GLC)	6.21	6.45	6.71	6.90	6.57b
พื้นที่ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (07-3-03P) อ. ครบุรี Line7 (GLP)	6.10	6.15	6.18	6.74	6.29b
พื้นที่ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับขุดคันดินกั้นน้ำ (07-3-01D/P) อ. ครบุรี Line7 (GLDP)	6.90	6.80	6.74	7.36	6.95a
พื้นที่ทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (EX-3-10) อ. ครบุรี (GLD)	5.98	6.70	6.40	6.93	6.50b
บริเวณเส้นทางที่ใช้สัญจร อ. ครบุรี Line7 (way)	5.80	6.11	6.30	6.64	6.21b
พื้นที่ป่า ต. หนองระเวียง (NT1R2)	6.25	6.1	6.08	6.04	6.11b

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกัน ถือว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT

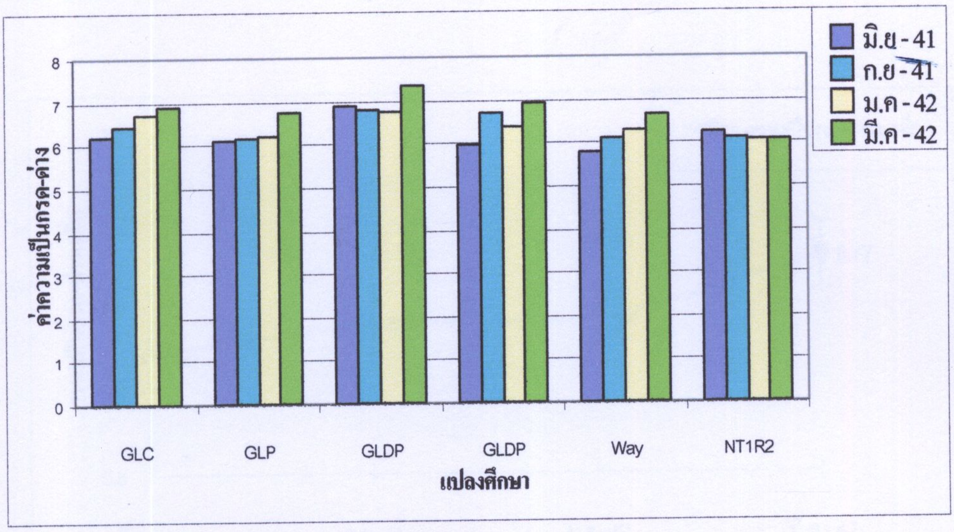
ตารางที่ 8 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างในดินของพื้นที่โครงการฯ

Source of variation	**df**	**SS**	**MS**	**F-value**
Treatment	5	1.83	0.37	3.92*
Error	18	1.68	0.09	
Total	23	3.513		

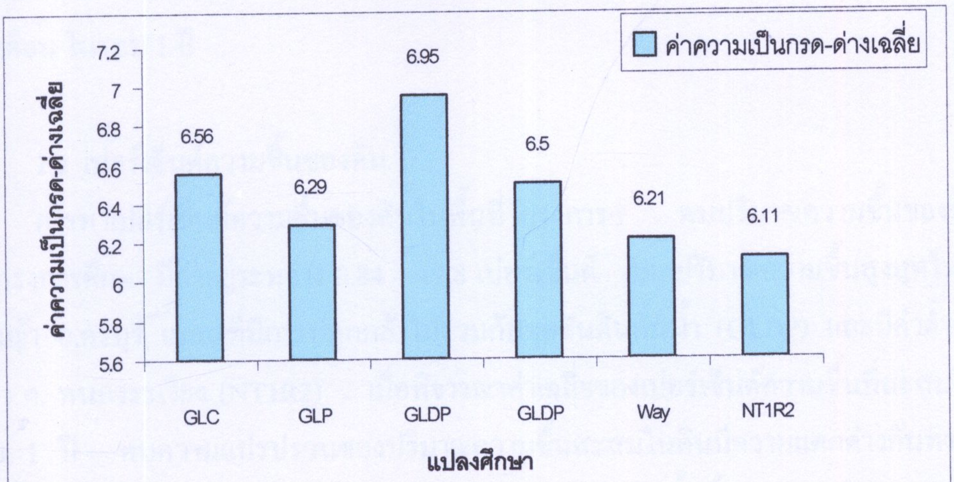
c.v. =47.6% coefficient of variation (c.v.)

*= แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

degree of freedom (df) Sum of Square (SS) Mean Square (MS)

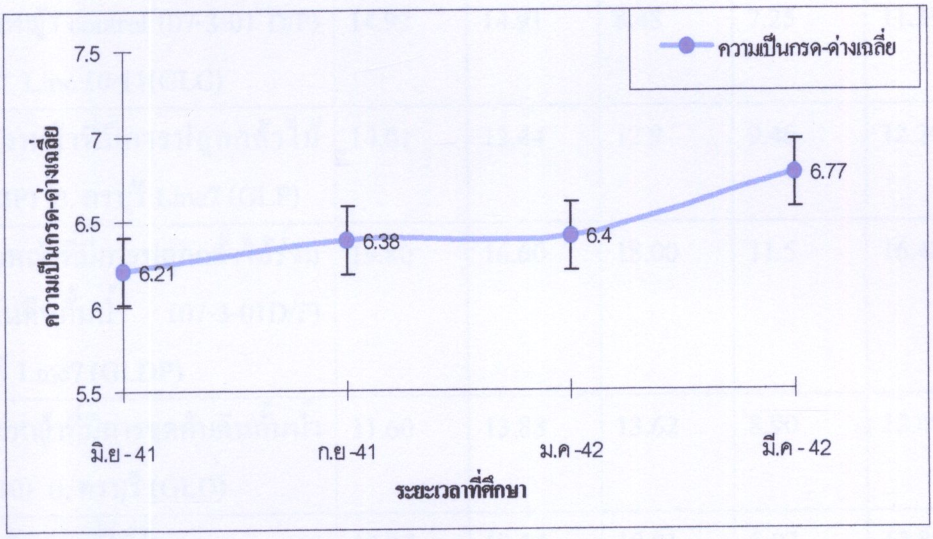


ภาพที่ 17 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างของดินในแต่ละแปลงศึกษา



ภาพที่ 18 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างของดินในแต่ละแปลงศึกษาในรอบ 1 ปี

สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด–ด่างเฉลี่ยของดินในแต่ละช่วงเดือนของพื้นที่โครงการฯ ในระยะเวลา 1 ปี พบค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 6.2 – 6.7 โดยค่าความกรด–ด่างของดินในพื้นที่ศึกษาจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในช่วงเดือนมีนาคม (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยของความเป็นกรด-ด่างของดินในพื้นที่โครงการ ฯ แต่ละช่วงเดือน ในรอบ 1 ปี

1.2 เปอร์เซ็นต์ความชื้นของดิน

การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินในพื้นที่โครงการฯ พบปริมาณความชื้นของดินในพื้นที่โครงการศึกษา มีค่าอยู่ระหว่าง 0.84 – 19.8 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณความชื้นสูงสุดในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้า อ.ครบุรี แปลงที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) และมีค่าต่ำสุดในพื้นที่ป่า ต. หนองระเวียง (NT1R2) เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่สะสมในดินในรอบ 1 ปี พบความแปรปรวนของปริมาณความชื้นสะสมในดินมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยในพื้นที่ป่า อ.ครบุรี แปลงที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) มีการสะสมของปริมาณความชื้นในดินที่สูงสุด คือ 16.47 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างจากแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าแปลงอื่น แต่แตกต่างจากแปลงศึกษาในพื้นที่ป่า ต.หนองเวียง (NT1R2) ที่มีการสะสมปริมาณความชื้นในดินต่ำที่สุด คือ 2.63 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาเฉพาะพื้นที่ศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้า พบป่าทุ่งหญ้าแปลงที่มีการดำเนินงานตามโครงการฯ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแปลงที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับขุดดินกั้นน้ำ (GLPD) มีปริมาณความชื้นสะสมในดินสูงที่สุด แต่ไม่ต่างจากแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าแปลงอื่น ๆ รวมถึงป่าทุ่งหญ้าธรรมชาติ (GLC) ที่มีปริมาณความชื้นสะสมในดินต่ำที่สุด โดยที่ปริมาณความชื้นสะสมทุกแปลงศึกษาในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้า อ. ครบุรี มีค่าสูงกว่าแปลงศึกษาในพื้นที่ป่า ต. หนองระเวียง (ตารางที่ 9–10 ภาพที่ 20-21)

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินในพื้นที่โครงการฯ จังหวัดนครราชสีมา

แปลงทดลอง	เปอร์เซ็นต์ความชื้นของดิน				
	มิ.ย - 41	ก.ย - 41	ม.ค - 42	มี.ค - 42	เฉลี่ย
พื้นที่ทุ่งหญ้า control (07-3-01 D/P) อ. ครบุรี Line 10-11(GLC)	14.92	14.91	8.48	7.25	11.39a
พื้นที่ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (07-3-03P) อ. ครบุรี Line7 (GLP)	14.01	12.44	12.9	9.46	12.20a
พื้นที่ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับขุดคันดินกั้นน้ำ (07-3-01D/P) อ. ครบุรี Line7 (GLDP)	19.80	16.60	18.00	11.5	16.48a
พื้นที่ทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (EX-3-10) อ. ครบุรี (GLD)	11.60	13.88	13.62	8.90	12.00a
บริเวณเส้นทางที่ใช้สัญจร อ. ครบุรี Line7 (way)	13.27	19.34	19.81	3.07	13.87a
พื้นที่ป่า ต. หนองระเวียง (NT1R2)	2.96	3.68	3..07	0.84	2.64b

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกัน ถือว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT

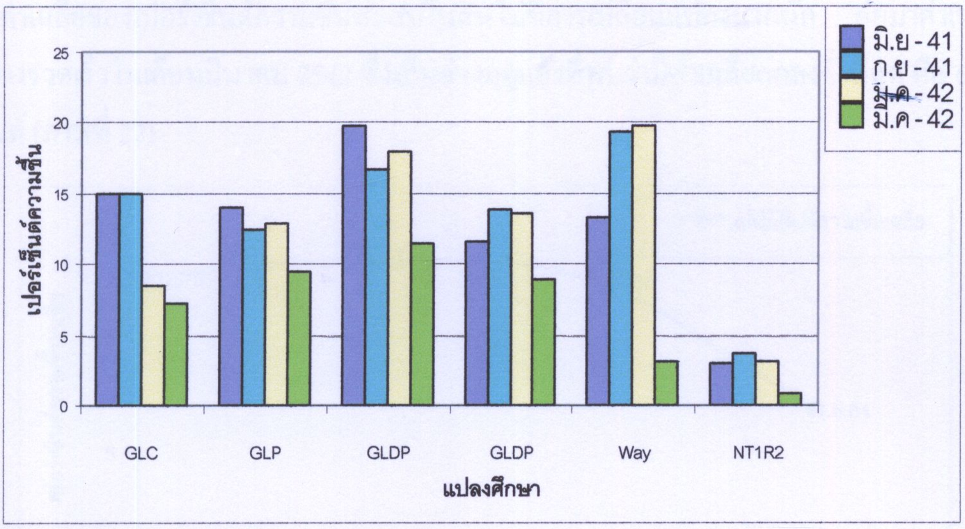
ตารางที่ 10 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินในพื้นที่โครงการฯ

Source of variation	df	SS	MS	F-value
Treatment	5	438.60	87.72	5.22**
Error	18	302.68	16.82	
Total	23	741.28		

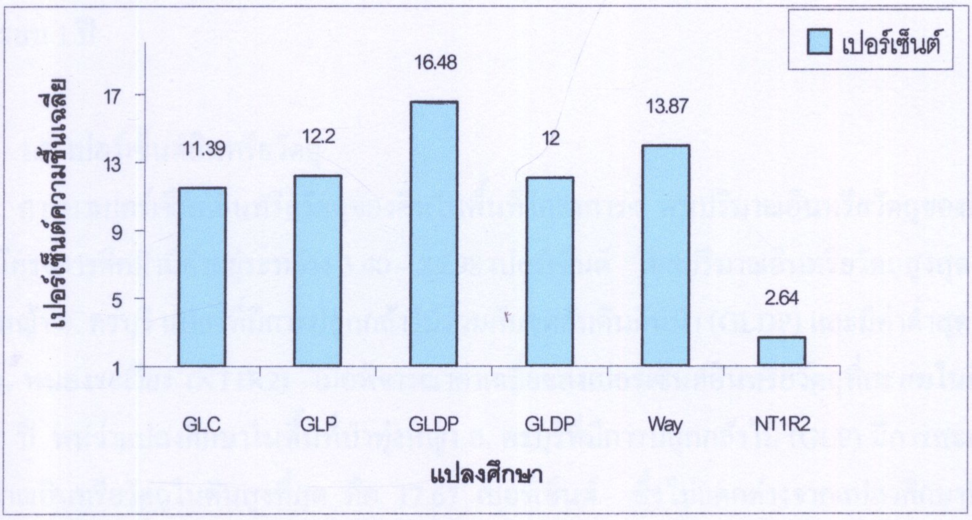
cv=35.8% coefficient of variation (c.v.)

**= แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

degree of freedom (df) Sum of Square (SS) Mean Square (MS)

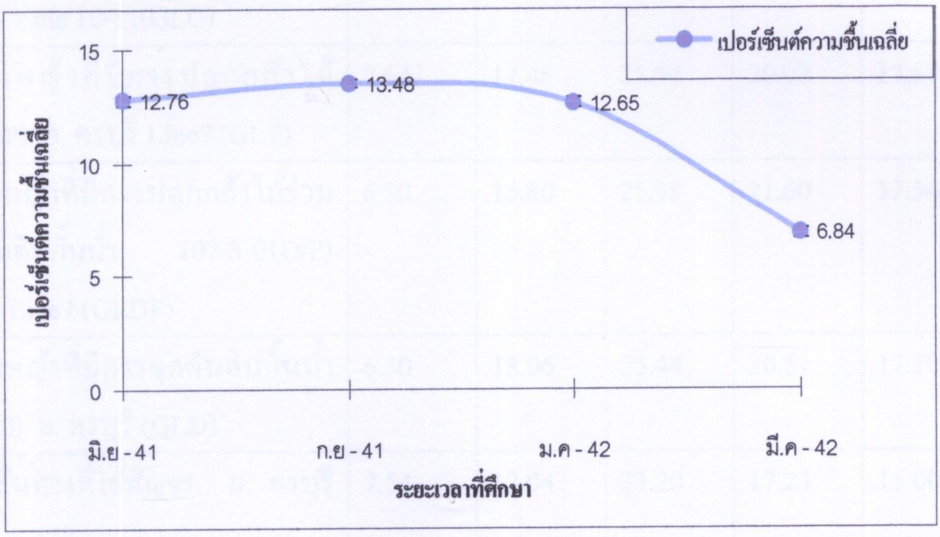


ภาพที่ 20 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินในแต่ละแปลงศึกษา



ภาพที่ 21 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความชื้นเฉลี่ยของดินจากแต่ละแปลงศึกษาในรอบ 1 ปี

สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความชื้นสะสมในดินในแต่ละช่วงเดือนในระยะเวลา 1 ปี ของพื้นที่โครงการฯ พบว่า ช่วงเวลาตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2541 ถึงเดือนมกราคม 2542 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความชื้นสะสมในดินไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก ต่อมาค่าเฉลี่ยลดลงอย่างรวดเร็วในเดือนมีนาคม 2542 ซึ่งเป็นช่วงฤดูแล้งที่พบว่ามีค่าเฉลี่ยลดลงต่ำที่สุด คือ 6.83 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความชื้นของดินในพื้นที่โครงการฯ แต่ละช่วงเดือนในรอบ 1 ปี

1.3 เปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุ

การหาเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุของดินในพื้นที่โครงการฯ พบปริมาณอินทรียวัตถุของดินในพื้นที่โครงการศึกษามีค่าอยู่ระหว่าง 3.40 – 25.98 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณอินทรียวัตถุสูงสุดในพื้นที่ทุ่งหญ้า อ. ครบุรี แปลงที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับขุดคันดินกันน้ำ (GLDP) และมีค่าต่ำสุดในพื้นป่า ต. หนองระเวียง (NT1R2) เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุที่สะสมในดินในรอบ 1 ปี พบว่าแปลงศึกษาในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้า อ. ครบุรีที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLP) มีการสะสมของปริมาณอินทรียวัตถุในดินสูงที่สุด คือ 17.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างจากแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าแปลงอื่นๆ รวมถึงแปลงศึกษาในพื้นที่ป่า ต. หนองระเวียง ที่มีการสะสมของปริมาณอินทรียวัตถุในดินต่ำที่สุด คือ 5.11 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบเฉพาะแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้า อ.ครบุรี พบการสะสมของปริมาณอินทรียวัตถุ มีค่าสูงที่สุดในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าแปลงที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLP) และมีค่าต่ำที่สุดในแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นเส้นทางการสัญจร (way) ซึ่งมีค่าไม่ต่างจากป่าทุ่งหญ้าธรรมชาติ (GLC) โดยแปลงศึกษาในพื้นที่ป่า อ.ครบุรี มีการสะสมของปริมาณอินทรียวัตถุในดินที่สูงกว่าและต่างจากแปลงศึกษาในพื้นที่ป่า ต. หนองระเวียง (ตารางที่ 11 – 12, ภาพที่ 23-24)

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุของดินในพื้นที่โครงการฯ จังหวัดนครราชสีมา

แปลงทดลอง	เปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุ				
	มิ.ย - 41	ก.ย - 41	ม.ค - 42	มี.ค - 42	เฉลี่ย
พื้นที่ทุ่งหญ้า control (07-3-01 D/P) อ. ครบุรี Line 10-11(GLC)	5.40	16.40	24.00	20.94	16.69a
พื้นที่ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (07-3-03P) อ. ครบุรี Line7 (GLP)	7.64	17.48	25.54	20.02	17.67a
พื้นที่ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับขุดคันดินกั้นน้ำ (07-3-01D/P) อ. ครบุรี Line7 (GLDP)	6.80	15.80	25.98	21.60	17.54a
พื้นที่ทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (EX-3-10) อ. ครบุรี (GLD)	6.30	18.06	25.44	20.51	17.58a
บริเวณเส้นทางที่ใช้สัญจร อ. ครบุรี Line7 (way)	7.54	12.04	23.20	17.23	15.00a
พื้นที่ป่า ต. หนองระเวียง (NT1R2)	3.40	4.04	5.11	7.88	5.11ab

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกัน ถือว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT

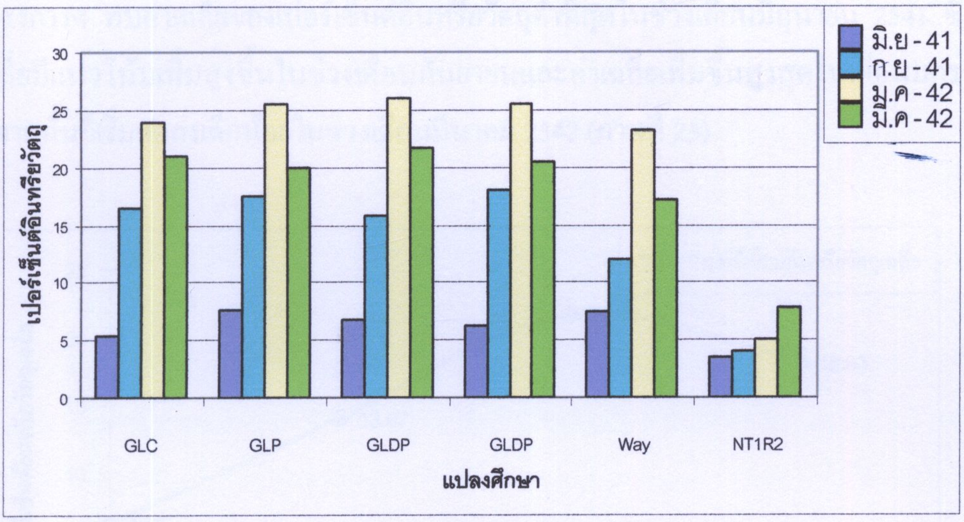
ตารางที่ 12 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุของดินในพื้นที่โครงการฯ

Source of variation	df	SS	MS	F-value
Treatment	5	483.69	96.74	1.89ns
Error	18	919.44	51.08	
	23	1403.12		

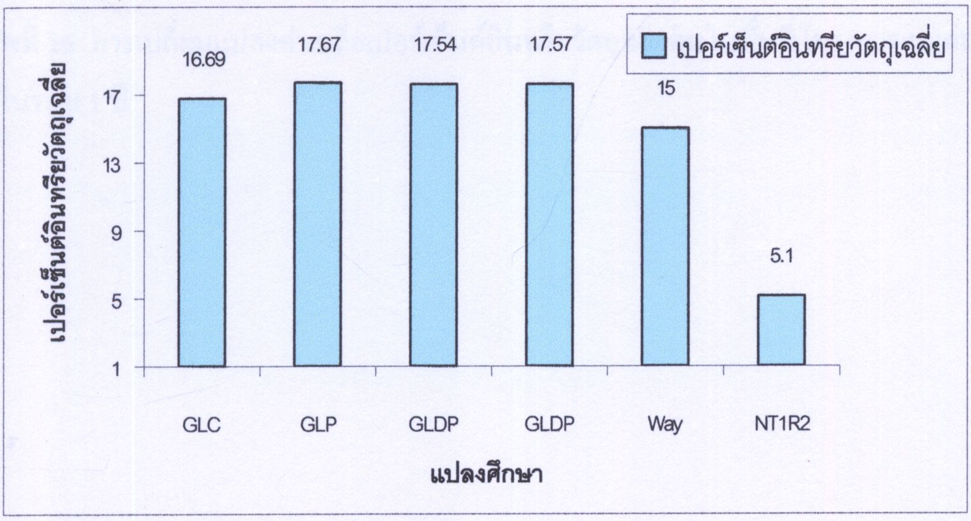
cv=47.0% coefficient of variation (c.v.)

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

degree of freedom (df) Sum of Square (SS) Mean Square (MS)

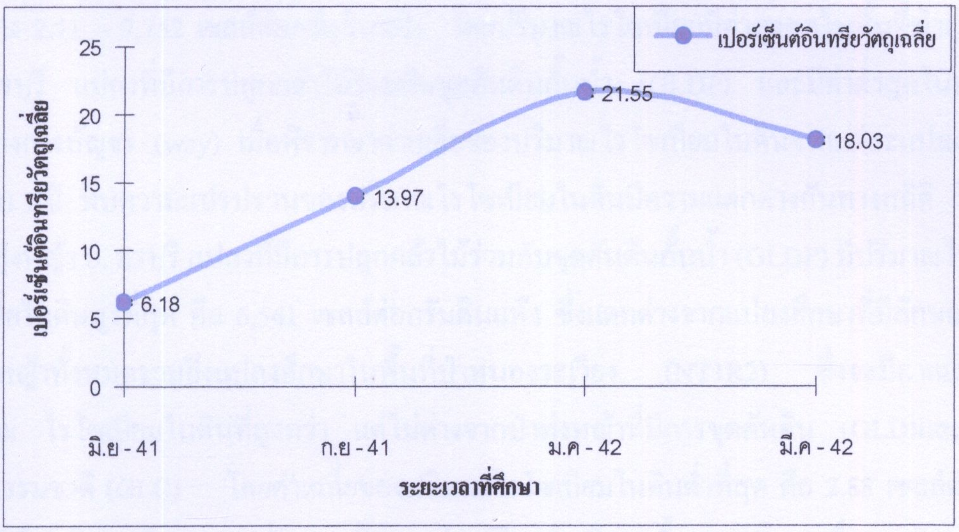


ภาพที่ 23 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุของดินจากแต่ละแปลงศึกษา



ภาพที่ 24 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุในดินจากแต่ละแปลงศึกษาในรอบ 1 ปี

สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุในดินในระยะเวลา 1 ปี ของพื้นที่โครงการฯ พบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุต่ำที่สุดในช่วงเดือนมิถุนายน 2541 ซึ่งต่อมาค่าเฉลี่ยมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในช่วงเดือนกันยายนและค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้นสูงสุดในเดือนมกราคม 2542 จากนั้นก็เริ่มลดลงเล็กน้อยในช่วงเดือนมีนาคม 2542 (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุของดินในพื้นที่โครงการฯ แต่ละช่วงเดือนในรอบ 1 ปี

2. ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางชีวภาพของดิน

การศึกษาประชากรไรโซเบียมในดิน

การศึกษาประชากรไรโซเบียม กลุ่ม cowpea ในดิน ของแต่ละแปลงศึกษาในช่วงระยะเวลา 1 ปี โดยใช้วิธี MPN – plant infect method พบปริมาณไรโซเบียมในพื้นที่ศึกษามีค่าอยู่ระหว่าง 2.11 – 7,752 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง โดยปริมาณไรโซเบียมมีค่าสูงสุดในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้า อ. ครบุรี แปลงที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) และมีค่าต่ำสุดในบริเวณเส้นทางการสัญจร (way) เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของปริมาณไรโซเบียมในดินจากแต่ละแปลงศึกษาในรอบ 1 ปี พบความแปรปรวนของปริมาณไรโซเบียมในดินมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยในพื้นที่ทุ่งหญ้า อ. ครบุรี แปลงที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) มีปริมาณไรโซเบียมเฉลี่ยในดินสูงที่สุด คือ 6,541 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง ซึ่งแตกต่างจากแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าทั้งหมดรวมถึงแปลงศึกษาในพื้นที่ป่าหนองระเวียง (NT1R2) ซึ่งจะมีค่าเฉลี่ยของปริมาณ ไรโซเบียมในดินที่สูงกว่า แต่ไม่ต่างจากป่าทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดิน (GLD)และป่าทุ่งหญ้าธรรมชาติ (GLC) โดยค่าเฉลี่ยของปริมาณไรโซเบียมในดินต่ำที่สุด คือ 2.88 เซลล์ต่อกรัมดินแห้งในบริเวณเส้นทางการสัญจร ซึ่งแตกต่างจากแปลงศึกษาทั้งหมด (ตารางที่ 13 – 14, ภาพที่ 26-27) และเมื่อพิจารณาเฉพาะแปลงศึกษาที่เป็นป่าทุ่งหญ้า อ. ครบุรี พบแปลงที่มีการดำเนินงานตามวิธีของโครงการฯ โดยการปลูกกล้า (GLP) หรือปลูกกล้าไม้ร่วมกับขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) มีค่าเฉลี่ยของปริมาณไรโซเบียมในดินที่สูงกว่าและต่างจากป่าทุ่งหญ้าธรรมชาติ (GLC) โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณเส้นทางการสัญจร ซึ่งไม่มีการปลูกพืชและขุดคันดินกั้นน้ำ มีปริมาณไรโซเบียมเฉลี่ยในดินต่ำมากที่สุด

ตารางที่ 13 ปริมาณไรโซเบียมในพื้นที่โครงการฯ จังหวัดนครราชสีมา

แปลงทดลอง	ปริมาณไรโซเบียมในพื้นที่โครงการฯ (เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง)				
	มิ.ย - 41	ก.ย - 41	ม.ค - 42	มี.ค - 42	เฉลี่ย
พื้นที่ทุ่งหญ้า control (07-3-01 D/P) อ. ครบุรี Line 10-11(GLC)	3,677	3,677	1,736	1,201	2,573b
พื้นที่ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (07-3-03P) อ. ครบุรี Line7 (GLP)	7,752	4,947	4,967	3,503	5,292a
พื้นที่ทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับขุดคันดินกั้นน้ำ (07-3-01D/P) อ. ครบุรี Line7 (GLDP)	8,143	7,929	5,188	4,905	6,541a
พื้นที่ทุ่งหญ้าที่มีการขุดคันดินกั้นน้ำ (EX-3-10) อ. ครบุรี (GLD)	2,500	3,644	3,636	1,742	2,881b
บริเวณเส้นทางที่ใช้สัญจร อ. ครบุรี Line7 (way)	3.17	3.34	2.11	2.88	2.88c
พื้นที่ป่า ต. หนองระเวียง (NT1R2)	2,306	3,297	3,258	1,629	2,623b

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกัน ถือว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT

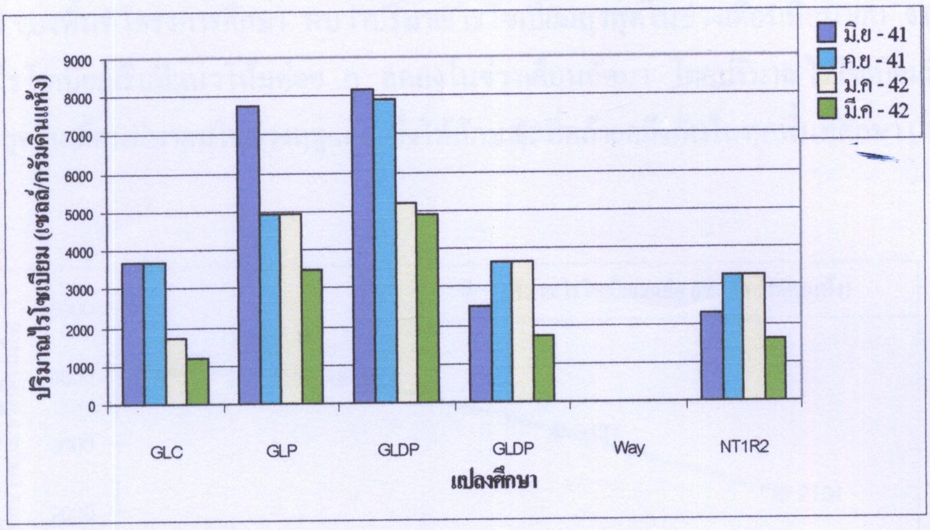
ตารางที่ 14 ตารางวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยประชากรไรโซเบียมในดินจากพื้นที่โครงการฯ

Source of variation	df	SS	MS	F-value
Treatment	5	106,030,314	21,206,062.9	13.61**
Error	18	28,038,109.1	1,557,672.7	
Total	23	134,068,424		

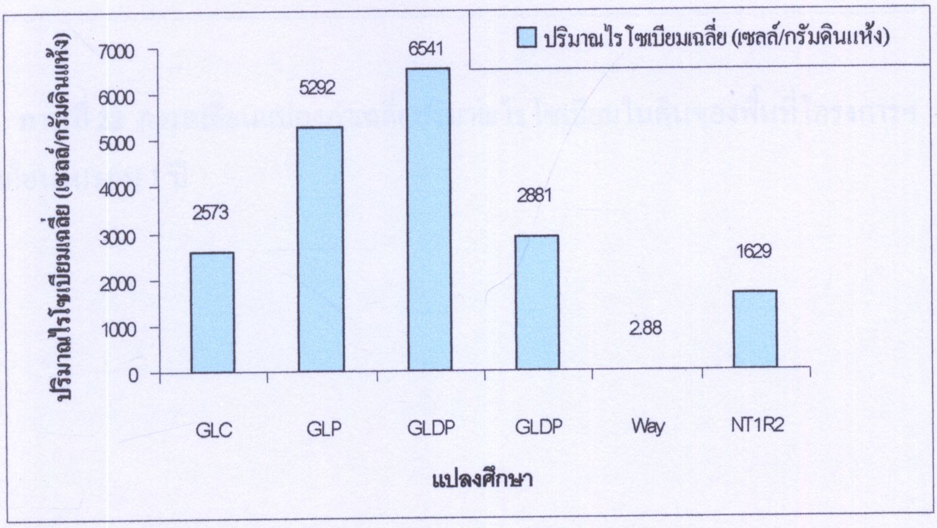
cv=37.6% coefficient of variation (c.v.)

**= แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

degree of freedom (df) Sum of Square (SS) Mean Square (MS)

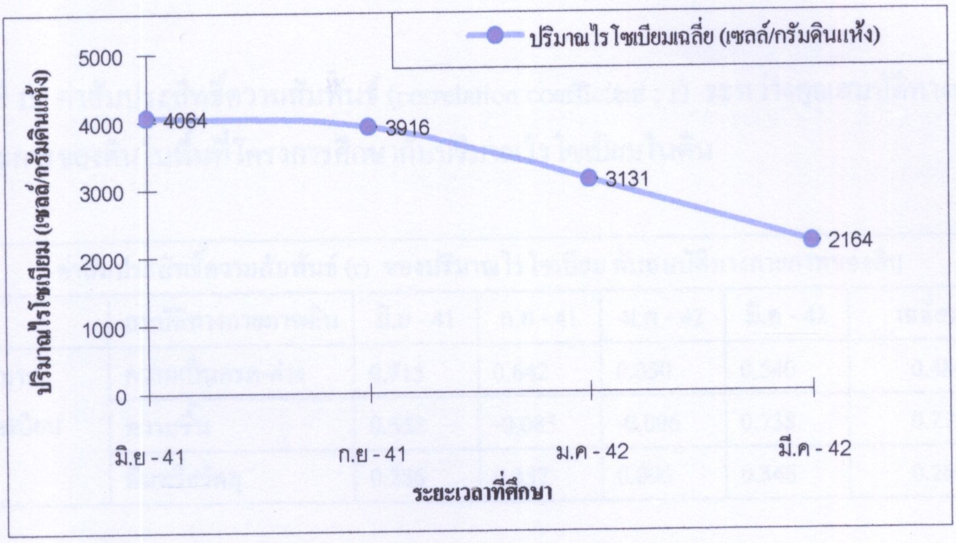


ภาพที่ 26 เปรียบเทียบปริมาณไรโซเบียมในดินของแต่ละแปลงศึกษา



ภาพที่ 27 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณไรโซเบียมในดินของแต่ละแปลงศึกษาในรอบ 1 ปี

สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยของปริมาณไรโซเบียมในดินแต่ละช่วงเดือนในระยะเวลา 1 ปี ของพื้นที่โครงการศึกษา พบว่าปริมาณไรโซเบียมสูงสุดในช่วงเดือนมิถุนายน จากนั้นปริมาณไรโซเบียมเริ่มมีแนวโน้มค่อย ๆ ลดลงในช่วงเดือนถัดมา โดยปริมาณไรโซเบียมมีการลดลงต่ำสุดในเดือนมีนาคมในช่วงฤดูแล้ง ซึ่งให้ลักษณะที่คล้ายคลึงกันในทุกพื้นที่ศึกษา (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยปริมาณไรโซเบียมในดินของพื้นที่โครงการฯ แต่ละช่วงเดือนในรอบ 1 ปี

3. ความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างปัจจัยทางกายภาพของดิน กับประชากรไรโซเบียมในดิน

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างประชากรไรโซเบียมในดินกับคุณสมบัติทางกายภาพของดินบางประการ ได้แก่ ความเป็นกรด – ด่างของดิน เปอร์เซ็นต์ความชื้นในดิน และเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุในดิน ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient ; r) ระหว่างคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของดินในพื้นที่โครงการศึกษากับปริมาณไรโซเบียมในดิน

ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) ของปริมาณไรโซเบียม กับสมบัติทางกายภาพของดิน						
	สมบัติทางกายภาพดิน	มิ.ย - 41	ก.ย - 41	ม.ค - 42	มี.ค - 42	เฉลี่ยรอบปี
ปริมาณไรโซเบียม	ความเป็นกรด-ด่าง	0.715	0.642	0.050	0.540	0.486 ns
	ความชื้น	0.552	-0.085	-0.096	0.738	0.277 ns
	อินทรียวัตถุ	0.286	0.337	0.096	0.346	0.266 ns

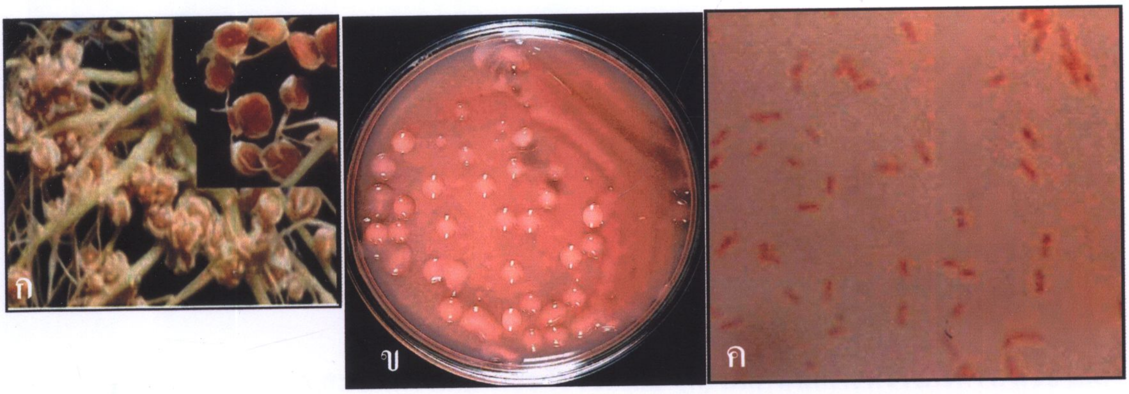
หมายเหตุ ค่าของสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เท่ากับ 0.87 (*)
ค่าสัมประสิทธิ์น้อยกว่า 0.87 (ns) = ไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประชากรไรโซเบียม กลุ่ม cowpea กับค่าความเป็นกรด–ด่าง เปอร์เซ็นต์ความชื้นและเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุในดิน จากแต่ละแปลงศึกษาในพื้นที่โครงการศึกษา โดยใช้ correlation test (r) พบความไม่สัมพันธ์ทางสถิติของปริมาณไรโซเบียมกับปัจจัยทางกายภาพของดินที่ศึกษา (ค่าสหสัมพันธ์เฉลี่ยของประชากรไรโซเบียมกับค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน (r) คือ +0.486 ; r ปริมาณไรโซเบียมกับเปอร์เซ็นต์ความชื้นในดิน คือ +0.277 และปริมาณไรโซเบียมกับเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุในดิน คือ + 0.266)

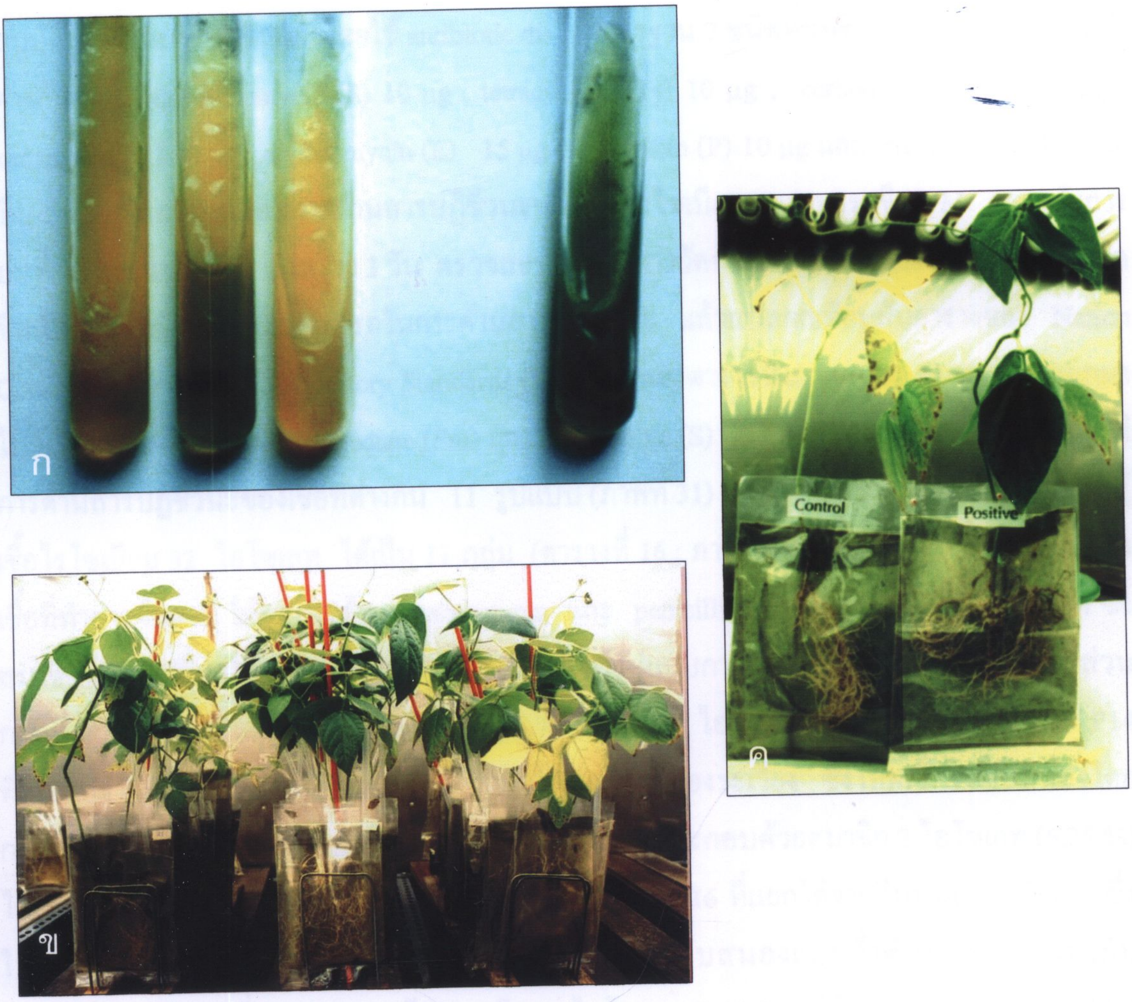
ตอนที่ 2 ผลการคัดแยกและจำแนกความแตกต่างของเชื้อไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็วจากคุณสมบัติทาง จีโนไทป์ และฟีโนไทป์

1. ผลการแยกเชื้อไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็วจากปมถั่วเขียวและทดสอบ presumptive – confirm Rhizobia test

เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของไรโซเบียมจากปมรากถั่วเขียว (ขนาดใหญ่ภายในปมควรมีสีแดง แสดงดังภาพ ที่ 29 ก) จากดินในพื้นที่โครงการฯ จำนวน 32 ไอโซเลท ดำเนินการเก็บดังตารางที่ 4 โดยเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมที่แยกได้ ทั้ง 32 ไอโซเลท ให้โคโลนีเจริญในระยะเวลา 2 – 3 วัน ลักษณะของโคโลนีเป็นแบบกลมนูนใส ไม่ดูดกลืนสีแดงของ congo red ผิวโคโลนีมีเมือกปกคลุมมาก (ภาพที่ 29 ข) เมื่อย้อมแกรมติดสีแกรมลบ (ภาพที่ 29 ค) และให้ผลผลิตกรดเมื่อทดสอบ presumptive test บนอาหารสูตร YMA ผสม bromthymol blue (BTB) โดยเชื้อไรโซเบียมผลิตกรดจะเปลี่ยนสีอาหารจากเดิมสีเขียว ให้กลายเป็นสีเหลือง (ภาพที่ 30 ก) และสามารถให้ลักษณะการสร้างปมบนรากถั่วเขียว (positive pouch) เมื่อทดสอบ comfirm Rhizobia test ภายในระยะเวลาเพียง 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 30 ข-ค) ซึ่งก็แสดงว่าเป็นเชื้อไรโซเบียมจริงตามที่ได้ระบุไว้ใน Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology



ภาพที่ 29 ผลการแยกเชื้อและตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเชื้อไรโซเบียม (ก) ลักษณะปมที่นำมาแยกเชื้อ (ข) ลักษณะโคโลนีของเชื้อไรโซเบียมถั่วเขียวบนอาหารสูตร YMA ผสม congo red (ค) ลักษณะเซลล์ย้อมติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งท่อนสั้น ๆ



ภาพที่ 30 การทดสอบคุณสมบัติความเป็นเชื้อไรโซเบียม (ก) แสดงผลการสร้างกรดของเชื้อ เมื่อทดสอบ presumptive Rhizobia test บนอาหาร YMA ผสม bromthymol blue (BTB) (ข) แสดงการศึกษา confirm Rhizobia test ในห้องทดลอง (ค) แสดงลักษณะการสร้างปมบนรากถั่วเขียวภายในถุงทดสอบ (positive pouch) เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ (uninoculated control)

2. ผลการศึกษาคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะของเชื้อ

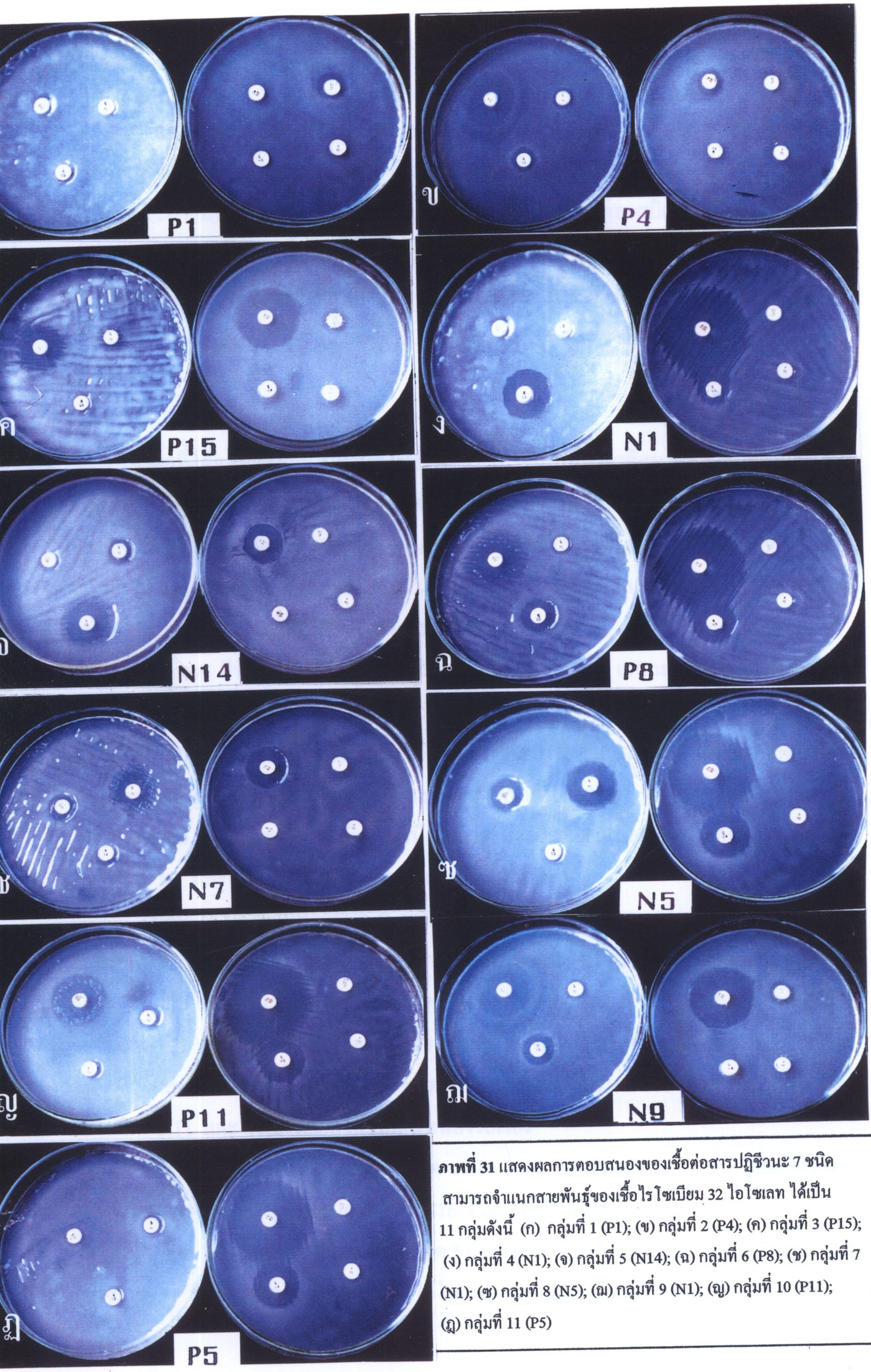
เมื่อนำเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลทที่แยกได้จากดินในพื้นที่โครงการศึกษา มาทดสอบคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ โดยใช้ antibiotic discs มาตรฐาน 7 ชนิดที่มีปริมาณของสารปฏิชีวนะที่ต่างกันดังนี้ คือ streptomycin (S) 10 µg , tetracycline (Te) 10 µg , carbenicillin (CB) 100 µg , kanamycin (K) 30 µg , erythromycin (E) 15 µg , penicillin (P) 10 µg และ rifampin (RA) 5 µg ซึ่งผลที่ได้จากการทดสอบการต้านสารปฏิชีวนะของเชื้อไรโซเบียมบนอาหารแข็ง YM ภายหลังการบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบผลโดยการวัดความกว้างของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นเป็นเกณฑ์ตัดสินความสามารถในการต้านสารปฏิชีวนะ แล้วแปลผลเทียบกับตารางของ Nation Committee for Clinical Laboratory Standards (1990) (แสดงตารางในภาคผนวก ค) แปลผลออกมาในรูปของ resistant (R) intermediate (Sm) และ susceptible (S) จากผลการทดลองนี้ พบคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะของเชื้อที่ต่างกัน 11 รูปแบบ (ภาพที่ 31) สามารถนำมาใช้จำแนกสายพันธุ์เชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท ได้เป็น 11 กลุ่ม (ตารางที่ 16 ; ภาพภาคผนวก ง) โดยที่ไอโซเลทของเชื้อที่ทำการศึกษานี้ ให้ผลการต้าน erythromycin และ penicillin ที่เหมือนกันทั้ง 32 ไอโซเลท ซึ่งสมาชิกใน กลุ่มที่ 1 มีเพียงไอโซเลท P9 (3.13 %) ที่ให้รูปแบบการต้านสารปฏิชีวนะทั้ง 7 ชนิด ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสมาชิก 6 ไอโซเลท (18.75 %) ได้แก่ ไอโซเลท P2, P3, P4, P7 และ P14 ที่แยกได้จากดินครบุรี และไอโซเลท N2 ที่แยกได้จากดินหนองระเวียง ซึ่งให้ผลการตอบสนองโดยการสร้าง inhibition zone กับ carbenicillin ส่วนกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยสมาชิก 2 ไอโซเลท (6.25 %) ได้แก่ ไอโซเลท P15 ที่แยกได้จากดินครบุรี และไอโซเลท N16 ที่แยกได้จากดินหนองระเวียง ซึ่งให้ผลการตอบสนองต่อ tetracycline และให้ผลการตอบสนองแบบกึ่งต้านกึ่งตอบสนองกับ carbenicillin กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยสมาชิก 3 ไอโซเลท (9.38 %) ได้แก่ ไอโซเลท N1, N11 และ N12 จากดินหนองระเวียง ซึ่งให้ผลการตอบต่อ tetracycline และ ให้ผลการตอบสนองแบบกึ่งต้านกึ่งตอบสนองกับ kanamycin ส่วนกลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยสมาชิก 3 ไอโซเลท (9.38 %) ได้แก่ ไอโซเลท N3, N14 และ N15 ที่แยกได้จากดินหนองระเวียง ซึ่งให้ผลการตอบสนองต่อ kanamycin และให้ผลการตอบสนองแบบกึ่งต้านกึ่งตอบสนองกับ tetracycline ส่วนกลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยสมาชิก 3 ไอโซเลท (9.38 %) ได้แก่ ไอโซเลท N10 ที่แยกได้จากดินหนองระเวียง และไอโซเลท P8, P9 ที่แยกได้จากดินครบุรี ซึ่งไอโซเลทกลุ่มนี้นอกจากจะตอบสนองต่อ carbenicillin และ tetracycline แล้วยังให้ผลการตอบสนองแบบกึ่งต้านกึ่งตอบสนองกับ kanamycin และ rifampin อีกด้วย ส่วนกลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยสมาชิก 2 ไอโซเลท (6.25 %) อันได้แก่ ไอโซเลท N7 และ N8 ที่แยกได้จากดินหนองระเวียง ซึ่งไอโซเลทกลุ่มนี้ให้ผลการตอบสนองแบบกึ่งต้านกึ่งตอบสนองกับ tetracycline และ kanamycin ส่วนกลุ่มที่ 8 มีเพียงไอโซเลท N5 (3.13 %) จากดินหนองระเวียง ซึ่งให้ผลการตอบสนองต่อ streptomycin กับ tetracycline และให้ผลการ

ตอบสนองแบบกึ่งต้านกึ่งตอบสนองกับ rifampin ส่วนกลุ่มที่ 9 มีเพียงไอโซเลท N9 ที่ให้ผลการตอบสนองต่อ carbenicillin และ tetracycline ส่วนกลุ่มที่ 10 ประกอบด้วยสมาชิก 6 ไอโซเลท (18.75%) ได้แก่ ไอโซเลท N4, N13 และ N6 ที่แยกได้จากดินหนองระเวียง และไอโซเลท P11 P12 และ P13 ที่แยกได้จากดินครบุรี ซึ่งให้ผลการตอบสนองต่อ carbenicillin กับ tetracycline และให้ผลการตอบสนองแบบกึ่งต้านกึ่งตอบสนองกับ rifampin ส่วนสมาชิกในกลุ่มสุดท้าย คือ กลุ่มที่ 11 ประกอบด้วย 4 ไอโซเลท (12.5 %) ได้แก่ ไอโซเลท P5, P6, P10 และ P16 ที่แยกได้จากดินครบุรี ซึ่งให้ผลการตอบสนองต่อ tetracycline และให้ผลการตอบสนองแบบกึ่งต้านกึ่งตอบสนองกับ rifampin

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ 7 ชนิดของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท

กลุ่มไรโซเบียมตามคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ	standard antibiotic disc 7 ชนิด และ zone diameter (mm)							
	CB 100 μg	S 10 μg	K 30 μg	Te 30 μg	RA 5 μg	E 15 μg	P 10 μg	ISOLATE
1	R (8-9)	R (8-9)	R (9-10)	R (8-9)	R (8-9)	R (8-9)	R (9-9)	P1
2	S (23-23)	R (9-10)	R (9-9)	R (9-10)	R (9-10)	R (8-9)	R (9-9)	P2 P3 P4 P7 P14 N2
3	Sm (20-21)	R (9-10)	R (9-10)	S (30-35)	R (9-10)	R (8-9)	R (8-9)	P15 N16
4	R (8-9)	R (8-9)	S (0-24)	S (30,38)	R (10,11)	R (8-9)	R (8-9)	N1 N11 N12
5	R (8-9)	R (9-10)	S (20-22)	Sm (15-16)	R (9-10)	R (9-10)	R (9-10)	N3 N14 N15
6	S (23-25)	R (9-10)	Sm (14-14)	S (30-38)	Sm (19-19.5)	R (9-10)	R (8-9)	N10 P8 P9
7	R (8-9)	Sm (12-13)	R (8-9)	Sm (15-16)	R (8-9)	R (9-10)	R (9-10)	N7 N8
8	R (12-13)	S (19-20)	R (8-9)	S (35-38)	Sm (18-19)	R (8-9)	R (9-10)	N5
9	S (29-32)	R (9-10)	R (11-12)	S (30,35)	R (9-10)	R (9-10)	R (9-10)	N9
10	S (23-24)	R (9-10)	R (9-10)	S (30-35)	Sm (18-18)	R (9-10)	R (9-10)	P11 P12 P13 N4 N6 N13
11	R (8-9)	R (8-9)	R (8-9)	S (30-35)	Sm 19-19.5)	R (9-10)	R (9-10)	P5 P6 P10 P16

resistant (R) intermediate (Sm) และ susceptible (S)



ภาพที่ 31 แสดงผลการตอบสนองของเชื้อต่อสารปฏิชีวนะ 7 ชนิด สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท ได้เป็น 11 กลุ่มดังนี้ (ก) กลุ่มที่ 1 (P1); (ข) กลุ่มที่ 2 (P4); (ค) กลุ่มที่ 3 (P15); (ง) กลุ่มที่ 4 (N1); (จ) กลุ่มที่ 5 (N14); (ฉ) กลุ่มที่ 6 (P8); (ช) กลุ่มที่ 7 (N1); (ซ) กลุ่มที่ 8 (N5); (ฌ) กลุ่มที่ 9 (N1); (ญ) กลุ่มที่ 10 (P11); (ฎ) กลุ่มที่ 11 (P5)

3. การศึกษาแบบแผนพลาสมิดโพรไฟล์ของเชื้อ

การศึกษาและสกัดแยกพลาสมิดขนาดใหญ่ของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลทที่นำมาศึกษา โดยการทำให้เซลแตก (lysis cell) ตามที่ดัดแปลงจากวิธีของ Harrison และคณะ (1989) จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้ภายหลังการทำให้เซลล์แตกมาแยกขนาดของพลาสมิด โดยใช้แผ่นอะกาโรส ขนาด 11x14 เซนติเมตร เพื่อให้มีความยาวเพียงพอในการแยกพลาสมิดขนาดใหญ่ของไรโซเบียมไอโซเลทที่ศึกษา เปรียบเทียบกับพลาสมิดขนาดใหญ่ ของ *B. japonicum* USDA 193 (Masterson et al., 1985) ของ *E. coil* 39R และของ *E. coil* No. 2 (Brinboim and Doly, 1997) ดังภาพที่ 32 (ก-ข)

ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้พบไรโซเบียม 32 ไอโซเลทที่นำมาศึกษามีพลาสมิดจำนวน 1 ถึง 3 ชิ้นต่อไอโซเลท ที่มีขนาดอยู่ในช่วงตั้งแต่ 164 – 600 เมกกะดาลตัน นอกจากนี้ยังพบพลาสมิดโพรไฟล์ที่ต่างกัน 9 รูปแบบ สามารถจำแนกเชื้อ 32 ไอโซเลทของไรโซเบียมได้เป็น 9 กลุ่ม ตามจำนวน และขนาดของพลาสมิดที่ต่างกันเป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนก และกำหนดให้สัญลักษณ์ของกลุ่มพลาสมิดที่จัดจำแนกได้เป็น A-I ดังตารางที่ 17

กลุ่ม A มีจำนวนพลาสมิด 1 ชนิด ขนาดประมาณ 336 เมกกะดาลตัน ได้แก่ไอโซเลท P2 , P3, P4, P7 และ P14 ที่แยกได้จากดินครบุรีและไอโซเลท N1 ที่แยกได้จากดินหนองระเวียง

กลุ่ม B มีจำนวนพลาสมิด 2 ชนิด ขนาดประมาณ 210 และ 250 เมกกะดาลตัน ได้แก่ไอโซเลท N3, N6, N9, N14 และ N15 ที่แยกได้จากดินหนองระเวียง

กลุ่ม C มีจำนวนพลาสมิด 2 ชนิด ขนาดประมาณ 600 และ 510 เมกกะดาลตัน ได้แก่ไอโซเลท N7 และ N8 ที่แยกได้จากดินหนองระเวียง

กลุ่ม D มีจำนวนพลาสมิด 2 ชนิด ขนาดประมาณ 600 และ 210 เมกกะดาลตัน ได้แก่ไอโซเลท P5, P6, P12 และ P16 ที่แยกได้จากดินครบุรี และไอโซเลท N10 จากดินหนองระเวียง

กลุ่ม E มีจำนวนพลาสมิด 2 ชนิด ขนาดประมาณ 336 และ210 เมกกะดาลตัน ได้แก่ไอโซเลท P11 และ P13 ที่แยกได้จากดินครบุรี และไอโซเลท N2 และ N13จากดินหนองระเวียง

กลุ่ม F มีจำนวนพลาสมิด 2 ชนิด ขนาดประมาณ 600 และ 336 เมกกะดาลตัน ได้แก่ไอโซเลท N11 และ N12 ที่แยกได้จากดินหนองระเวียง

กลุ่ม G มีจำนวนพลาสมิด 2 ชนิด ขนาด 336 และ 186 เมกกะดาลตัน ได้แก่ไอโซเลท P15 ที่แยกได้จากดินครบุรี และไอโซเลท N16 ที่แยกได้จากดินเหนองระเวียง

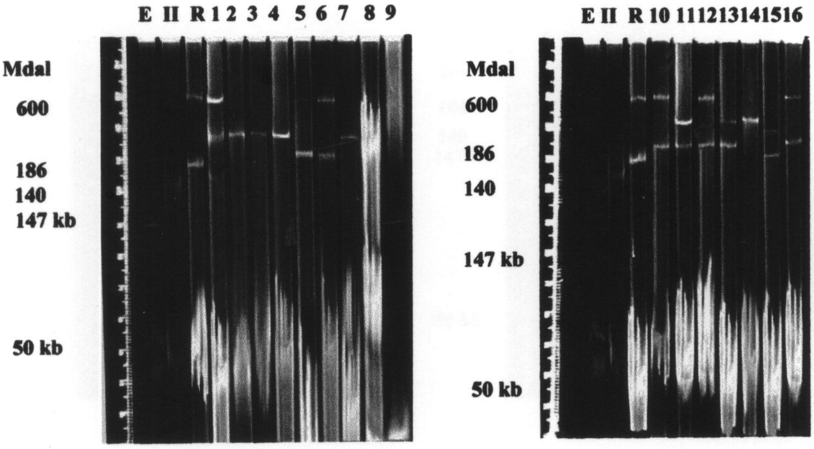
กลุ่ม H มีจำนวนพลาสมิด 3 ชนิด ขนาด 600, 336 และ 164 เมกกะดาลตัน ได้แก่ไอโซเลท P1 ที่แยกได้จากดินครบุรี และไอโซเลท N16 ที่แยกได้จากดินหนองระเวียง

กลุ่ม I ไม่ปรากฏว่ามีพลาสมิด ได้แก่ ไอโซเลท P8, P9 จากดินครบุรี และไอโซเลท N4 ที่แยกได้จากดินหนองระเวียง

ในการทดลองนี้ไม่พบลักษณะเด่นที่แน่นอนของการจัดจำแนกตามแบบพลาสมิดที่มีความสัมพันธ์กับชนิดของพืชและแหล่งที่มาของเชื้อ ดังเช่น การที่พบว่าพลาสมิดโพรไฟล์จากกลุ่ม A, B, D และ E ประกอบด้วยสมาชิกของไอโซเลทที่ได้มาจากพืชทั้ง 2 สายพันธุ์ และพลาสมิดโพรไฟล์จากกลุ่ม A, D, E, G และ H ประกอบด้วย สมาชิกของไอโซเลทที่ได้มาจากดินทั้ง 2 ชนิด เป็นต้น

ตารางที่ 17 จำนวนและขนาดพลาสมิดของไรโซเบียมถั่วเขียวที่แยกจากดินในพื้นที่โครงการศึกษา

กลุ่มไรโซเบียมตามพลาสมิดโพรไฟล์	จำนวนและขนาดของพลาสมิด	ไอโซเลท
กลุ่ม A	1 ชิ้น : ขนาด 336 Mdal	P2 P3 P4 P7 P14 N1
กลุ่ม B	2 ชิ้น : ขนาด 250 Mdal ขนาด 210 Mdal	N3 N6 N9 N14 N15
กลุ่ม C	2 ชิ้น : ขนาด 600 Mdal ขนาด 510 Mdal	N7 N8
กลุ่ม D	2 ชิ้น : ขนาด 600 Mdal : ขนาด 210 Mdal	P5 P6 P10 P12 P16 N10
กลุ่ม E	2 ชิ้น : ขนาด 336 Mdal : ขนาด 210 Mdal	P11 P13 N2 N13
กลุ่ม F	2 ชิ้น : ขนาด 600 Mdal : ขนาด 336 Mdal	N11 N12
กลุ่ม G	2 ชิ้น : ขนาด 336 Mdal : ขนาด 186 Mdal	P15 N16
กลุ่ม H	3 ชิ้น : ขนาด 600 Mdal : ขนาด 336 Mdal : ขนาด 164 Mdal	P1 N5
กลุ่ม I	ไม่ปรากฏพลาสมิด	P8 P9 N4



ภาพที่ 32 ก พลาสมิดขนาดใหญ่ของไรโซเบียม {*Rhizobium sp.* (ถั่วเขียว)} ที่แยกจากดินในพื้นที่ป่า อ. ครบุรี

lane E : พลาสมิดของ *E.coil* 39R

lane S : พลาสมิดของ *E.coil* No.2

lane R : พลาสมิดของ *B. japonicum* USDA 193

lane 1 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (P1)

lane 2 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (P2)

lane 3 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (P3)

lane 4 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (P4)

lane 5 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (P5)

lane 6 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (P6)

lane 7 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (P7)

lane 8 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (P8)

lane 9 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (P9)

lane10 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (P10)

lane 11 :ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (P11)

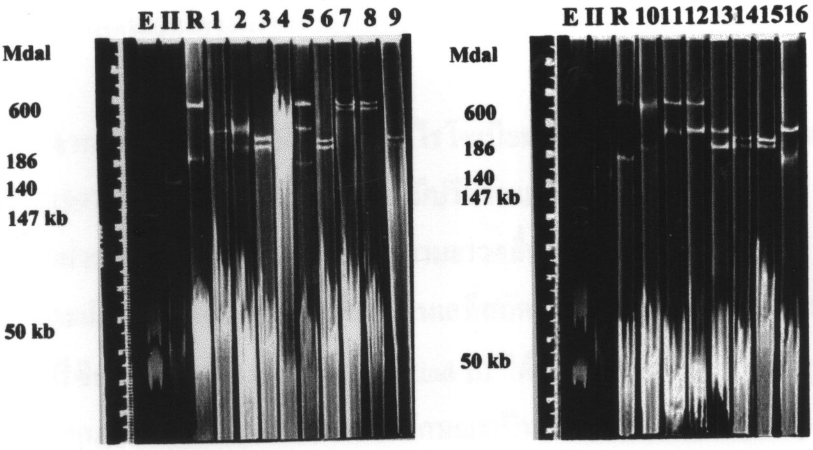
lane12 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (P12)

lane 13 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (P13)

lane14 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (P14)

lane 15 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (P15)

lane16 :ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (P16)



ภาพที่ 32 ข พลาสมิดขนาดใหญ่ของไรโซเบียม {*Rhizobium sp.(*ถั่วเขียว)} ที่แยกจากดินในพื้นที่ป่า ต. หนองระเวียง

lane E : พลาสมิดของ *E.coil* 39R

lane S : พลาสมิดของ *E.coil* No.2

lane R : พลาสมิดของ *B. japonicum* USDA 193

lane 1 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (N1)

lane 2 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (N2)

lane 3 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (N3)

lane 4 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (N4)

lane 5 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (N5)

lane 6 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (N6)

lane 7 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (N7)

lane 8 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (N8)

lane 9 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (N9)

lane10 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว)(N10)

lane11: ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (N11)

lane 12 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว)(N12)

lane13 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (N13)

lane 14 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (N14)

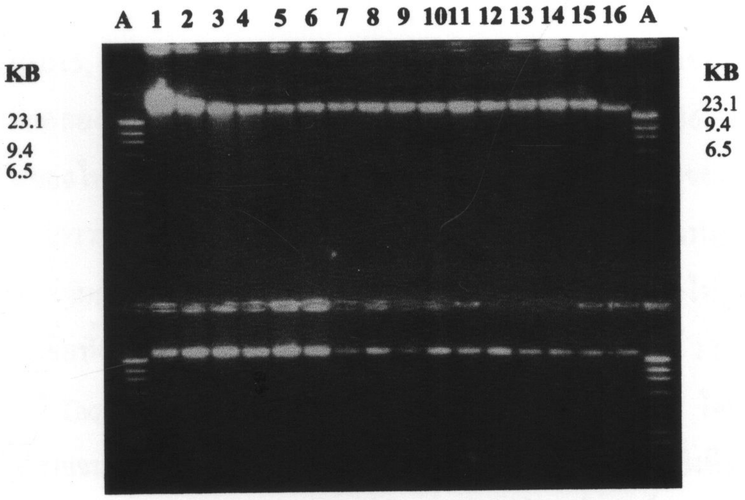
lane15 : ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (N15)

lane 16 :ไรโซเบียม (ถั่วเขียว) (N16)

4. ผลการศึกษาและวิเคราะห์รูปแบบทางพันธุกรรมของเชื้อ โดยเทคนิค RAPD

4.1 การสกัดแยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากไรโซเบียม

จากการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากไรโซเบียม ตามใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Achara และคณะ (1997) ดีเอ็นเอที่แยกได้ด้วยวิธีนี้มีปริมาณและความบริสุทธิ์เพียงพอ เมื่อตรวจสอบโดยวัดอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร พบว่า อยู่ในช่วง 1.8 – 2.0 และเมื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการนำดีเอ็นเอไปแยกขนาดด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบขนาดกับ λ/Hind III ได้ผลดังภาพที่ 33 จากรูปสังเกตได้ว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏขึ้นของเชื้อแต่ละชนิด มีลักษณะเป็นแถบเดียวคมชัด (sharp band) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็นสายยาวไม่ฉีกขาด ไม่พบการเกิด smear ซึ่งการสกัดได้โครโมโซมอลดีเอ็นเอที่มีสายยาวไม่ฉีกขาดนี้ มีโอกาสที่จะได้ยีนต่าง ๆ ที่อยู่บนจีโนมครอบคลุมครบทั้งจีโนมและดีเอ็นเอที่ได้นี้ มีความสะอาด ซึ่งมีคุณภาพดีพอที่นำไปใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยอาศัยปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 33 ผลการสกัดแยกโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากไรโซเบียม จากรูปจะสังเกตได้ว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏขึ้นของเชื้อแต่ละชนิด มีลักษณะเป็นแถบเดียวคมชัด แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็นสายยาวไม่ฉีกขาด และไม่พบการเกิด smear

หมายเหตุ สัญลักษณ์ A คือ λ DNA/Hind III

4.2 สภาวะและปฏิกิริยาที่เหมาะสมของ PCR ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี RAPD

4.2.1. ผลของปริมาณเอ็นไซม์ Ampli Taq Polymerase, annealing temperature และปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่มีผลต่อรูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่ได้

จากการใช้สภาวะและปฏิกิริยาตั้งต้นที่ดัดแปลงมาจาก Teaumroong และคณะ (1996), Paffeti และคณะ (1996) และ Nuswantara และคณะ (1996) โดยแปรปริมาณเอ็นไซม์ Ampli Taq Polymerase เป็น 3 ระดับ คือ 0.015 , 0.025 และ 0.035 unit/reaction ร่วมกับ 6 สภาวะของปฏิกิริยา PCR แสดงผลในตารางที่ 18 ได้ผลดังภาพที่ 34-36 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงรูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ (5' GGAAGTCGCC 3') ตามรายงานของ Teaumroong และคณะ (1996) ร่วมกับการแปรสภาวะเพื่อหาอุณหภูมิในการ annealing ที่เหมาะสมกับปริมาณ Ampli Taq Polymerase และปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยภาพที่ 34 ใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 32 องศาเซลเซียส ร่วมกับการแปรปริมาณ Taq Polymerase (0.015, 0.025, 0.035 unit/reaction) และปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ (25, 12.5 pmol) ส่วนภาพที่ 35 ใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส ร่วมกับการแปรปริมาณ Taq Polymerase (0.015, 0.025, 0.035 unit/reaction) และปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ (25, 12.5 pmol) ส่วนภาพที่ 36 ใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 40 องศาเซลเซียส ร่วมกับการแปรปริมาณ Taq Polymerase (0.015, 0.025, 0.035 unit/reaction) และปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ (25, 12.5 pmol) จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิในการ annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส ที่ 2 ระดับความเข้มข้นของไพรเมอร์ สามารถให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท ที่ชัดเจนกว่าการใช้สภาวะอุณหภูมิในการ annealing อื่น โดยที่สภาวะอุณหภูมิการ annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส ร่วมกับความเข้มข้นของปริมาณไพรเมอร์ 25 pmol ให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท ที่ชัดเจนกว่า การใช้ปริมาณไพรเมอร์ 12.5 pmol ที่ทุกระดับของปริมาณเอ็นไซม์ Taq DNA polymerase (0.015 0.025 และ 0.035 unit) โดยมีแนวโน้มที่ได้รูปแบบการเคลื่อนที่ที่ชัดเจนขึ้นเมื่อปริมาณเอ็นไซม์เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระดับ 0.025 และ 0.035 unit (ภาพที่ 35) พบว่า ไอโซเลท P2 ให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอที่ 3 ตำแหน่ง คือ 2.8 0.9 และ 0.50 กิโลเบส ส่วนไอโซเลท P3 ให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอที่ 5 ตำแหน่ง คือ 2.4 1.6 1.4 0.87 และ 0.50 กิโลเบส ส่วนไอโซเลท N3 ให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอที่ 5 ตำแหน่ง คือ 2.0, 1.6, 1.5, 1.07 และ 0.55 กิโลเบส ส่วนการใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 32 (ภาพที่ 34) และ 40 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 36) พบรูปแบบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอที่ไม่ครบทุกตัวอย่างเชื้อและไม่ชัดเจนที่ทุกระดับของปริมาณความเข้มข้นเอ็นไซม์ และความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ทดสอบ จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม โดยใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 36 องศาเซลเซียสร่วมกับการใช้ไพรเมอร์เข้มข้น 25 pmol กับปริมาณ Taq DNA polymerase ที่ระดับ 0.025 และ 0.035 unit ให้รูปแบบการ

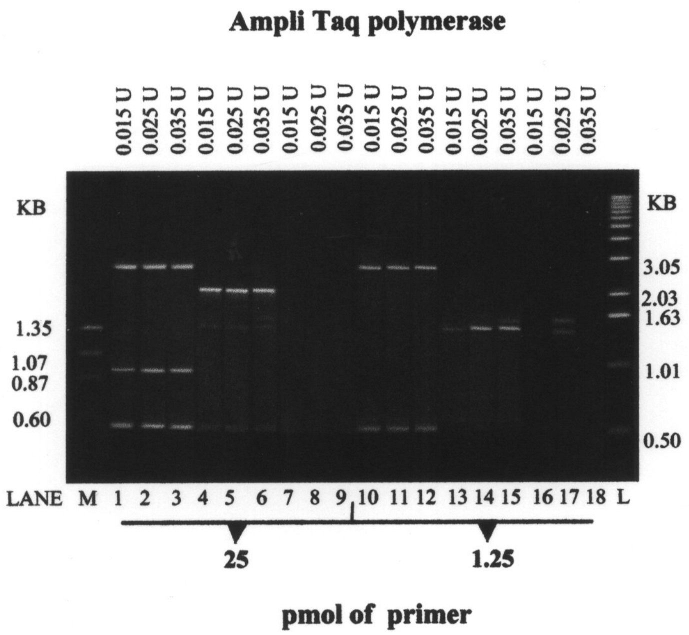
เคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอที่ครบถ้วนทุกตัวอย่างเชื้อ ดังนั้นการทดลองนี้ จึงนำสภาวะที่ใช้เอ็นไซม์ปริมาณ 0.025 และ 0.035 unit ที่อุณหภูมิในการ annealing 36 องศาเซลเซียส โดยใช้จำนวนรอบในการเพิ่มดีเอ็นเอ 45 รอบ มาศึกษาหาปริมาณ $MgCl_2$ เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 18 ผลผลิตแถบดีเอ็นเอของไรโซเบียม 3 ไอโซเลท ที่เกิดจากการแปรปริมาณเอ็นไซม์ Ampli Taq Polymerase และอุณหภูมิในการ annealing ที่ 3 ระดับ ร่วมกับไพรเมอร์เข้มข้น 2 ระดับ

อุณหภูมิ annealingที่ 32 C' ภาพที่ 34	**Ampli Taq DNA polymerase**					
	0.015 U		**0.025 U**		**0.035 U**	
	25 pmol primer	1.25 pmol primer	25 pmol primer	1.25 pmol primer	25 pmol primer	1.25 pmol primer
เชื้อ P2	2.8, 0.90, 0.50 kb (เลนที่ 1)	2.8, 0.50 kb (เลนที่ 10)	2.8, 0.90, 0.50 kb (เลนที่ 2)	2.8, 0.50 kb (เลนที่ 11)	2.8, 0.90, 0.50 kb (เลนที่ 3)	2.8, 0.50 kb (เลนที่ 12)
เชื้อ P3	2.4, 1.6, 0.50 kb (เลนที่ 4)	1.4 kb (เลนที่ 13)	2.4, 1.6, 0.50 kb (เลนที่ 5)	1.4 kb (เลนที่ 14)	2.4, 1.6, 1.4, 0.50 kb (เลนที่ 6)	1.4 kb (เลนที่ 15)
เชื้อ N3	ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ 7)	ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ 16)	ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ x)	1.5 kb (เลนที่ 17)	ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ 9)	ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ 18)

อุณหภูมิ annealingที่ 36 C' ภาพที่ 35	**Ampli Taq DNA polymerase**					
	0.015 U		**0.025 U**		**0.035 U**	
	25 pmol primer	1.25 pmol primer	25 pmol primer	1.25 pmol primer	25 pmol primer	1.25 pmol primer
เชื้อ P2	2.8, 0.90, 0.50 kb (เลนที่ 1)	2.8, 0.50 kb (เลนที่ 10)	2.8, 0.90, 0.50 kb (เลนที่ 2)	2.8, 0.50 kb (เลนที่ 11)	2.8, 0.90, 0.50 kb (เลนที่ 3)	2.8, 0.50 kb (เลนที่ 12)
เชื้อ P3	1.4, 0.87 0.50 kb (เลนที่ 4)	1.4 , 0.50 kb (เลนที่ 13)	2.4, 1.6, 1.4 0.87 0.50 kb (เลนที่ 5)	1.4, 0.50 kb (เลนที่ 14)	2.4, 1.6, 1.4 0.87 0.50 kb (เลนที่ 6)	1.4, 0.50 kb (เลนที่ 15)
เชื้อ N3	1.6, 1.5, 0.55 kb (เลนที่ 7)	ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ 16)	2.0, 1.6, 1.5, 1.07, 0.55 kb (เลนที่ 8)	1.6, 1.5 kb (เลนที่ 17)	2.0, 1.6, 1.5, 1.07, 0.55 kb (เลนที่ 9)	ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ 18)

อุณหภูมิ annealingที่ 40 C' ภาพที่ 36	**Ampli Taq DNA polymerase**					
	0.015 U		**0.025 U**		**0.035 U**	
	25 pmol primer	1.25 pmol primer	25 pmol primer	1.25 pmol primer	25 pmol primer	1.25 pmol primer
เชื้อ P2	2.8, 0.90 kb (เลนที่ 1)	ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ 10)	2.8, 0.90 kb (เลนที่ 2)	2.8 kb (เลนที่ 11)	2.8, 0.90 kb (เลนที่ 3)	2.8 kb (เลนที่ 12)
เชื้อ P3	2.4 kb (เลนที่ 4)	1.6 kb (เลนที่ 13)	. ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ 5)	1.6 kb (เลนที่ 14)	ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ 6)	ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ 15)
เชื้อ N3	ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ 7)	ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ 16)	ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ 8)	ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ 17)	ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ 9)	ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ 18)



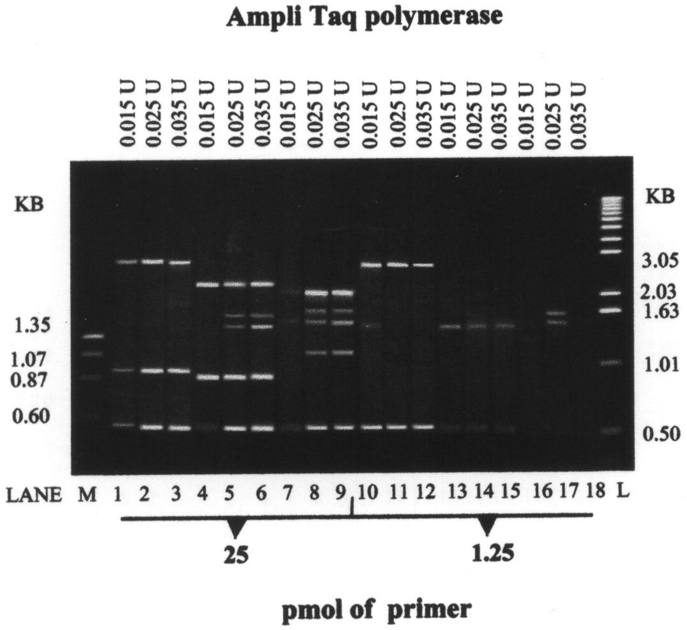
ภาพที่ 34 ผลการแปรปริมาณ Ampli Taq DNA polymerase 3 ระดับร่วมกับปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ 2 ระดับ ที่มีผลต่อรูปแบบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอในเชื้อไรโซเบียม 3 ไอโซเลท โดยใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 32 องศาเซลเซียส

lane (M) ϕ x 174 RF DNA/Hae III ; lane (L) 1 kilobase DNA ladder

lane (1-3) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท P2 ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 25 pmol และ lane (10-12) ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 12.5 pmol ร่วมกับ Ampli Taq DNA 3 ระดับ

lane (4-6) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท P3 ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 25 pmol และ lane (13-15) ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 12.5 pmol ร่วมกับ Ampli Taq DNA 3 ระดับ

lane (7-9) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท N3 ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 25 pmol และ lane (16-18) ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 12.5 pmol ร่วมกับ Ampli Taq DNA 3 ระดับ



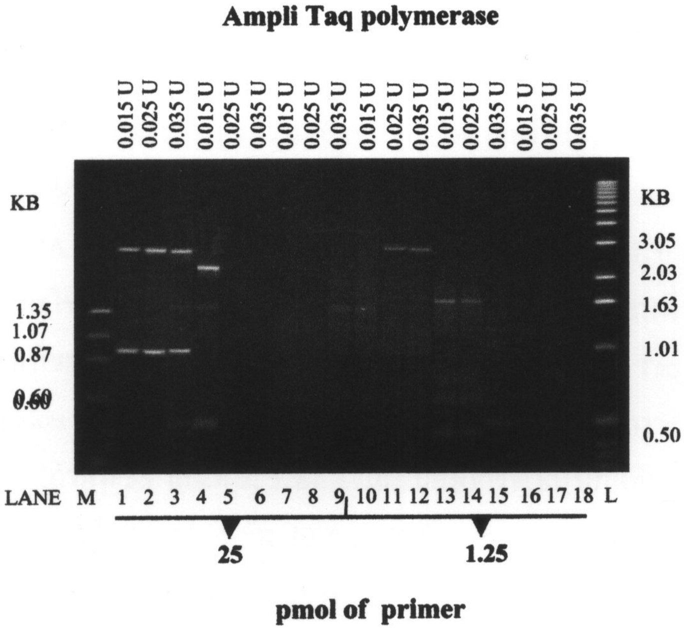
ภาพที่ 35 ผลการแปรปริมาณ Ampli Taq DNA polymerase 3 ระดับร่วมกับปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ 2 ระดับ ที่มีผลต่อรูปแบบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอในเชื้อไรโซเบียม 3 ไอโซเลท โดยใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส

lane (M) ϕ x 174 RF DNA/Hae III ; lane (L) 1 kilobase DNA ladder

lane (1-3) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท P2 ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 25 pmol และ lane (10-12) ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 12.5 pmol ร่วมกับ Ampli Taq DNA 3 ระดับ

lane (4-6) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท P3 ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 25 pmol และ lane (13-15) ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 12.5 pmol ร่วมกับ Ampli Taq DNA 3 ระดับ

lane (7-9) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท N3 ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 25 pmol และ lane (16-18) ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 12.5 pmol ร่วมกับ Ampli Taq DNA 3 ระดับ



ภาพที่ 36 ผลการแปรปริมาณ Ampli Taq DNA polymerase 3 ระดับร่วมกับปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ 2 ระดับ ที่มีผลต่อรูปแบบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอในเชื้อไรโซเบียม 3 ไอโซเลท โดยใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่ 32 องศาเซลเซียส

lane (M) ϕ x 174 RF DNA/Hae III ; lane (L) 1 kilobase DNA ladder

lane (1-3) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท P2 ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 25 pmol และ lane (10-12) ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 12.5 pmol ร่วมกับ Ampli Taq DNA 3 ระดับ

lane (4-6) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท P3 ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 25 pmol และ lane (13-15) ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 12.5 pmol ร่วมกับ Ampli Taq DNA 3 ระดับ

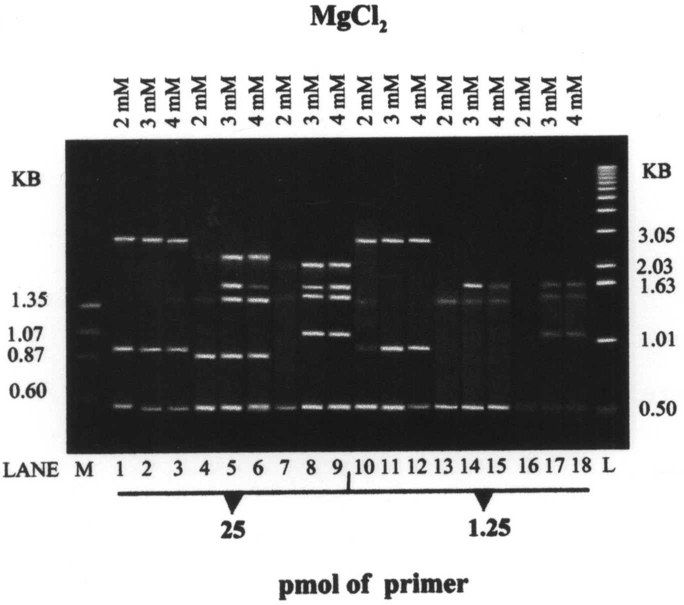
lane (7-9) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท N3 ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 25 pmol และ lane (16-18) ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 12.5 pmol ร่วมกับ Ampli Taq DNA 3 ระดับ

4.2.2 ผลของปริมาณ $MgCl_2$ ร่วมกับ Taq DNA polymerase ที่มีผลต่อรูปแบบการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ

จากสภาวะที่เหมาะสมในข้อ 4.2.1 นำมาศึกษาหาปริมาณ $MgCl_2$ ที่เหมาะสม โดยการแปรปริมาณเป็น 3 ระดับ คือ 2, 3 และ 4 มิลลิโมลาร์ /reaction แสดงผลในตารางที่ 19 และภาพที่ 37-38 จากภาพแสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่าระดับของ Mg^{++} อิสระที่เป็น co-factor ร่วมกับ Taq DNA polymerase และปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้นั้น มีผลต่อรูปแบบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอในลักษณะของผลผลิตแถบดีเอ็นเอที่มีความเข้ม-จางแตกต่างกัน โดยจะพบว่าปริมาณ Taq DNA polymerase 0.025 unit/reaction กับการใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ที่สภาวะการใช้ปริมาณไพรเมอร์เข้มข้น 25 pmol (ภาพที่ 37 เลนที่ 2, 5, 8) สามารถให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนเหมือนกับ การใช้ปริมาณ Taq DNA polymerase ที่ 0.035 unit/reaction กับการใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ที่สภาวะการใช้ปริมาณไพรเมอร์เข้มข้น 25 pmol (ภาพที่ 38 เลนที่ 2, 5, 8) และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากสภาวะการใช้ปริมาณไพรเมอร์เข้มข้น 12.5 pmol ที่ระดับความเข้มข้น $MgCl_2$ และเอนไซม์เดียวกัน พบผลผลิตแถบดีเอ็นเอที่น้อยและจางกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าที่ระดับการใช้ $MgCl_2$ 3 มิลลิโมลาร์ จะให้ผลผลิตแถบดีเอ็นเอที่เข้มและคมชัดกว่า การใช้ $MgCl_2$ 4 มิลลิโมลาร์ ที่ระดับความเข้มข้นและเอนไซม์เดียวกัน ประกอบกับผลการวิจัยของ McPherson และคณะ (1991) กล่าวว่า การใช้ $MgCl_2$ ในปฏิกิริยามากเกินไป จะไปมีผลผลักดันปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยเอนไซม์ Taq DNA polymerase เกิดเร็วเกินไปทำให้เอนไซม์ลดความแม่นยำลง ดังนั้น จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดย PCR คือการใช้ปริมาณ $MgCl_2$ ที่ระดับ 3 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับปริมาณเอนไซม์ 0.025 unit และปริมาณไพรเมอร์ 25 pmol ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและครบถ้วน มีความเหมาะสมมากที่สุด

ตารางที่ 19 ผลผลิตแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการแปรปริมาณ $MgCl_2$ ร่วมกับปริมาณเอนไซม์ Ampli Taq polymerase และปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ 2 ระดับ

Ampli Taq DNA polymerase 0.025 U (ภาพที่ 37)	25 pmol primer			1.25 pmol primer		
	2 mM $MgCl_2$	3 mM $MgCl_2$	4 mM $MgCl_2$	2 mM $MgCl_2$	3 mM $MgCl_2$	4 mM $MgCl_2$
เชื้อ P2	2.8, 0.90,0.50 kb (เลนที่ 1)	2.8, 0.90, 0.50 kb (เลนที่ 2)	2.8, 0.90, 0.50 kb (เลนที่ 3)	2.8, 0.50 kb (เลนที่ 10)	2.8, 0.90, 0.50 kb (เลนที่ 11)	2.8, 0.90, 0.50 kb (เลนที่ 12)
เชื้อ P3	2.4, 1.4, 0.87, 0.50 kb (เลนที่ 4)	2.4, 1.6, 1.4, 0.87 0.50 kb (เลนที่ 5)	2.4, 1.6, 1.4, 0.87 0.50 kb (เลนที่ 6)	1.4, 0.55 kb (เลนที่ 13)	1.6, 1.4, 0.50 kb (เลนที่ 14)	1.6, 1.4, 0.50 kb (เลนที่ 15)
เชื้อ N3	2.0, 1.5, 0.55 kb (เลนที่ 7)	2.0, 1.6, 1.5, 1.07, 0.55 kb (เลนที่ 8)	2.0, 1.6, 1.5, 1.07, 0.55 kb (เลนที่ 9)	ไม่ปรากฏแถบ (เลนที่ 16)	1.6, 1.5, 1.07 kb (เลนที่ 17)	1.6, 1.5, 1.07 kb (เลนที่ 18)
Ampli Taq DNA polymerase 0.035 U (ภาพที่ 38)	25 pmol primer			1.25 pmol primer		
	2 mM $MgCl_2$	3 mM $MgCl_2$	4 mM $MgCl_2$	2 mM $MgCl_2$	3 mM $MgCl_2$	4 mM $MgCl_2$
เชื้อ P2	2.8, 0.90, 0.50 kb (เลนที่ 1)	2.8, 0.90, 0.50 kb (เลนที่ 2)	2.8, 0.90, 0.50 kb (เลนที่ 3)	2.8, 0.90, 0.50 kb (เลนที่ 10)	2.8, 0.90, 0.50 kb (เลนที่ 11)	2.8, 0.90, 0.50 kb (เลนที่ 12)
เชื้อ P3	2.4, 1.6, 0.87 0.50 kb (เลนที่ 4)	2.4, 1.6, 1.4, 0.87, 0.50 kb (เลนที่ 5)	2.4, 1.6, 1.4, 0.87 0.50 kb (เลนที่ 6)	1.4 kb (เลนที่ 13)	2.4, 1.6, 1.4, 0.87 0.50 kb (เลนที่ 14)	1.6, 1.4 kb (เลนที่ 15)
เชื้อ N3	2.0, 1.6, 0.55 kb (เลนที่ 7)	2.0, 1.6, 1.5, 1.07, 0.55 kb (เลนที่ 8)	2.0, 1.6, 1.5, 0.55 kb (เลนที่ 9)	1.6, 1.5, 1.07 kb (เลนที่ 16)	1.6, 1.5, 1.07 kb (เลนที่ 17)	1.6, 1.5, 1.07 kb (เลนที่ 18)



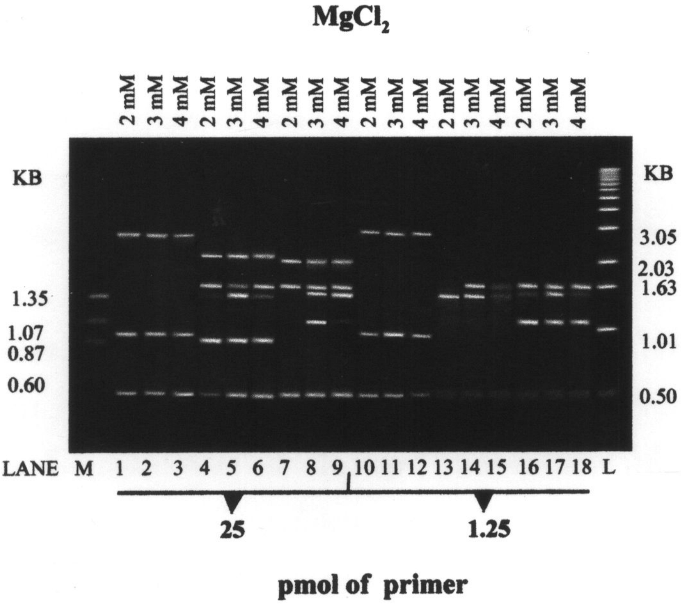
ภาพที่ 37 ผลของปริมาณ $MgCl_2$ 3 ระดับ ร่วมกับTaq DNA polymerase 0.025 unit และความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ 2 ระดับ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบของไรโซเบียมถั่วเขียว 3 ไอโซเลท

lane (M) ϕ x 174 RF DNA/Hae III ; lane (L) 1 kilobase DNA ladder

lane (1-3) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท P2 ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 25 pmol และ lane (10-12) ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 12.5 pmol ร่วมกับปริมาณ $MgCl_2$ 3 ระดับ

lane (4-6) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท P3 ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 25 pmol และ lane (13-15) ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 12.5 pmol ร่วมกับปริมาณ $MgCl_2$ 3 ระดับ

lane (7-9) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท N3 ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 25 pmol และ lane (16-18) ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 12.5 pmol ร่วมกับปริมาณ $MgCl_2$ 3 ระดับ



ภาพที่ 38 ผลของปริมาณ $MgCl_2$ 3 ระดับ ร่วมกับ Taq DNA polymerase 0.035 unit และความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ 2 ระดับ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบของไรโซเบียมถั่วเขียว 3 ไอโซเลท

lane (M) ϕ x 174 RF DNA/Hae III ; lane (L) 1 kilobase DNA ladder

lane (1-3) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท P2 ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 25 pmol และ lane (10-12) ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 12.5 pmol ร่วมกับปริมาณ $MgCl_2$ 3 ระดับ

lane (4-6) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท P3 ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 25 pmol และ lane (13-15) ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 12.5 pmol ร่วมกับปริมาณ $MgCl_2$ 3 ระดับ

lane (7-9) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท N3 ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 25 pmol และ lane (16-18) ที่สภาวะความเข้มข้นไพรเมอร์ 12.5 pmol ร่วมกับปริมาณ $MgCl_2$ 3 ระดับ

4.3. การศึกษาหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการนำมาใช้สังเคราะห์ดีเอ็นเอของไรโซเบียมถั่วเขียว

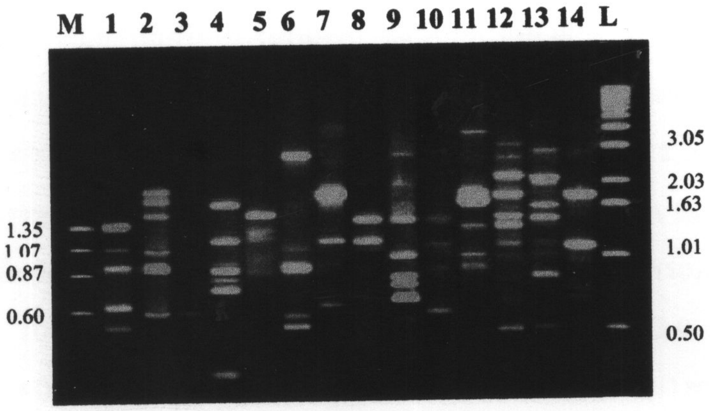
จากการทดสอบไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 7 ชนิด ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความยาว 10-15 เบส มีสัดส่วนของปริมาณ G + C ตั้งแต่ 60 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป เพื่อคัดเลือกว่าไพรเมอร์ใดที่ทำให้เกิดรูปแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียมทั้ง 4 ไอโซเลทที่ต่างกัน คือ ไอโซเลท P2 และ P3 จากดินครบุรี นำมาใช้เป็นตัวแทนจากต่าง box และไอโซเลท N3 และ N4 จากดินหนองระเวียง นำมาใช้เป็นตัวแทนจาก box เดียวกัน จากผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อ 4 ไอโซเลทร่วมกับการใช้ไพรเมอร์ทดสอบจำนวน 7 ชนิด พบตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน แสดงดังตารางที่ 20 ภาพที่ 39 ก-ข)

จากตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอต่าง ๆ ดังกล่าวที่เกิดขึ้นนี้ นำมาใช้พิจารณาและคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม ในการทดลองนี้พบไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 5 ชนิดที่สามารถทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอต่างกันทั้ง 4 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปริมาณมากเห็นเป็นแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน (major band) และแถบดีเอ็นเอที่เป็นแถบจาง (minor band) ขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายในเชื้อไอโซเลทเดียวกัน จะพบว่าไพรเมอร์ที่เหมาะสมทั้ง 5 ชนิดนั้นให้ค่าของตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันระหว่างไอโซเลทและระหว่างไพรเมอร์ ซึ่งความหลากหลายที่ต่างกันของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นระหว่างไพรเมอร์นี้ นอกจากจะสามารถระบุความแตกต่างที่เกิดในแต่ละไอโซเลทแล้ว ยังสามารถบอกถึงระดับความหลากหลายที่เกิดภายในประชากรของเชื้อชนิดเดียวกันได้อีกด้วย

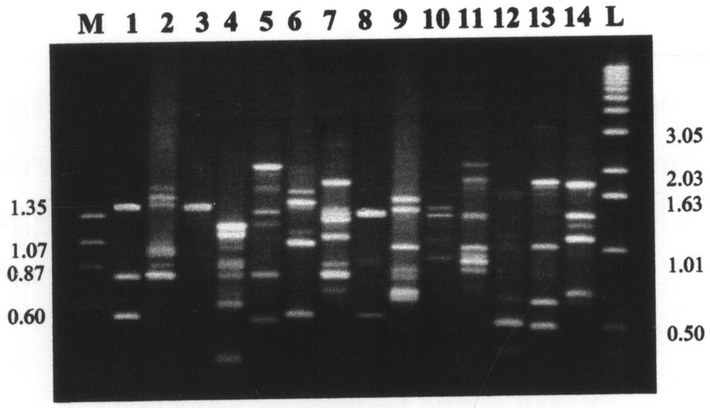
ตารางที่ 20 ผลผลิตแถบดีเอ็นเอของเชื้อ 4 ไอโซเลทที่เกิดจากไพรเมอร์ทั้ง 7 ที่นำมาทดสอบ

ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์	เชื้อ	จำนวนและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ (กิโลเบส)
1 *	(5' GACGACCACGACGC 3')	P2	5 แถบ : 1.35, 1.07, 0.9, 0.64 และ 0.50 (ภาพที่ 39ก เลนที่ 1)
		P3	2 แถบ : 1.35 , 1.07 (ภาพที่ 39ก เลนที่ 8)
		N3	3 แถบ : 1.4 , 0.80, 0.64 (ภาพที่ 39ข เลนที่ 1)
		N4	2 แถบ : 1.3 และ 0.64 (ภาพที่ 39ข เลนที่ 8)
2 *	(5' CGGCCCCTGT 3')	P2	4 แถบ : 1.45 , 1.01 , 0.90 และ 0.60 (ภาพที่ 39ก เลนที่ 2)
		P3	6 แถบ : 1.4, 1.01, 0.87 , 0.80 , 0.70 และ 0.60 (ภาพที่ 39ก เลนที่ 9)
		N3	5 แถบ : 1.5 , 1.45, 1.40 , 0.90 และ 0.80 (ภาพที่ 39ข เลนที่ 2)
		N4	4 แถบ : 1.5 , 1.4, 1.01 , 0.80 และ 0.70 (ภาพที่ 39ข เลนที่ 9)
3	(5' AAGAGCCCGT 3')	P2	1 แถบ : 0.60 (ภาพที่ 39ก เลนที่ 3)
		P3	3 แถบ : 0.60 , 1.4 และ 1.07 (ภาพที่ 39ก เลนที่ 10)
		N3	1 แถบ : 1.4 (ภาพที่ 39ข เลนที่ 3)
		N4	4 แถบ : 1.4 , 1.3 , 1.07 และ 0.90 (ภาพที่ 39ข เลนที่ 10)
4 *	(5' AGCGCCATTG 3')	P2	6 แถบ : 1.7 , 1.1 , 0.87 , 0.80 , 0.70 และ 0.29 (ภาพที่ 39ก เลนที่ 4)
		P3	7 แถบ : 3, 1.8, 1.7, 1.6, 1.25, 1.01 และ 0.87 (ภาพที่ 39ก เลนที่ 11)
		N3	6 แถบ : 1.1, 1.07, 0.87 , 0.80 , 0.60 , 0.29 (ภาพที่ 39ข เลนที่ 4)
		N4	3 แถบ : 1.6 , 0.70 และ 0.50 (ภาพที่ 39ข เลนที่ 11)
5	(5' GTCGCCGTCA 3')	P2	1 แถบ : 1.50 (ภาพที่ 39ก เลนที่ 5)
		P3	8 แถบ : 3, 2.8, 2.0, 1.7, 1.4, 1.3, 1.1 และ 1.07 (ภาพที่ 39ก เลนที่ 12)
		N3	6 แถบ : 2, 1.35, 1.25, 0.8 และ 0.64 (ภาพที่ 39ข เลนที่ 5)
		N4	2 แถบ : 1.6 และ 0.51 (ภาพที่ 39ข เลนที่ 12)
6 *	(5' GGAAGTCGCC 3')	P2	4 แถบ : 2.8, 0.90, 0.55 และ 0.50 (ภาพที่ 39ก เลนที่ 6)
		P3	7 แถบ : 2.8, 2.4, 1.6, 1.4, 1.07, 0.87 และ 0.50 (ภาพที่ 39ก เลนที่ 13)
		N3	4 แถบ : 1.6, 1.5 , 1.07 และ 0.55 (ภาพที่ 39ข เลนที่ 6)
		N4	4 แถบ : 1.8, 1.07, 0.75 และ 0.50 (ภาพที่ 39ข เลนที่ 13)
7 *	(5' GTAGACCCGT 3')	P2	3 แถบ : 1.7 , 1.20 และ 0.75 (ภาพที่ 39ก เลนที่ 7)
		P3	2 แถบ : 1.7 และ 1.07 (ภาพที่ 39ก เลนที่ 14)
		N3	8 แถบ : 1.7, 1.4, 1.35, 1.20, 1.07, 0.87, 0.80 และ 0.75 (ภาพที่ 39ข เลนที่ 7)
		N4	5 แถบ : 1.7, 1.35, 1.20, 1.07 และ 0.75 (ภาพที่ 39ข เลนที่ 14)

หมายเหตุ * = แทนไพรเมอร์ที่เลือกมาใช้



ภาพ (ก)



ภาพ (ข)

ภาพที่ 39 ผลการศึกษาหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำให้เกิดรูปแบบการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากเชื้อ 4 ไอโซเลทที่ต่างกัน

ก) แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ 7 ชนิด โดยใช้ไอโซเลท P2 และ P3 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

lane (M) ϕ x 174 RF DNA/Hae III ; lane (L) 1 kilobase DNA ladder

lane (1-7) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท P2 ร่วมกับไพรเมอร์ 1-7

lane (8-14) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท P3 ร่วมกับไพรเมอร์ 1-7

ข) แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ 7 ชนิดโดยใช้ไอโซเลท N3 และ N4 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

lane (1-7) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท P2 ร่วมกับไพรเมอร์ 1-7

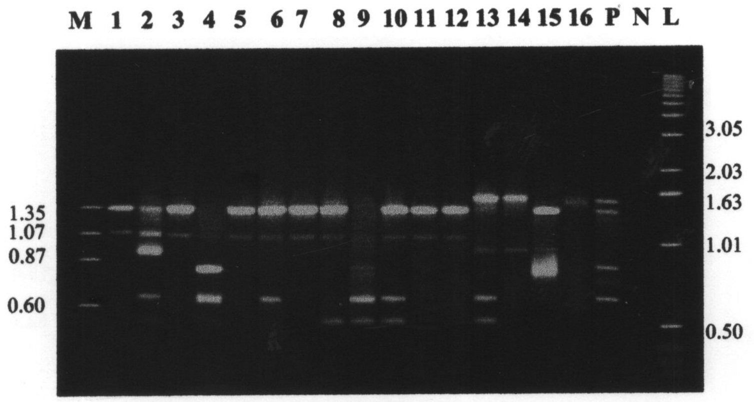
lane (8-14) ผลผลิตดีเอ็นเอจากไอโซเลท P3 ร่วมกับไพรเมอร์ 1-7

4.4 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอของไรโซเบียม 32 ไอโซเลท โดยเทคนิค RAPD

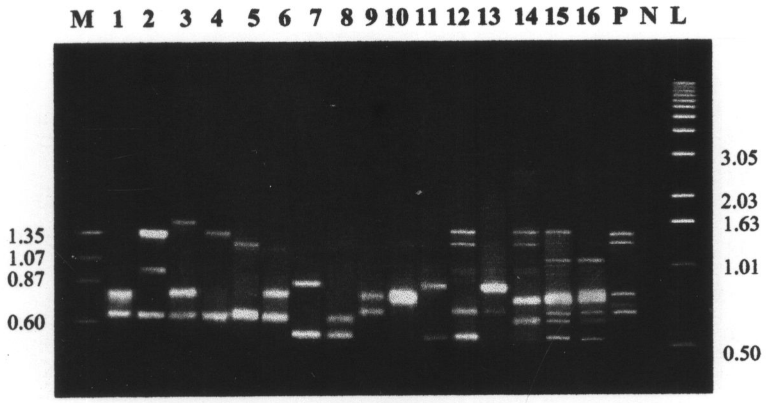
จากสภาวะและปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดย PCR ในข้อ 4.2 ร่วมกับไพรเมอร์ 5 ชนิดที่คัดเลือกแล้วว่าเหมาะสมจาก ข้อ 4.3 ถูกนำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ 32 ไอโซเลท โดยรูปแบบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิสเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (ϕX174 RF DNA/Hae III fragment และ 1 Kb DNA ladder) พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่หลากหลาย โดยแถบของดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์มีจำนวนแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 10-18 แถบ และมีขนาดดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในช่วง 0.29 – 3.0 กิโลเบส (ตารางที่ 21) (ภาพที่ 40 – 44) จากจำนวนชิ้นและขนาดดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด นำมา score band เข้าโปรแกรม UPGMA โดยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ 5 ชนิด ร่วมกับดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ 32 ไอโซเลท ที่นำมาศึกษานี้ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างไอโซเลทและระหว่างไพรเมอร์ ซึ่งรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างไพรเมอร์นี้บางแถบคาดว่าจะสามารถใช้เป็นตัวแทนหรือเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียมได้ ดังไอโซเลท P7 ซึ่งมีขนาดของดีเอ็นเอ เท่ากับ 1.35 (ภาพที่ 40 ก, ภาพที่ 43 ก และ ภาพที่ 44 ก) ไอโซเลท P2 ซึ่งมีขนาดของดีเอ็นเอ เท่ากับ 0.9 (ภาพที่ 40 ก, ภาพที่ 41 ก และ ภาพที่ 42 ก) เป็นต้น

ตารางที่ 21 จำนวนและขนาดผลผลิตแถบดีเอ็นเอของเชื้อ 32 ไอโซเลทที่เกิดจากไพรเมอร์ที่เหมาะสม 5 ชนิด

ชนิดไพรเมอร์	จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ (กิโลเบส)
1	10	1.4 , 1.35 , 1.2 ,1.07 , 0.9 ,0.87 , 0.80 , 0.70, 0.64, 0.50
2	12	1.6, 1.5, 1.45, 1.4, 1.2 , 1.01, 0.90 , 0.87 , 0.80, 0.70, 0.60 , 0.50
4	18	3.0, 2.0, 1.8, 1.70 , 1.60 , 1.4 ,1.35, 1.25 , 1.1, 1.07 , 1.01 0.87 , 0.82 , 0.80 , 0.70 , 0.60 , 0.50 , 0.29
6	18	2.8 , 2.4 , 2.0 , 1.8, 1.7, 1.6, 1.5 , 1.4, 1.35, 1.1, 1.07, 0.90 , 0.87 , 0.80 , 0.75 , 0.70, 0.55 , 0.50
7	16	2.7, 2.1, 2.0, 1.7, 1.6, 1.4 , 1.35, 1.20, 1.07, 1.01, 0.90 0.87, 0.80, 0.75, 0.60 , 0.50



ภาพ (ก)



ภาพ (ข)

ภาพที่ 40 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 1 ร่วมกับดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท

ก) (lane 1-16) แถบดีเอ็นเอจากไรโซเบียม (ถั่วเขียว) ที่แยกจากพื้นที่ อ.ครบุรี คือไอโซเลท P1-P16

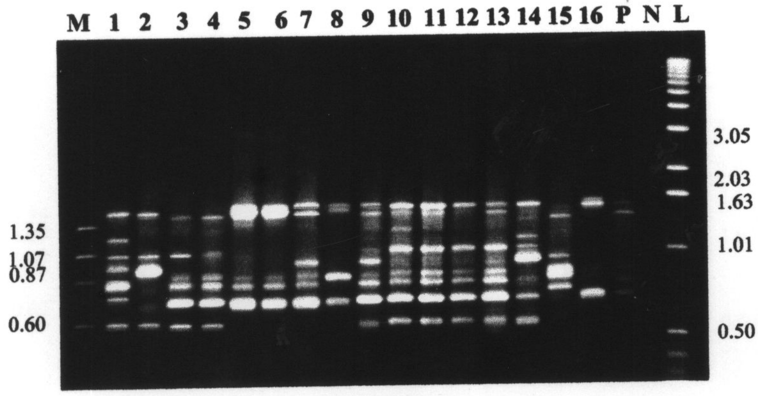
ข) (lane 1-16) แถบดีเอ็นเอจากไรโซเบียม (ถั่วเขียว) ที่แยกจากพื้นที่ ต. ระเวียง คือไอโซเลท N1-N16

L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส

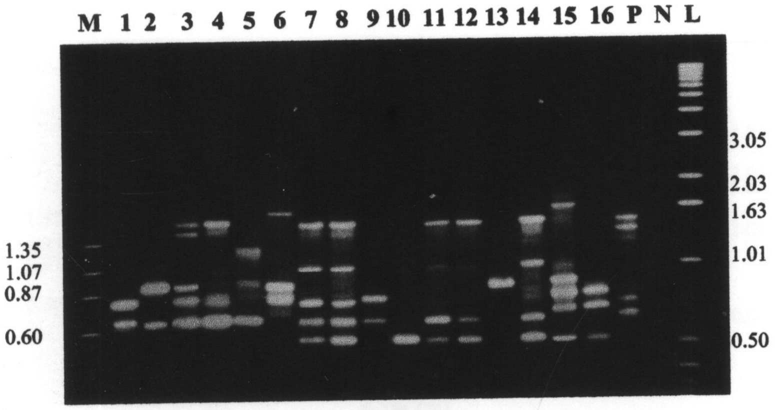
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ϕX174 RF DNA/Hae III แสดงตัวเลขกิโลเบส

P คือ แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเชื้อ ไรโซเบียม (*R. leguminosarum*) สำหรับเป็น positive control

N คือ negative control



ภาพ (ก)



ภาพ (ข)

ภาพที่ 41 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 2 ร่วมกับดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท

ก) (lane 1-16) แถบดีเอ็นเอจากไรโซเบียม (ถั่วเขียว) ที่แยกจากพื้นที่ อ.ครบุรี คือไอโซเลท P1-P16

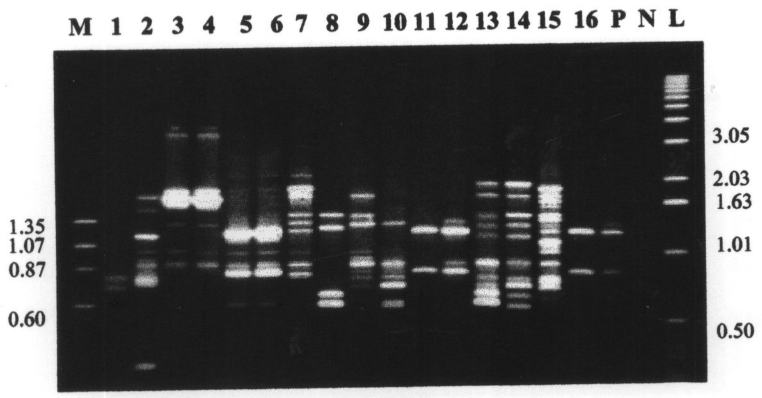
ข) (lane 1-16) แถบดีเอ็นเอจากไรโซเบียม (ถั่วเขียว) ที่แยกจากพื้นที่ ต. ระเวียง คือไอโซเลท N1-N16

L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส

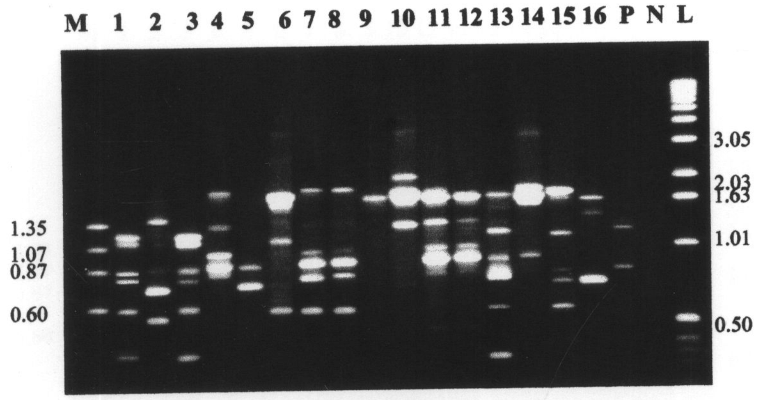
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ϕX174 RF DNA/Hae III แสดงตัวเลขกิโลเบส

P คือ แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเชื้อ ไรโซเบียม (*R. leguminosarum*) สำหรับเป็น positive control

N คือ negative control



ภาพ (ก)



ภาพ (ข)

ภาพที่ 42 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 4 ร่วมกับดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท

ก) (lane 1-16) แถบดีเอ็นเอจากไรโซเบียม (ถั่วเขียว) ที่แยกจากพื้นที่ อ.ครบุรี คือไอโซเลท P1-P16

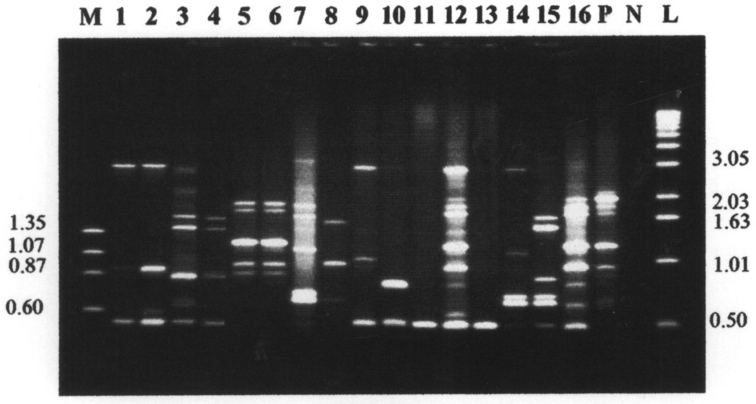
ข) (lane 1-16) แถบดีเอ็นเอจากไรโซเบียม (ถั่วเขียว) ที่แยกจากพื้นที่ ต. ระเวียง คือไอโซเลท N1-N16

L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส

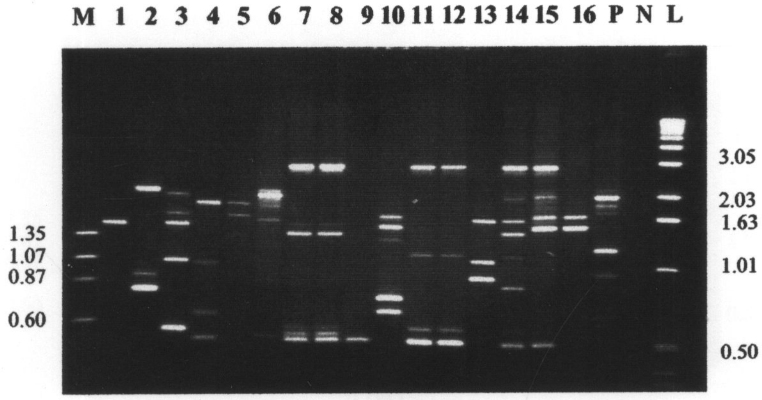
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ϕX174 RF DNA/Hae III แสดงตัวเลขกิโลเบส

P คือ แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเชื้อ ไรโซเบียม (*R. leguminosarum*) สำหรับเป็น positive control

N คือ negative control



ภาพ (ก)



ภาพ (ข)

ภาพที่ 43 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 6 ร่วมกับดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท

ก) (lane 1-16) แถบดีเอ็นเอจากไรโซเบียม (ถั่วเขียว) ที่แยกจากพื้นที่ อ.ครบุรี คือไอโซเลท P1-P16

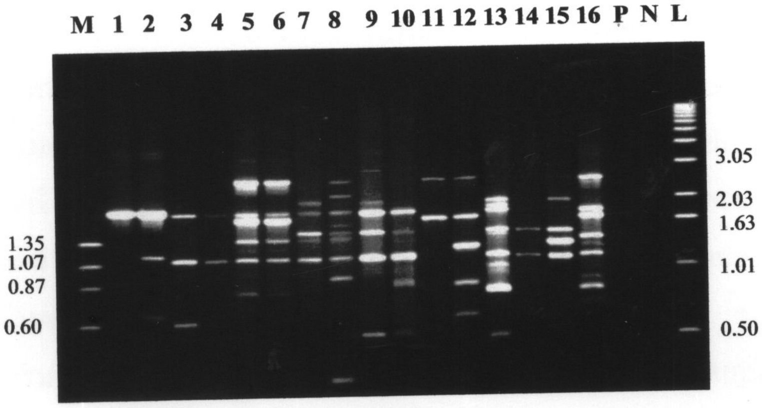
ข) (lane 1-16) แถบดีเอ็นเอจากไรโซเบียม (ถั่วเขียว) ที่แยกจากพื้นที่ ต. ระเวียง คือไอโซเลท N1-N16

L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส

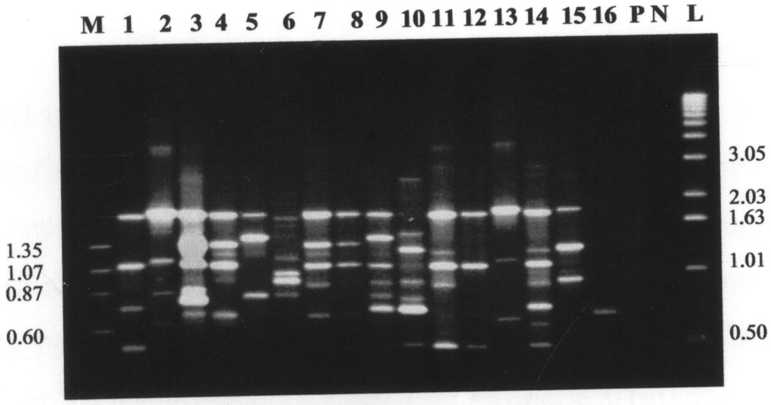
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ϕX174 RF DNA/Hae III แสดงตัวเลขกิโลเบส

P คือ แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเชื้อ ไรโซเบียม (*R. leguminosarum*) สำหรับเป็น positive control

N คือ negative control



ภาพ (ก)



ภาพ (ข)

ภาพที่ 44 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 7 ร่วมกับดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท

ก) (lane 1-16) แถบดีเอ็นเอจากไรโซเบียม (ถั่วเขียว) ที่แยกจากพื้นที่ อ.ครบุรี คือไอโซเลท P1-P16

ข) (lane 1-16) แถบดีเอ็นเอจากไรโซเบียม (ถั่วเขียว) ที่แยกจากพื้นที่ ต. ระเวียง คือไอโซเลท N1-N16

L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kilobase DNA ladder แสดงตัวเลขเป็นกิโลเบส

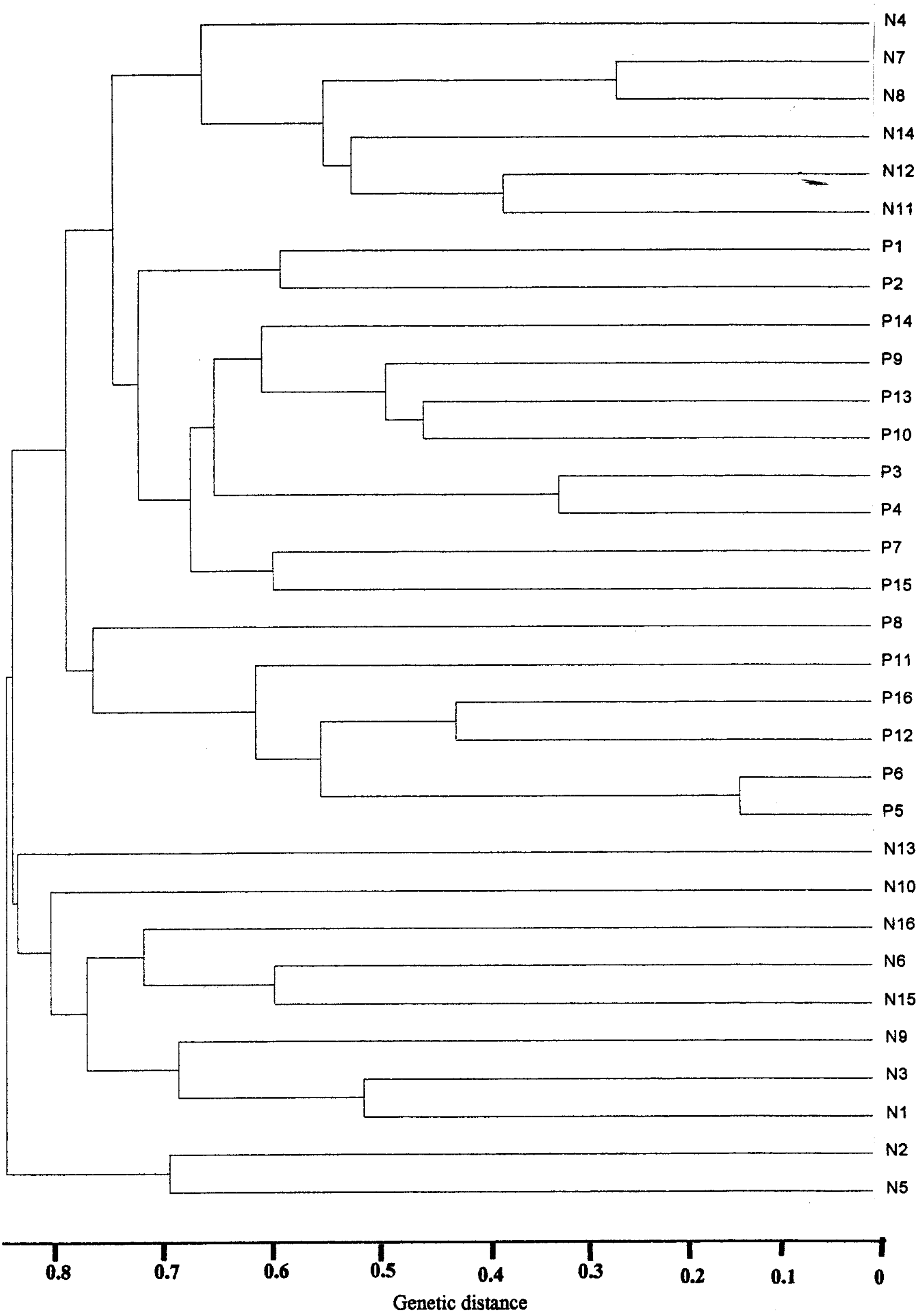
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ϕX174 RF DNA/Hae III แสดงตัวเลขกิโลเบส

P คือ แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเชื้อ ไรโซเบียม (*R. .leguminosarum*) สำหรับเป็น positive control

N คือ negative control

4.5 ผลการวิเคราะห์ RAPD เพื่อการจำแนกและศึกษาความแปรปรวน

จากการนำข้อมูลเกี่ยวกับขนาดและจำนวนแถบของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ จากเทคนิค RAPD จำนวนทั้งสิ้น 64 ชิ้น จาก 5 ไพรเมอร์ แสดงให้เห็นความแตกต่างของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลทที่แยกได้จากพื้นที่โครงการศึกษา มาวิเคราะห์ความแปรปรวนและจัดจำแนกกลุ่มด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Jaccard 's coefficient ข้อมูลจะถูกปรับเปลี่ยนโดยกำหนดเลขสัญลักษณ์ "1" กรณีที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และกำหนดเลขสัญลักษณ์ "0" กรณีที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ตารางผนวกที่ ง) จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี UPGMA เพื่อคำนวณหาระดับความเหมือนและความต่างของแต่ละไอโซเลททีละคู่สลับกันจนครบทั้ง 32 ไอโซเลท จากนั้นนำค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) (แสดงดังภาคผนวก จ) ไปเขียนเป็นแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree ซึ่งผลการจัดจำแนกกลุ่มของไรโซเบียมทั้ง 32 ไอโซเลท โดยใช้ข้อมูลจาก 5 ไพรเมอร์ แสดงดังภาพที่ 45 พบไอโซเลทไรโซเบียมที่นำมาศึกษาถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มที่ต่างกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาจากผลพบการแยกกันที่ชัดเจนของกลุ่มไอโซเลทที่เก็บจากดินต่างชนิด โดยสมาชิกของไอโซเลททั้งหมดจากกลุ่มจีโนไทป์ ที่ 2 และ 3 เป็นเชื้อที่แยกได้จากดินครบุรี และสมาชิกไอโซเลททั้งหมดจากกลุ่มจีโนไทป์ ที่ 1, 4 และ 5 เป็นเชื้อที่แยกได้จากดินหนองระเวียง โดยกลุ่มจีโนไทป์ที่ 1 ประกอบด้วยสมาชิกของไอโซเลทส่วนใหญ่แยกมาจากปมถั่วเขียวกำแพงแสน 2 อันได้แก่ ไอโซเลท N4 , N7, N8, N11 และ N12 ยกเว้นเพียง ไอโซเลท N14 ได้มาจากปมถั่วเขียวกำแพงแสน 1 ส่วนกลุ่มจีโนไทป์ ที่ 2 ประกอบด้วยสมาชิกของไอโซเลท P1, P2, P14, P9, P10 และ P13 ที่แยกได้จากปมถั่วเขียวกำแพงแสน 1 และไอโซเลท P3, P4, P7 และ P15 ที่แยกได้จากปมถั่วเขียวกำแพงแสน 2 ส่วนกลุ่มจีโนไทป์ ที่ 3 ประกอบด้วยสมาชิกของไอโซเลทส่วนใหญ่ได้มาจากปมถั่วเขียวกำแพงแสน 2 ได้แก่ ไอโซเลท P8, P11, P12 และ P16 ยกเว้นเพียงไอโซเลท P5 และ P6 เท่านั้นที่แยกมาจากปมถั่วเขียวกำแพงแสน 1 ส่วนกลุ่มจีโนไทป์ ที่ 4 ประกอบด้วยสมาชิกของไอโซเลทส่วนใหญ่ได้มาจากปมถั่วเขียวกำแพงแสน 1 ยกเว้นเพียงไอโซเลท N15 และ N16 เท่านั้น ที่ได้มาจากปมถั่วเขียวกำแพงแสน 2 ส่วนกลุ่มจีโนไทป์ ที่ 5 ประกอบด้วยสมาชิกของไอโซเลททั้งหมดที่ได้มาจากปมถั่วเขียวกำแพงแสน 1 ได้แก่ ไอโซเลท N2 และN5 ขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การแยกกันของไอโซเลทที่เก็บจากปมรากถั่วเขียวสายพันธุ์กำแพงแสน 1 และถั่วเขียวกำแพงแสน 2 ในแต่ละกลุ่มจีโนไทป์เหล่านี้ จะพบว่าเกือบร้อยละ 70 ของจำนวนไอโซเลททั้งหมดในกลุ่มจีโนไทป์ ที่ 1 และจำนวนไอโซเลททั้งหมดในกลุ่มจีโนไทป์ ที่ 3 คือไอโซเลทที่เก็บจากปมถั่วเขียว ก.พ.ส 2 และมากกว่าร้อยละ 70 ของไอโซเลททั้งหมดในกลุ่มจีโนไทป์ ที่ 4 และจำนวนไอโซเลททั้งหมดในกลุ่มจีโนไทป์ ที่ 5 พบว่าเป็นไอโซเลทที่เก็บจากปมถั่วเขียวก.พ.ส 1 แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าชนิดดินที่ต่างกันเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมได้มากกว่าสายพันธุ์พืช อย่างไรก็ตามไม่พบการแยกกันของไอโซเลทที่เก็บจากต่างช่วงเวลากัน แสดงให้เห็นว่าช่วงเวลาการตัดเก็บปมที่ต่างกันไม่ได้เป็นปัจจัยทำให้เกิดต่างแตกทางพันธุกรรม

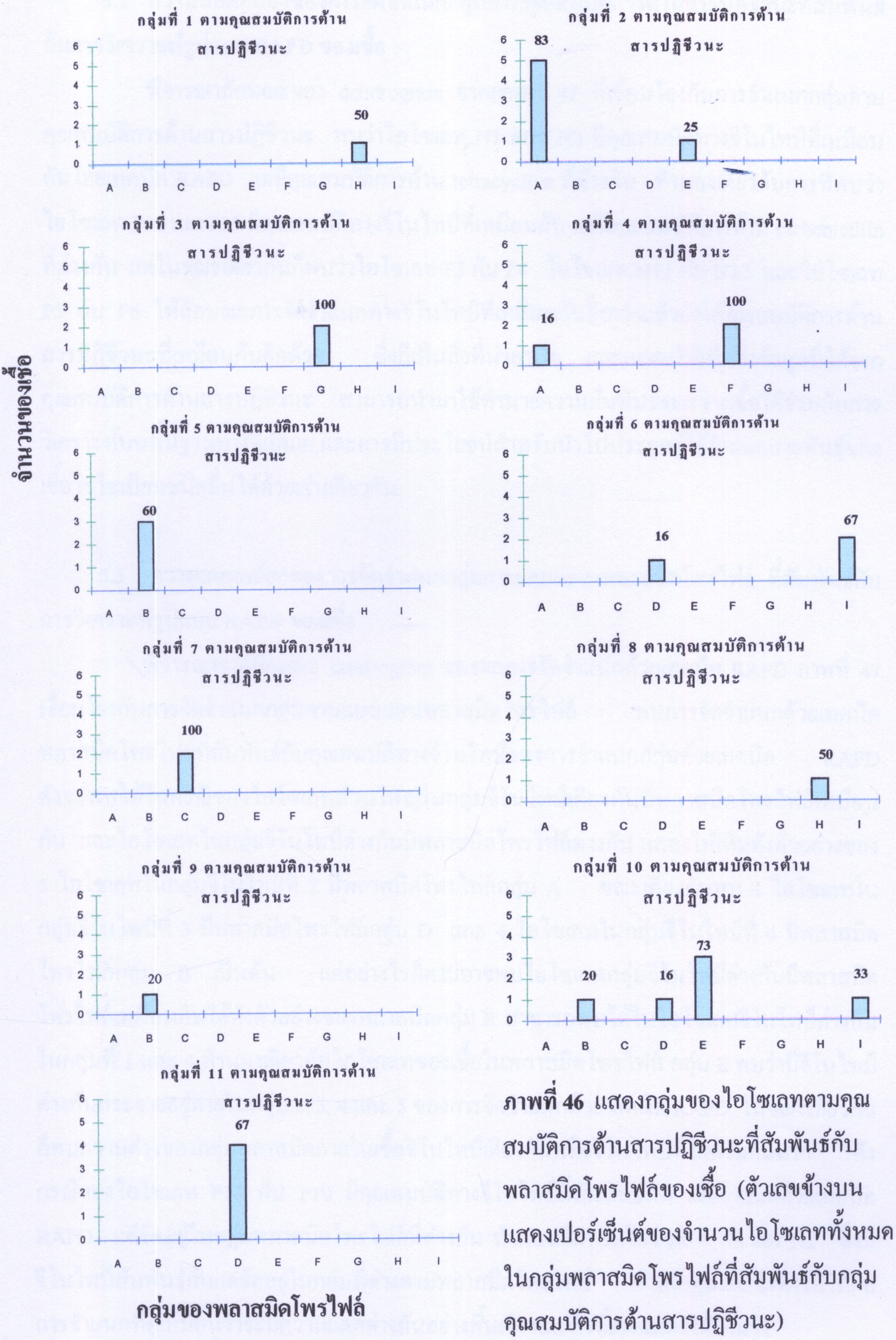


ภาพที่ 45 แสดงการจัดจำแนกกลุ่มไรโซเบียมถั่วเขียว 32 ไอโซเลทในลักษณะ dendrogram (โดยการวิเคราะห์ข้อมูลจาก 5 ไพรเมอร์)

5. เปรียบเทียบข้อมูลการจำแนกความแตกต่างของไรโซเบียมจาก 3 เทคนิค คือ พลาสมิดโพรไฟล์ คุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ และวิเคราะห์รูปแบบ RAPD

5.1 ความสอดคล้องของการจัดจำแนกกลุ่มตามคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ และแบบแผนพลาสมิดโพรไฟล์ของเชื้อ

พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท ได้เป็น 11 กลุ่มตามคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะและ 9 กลุ่มตามแบบแผนพลาสมิดโพรไฟล์ของเชื้อที่ต่างกันในส่วนของจำนวนและขนาด เมื่อคำนวณเป็นตัวเลขพบเกือบร้อยละ 70 ของไอโซเลททั้งหมด มีการจัดกลุ่มที่เหมือนการโดยพลาสมิดโพรไฟล์ และคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ พิจารณาได้จากหลายกรณีของการจำแนกกลุ่มตามคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่เชื่อมโยงกับกลุ่มพลาสมิดโพรไฟล์ที่จำเพาะ ดังแสดงในภาพที่ 46 พบ 5 ไอโซเลทของสมาชิกในพลาสมิดโพรไฟล์ กลุ่ม A ให้คุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่ตรงตามกลุ่มที่ 2 คิดเป็นร้อยละ 83 ของจำนวนไอโซเลททั้งหมดในพลาสมิดกลุ่ม A ทำนองเดียวกันกับการที่พบ 3 ไอโซเลทของสมาชิกในพลาสมิดโพรไฟล์กลุ่ม E ให้คุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่ตรงตามกลุ่มที่ 10 คิดเป็นร้อยละ 75 ของจำนวนไอโซเลททั้งหมดในพลาสมิดกลุ่ม E และคิดเป็นร้อยละ 67 ของจำนวนไอโซเลททั้งหมดในพลาสมิดกลุ่ม D ที่ให้คุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่ตรงตามกลุ่มที่ 11 เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามอาจพบคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะเดียวกันให้หลายกลุ่มพลาสมิดโพรไฟล์ที่ต่างกันก็ได้ ดังจะพบปรากฏการณ์นี้ภายในสมาชิกของ กลุ่มที่ 2 , 4 , 6 และ 10 ของการจัดจำแนกตามคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่ต่างกัน แสดงให้เห็นว่าเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์สามารถจำแนกความต่างของเชื้อที่มีคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะเดียวกันหรือมีคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ที่เหมือนกันออกจากกันได้



ภาพที่ 46 แสดงกลุ่มของไอโซเลทตามคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่สัมพันธ์กับพลาสมิดโพรไฟล์ของเชื้อ (ตัวเลขข้างบนแสดงเปอร์เซ็นต์ของจำนวนไอโซเลททั้งหมดในกลุ่มพลาสมิดโพรไฟล์ที่สัมพันธ์กับกลุ่มคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ)

5.2 ความสอดคล้องของการจัดจำแนกกลุ่มตามคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่สัมพันธ์กับการวิเคราะห์รูปแบบ RAPD ของเชื้อ

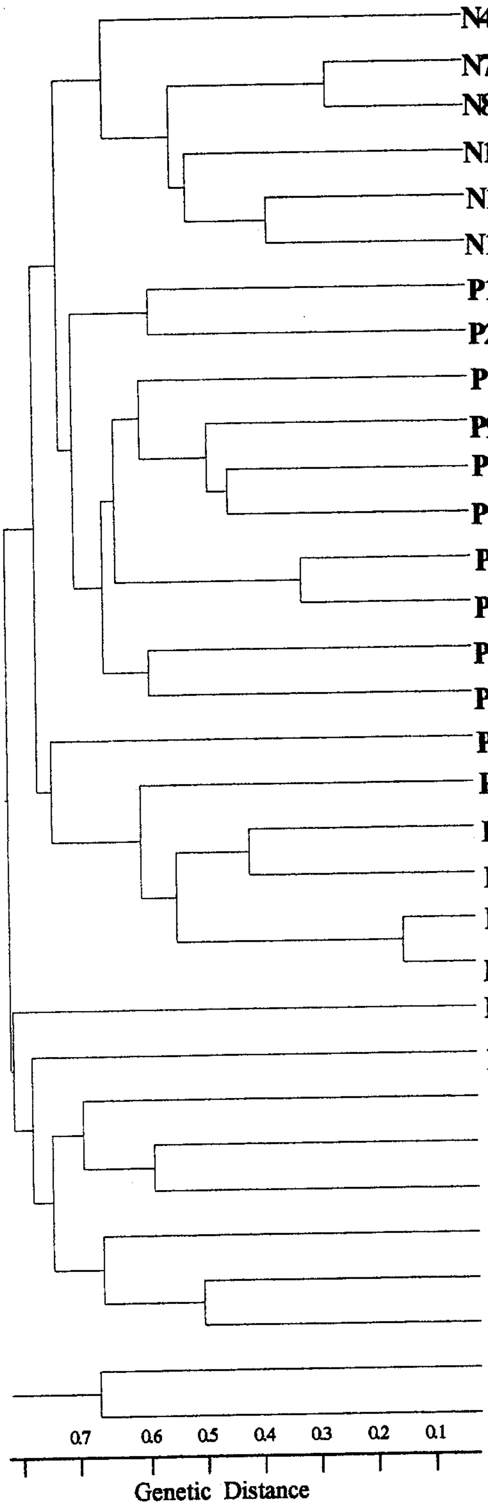
พิจารณาลักษณะของ dendrogram จากภาพที่ 47 ที่เชื่อมโยงกับการจำแนกกลุ่มตามคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ พบว่าไอโซเลท N1 และ N3 มีคุณสมบัติทางจีโนไทป์ที่เหมือนกันโดยเทคนิค RAPD แต่มีคุณสมบัติการต้าน tetracycline ที่ต่างกัน ทำนองเดียวกับการที่พบว่าไอโซเลท P10 และP13 มีคุณสมบัติทางจีโนไทป์ที่เหมือนกัน แต่มีคุณสมบัติการต้าน carbenicillin ที่ต่างกัน แต่ในขณะเดียวกันก็พบว่าไอโซเลท P3 กับ P4 ไอโซเลท N11 กับ N12 และไอโซเลท P5 กับ P6 ให้ลักษณะการจัดจำแนกทางจีโนไทป์ที่เหมือนกันยิ่งกว่าแล้วยังให้คุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่เหมือนกันอีกด้วย ซึ่งก็เป็นสิ่งที่น่าสนใจ และแสดงให้เห็นว่าข้อมูลที่ได้จากคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ สามารถนำมาใช้ทำนายความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อได้ร่วมกับการวิเคราะห์บนพื้นฐานทางดีเอ็นเอ และอาจมีประโยชน์สำหรับนำไปประยุกต์ใช้จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียมชนิดอื่นได้ด้วยเช่นเดียวกัน

5.3 ความสอดคล้องของการจัดจำแนกกลุ่มตามแบบแผนพลาสมิดโพรไฟล์ ที่สัมพันธ์กับการวิเคราะห์รูปแบบ RAPD ของเชื้อ

พิจารณาจากลักษณะ dendrogram ของผลการจัดจำแนกด้วยเทคนิค RAPD ภาพที่ 47 เชื่อมโยงกับการจัดจำแนกกลุ่มตามแบบแผนพลาสมิดโพรไฟล์ พบการจัดจำแนกด้วยเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์ที่สัมพันธ์กับคุณสมบัติทางจีโนไทป์ของการจำแนกกลุ่มด้วยเทคนิค RAPD ดังจะพบได้ในกรณีของไอโซเลทส่วนใหญ่ในกลุ่มจีโนไทป์เดียวกันมีพลาสมิดโพรไฟล์เหมือนกัน และไอโซเลทในกลุ่มจีโนไทป์ต่างกันมีพลาสมิดโพรไฟล์ต่างกัน แสดงให้เห็นดังตัวอย่างของ 5 ไอโซเลทในกลุ่มจีโนไทป์ที่ 2 มีพลาสมิดโพรไฟล์กลุ่ม A ขณะเดียวกันพบ 4 ไอโซเลทในกลุ่มจีโนไทป์ที่ 3 มีพลาสมิดโพรไฟล์กลุ่ม D และ 4 ไอโซเลทในกลุ่มจีโนไทป์ที่ 4 มีพลาสมิดโพรไฟล์กลุ่ม B เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามอาจพบไอโซเลทกลุ่มจีโนไทป์ต่างกันมีพลาสมิดโพรไฟล์เหมือนกันได้ดังตัวอย่างของพลาสมิดกลุ่ม B สามารถพบได้ในไอโซเลทจีโนไทป์ต่างกันในกลุ่มที่ 1 และ 4 ทำนองเดียวกับไอโซเลทของเชื้อในพลาสมิดโพรไฟล์ กลุ่ม E พบว่ามีจีโนไทป์ต่างกันกระจายอยู่ภายในกลุ่ม 2, 3, 4 และ 5 ของการจัดจำแนกด้วยเทคนิค RAPD ในขณะเดียวกันก็พบความต่างของกลุ่มพลาสมิดภายในเชื้อจีโนไทป์เดียวกันหรือจีโนไทป์ที่ใกล้ชิดกันมาก ดังกรณีของไอโซเลท P13 กับ P10 มีคุณสมบัติทางจีโนไทป์ที่สัมพันธ์กัน เมื่อจำแนกด้วยเทคนิค RAPD แต่จัดอยู่ในกลุ่มพลาสมิดโพรไฟล์ที่ต่างกัน ทำนองเดียวกับไอโซเลท N3 กับ N1 ซึ่งมีจีโนไทป์สัมพันธ์กันแต่จัดอยู่ในกลุ่มที่ต่างตามพลาสมิดโพรไฟล์ ด้วยเหตุนี้เอง จึงทำให้ได้ผลการจำแนกที่ดูเหมือนว่าจะมีความแตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง และสิ่งนี้เองแสดงให้เห็นว่า

พลาสมิดโพรไฟล์เป็นเทคนิคการจำแนกที่ให้ระดับความหลากหลายสูงกว่า RAPD ในบางกรณี ซึ่งเป็นสาเหตุของจุดเด่นประการสำคัญของเทคนิคนี้ที่ควรระวัง คือสามารถจำแนกไอโซเลทเชื้อจีโนไทป์ใกล้ชิดกันออกจากกันได้อย่างสิ้นเชิง จึงเป็นข้อเสียที่สำคัญมากของเทคนิคนี้หากเลือกมาใช้จัดจำแนกเพียงลำพังเทคนิคเดียว แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์ จะแสดงให้เห็นความหลากหลายภายในประชากรในระดับที่สูงมาก แต่ก็มีประโยชน์มากเช่นกันเมื่อนำมาวิเคราะห์ร่วมกับ RAPD จะสามารถจำแนกความแตกต่างของไอโซเลทจีโนไทป์ใกล้ชิดกันมากออกจากกันได้แล้วยังแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายที่เกิดภายในพลาสมิดกลุ่มเดียวกันอีกด้วย ซึ่งข้อมูลการจัดจำแนกจาก 2 เทคนิคนี้ สามารถนำมาใช้ยืนยันความสัมพันธ์ได้ร่วมกับคุณสมบัติฟีโนไทป์ของเชื้อ ตามรายงานของ Teaumroong และคณะ (1996) กล่าวว่า คุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่ต่างกัน สามารถนำมาใช้ยืนยันความสัมพันธ์และจำแนกความแตกต่างของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นเมื่อพิจารณาร่วมกับคุณสมบัติทางจีโนไทป์ ดังนั้นการทดลองนี้จึงเชื่อมผลการศึกษาคุณลักษณะการต้านสารปฏิชีวนะไว้ด้วยกันกับ dendrogram ดังภาพที่ 47

จากภาพที่ 47 แสดงผลการจัดจำแนกร่วมกันของทั้ง 3 เทคนิค ในรูปของ dendrogram ที่เชื่อมโยงกับการจำแนกกลุ่มตามแบบแผนพลาสมิดโพรไฟล์และคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ พบไอโซเลท N1 กับ N3 มีคุณสมบัติทางจีโนไทป์ที่สัมพันธ์กันโดยเทคนิค RAPD แต่ให้ผลการจัดจำแนกที่แตกต่างกันตามกลุ่มพลาสมิดโพรไฟล์ และคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะของเชื้อ ขณะเดียวกับการพบคุณสมบัติทางจีโนไทป์ต่างกันมีกลุ่มพลาสมิดโพรไฟล์ หรือคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่เหมือนกันได้ ดังจะพบปรากฏการณ์นี้ในกลุ่มจีโนไทป์ต่างกันของไอโซเลท P13 กับ N2 มีกลุ่มพลาสมิดโพรไฟล์ที่เหมือนกัน และกลุ่มจีโนไทป์ต่างกันของไอโซเลท P11 กับ N4 มีการจัดกลุ่มตามคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่เหมือนกัน แต่สิ่งที่น่าสนใจยิ่งที่พบในการทดลองนี้ คือ ความสัมพันธ์กันในลักษณะของผลที่คอมพลีเมนทารี (complementary) กันระหว่าง 3 เทคนิค ดังกรณีของไอโซเลท P12 กับ P16 มีคุณสมบัติทางจีโนไทป์ และกลุ่มของพลาสมิดโพรไฟล์ที่เหมือนกัน แต่ต้าน carbennicillin ต่างกัน ในขณะเดียวกันกับการพบไอโซเลท P5 กับ P6 และไอโซเลท P3 กับ P4 และ ไอโซเลท N7 กับ N8 มีจีโนไทป์ที่เหมือนกันยิ่งกว่าแล้วยังให้คุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่เหมือนกันอีกด้วย ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่ง และแสดงให้เห็นว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ สามารถนำมาใช้ยืนยันผลได้ร่วมกับคุณสมบัติทางจีโนไทป์ของเชื้อ จากการทดลองนี้เปรียบเทียบผลการจัดจำแนกของ 3 เทคนิค ยังพบข้อจำกัดของเทคนิคการจัดจำแนกที่ต่างกันและระดับความหลากหลายที่ตรวจพบภายในประชากรขึ้นอยู่กับเทคนิคที่เลือกใช้ โดยพบว่าพลาสมิดโพรไฟล์เป็นเทคนิคการจำแนกที่มีความสอดคล้องกับเทคนิค RAPD แต่ให้ความหลากหลายของการจัดจำแนกที่สูงกว่าในบางกรณี



ISOLATE	Plasmid group	CB	S	K	Te	RA	E	P
N4 (1/1st)	I	S	R	R	S	sm	R	R
N7 (2/2nd)	C	R	sm	R	sm	R	R	R
N8 (2/2nd)	C	R	sm	R	sm	R	R	R
N14 (1/4th)	B	R	R	S	sm	R	R	R
N12 (2/3rd)	F	R	R	S	S	R	R	R
N11 (2/3rd)	F	R	R	S	S	R	R	R
P1 (1/1st)	H	R	R	R	R	R	R	R
P2 (1/1st)	A	S	R	R	R	R	R	R
P14 (1/4th)	A	S	R	R	R	R	R	R
P9 (1/3rd)	I	S	R	sm	S	sm	R	R
P13 (1/4th)	E	S	R	R	S	sm	R	R
P10 (1/3rd)	D	R	R	R	S	sm	R	R
P3 (2/1st)	A	S	R	R	R	R	R	R
P4 (2/1st)	A	S	R	R	R	R	R	R
P7 (1/1st)	A	S	R	R	R	R	R	R
P15 (2/4th)	G	sm	R	R	S	R	R	R
P8 (2/2nd)	I	S	R	sm	S	sm	R	R
P11 (2/3rd)	E	S	R	R	S	sm	R	R
P16 (2/4th)	D	R	R	R	S	sm	R	R
P12 (2/3rd)	D	S	R	R	S	sm	R	R
P6 (1/2nd)	D	R	R	R	S	sm	R	R
P5 (1/2nd)	D	R	R	R	S	sm	R	R
N13 (1/4th)	E	S	R	R	S	sm	R	R
N10 (1/3rd)	D	S	R	sm	S	sm	R	R
N16 (2/4th)	G	sm	R	R	S	R	R	R
N6 (1/2nd)	B	S	R	R	S	sm	R	R
N15 (2/4th)	B	R	R	S	sm	R	R	R
N9 (1/3rd)	B	S	R	R	S	R	R	R
N3 (1/1st)	B	R	R	S	sm	R	R	R
N1 (1/1st)	A	R	R	S	S	R	R	R
N2 (1/1st)	E	S	R	R	R	R	R	R
N5 (1/2nd)	H	R	S	R	S	sm	R	R

ภาพที่ 47 จัดจำแนกกลุ่มไรโซเบียมถั่วเขียว 32 ไอโซเลทในรูปของ dendrogram เปรียบเทียบร่วมกับการจัดจำแนกกลุ่มตามพลาสมิดโพรไฟล์ และคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะของเชื้อ

สัญลักษณ์ในวงเล็บตัวแรก คือ 1= ถั่วเขียว ก.พ.ส1, 2= ถั่วเขียว ก.พ.ส2

สัญลักษณ์ในวงเล็บตัวที่สอง คือ 1st/ 2nd/3rd/4th=ช่วงเวลาการคัดเก็บตัวอย่างปมถั่วเขียวสำหรับใช้แยกเชื้อ คือ 7 กรกฎาคม 2541/ 12 ตุลาคม 2541/ 9 กุมภาพันธ์ 2542/ 17 เมษายน 2542 ตามลำดับ

มีประโยชน์มากเมื่อวิเคราะห์และจัดจำแนกร่วมกับเทคนิค RAPD จะช่วยลดข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นจากการจำแนกเพียงเทคนิคเดียว และยังแสดงให้เห็นถึงรายละเอียดของการจัดจำแนกภายในจีโนมที่เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย ในขณะที่เทคนิค RAPD สามารถใช้เป็นพื้นฐานของการจัดจำแนกไอโซเลทที่มีพันธุกรรมใกล้ชิดกันไว้ในกลุ่มเดียวกัน และจำแนกไอโซเลทที่มีความแตกต่างกันไว้ในกลุ่มที่ต่างกัน แต่มีข้อจำกัดตรงไม่สามารถแยกไอโซเลทที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมาก ๆ ออกจากกันได้ ดังนั้น เทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์ จึงควรนำมาใช้เสมือนเป็นเทคนิคประกอบร่วมกับการวิเคราะห์รูปแบบ RAPD ในกรณีที่ต้องการรายละเอียดของการจัดจำแนกภายในจีโนมที่มากยิ่งขึ้น ซึ่งนอกจากจะแสดงให้เห็นความหลากหลายที่เกิดภายในพลาสมิดกลุ่มเดียวกันแล้วยังสามารถแยกไอโซเลทของจีโนไทป์ใกล้ชิดกันมากออกจากกันได้อีกด้วย ซึ่งผลการจัดจำแนกทางจีโนไทป์เมื่อนำมาใช้ยืนยันความสัมพันธ์ร่วมกับคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ จะแสดงให้เห็นถึงความต่างของเชื้อที่มีคุณสมบัติทางฟีโนไทป์เดียวกัน ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการจัดจำแนก และแสดงให้เห็นความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการภายในประชากรของเชื้อที่ละเอียดมากยิ่งขึ้นได้

6. ผลการศึกษาความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม 32 ไอโซเลทจากพื้นที่โครงการฯ

ได้ทำการเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของพืชควบคู่กับการวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไนโตรจีเนสจากปมรากถั่วที่ได้จากต้นถั่วที่ปลูกในสภาพปลอดจากเชื้ออื่น ยกเว้นสายพันธุ์ของไรโซเบียมที่จะทดสอบเท่านั้น ซึ่งวิธีการนี้นอกจากเป็นการแสดงความโดดเด่นของไรโซเบียมสายพันธุ์หนึ่ง ๆ แล้วยังใช้เป็นมาตรฐานการคัดเลือกสายพันธุ์ด้วย

จากการนำเชื้อไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็วที่แยกได้จากทั้งหมดจำนวน 32 ไอโซเลท มาจัดกลุ่มมาตรฐานการตรึงไนโตรเจนด้วยหลักการอธิบาย ตามวิธีของ Vincent (1970) โดยน้ำหนักแห้งของต้นถั่วที่ได้รับการใส่เชื้อไรโซเบียมทั้ง 32 ไอโซเลท มีค่าสูงกว่าต้นถั่วที่ไม่ได้ใส่เชื้ออย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ จำนวนปม น้ำหนักปมแห้ง ยังมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเชื้อทั้ง 32 ไอโซเลทที่นำมาศึกษา แสดงดังตารางที่ 22 โดยจะไม่พบการสร้างปมบนต้นถั่วที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อ (control) (ภาพที่ 48D)

จากตารางที่ 22 เรียงลำดับตามน้ำหนักแห้งของต้นพืชที่ได้ จากการวิเคราะห์ทางสถิติเป็นมาตรฐาน พบว่าในการแบ่งกลุ่มที่ให้น้ำหนักแห้งสูง คือ อยู่ในช่วง 4.96-3.81 กรัมต่อต้น (ภาพที่ 48A ช่องที่ 1-12) และกลุ่มที่ให้น้ำหนักต้นแห้งปานกลางอยู่ในช่วง 3.68-2.50 กรัมต่อต้น (ภาพที่ 48A ช่องที่ 13-26) และกลุ่มที่ให้น้ำหนักต้นแห้งค่อนข้างต่ำอยู่ในช่วง 1.10-0.45 กรัมต่อต้น (ภาพที่ 48A ช่องที่ 27-33) เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักต้นแห้งกับจำนวนปม พบ

ความสัมพันธ์กันระหว่างน้ำหนักต้นแห้งกับน้ำหนักปมแห้งมากกว่าจำนวนปม โดยจะพบว่าไอโซเลทที่ให้น้ำหนักต้นแห้งสูงมีจำนวนปมที่เกิดอยู่ในระดับสูงในช่วง 91-61 ปมต่อต้นได้แก่ ไอโซเลท P3(1) P6(2) N5(3) P10(5) P14(6) และ P4(12) (ภาพที่ 48B ช่องที่ 1, 2, 3, 5, 6, 12) ส่วนไอโซเลทที่ให้น้ำหนักต้นแห้งสูง แต่มีจำนวนปมอยู่ในระดับปานกลางในช่วง 60-31 ปมต่อต้น ได้แก่ ไอโซเลท P15(4) N16(7) N3(8) P11(9) P12(11) (ภาพที่ 48B ช่องที่ 4, 7, 8, 9, 11) ส่วนไอโซเลทที่ให้น้ำหนักต้นแห้งสูง แต่มีจำนวนปมต่ำอยู่ในช่วง 26-13 ปมต่อต้น ได้แก่ ไอโซเลท P5(10) (ภาพที่ 48B ช่องที่ 10) ส่วนการทดลองที่ให้น้ำหนักต้นแห้งปานกลาง แต่มีจำนวนปมอยู่ในระดับสูง ได้แก่ ไอโซเลท N8(14) N11(15) N6(19) N4(22) P1(26) (ภาพที่ 48B ช่องที่ 14, 15, 19, 22, 26) ส่วนไอโซเลทที่ให้น้ำหนักต้นแห้ง และจำนวนปมอยู่ในระดับปานกลาง ได้แก่ ไอโซเลท N14(13) N15(20) P16(21) (ภาพที่ 48B ช่องที่ 13, 20, 21) ส่วนไอโซเลทที่ให้น้ำหนักแห้งปานกลางแต่มีจำนวนปมต่ำ ได้แก่ ไอโซเลท N7(16) N2(17) N1(18) P7(23) P8(24) P9(25) (ภาพที่ 48B ช่องที่ 16, 17, 18, 23, 24, 25) ส่วนไอโซเลทที่ให้น้ำหนักต้นแห้งต่ำ แต่มีจำนวนปมอยู่ในระดับปานกลาง ได้แก่ ไอโซเลท N10(27) P2(29) (ภาพที่ 48B ช่องที่ 27,29) ส่วนไอโซเลทที่ให้น้ำหนักต้นแห้งต่ำมีจำนวนปมต่ำ ได้แก่ ไอโซเลท N13(28) N9(30) N12(31) P13(32) (ภาพที่ 48B ช่องที่ 28, 30, 31, 32) เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักต้นแห้งกับน้ำหนักปมแห้ง พบว่าไอโซเลทที่ให้น้ำหนักต้นแห้งสูงมีน้ำหนักปมแห้งสูงอยู่ในช่วง 82.25-58.05 มิลลิกรัมต่อต้น ได้แก่ ไอโซเลท P3(1) P6(2) P15(4) P10(5) P14(6) N16(7) N3(8) P11(9) P5(10) P12(11) (ภาพที่ 48C ช่องที่ 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) ส่วนไอโซเลทที่ให้น้ำหนักต้นแห้งสูงมีน้ำหนักปมแห้งปานกลาง (52.00-30.05 มิลลิกรัมต่อต้น) ได้แก่ ไอโซเลท N5(3) P4(12) ส่วนไอโซเลทที่ให้น้ำหนักต้นแห้งปานกลางมีน้ำหนักปมแห้งสูง และปานกลางในช่วง 69.00-30.05 มิลลิกรัมต่อต้น ได้แก่ ไอโซเลท N14(13) N8(14) N11(15) N7(16) N2(17) N1(18) N6(19) N15(20) P16(21) N4(22) P7(23) P8(24) P9(25) P1(26) (ภาพที่ 48C ช่องที่ 13-26) ส่วนไอโซเลทที่ให้น้ำหนักต้นแห้งค่อนข้างต่ำมีน้ำหนักปมแห้งต่ำอยู่ในช่วง 13.00-9.50 มิลลิกรัมต่อต้น ได้แก่ ไอโซเลท N10(27) N13(28) P2(29) N9(30) N12(31) P13(32) (ภาพที่ 48C ช่องที่ 27-32)

ค่า ARA ที่แสดงถึง nitrogenase activity จากค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเชื้อทั้ง 32 ไอโซเลท ขณะเดียวกันพบน้ำหนักต้นแห้งมีความสัมพันธ์กับค่า ARA มากกว่าน้ำหนักปมแห้ง ดังจะเห็นว่าไอโซเลทส่วนใหญ่ที่มีน้ำหนักต้นแห้งสูงมีแนวโน้มให้ค่า ARA สูง (ภาพที่ 48D) แต่อย่างไรก็ตามอาจพบว่าไอโซเลทที่มีน้ำหนักต้นแห้งต่ำกลับมีค่า ARA ที่สูงกว่าไอโซเลทที่มีค่าน้ำหนักต้นแห้งสูงได้ ดังจะพบปรากฏการณ์นี้ในไอโซเลท P1 (ภาพที่ 47C ช่อง26) ซึ่งมีน้ำหนักต้นแห้งต่ำกว่าไอโซเลท N7(15) N11(16) N2(17)

(ภาพที่ 47C ช่องที่ 15-17) แต่กลับมีค่า ARA ที่สูงกว่าไอโซเลททั้ง 3 นอกจากนี้ยังพบอีกว่าน้ำหนักต้นแห้งเดียวกันอาจมีค่า ARA ที่แตกต่างกันก็ได้

จากการศึกษาตำแหน่งหรือบริเวณปมที่เกิดจากการใส่เชื้อทั้ง 32 ไอโซเลท แสดงดังภาคผนวก ซ มีอยู่ด้วยกัน 3 แบบ (ภาพที่ 49A-C) คือ แบบเกาะอยู่ที่รากแก้ว ได้แก่ ไอโซเลท P1 P9 N6 N12 เกาะกลุ่มอยู่ที่รากแขนง ได้แก่ ไอโซเลท P2 P7 P8 P13 P15 N1 N2 N3 N7 N10 N13 N15 เกาะกลุ่มอยู่ที่รากแก้วและรากแขนง อันได้แก่ ไอโซเลทที่เหลือทั้งหมด โดยจะพบไอโซเลทส่วนใหญ่ที่นำมาศึกษานี้ ให้ลักษณะการติดปมบริเวณส่วนของรากแขนงหรือรากแขนงกับรากแก้ว ซึ่งจะมีแนวโน้มที่ให้ค่า ARA และน้ำหนักต้นแห้งที่ค่อนข้างสูงกว่าไอโซเลทที่สร้างปมเพียงบริเวณรากแก้วเท่านั้น

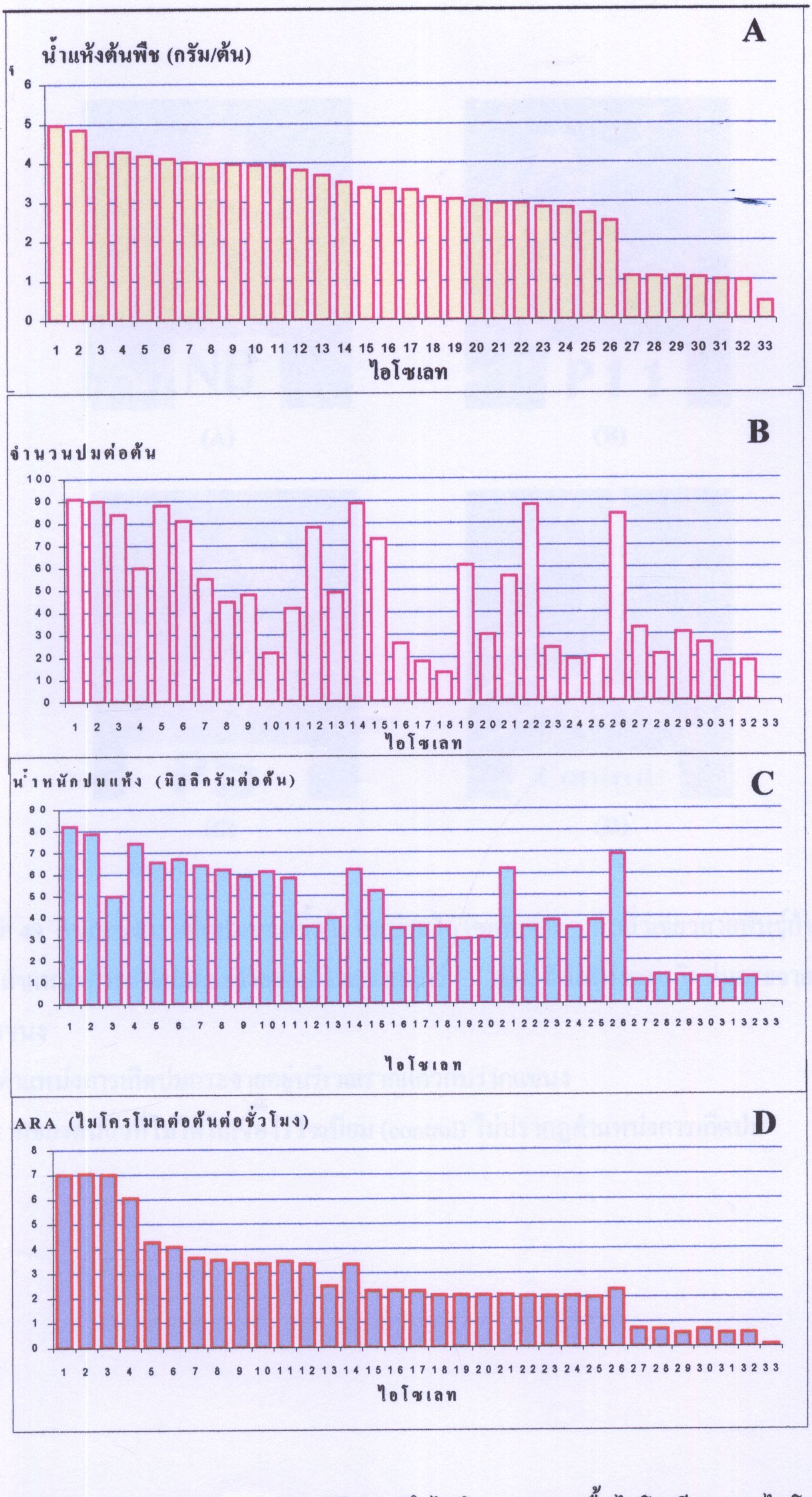
ตารางที่ 22 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของน้ำหนักต้นแห้ง จำนวนปม น้ำหนักปมแห้ง และ ARA ของต้นถั่วเขียว เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ 32 ไอโซเลทที่แยกจากดินในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้า อ. ครบุรี และป่าเบญจพรรณ ต.หนองระเวียง ร่วมกับถั่วเขียวสายพันธุ์ ก.พ.ส 2 โดยวิธี Leonard jar เก็บเกี่ยวพืชอายุ 40 วัน

No	ไอโซเลท	ตำแหน่งที่ติดปม	น้ำแห้งต้นพืช กรัมต่อต้น	ARA μmol/ plant/hr.	น้ำหนักปมแห้ง มิลลิกรัมต่อต้น	จำนวนปม
1	P3	รากแก้ว/แขนง	4.96 a	6.9863 a	82.25 a	91 a
2	P6	รากแก้ว/แขนง	4.84 a	7.0260 a	78.80 a	90 a
3	N5	รากแก้ว/แขนง	4.29 ab	6.9761 a	49.80 cb	84 a
4	P15	รากแขนง	4.28 ab	6.0555 a	74.35 a	60 b
5	P10	รากแก้ว/แขนง	4.17 b	4.2548 a	65.50 ab	88 a
6	P14	รากแก้ว/แขนง	4.11 b	4.0866 a	67.00 ab	81 a
7	N16	รากแก้ว/แขนง	4.01 b	3.6356 a	64.00 ab	55 b
8	N3	รากแขนง	3.98 b	3.5330 a	62.00 b	45 bc
9	P11	รากแก้ว/แขนง	3.96 b	3.4092 a	59.00 b	48 bc
10	P5	รากแขนง	3.94 b	3.3894 a	61.20 b	22 cd
11	P12	รากแก้ว/แขนง	3.94 b	3.4791 a	58.05 b	42 bc
12	P4	รากแก้ว/แขนง	3.81 b	3.3741 a	35.90 d	78 a
13	N14	รากแก้ว/แขนง	3.68 bc	2.4802 ab	39.80 cd	49 bc
14	N8	รากแก้ว/แขนง	3.51 bc	3.3525 a	62.00 b	89 a
15	N11	รากแก้ว	3.36 bc	2.2844 ab	52.00 cb	73 ab

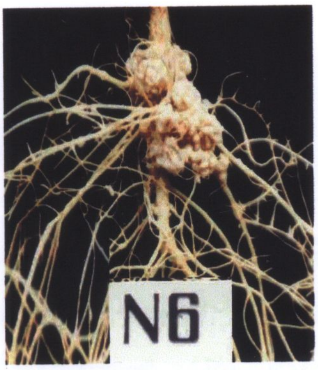
16	N7	รากแก้ว/แขนง	3.34 bc	2.2776 ab	35.05 d	26 cd
17	N2	รากแขนง	3.31 bc	2.2639 ab	35.90 d	18 cd
18	N1	รากแขนง	3.11 c	2.1056 ab	35.50 d	13 d
19	N6	รากแก้ว	3.07 c	2.1094 ab	30.05 d	61 ab
20	N15	รากแขนง	3.02 c	2.0996 ab	30.70 c	30 c
21	P16	รากแขนง	2.96 c	2.0838 ab	62.30 b	56 b
22	N4	รากแก้ว/แขนง	2.96 c	2.0606 ab	35.60 d	88 a
23	P7	รากแขนง	2.86 c	2.0376 ab	38.55 cd	24 cd
24	P8	รากแก้ว/แขนง	2.84 c	2.0639 ab	35.20 d	19 cd
25	P9	รากแขนง	2.71 cd	2.0159 ab	38.55 cd	20 cd
26	P1	รากแก้ว	2.50 d	2.3089 ab	69.00 ab	84 a
27	N10	รากแขนง	1.10 e	0.7306 ab	10.55 e	33 c
28	N13	รากแก้ว/แขนง	1.08 e	0.6941 ab	13.00 e	21 cd
29	P2	รากแขนง	1.08 e	0.5401 ab	12.50 e	31 c
30	N9	รากแขนง	1.06 e	0.6955 ab	12.00 e	26 cd
31	N12	รากแขนง	1.01 e	0.5397 ab	9.50 e	18 cd
32	P13	รากแก้ว	0.98 e	0.5583 ab	12.00 e	18 cd
33	control	-	0.35 f	0.0914 c	0.00 f	0.00 e

ARA = nitrogenase activity (µmol/ plant/hr.)

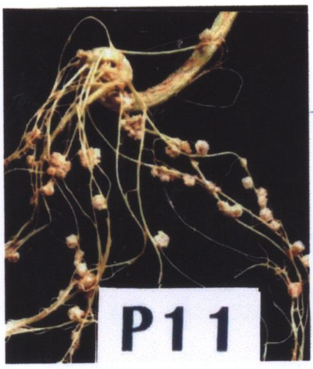
ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกัน ถือว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT



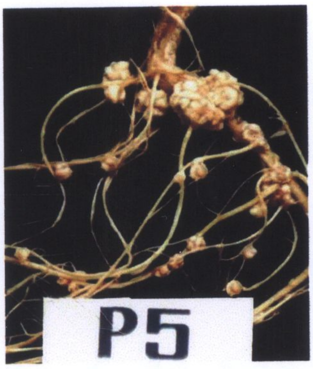
ภาพที่ 48 แสดงผลการทดสอบ 4 คุณสมบัติการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียม 32 ไอโซเลท ร่วมกับต้นถั่วที่ไม่ได้ใส่เชื้อ (control) (A) น้ำหนักแห้งต้นพืช (B) จำนวนปมต่อต้น (C) น้ำหนักปมแห้ง (D) Acetylene Reduction Assay (ARA)



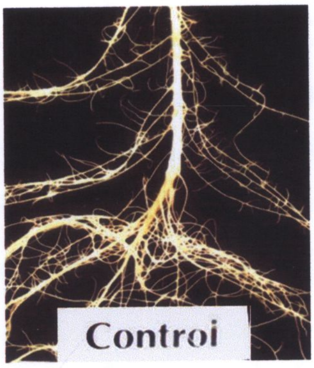
(A)



(B)



(C)



(D)

ภาพที่ 49 ตำแหน่งการเกิดปมของเชื้อไรโซเบียมไอโซเลทต่าง ๆ กับถั่วเขียวสายพันธุ์กำแพงแสน 2
(A) ตำแหน่งการเกิดปมกระจายอยู่บริเวณรากแก้ว ; (B) ตำแหน่งการเกิดปมกระจายอยู่บริเวณรากแขนง
(C) ตำแหน่งการเกิดปมกระจายอยู่บริเวณรากแก้วกับรากแขนง
(D) รากของต้นถั่วที่ไม่ได้ใส่เชื้อไรโซเบียม (control) ไม่ปรากฏตำแหน่งการเกิดปม

บทที่ 6
อภิปรายผลการศึกษา

ตอนที่ 1

1. การศึกษาปัจจัยทางกายภาพของดิน

ค่าความเป็นกรด–ด่างของดินในพื้นที่อยู่ในช่วง 5.8 – 7.36 ซึ่งเป็นช่วงที่เป็นกลางถึงกรดอ่อนๆ โดยทั่วไปแบคทีเรียส่วนใหญ่ในดินเจริญได้ดีในช่วง pH 6.5 ซึ่งมีสภาพเป็นกลางถึงกรดอ่อนๆ (ประกิตต์สิน สีหนนท์ 2540) ค่าความเป็นกรด – ด่างของพื้นที่ศึกษาโดยเฉลี่ยแล้วอยู่ในช่วง 6.1 – 6.9 และเนื่องจากแปลงศึกษาในพื้นที่ป่า อ. ครบุรี มีสภาพที่เป็นกลางสูงกว่า แปลงศึกษาในพื้นที่ป่า ต. หนองระเวียง จึงอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมให้ปริมาณไรโซเบียมในพื้นที่ป่า อ. ครบุรี มีมากกว่า ดังการทดลองนี้พบว่าปริมาณไรโซเบียมลดลงในทุกพื้นที่ในช่วงเดือนมีนาคม ปี 2542 ซึ่งเป็นช่วงที่ค่าความเป็นกรด–ด่างในพื้นที่ศึกษามีแนวโน้มเฉลี่ยสูงขึ้นใกล้เคียงกับความเป็นกลางมากที่สุด คือ 6.8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของปริมาณไรโซเบียมในดินอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญอีกหลายปัจจัยที่นอกเหนือจากค่าความเป็นกรด–ด่างของดิน

เปอร์เซ็นต์ความชื้นเฉลี่ยในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าครบุรี มีค่าสูงกว่าแปลงศึกษาในพื้นที่ป่าหนองระเวียง อาจเนื่องจากผลที่เกิดจากชนิดของดิน แปลงศึกษาในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าครบุรีลักษณะเนื้อดินละเอียด การยึดเกาะของเม็ดดินและโครงสร้างของดินมีความสามารถอุ้มน้ำได้ดีกว่าดินในพื้นที่ป่าหนองระเวียง ซึ่งมีลักษณะเนื้อดินเป็นดินทรายประกอบกับหลักความจริงที่ว่าอนุภาคของดินขนาดเล็กย่อมมีความสามารถอุ้มน้ำได้ดีกว่าดินขนาดใหญ่ หรือดินทราย (สมศักดิ์ วังใน, 2525) นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์ความชื้นที่มีค่าสูงในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าครบุรี อาจมีสาเหตุมาจากชนิดของประชากรพืชในป่าทุ่งหญ้าครบุรีมีระบบรากเป็นระบบรากฝอยทำให้มีโอกาสที่จะอุ้มน้ำได้มากกว่า โดยที่พื้นที่ป่าหนองระเวียงมีลักษณะป่าเป็นป่าเต็งรัง ชนิดของพืชส่วนใหญ่เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่และไม้พุ่มที่มีระบบรากลึกกว่า แต่ความสามารถอุ้มน้ำให้กับดินได้มากไม่เท่ากับระบบรากฝอย (วิฑูร ชินพันธุ์, 2537) ในช่วงเดือนมีนาคม 2542 เป็นช่วงที่มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่ำที่สุดเนื่องจากเป็นช่วงฤดูแล้ง แต่ความคาดเคลื่อนอาจเกิดขึ้นได้บ้างขณะการเก็บตัวอย่างเนื่องจากอิทธิพลของฝนที่ตกลงมาในช่วงเวลานั้น

เปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุเฉลี่ยในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าครบุรี มีค่าสูงกว่าพื้นที่ป่าหนองระเวียง อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากพื้นที่ทุ่งหญ้า อ. ครบุรี มีลักษณะป่าเป็นพื้นที่ป่าเปิดที่พึ่งจะเริ่มมีการพัฒนา และปรับปรุงฟื้นฟูสภาพ จึงทำให้ปริมาณความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

รวมถึงจุลินทรีย์ในดินมีน้อย ดังนั้น กิจกรรมในการย่อยสลายอินทรียวัตถุที่เกิดขึ้นในดินจึงมีน้อยตามไปด้วย มีผลทำให้เกิดการสะสมของปริมาณอินทรียวัตถุในดินมาก ซึ่งแตกต่างจากพื้นที่ป่าเบญจพรรณ ตำบลหนองระเวียง ลักษณะป่ามีการพัฒนามาเป็นเวลานานแล้ว การหมุนเวียนธาตุอาหารต่างๆกำลังเข้าสู่สภาวะสมดุลย์และเป็นวงจรใกล้ปิด จึงทำให้ปริมาณและความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตรวมถึงจุลินทรีย์กลุ่มตรึงไนโตรเจน และกลุ่มย่อยสลายในดิน มีมากกว่า เป็นเหตุผลให้กิจกรรมการย่อยสลายของอินทรียวัตถุในดินมีมากและเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วตามไปด้วย ทำให้มีการสะสมอินทรีย์วัตถุในดินต่ำ ธาตุอาหารส่วนใหญ่ที่ได้จากการย่อยสลายอินทรียวัตถุโดยจุลินทรีย์ในดินนั้น จะถูกลำเลียงส่งไปเก็บไว้ในรูปของเนื้อเยื่อพืช ซึ่งสิ่งนี้จะเป็นกลไกป้องกันการสูญเสียธาตุอาหารไปจากระบบนิเวศโดยการชะล้างของฝน และเมื่อใดที่ใบพืชเริ่มแก่ตัวร่วงลงมาทับถมกัน จะถูกย่อยสลายเป็นธาตุอาหารหมุนเวียนกลับคืนสู่ระบบนิเวศ และมีจำนวนน้อยที่ถูกชะล้างไปได้ด้วยการกัดเซาะ (Richards et al., 1994) นอกจากนี้การทดลองนี้ยังพบปริมาณอินทรียวัตถุมีค่าสูงในทุกพื้นที่ศึกษาในช่วงเดือนมกราคมปี 2542 เนื่องจากเป็นช่วงที่มีการร่วงหล่นของใบพืชบางชนิด มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและความยาวช่วงวันเริ่มเข้าฤดูหนาว อากาศเย็นทำให้กิจกรรมของจุลินทรีย์ในดินลดลง เป็นผลให้การสะสมของเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุมีมากขึ้น ปริมาณของอินทรียวัตถุที่สะสมในดินนี้ บ่งบอกถึงการมีแหล่งอาหารและการหมุนเวียนของธาตุอาหารเกิดขึ้นภายในดิน เมื่อใดที่ค่าเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุ และเปอร์เซ็นต์ความชื้นในดินมีค่าคงที่สม่ำเสมอ จึงจะแสดงว่าป่านั้นมีความอุดมสมบูรณ์ (ศรีศักดิ์ ธานี, 2540)

การศึกษาความสัมพันธ์ทางกายภาพดินบางประการที่มีผลต่อปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินนั้น จำเป็นต้องศึกษาจากหลายๆปัจจัยร่วม งานวิจัยนี้เลือกศึกษาเปอร์เซ็นต์ความชื้น เปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุ และค่าความเป็นกรด – ด่าง ซึ่งไม่เพียงพอที่จะเป็นตัวกำหนดปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินได้ ดังเช่น การที่พบว่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นและเปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุภายในดินบริเวณเส้นทางการสัญจรมีค่าสูงกว่าแปลงศึกษาในพื้นที่ป่าหนองระเวียง แต่ก็มิได้หมายความว่าปริมาณไรโซเบียมในบริเวณเส้นทางการสัญจรจะต้องมีค่ามากกว่า เพราะยังมีปัจจัยร่วมสำคัญอื่น ๆ ที่มีผลต่อปริมาณและการมีชีวิตรอดของไรโซเบียมในดินอีกมากมาย (สมศักดิ์ วังใน, 2525) อาทิเช่น ระบบการปลูกพืช อุณหภูมิ ปริมาณของก๊าซออกซิเจน และปริมาณของธาตุอาหารในดิน เป็นต้น (กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ในดิน, 2541)

2. การศึกษาปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดิน

การประเมินปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดิน ด้วยวิธี MPN – Plant infect technique เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและนิยมใช้กันมากในการตรวจนับปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดิน ซึ่งการประเมินปริมาณของเชื้อไรโซเบียมเฉพาะสายพันธุ์ ทำได้โดยใช้พืชทดสอบที่มีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของไรโซเบียมที่ต้องการศึกษา และเนื่องจากพืชส่วนใหญ่ในพื้นที่ศึกษาเป็นพืชในกลุ่ม cowpea ซึ่งมีอยู่มากมายหลายชนิด ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาปริมาณไรโซเบียมในกลุ่ม cowpea ในดินจากหลายพื้นที่ที่มีระบบการฟื้นฟูสภาพป่าที่ต่างกัน โดยใช้ถั่วเขียวเป็นพืชทดสอบ พบว่าปริมาณเชื้อไรโซเบียมกลุ่ม cowpea จากดินในพื้นที่โครงการศึกษามีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.88 – 6,541 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง โดยปริมาณไรโซเบียมมีมากในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้า อ. ครบุรี บริเวณแปลงที่มีการดำเนินงานปรับปรุงสภาพดินโดยการปลูกกล้าไม้ (GLP)หรือปลูกกล้าไม้ร่วมกับขุดคันดินกั้นน้ำ (GLDP) ซึ่งแตกต่างจากแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าทั้งหมดรวมไปถึงแปลงศึกษาในพื้นที่ป่าหนองระเวียง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาพความเป็นกลาง ปริมาณความชื้นและปริมาณอินทรียวัตถุในดินที่มีมากกว่า หรือเกี่ยวเนื่องกับหลายปัจจัยร่วมภายในดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดและปริมาณพืชที่ปลูก เนื่องจากไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียในดินที่มีวงชีวิตแบบพึ่งพาประกอบกับลักษณะพิเศษเฉพาะตัวในการเลือกที่จะเกิดปมกับถั่วแต่ละชนิดอย่างจำเพาะ จึงเป็นเหตุให้พบว่าแปลงที่มีการปลูกพืชจำพวกกล้าไม้ร่วมกับถั่วมะแฮะ ตรวจพบปริมาณไรโซเบียมในดินมากกว่าบริเวณอื่นที่ไม่มีการปลูกพืชหรือมีเพียงการปลูกพืชตระกูลหญ้าหรือพืชล้มลุกชนิดอื่นๆที่นอกเหนือจากพืชตระกูลถั่ว ดังเช่นการทดลองของ นันทกร และคณะ (2526) พบว่าระบบการปลูกพืชและอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรไรโซเบียมในดิน โดยในดินที่มีการปลูกพืชหลายชนิดร่วมกับพืชตระกูลถั่ว หรือดินแถบทุ่งหญ้าที่มีประชากรไรโซเบียมอยู่มากกว่าบริเวณที่ไม่มีการปลูกถั่วรวมถึงบริเวณว่างเปล่าที่ไม่มีการปลูกพืช ส่วนการที่พบว่าปริมาณไรโซเบียมเฉลี่ยต่ำสุดในบริเวณเส้นทางการสัญจร อาจเนื่องมาจากดินบริเวณนี้ไม่มีการปลูกพืช ลักษณะเนื้อดินเป็นดินเหนียว อากาศถ่ายเทไม่ดี ปริมาณออกซิเจนต่ำ เป็นผลให้การเจริญของแบคทีเรียในดินต่ำกว่าบริเวณที่มีการปลูกพืช ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อไรโซเบียมจะดำรงชีวิตอยู่ในดินได้ดีในสภาพที่มีการเพาะปลูก เพราะพืชจะช่วยปลดปล่อยสารอาหารสำหรับการเจริญของไรโซเบียม ดังที่ Starky และคณะ (1958) ได้รายงานว่ารากพืชมีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย เพราะบริเวณรอบรากพืชมีกรดอะมิโนหลายชนิดสะสม ที่เป็นปัจจัยช่วยกระตุ้นการเจริญ (growth factor) ของจุลินทรีย์ โดยกรดอะมิโนเหล่านี้อาจถูกปล่อยออกมาจากรากพืช หรือเกิดจากการเน่าสลายของชิ้นส่วนพืช หรือสังเคราะห์ขึ้นโดยจุลินทรีย์บริเวณราก ส่วนการที่พบว่าพื้นทุ่งหญ้าที่ปล่อยให้มีการเปลี่ยนแปลงสภาพเองตามธรรมชาติ (GLC) มีค่าเฉลี่ยของปริมาณไรโซเบียมอยู่ในระดับปานกลางไม่แตกต่างจากพื้นที่ป่าหนองระเวียง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพื้นที่เหล่านี้อาจมีพืชตระกูลถั่วชนิดต่าง ๆ ที่เจริญอยู่ได้เองตามธรรมชาติเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก และถั่วเหล่านี้สามารถเกิดปมได้

กับไรโซเบียมที่เป็นชนิดเดียวกันกับถั่วเขียวที่นำมาใช้เป็นพืชทดสอบ จึงทำให้พบว่าในดินบริเวณนี้ มีปรากฏการณ์ของไรโซเบียมกลุ่ม cowpea เกิดขึ้นได้ (นันทกร และคณะ, 2526) นอกจากนี้การที่พบปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินแต่ละบริเวณมีความแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากชนิดของดินที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกัน แม้ในดินใกล้เคียงกันยังมีความแตกต่างกันของสัดส่วนธาตุอาหารที่เปลี่ยนแปลงไปตลอดเวลา อย่างไรก็ตามปริมาณของเชื้อไรโซเบียมในดิน อาจใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ความอุดมสมบูรณ์ของดินได้ด้วยวิธีหนึ่ง ทั้งนี้เนื่องจากการดำรงชีวิตของเชื้อไรโซเบียมภายในดินมีหลายปัจจัยมาเกี่ยวข้อง อาทิเช่น การมีชีวิตรอดของเชื้อกับพืชอาศัย BoonKerd และ Weaver (1982) พบว่าการที่เชื้อไรโซเบียมจะมีชีวิตอยู่ในดินได้ดีเพียงใดขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความชื้นภายในดิน ซึ่งไรโซเบียมโดยทั่ว ๆ ไปจะไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในดินที่มีอุณหภูมิหรือความแห้งแล้งภายในดินสูงรวมถึงระบบของการเพาะปลูกก็อาจมีผลต่อการมีชีวิตรอดของไรโซเบียมภายในดินด้วย (Weaver et al., 1987) นอกจากนี้ ค่าความเป็นกรดของดิน สภาพความแห้งแล้งในแต่ละฤดูกาล สภาวะน้ำท่วมขังรวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศที่แปรปรวนในแต่ละปี มีผลทำให้เกิดการลดลงของปริมาณไรโซเบียมภายในดินด้วยกันทั้งสิ้น (Willing 1967 ; Day et al., 1978)

จากข้อมูลการวิจัยครั้งนี้นับว่ามีประโยชน์สำหรับการนำมาใช้เป็นแนวทางการปรับปรุงพื้นฟูสภาพป่า ว่าควรจะปรับปรุงด้วยวิธีใดต่อไป จำเป็นต้องปรับปรุงโดยใช้เชื้อไรโซเบียมร่วมกับการปลูกถั่วหรือไม่ แต่อย่างไรก็ตามบริเวณที่มีการตรวจพบปริมาณไรโซเบียมอยู่เป็นจำนวนมากก็ไม่อาจคาดได้ว่าไม่จำเป็นต้องใช้เชื้อไรโซเบียมในการปรับปรุงดิน ทั้งนี้ก็เพราะว่าถ้าดินแห่งนั้นมีไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนต่ำหรือไม่มีการตรึงไนโตรเจนเลยก็ย่อมไม่เกิดประโยชน์อะไร และจำเป็นต้องใช้เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งการคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีศักยภาพการตรึงไนโตรเจนสูงนั้น จำเป็นต้องศึกษาและทำการวิจัยเพื่อคัดแยกเชื้อในขั้นต่อไป

ตอนที่ 2

1. การแยกเชื้อ และทดสอบ presumptive – confirm rhizobia test

การจำแนกตามระบบ cross inoculation group ตาม Burgey's manual of Systematic Bacteriology และสมศักดิ์ วังใน (2540) กล่าวว่า เชื้อไรโซเบียมที่แยกจากปมรากถั่วเขียวประกอบด้วย 2 สกุล คือ *Bradyrhizobium sp.* และ *Rhizobium sp.* และ เนื่องจาก

ไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็วมีคุณสมบัติการมีพลาสมิดขนาดใหญ่ที่ควบคุมการเจริญแบบชีวสัมพันธ์ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้างวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ ในขณะที่ *Bradyrhizobium sp.* ไม่มีพลาสมิดดังกล่าว ซึ่งการจะจำแนกความแตกต่างระหว่างเชื้อ 2 ชนิดนี้ ทำได้โดยอาศัยความสามารถในการสร้างกรด- ด่างบนอาหาร YM ที่มีบรอมไทรมอลบูล เป็นอินดิเคเตอร์ (มีสีเขียว) โดยเชื้อไรโซเบียมจะมีคุณสมบัติในการสร้างกรดเปลี่ยนสีอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ในขณะที่เชื้อ *Bradyrhizobium* จะมีคุณสมบัติในการสร้างด่างเปลี่ยนสีอาหารจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน ตามรายงานของ Norris (1965) จัดไอโซเลทที่สร้างกรดเป็นพวก *Rhizobium* และไอโซเลทที่สร้างด่างเป็นพวก *Bradyrhizobium* นอกจากนี้แล้วอัตราการเจริญและขนาดของโคโลนีก็สามารถนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกสกุลของไรโซเบียมได้เช่นกัน ดังรายงานการวิจัยของ Lindstrom และคณะ (1983) และพรพรรณ จงสันติกุล (2528) ใช้ขนาดของโคโลนีและอัตราการเจริญเป็นเกณฑ์ในการจำแนกสกุลของไรโซเบียม โดยกำหนดให้ไอโซเลทที่สร้างโคโลนีภายในเวลา 5-10 วัน และมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่น้อยกว่า 1 มิลลิเมตร เป็น *Bradyrhizobium* และไอโซเลทที่สร้างโคโลนีได้ภายในเวลาเพียง 3 – 5 วัน และมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่มากกว่า 1 มิลลิเมตรเป็น *Rhizobium* ซึ่งสอดคล้องกับที่ระบุไว้ตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Jordon, 1984) ว่า *Rhizobium* เป็นกลุ่มเชื้อที่เจริญเร็ว ส่วน *Bradyrhizobium* เป็นกลุ่มเชื้อที่เจริญช้า ดังนั้น การที่ตรวจพบว่าเชื้อบริสุทธิ์ไรโซเบียมที่แยกมาได้นั้นมีคุณสมบัติตรงตามที่ได้กล่าวมาไว้แล้ว ประกอบกับเมื่อทดลองยืนยันคุณสมบัติการเข้าสร้างปมกับถั่วเขียวแล้วปรากฏว่าเชื้อไรโซเบียมดังกล่าวสามารถเข้าสร้างปมกับรากถั่วเขียวได้ ซึ่งก็เท่ากับเป็นการสนับสนุนว่าเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกมาได้นั้นเป็นเชื้อไรโซเบียมถั่วเขียวที่ต้องการจริง

2. การศึกษาคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ

การทดสอบความสามารถในการต้านสารปฏิชีวนะ 7 ชนิด ของเชื้อไรโซเบียมที่แยกได้จำนวน 32 ไอโซเลท พบลักษณะของการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน 11 รูปแบบจากลักษณะของการเกิด inhibition zone ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางที่ต่าง ๆ กัน ซึ่งการแปลผลและประเมินความสามารถในการต้านสารปฏิชีวนะของเชื้อแต่ละไอโซเลทในรูปของสัญลักษณ์ R (resistant) แสดงว่าเชื้อนั้นต้านต่อสารปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบ และในรูปของสัญลักษณ์ S (sesceptible) แสดงว่าเชื้อนั้นไม่ต้านต่อสารปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบและในรูปของสัญลักษณ์ sm (intermediate) แสดงว่าเชื้อนั้นมีการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะชนิดนั้นแบบกึ่งต้านกึ่งตอบสนองซึ่งการที่พบว่าเชื้อไรโซเบียมทั้ง 32 ไอโซเลท มีความสามารถต้าน pennicilin และ erythromycin ได้เหมือนกัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อไรโซเบียมที่แยกได้จากถั่วเขียวนี้มียีนที่ต้านต่อ pennicilin และ erythromycin

ที่เหมือนกัน นอกจากนี้พบคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะชนิดอื่นมีความแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลท ซึ่งลักษณะการต้านสารปฏิชีวนะที่แตกต่างกันระหว่างไอโซเลทสามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ (maker) และแยกความแตกต่างของเชื้อชนิดเดียวกันออกจากกันได้ ดังงานวิจัยของ Cole และ Ekan (1973) กล่าวว่า คุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่ต่างกัน สามารถนำมาใช้เป็นมาตรฐานในการแยกสายพันธุ์ของเชื้อได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ และอาจนำมาซึ่งความเข้าใจถึงความผันแปรที่เกิดขึ้นเสมอๆในธรรมชาติ โดยที่รูปแบบการต้านสารปฏิชีวนะจะมีความจำเพาะสูงในแต่ละสายพันธุ์ ประกอบกับงานวิจัยของ Teaumroong และคณะ (1996) กล่าวว่าคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ของเชื้อบนพื้นฐานการต้านสารปฏิชีวนะที่ต่างกันในแต่ละไอโซเลท สามารถนำมาใช้เป็นเทคนิคประกอบ เพื่อยืนยันผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อร่วมกับเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลได้ ดังนั้น การทดลองนี้จึงนำข้อมูลที่ได้มายืนยันผลร่วมกับพลาสมิดโพรไฟล์ และเทคนิค RAPD

3. การศึกษาพลาสมิดโพรไฟล์

การศึกษาทางพันธุกรรมและการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็วส่วนใหญ่มักเป็นการศึกษาและวิเคราะห์จากแบบแผนพลาสมิด ซึ่งเชื่อกันว่ามีความสำคัญมากเนื่องจากบนพลาสมิดขนาดใหญ่ของไรโซเบียมบรรจุยีนที่ควบคุมการเจริญแบบชีวสัมพันธ์ที่สำคัญหลายลักษณะ ที่สามารถนำมาใช้จำแนกความแตกต่างของเชื้อไรโซเบียมชนิดเดียวกันออกเป็นหลายกลุ่มย่อย ตามรายงานของ Bromfield และคณะ (1987) พบความหลากหลายของพลาสมิดที่เกิดขึ้นในประชากรไรโซเบียมชนิดเดียวกัน ซึ่งปรากฏออกมาในลักษณะของการมีพลาสมิดโพรไฟล์ที่ต่างกันในแง่ของจำนวนและขนาด ประกอบกับการทดลองของ Laguerre และคณะ (1992) ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียมชนิดเดียวกัน โดยการวิเคราะห์จาก 3 เทคนิค คือ วิเคราะห์จากพลาสมิดโพรไฟล์ วิเคราะห์จากรูปแบบดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ (total DNA restriction) และวิเคราะห์จาก RFLP ของ 2 บริเวณบนโครโมโซม พบระดับความเหมือนที่จำเพาะบางส่วนจากผลการวิเคราะห์ร่วมกันทั้ง 3 เทคนิค ให้ผลที่สอดคล้องกันมากกว่า 80% ของจำนวน ไอโซเลททั้งหมด โดยกำหนดให้ระดับของผลการวิเคราะห์ที่เหมือนกันทั้งหมดเป็นระดับชนิด (type) และเหมือนกันบางส่วนเป็นระดับกลุ่ม (class) พบความไม่สอดคล้องกันระหว่าง 2 เทคนิคในระดับชนิด แต่ไม่พบในระดับกลุ่ม ซึ่งการที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์เป็นเทคนิคการจัดจำแนกที่ให้ระดับความหลากหลายสูง จึงเป็นสาเหตุให้พบพลาสมิดโพรไฟล์ต่างกันเกิดขึ้นภายในโครโมโซมจีโนไทป์เดียวกันได้ แต่อย่างไรก็ตามข้อเสียของเทคนิคพลาสมิดนี้เองจะเป็นประโยชน์อย่างมากหากนำมาใช้จำแนกหรือศึกษาร่วมกับเทคนิค RFLP ซึ่งจะสามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ที่มีวิวัฒนาการใกล้ชิดกันมาก

ออกจากกันได้ ดังนั้น การทดลองนี้จึงนำเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์มาใช้เสมือนเป็นเทคนิคประกอบร่วม (complementary technique) กับผลการวิเคราะห์โดยเทคนิค RAPD

4. การศึกษาและวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RAPD

4.1 การสกัดแยกโครโมโซมัลดีเอ็นเอจากไรโซเบียม

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากไรโซเบียม ตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Arachara และคณะ (1997) สามารถให้ผลผลิตดีเอ็นเอสายยาวไม่ฉีกขาดและมีคุณภาพดีเพียงพอ การที่ได้ผลผลิตดีเอ็นเอที่เป็นสายยาวไม่ฉีกขาดนี้มีโอกาสที่จะได้ยีนต่าง ๆ ที่อยู่บนจีโนมครอบคลุมครบทั้งจีโนมและดีเอ็นเอที่ได้นี้ มีความสะอาด ซึ่งคุณภาพดีพอที่นำไปใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม โดยอาศัยปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอนต่อไป

4.2 สภาวะและปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย PCR

การศึกษาสภาวะและปฏิกิริยาของ PCR ที่เหมาะสมในการทดลองนี้ ได้ทำการทดลองศึกษาหาอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนการทำ annealing เป็นลำดับแรกตามที่ ดร.วิไล หนุนภักดี (2528) กล่าวว่า อุณหภูมิที่สำคัญที่สุดที่ต้องระมัดระวัง คือ annealing temperature ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งหากใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณเบสคู่สมจะไม่เกิดขึ้น และหากอุณหภูมิต่ำเกินไปการจับกันของเบสคู่สมอาจไม่เที่ยงตรงและมีการจับคู่กันที่ผิด (mismatch) เกิดขึ้น ดังนั้นการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอนของ annealing จึงเป็นสิ่งที่ควรกระทำเป็นอย่างแรก ลำดับรองมาคือการศึกษาหาองค์ประกอบ 2 อย่างที่มีอิทธิพลอย่างมากต่อรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ คือ ปริมาณเอนไซม์ Ampli Taq DNA Polymerase และ ปริมาณ $MgCl_2$ ซึ่งผลจากการทดลองที่ได้นี้พบว่าการใช้เอนไซม์และ $MgCl_2$ ในระดับที่ใกล้เคียงกันจะไปมีผลต่อความเข้มและความจางของแถบดีเอ็นเอที่ต่าง (distinct band) กับปรากฏการณ์เกิด หรือไม่เกิดของแถบดีเอ็นเอแถบจาง (minor band) เท่านั้น โดยผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ ศุภกิจ สอนประจักษ์ (2539) โดยที่ Eckert และคณะ (1991) ได้ทำการทดลองและให้คำแนะนำไว้ว่า ประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เกิดขึ้นจะให้ผลดีหรือแม่นยำเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมกับปริมาณเอนไซม์ Ampli Taq DNA polymerase เนื่องจากแมกเนเซียมไอออนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ (co-factor) ที่ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้แล้วแมกเนเซียมไอออนยังสามารถเข้าไปจับ (bound) กับดีเอ็นเอต้นแบบ ดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่

ไพรเมอร์ และ dNTPs ได้ในเวลาเดียวกัน ดังนั้น การทำปฏิกิริยา PCR ให้ได้ผลดีนั้นจำเป็นต้องหาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมด้วย นอกจากนี้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ก็ควรให้เหมาะสมกับปริมาณ $MgCl_2$ และปริมาณ Ampli Taq DNA polymerase ที่ใช้ด้วย ซึ่งถ้าหากความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้น้อยเกินไป อาจทำให้ได้ผลผลิตดีเอ็นเอที่น้อยหรือมีผลทำให้เกิดผลผลิตแถบจางของดีเอ็นเอหลัก (major band) หรือเกิดการสูญหายของแถบดีเอ็นเอที่สำคัญบางแถบ แต่หากความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้มากเกินไปแล้วอาจทำให้ได้แถบดีเอ็นเอผลผลิตที่ไม่จำเพาะเจาะจง (non specific band) เพิ่มมากขึ้นด้วย สำหรับสภาวะและปฏิกิริยาที่ได้จากการทดลองนี้มีข้อควรพึงระวังในการนำไปใช้ ทั้งนี้เนื่องมาจาก PCR เป็นวิธีที่มีความไวสูง (high sensitivity) ดังนั้นเงื่อนไขทุกประการจะต้องตรงกับที่ระบุไว้ คือ

- ความเข้มข้นเริ่มต้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ต้องเท่ากันตลอดการทดลอง ซึ่งถ้าหากความเข้มข้นของดีเอ็นเอเปลี่ยนไปจะมีผลทำให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอเปลี่ยนไปด้วยแม้ว่าองค์ประกอบอื่น ๆ ของปฏิกิริยาจะคงที่ก็ตาม ดังที่ศุภกิจ สอนประจักษ์ (2539) อ้างถึงผลการทดลองของ Weeden และคณะ (ไม่ปรากฏปีพิมพ์) ว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นมีผลกระทบต่อรูปแบบลายพิมพ์ ดีเอ็นเอที่ได้
- เครื่องที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal cycler) จากบริษัทต่างกันก็จะให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากประสิทธิภาพในการเพิ่มและการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ซึ่งจะไปมีผลต่อการจับของไพรเมอร์กับสายดีเอ็นเอต้นแบบ และยังมีผลต่อช่วงระยะเวลาที่เอนไซม์จะทำงานให้ได้ประสิทธิภาพที่สูงสุด ดังนั้น การรายงานสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR จะต้องระบุชนิดและรุ่นของเครื่องเสมอ

4.3 ผลการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมของไรโซเบียมถั่วเขียว

จากผลการทดสอบไพรเมอร์ จำนวน 7 ชนิด พบไพรเมอร์จำนวน 5 ชนิดที่เหมาะสมซึ่งสามารถให้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอที่หลากหลายของเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทที่นำมาทดสอบได้ ซึ่งการที่พบว่าแต่ละไพรเมอร์ให้ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่หลากหลาย สามารถนำมาใช้บอกระดับความเหมือนหรือความต่างกันระหว่างไอโซเลทของเชื้อชนิดเดียวกันได้ การที่พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 5 ชนิดนี้ให้ค่าของตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนต่างกันเมื่อพิจารณาภายในเชื้อไอโซเลทเดียวกัน ก็อาจเนื่องมาจากไพรเมอร์ทั้ง 5 มีลำดับเบสที่ต่างกัน จึงทำให้ตำแหน่งที่เป็นเบสคู่สมที่ไพรเมอร์สามารถเข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อได้แตกต่างกัน ดังนั้น เมื่อดีเอ็นเอถูกเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยา PCR จึงทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีขนาดและปริมาณแตกต่างกันไปด้วย ในขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาระหว่างเชื้อที่ต่างไอโซเลทกันพบว่าไพรเมอร์แต่ละชนิดให้ค่าของตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันอีกด้วย เนื่องจากเหตุผลที่คล้ายคลึงกัน คือ

เชื้อต่างไอโซเลทกันมีลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เป็นผลให้ไพรเมอร์เข้าไปจับกับตำแหน่งที่เป็นเบสคู่สมได้ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน จึงทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีขนาดและปริมาณแตกต่างกัน

4.4 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอของไรโซเบียมโดยเทคนิค RAPD

รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้เทคนิค RAPD ดังผลการทดลองข้อ 4.4 จะเห็นได้ว่ามีรูปแบบที่ซับซ้อนน้อยกว่าการจัดจำแนกโดยวิธีอื่น ๆ เช่น RFLP, AFLP (Amplified Fragment length Polymorphism) และ Pulseld Field Gel Electrophoresis (PFGE) เป็นต้น ซึ่งวิธีต่าง ๆ เหล่านี้ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความละเอียดสูง คือ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอมาก ซึ่งบางตำแหน่งก็ไม่ได้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่สำคัญต่อการจำแนกชนิดหรือสายพันธุ์ ทำให้เกิดความยุ่งยากในการวิเคราะห์ผลโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ไม่มีเครื่องมือมีประสิทธิภาพเพียงพอที่ช่วยในการวิเคราะห์ (เช่น computer software และอุปกรณ์ที่ช่วยในการอ่านค่า M.W. ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ) อาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้ง่าย แต่สำหรับวิธี RAPD นี้จะเห็นได้ว่ารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ จะให้ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอไม่มากเท่ากับวิธี ต่าง ๆ ดังกล่าวและไม่น้อยจนเกินไปจนกระทั่งไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะใช้ในการจำแนกสายพันธุ์เชื้อ การวิเคราะห์ผลจึงทำได้ง่ายและสะดวกกว่า โอกาสที่จะเกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ผลจึงมีน้อย แต่อย่างไรก็ตามการค้นคว้าข้อมูลและจากรายงานต่าง ๆ ในเรื่องของจำนวนแถบดีเอ็นเอบางแถบที่ใช้เป็นเครื่องหมายที่สำคัญที่เกิดขึ้นนี้ ยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนว่าจำนวนตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เกิดขึ้นควรมีเท่าใด จึงจะเหมาะสมแต่ก็มีข้อเสนอแนะไว้ว่าควรดูจากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอหลากหลายที่เกิดขึ้นนี้ว่าสามารถที่จะทำให้บรรลุวัตถุประสงค์ได้หรือไม่ คือ แยกความแตกต่างระหว่างชนิดและบอกระดับความเหมือน หรือความต่างภายในประชากรชนิดเดียวกันได้หรือไม่

นอกจากนี้เทคนิค RAPD ยังสามารถนำมาใช้เป็นเทคนิคพื้นฐานสำหรับการจัดจำแนกและทำนายความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ หรือสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะพิเศษได้หากมีการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม คือ ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตทั้ง 2 ชนิด ที่สนใจออกจากกันได้ โดยพิจารณาจากผลผลิตของแถบดีเอ็นเอบางแถบที่มีความจำเพาะกับสิ่งมีชีวิตบางชนิดหรือบางพันธุ์นั้นเอง

4.5 การจำแนกความแปรปรวนทางพันธุกรรมของไรโซเบียมจากการวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอ

จากผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 32 ไอโซเลท ที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์สายเดียวที่ต่างกัน 5 ชนิดนั้น พบว่าแต่ละไพรเมอร์ให้ผลผลิตของแถบดีเอ็นเอในจำนวน และตำแหน่งที่ต่างกันไปตามแต่ละชนิดของไพรเมอร์ ดังแสดงในตารางที่ 19 ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากไพรเมอร์แต่ละชนิด จะไปสุ่มจับและเพิ่มปริมาณ (random amplified) ณ ตำแหน่งที่ต่างกันบนสายดีเอ็นเอ ซึ่งก็แล้วแต่ว่าลำดับเบสบริเวณใดบ้างบนสายดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเบสคู่สม (complementary) กับไพรเมอร์ชนิดนั้น ๆ เป็นผลให้ได้ตำแหน่งและจำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ต่างกันในเชื้อชนิดเดียวกัน ส่วนการที่ต้องมีการใช้ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เกิดจากไพรเมอร์ทั้ง 5 ชนิดมารวมกันในการสรุปผลก็เนื่องมาจาก ตามหลักการทางสถิติ พบว่าการใช้ไพรเมอร์หนึ่งไพรเมอร์ใดในการสรุปผลนั้นอาจให้ข้อสรุปที่ผิดพลาดได้ ทั้งนี้เนื่องจากไพรเมอร์นั้นๆอาจจะไปสุ่มจับบนสายดีเอ็นเอกระจายหนักไปทางด้านใดด้านหนึ่งของจีโนม ในกรณีเช่นนี้อาจทำให้ส่วนที่ไม่ถูกสุ่มจับไม่ได้รับการตรวจสอบโดยไพรเมอร์นั้นเป็นผลทำให้ยีนที่อยู่บริเวณดังกล่าว ซึ่งอาจเป็นยีนที่สำคัญหรือยีนเด่นของเชื้อสายพันธุ์นั้น ๆ ไม่ได้รับการตรวจสอบผล คือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สำคัญบางตำแหน่งขาดหายไป ดังนั้น การสรุปผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี RAPD นี้จำเป็นต้องมีการใช้ไพรเมอร์มากกว่า 1 ชนิด เพื่อเพิ่มความมั่นใจว่าได้ข้อสรุปมาจากการวิเคราะห์ทั้งหมดภายในจีโนม อย่างแท้จริง ซึ่งจะแสดงออกมาให้เห็นในรูปของความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยผลที่ได้จากการทดลองนี้ พบว่าความผันแปรทางพันธุกรรมที่ต่างกันส่วนใหญ่เกิดเนื่องจากชนิดของดิน แต่การที่พบว่าไอโซเลทที่แยกจากดินชนิดเดียวกันมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม อาจได้รับอิทธิพลจากสภาวะแวดล้อมในลักษณะการมีสิ่งกีดขวางการแลกเปลี่ยนยีนหรือการแยกกันทางภูมิศาสตร์และจีโนไทป์ของพืชอาศัย ดังที่ Paffett และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อไรโซเบียมที่แยกจาก *Medicago sativa* 4 สายพันธุ์ ที่ปลูกในดิน 2 บริเวณที่มีความต่างกันทางภูมิศาสตร์ พบข้อสรุปของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นภายในประชากรไรโซเบียมชนิดเดียวกัน เนื่องมาจากอิทธิพลของสายพันธุ์พืช และชนิดของดินที่ต่างกันเป็นปัจจัยสำคัญ ซึ่งก็สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบว่าความแตกต่างหรือความผันแปรทางพันธุกรรมส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นภายในประชากรของเชื้อไรโซเบียม มีผลเนื่องมาจากชนิดของดินและสายพันธุ์พืช โดยชนิดของดินที่ต่างกันเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมได้มากกว่าสายพันธุ์พืช นอกจากนี้คุณสมบัติการมีพลาสมิดขนาดใหญ่ก็เป็นปัจจัยร่วมที่สำคัญมากอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลทำให้เกิดวิวัฒนาการที่แตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากรไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็ว ดังรายงานการศึกษาของ Brom และคณะ (1991) พบความหลากหลายในระดับความถี่สูงของการเกิด rearrangement บนพลาสมิดขนาดใหญ่ของเชื้อไรโซเบียมในลักษณะของการเกิด amplification, deletion, cointegration และการสูญหายของ

พลาสมิดรวมไปถึงอิทธิพลของการถ่ายโอนพลาสมิด (plasmid transfer) และ recombination ที่พบว่าเกิดขึ้นได้เสมอในประชากรธรรมชาติ (Paffett et al., 1996) นอกจากนี้ความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อไรโซเบียม อาจได้รับอิทธิพลจากสภาวะแวดล้อมภายนอก หรือโดยเฉพาะอย่างยิ่งสภาวะการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่จะเกิดขึ้นได้ทั้งภายในและภายนอกของพืชอาศัย (Romero et al., 1991) มีผลให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็ว ในระดับความถี่สูง ซึ่งข้อมูลการศึกษาปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลทำให้เกิดความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตบางชนิดมีประโยชน์ต่อการอนุรักษ์ทรัพยากรและความหลากหลายทางชีวภาพเป็นอย่างยิ่ง ตามรายงานของ ดร. วิสุทธิ์ ใบไม้ (2530) กล่าวว่า ข้อมูลการศึกษาปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลทำให้เกิดความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด อาจนำมาซึ่งคำตอบและแนวทางการจัดการกับสภาพความหลากหลายทางชีวภาพในท้องถิ่นเหล่านั้นให้คงอยู่ต่อไปได้อีกด้วย เมื่อพิจารณาจากค่าของระยะห่างทางพันธุกรรม พบว่าไอโซเลทที่แยกได้จากดินเดียวกันมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากกว่าไอโซเลทที่แยกได้จากดินที่ต่างชนิดกัน แต่การที่พบว่าไอโซเลทที่แยกจากดินเดียวกัน มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอาจเนื่องมาจากหลายปัจจัยภายในดินที่สำคัญ เช่น การแยกทางภูมิศาสตร์ และจีโนไทป์ของพืชอาศัย รวมไปถึงคุณสมบัติการมีพลาสมิดในจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้างวิวัฒนาการของประชากรไรโซเบียม กลุ่มเจริญเร็วโดยพลาสมิดสามารถเกิดกระบวนการจัดเรียงตัวใหม่ของยีนหรือการแลกเปลี่ยนยีนได้ในระดับความถี่สูง มีผลให้เกิดจีโนไทป์ใหม่ ๆ ในแต่ละ generation แม้ว่า tree dendrogram จะไม่แสดงให้เห็นถึงวิวัฒนาการ โดยตรงแต่ก็แสดงความสัมพันธ์ในเชิงที่ยอมรับได้ ซึ่งเมื่อข้อมูลถูกแสดงออกมาในรูปของ dendrogram ก็จะสามารถตรวจพบความแตกต่างที่เกิดขึ้นภายใน ประชากรได้ง่ายยิ่งขึ้น

4.6 เปรียบเทียบผลการจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อ จากการพิจารณาจาก 3 พื้นฐาน คือ พลาสมิดโพรไฟล์ คุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ และรูปแบบ RAPD

การพิจารณาคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ของเชื้อเป็นหลักในการจัดจำแนก อาจมีอิทธิพลจากสภาวะแวดล้อมภายนอกเข้ามาเกี่ยวข้อง จึงทำให้มีความไม่แน่นอน หรือมีความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นได้ง่าย ซึ่งก็อาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้พบข้อผิดพลาดเกิดขึ้นในระหว่างการจำแนก ดังเช่นการทดลองนี้ พบคุณสมบัติทางจีโนไทป์เหมือนกันให้คุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่ต่างกัน

หรือการที่พบว่าคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะเดียวกันให้หลายกลุ่มพลาสมิดโพรไฟล์ เป็นต้น ดังนั้น การจำแนกความแตกต่างของเชื้อชนิดเดียวกัน จำเป็นต้องอาศัยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ร่วมกับคุณสมบัติทางจีโนไทป์ จึงจะได้ข้อมูลการจัดจำแนกที่ถูกต้องเพียงพอ แต่อย่างไรก็ตามการจำแนกประชากรของเชื้อ โดยอาศัยการวิเคราะห์แบบแผนพลาสมิดร่วมกับคุณสมบัติทางจีโนไทป์บนพื้นฐานการวิเคราะห์รูปแบบ RAPD อาจพบคุณสมบัติทางจีโนไทป์ที่ต่างกันบนพื้นฐาน RAPD ให้กลุ่มพลาสมิดโพรไฟล์เดียวกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากอิทธิพลของกระบวนการส่งถ่ายพลาสมิด (plasmid transfer) กระบวนการเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของยีน (rearrangement) หรือเกิดจากความผันแปรของตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ (DNA restriction site) บนพลาสมิดที่ต่างกัน แต่ไม่ต่างกันในแง่ของจำนวนและขนาด ซึ่งก็จะแสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (plasmid restriction site) เป็นสิ่งจำเป็น ในขณะเดียวกันก็ยังพบข้อเสียที่สำคัญยิ่งของเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์หากนำมาใช้พิจารณาเป็นหลักพื้นฐานในการจัดจำแนก ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Laguerre และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไรโซเบียมจากเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์ร่วมกับคุณสมบัติทางจีโนไทป์ พบกลุ่มพลาสมิดโพรไฟล์ต่างกันเกิดขึ้นภายในจีโนไทป์เดียวกัน และพบความไม่สอดคล้องกันบางกรณีระหว่างการจัดจำแนกตามแบบแผนพลาสมิดโพรไฟล์ร่วมกับคุณสมบัติทางจีโนไทป์ของเชื้อบนพื้นฐานการวิเคราะห์แบบแผนดีเอ็นเอตัดจำเพาะ (DNA restriction) และเทคนิค RFLP ของ 2 บริเวณบนโครโมโซม ซึ่งอาจเนื่องมาจากเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์นี้ให้ความหลากหลายของการจัดจำแนกในระดับที่สูงกว่าปกติ (high resolution method) ซึ่งถ้าความต่างของพลาสมิดเกิดจากการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยถึงการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นมากภายในจีโนมที่ไม่รู้ จากจุดนี้เองเป็นจุดสำคัญเมื่อใช้พลาสมิดโพรไฟล์เป็นเทคนิคเริ่มต้นในการจำแนกความแตกต่าง ซึ่งจะให้ผลที่ค่อนข้างใกล้เคียงกับคุณสมบัติทางจีโนไทป์ของเชื้อในการศึกษากลุ่มประชากรพันธุศาสตร์ของเชื้อที่แยกจากปมรากพืช โดยถ้าความต่างของพลาสมิดเกิดจากการเปลี่ยนแปลงภายในจีโนมที่เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยจะทำให้ พบว่าไอโซเลทที่มีพันธุกรรมใกล้ชิดกันมีพลาสมิดโพรไฟล์ที่ต่างกลุ่มกัน ซึ่งทำให้ดูเหมือนว่าไอโซเลทของทั้งสองนี้มีจีโนมที่แตกต่างกันโดยสิ้นเชิง จึงเป็นสาเหตุให้เทคนิคการวิเคราะห์พลาสมิดโพรไฟล์ไม่สอดคล้องกับเทคนิค RAPD แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าความต่างของพลาสมิดเกิดจากผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงภายในจีโนมครั้งยิ่งใหญ่ จึงเป็นสาเหตุให้พบว่าไอโซเลทที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันให้กลุ่มพลาสมิดโพรไฟล์ที่ต่างกัน จึงทำให้พบความสอดคล้องกันระหว่างเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์ กับ RAPD นอกจากนี้แล้ว งานวิจัยของ Romero และคณะ (1991) ยังได้กล่าวถึงปรากฏการณ์ของความผันแปรที่เกิดขึ้นบนพลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงภายในจีโนมว่าพลาสมิดสามารถเกิดกระบวนการจัดเรียงใหม่ของยีนบนพลาสมิดที่สัมพันธ์เกี่ยวข้อง

กับจำนวน copy number ของจีโนมิกบริเวณที่บรรจุยีนที่เกี่ยวข้องกับการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพากับพืชอาศัย โดยลักษณะหนึ่งของการเกิดกระบวนการจัดเรียงตัวใหม่ของยีนที่น่าสนใจ คือ ความหลากหลายของขนาดพลาสมิด ซึ่งโดยทั่วไปการจัดเรียงตัวใหม่ของลำดับดีเอ็นเอที่เกิดบนยีนที่มีขนาดตั้งแต่ 270 กิโลเบสขึ้นไป มีผลให้เกิดความผันแปรของจำนวนและขนาดพลาสมิด โดยที่อัตราความผันแปรที่เกิดขึ้นบนพลาสมิดเป็น 4 เท่าของดีเอ็นเอในจีโนมเชื้อ (bacterial chromosome) ซึ่งการเกิดกระบวนการจัดเรียงตัวใหม่ของยีนบริเวณที่มีลำดับดีเอ็นเอซ้ำๆ กันบนพลาสมิด อาจนำไปสู่ชนิดของการจัดเรียงตัวของยีนภายในจีโนมที่ต่างกันในลักษณะการเกิด deletion amplification และ inversion โดยที่การจัดเรียงตัวใหม่ของยีนบนจีโนมในลักษณะ deletion อาจมีผลกระทบต่อคุณสมบัติการอยู่ร่วมกันของเชื้อกับพืชอาศัยในลักษณะของการสร้างปม หรือการตรึงไนโตรเจน ซึ่งปรากฏการณ์ผันแปรของรูปแบบพลาสมิดที่แตกต่างกันในระดับความถี่สูงนี้ มีผลให้การจัดจำแนกโดยวิเคราะห์จากพลาสมิดโพรไฟล์เป็นวิธีหนึ่งที่ให้ความหลากหลายของการจัดจำแนกในระดับสูงจะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่มีพันธุกรรมใกล้ชิดกันมาก ๆ หรือมีความแตกต่างกันมาก ๆ ออกจากกันได้ แต่อย่างไรก็ตามที่ระดับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์นี้เองยังมีข้อเสียของการจัดจำแนกเกิดขึ้นด้วย คือ สามารถแยกสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม หรือมีแหล่งกำเนิดเดียวกันมีจีโนไทป์ที่เหมือนกันออกจากกันได้อย่างสิ้นเชิง ซึ่งเป็นข้อที่ควรพึ่งระวังอย่างมากหากนำมาใช้พิจารณาเป็นหลักพื้นฐานในการจัดจำแนกเพียงเทคนิคเดียว ซึ่งความไม่สอดคล้องกันระหว่างเทคนิคที่เกิดขึ้นนี้เอง เป็นสาเหตุให้การวิเคราะห์ระดับความเหมือนกันที่จำเพาะบางส่วนจึงดูเหมือนว่ามีความเหมาะสมและจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในประชากรธรรมชาติของเชื้อ โดยระดับความหลากหลายที่สังเกตได้ในประชากรขึ้นอยู่กับเทคนิคที่เลือกใช้ จากการทดลองของ Laguerre และคณะ (1992) กำหนดให้ระดับของการวิเคราะห์รูปแบบการจัดจำแนกบนพื้นฐานโครโมโซมที่เหมือนกันทั้งหมดเป็นระดับชนิด (type) และเหมือนกันบางส่วนเป็นระดับกลุ่ม (class) โดยพบความสอดคล้องกันของแบบแผน พลาสมิดกับผลการวิเคราะห์รูปแบบการจัดการทางพันธุกรรมบนพื้นฐานโครโมโซมในระดับกลุ่มมากกว่า 80% ของจำนวนไอโซเลททั้งหมด ซึ่งก็แสดงให้เห็นว่าเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์ รูปแบบของดีเอ็นเอตัดจำเพาะและการศึกษา RFLP ของ 2 บริเวณบนโครโมโซม สามารถนำมาใช้เป็นตัวแทนการศึกษาทั้งหมดภายในจีโนมได้ โดยเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์จะให้ความสัมพันธ์ที่เชื่อมโยงกับโครโมโซมจีโนไทป์ของการจัดจำแนกในระดับกลุ่ม แต่ไม่พบในระดับชนิดประกอบกับอีกหลายรายงานการศึกษาความหลากหลายภายในประชากรของเชื้อจากปมราก (Paffett et al., 1996 ; Brom et al.,1991) พบว่า เทคนิคนี้สามารถนำมาใช้เป็นตัวแทนการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดภายในจีโนมได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอทั้งหมด จึงทำให้เทคนิคการวิเคราะห์พลาสมิดถูกยอมรับ และนำมาใช้เป็นมาตรฐานในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่มีจำนวนมาก ๆได้อย่าง

สะดวกรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ มีประโยชน์สำหรับการจำแนกเชื้อขั้นต้นในกรณีที่ไม่ต้องการความละเอียดมากนักและสามารถนำมาใช้เสมือนเป็นเทคนิคประกอบร่วมกับการศึกษาโดยเทคนิคอื่นทางดีเอ็นเอเมื่อต้องการข้อมูลการจัดจำแนกที่มีความละเอียดและถูกต้องมากยิ่งขึ้น ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงนำเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์ มาใช้เสมือนเป็นเทคนิคประกอบร่วมกับการวิเคราะห์ภายในจีโนมโดยเทคนิค RAPD ซึ่งจะช่วยลดข้อผิดพลาดที่เกิดจากการจัดจำแนกเพียงเทคนิคเดียว แล้วยังให้รายละเอียดของข้อมูล (information) ที่ครบถ้วนบนรากฐานของกระบวนการวิวัฒนาการที่แตกต่างภายในจีโนม ซึ่งผลการวิเคราะห์แบบแผนพลาสมิดร่วมกับเทคนิค RAPD นี้ นอกจากจะช่วยแยกความแตกต่างของไอโซเลททีมีพันธุกรรมใกล้ชิดกันออกจากกันได้แล้ว ยังแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นภายในพลาสมิดกลุ่มเดียวกันได้อีกด้วย จากการทดลองนี้พบข้อจำกัดที่เป็นได้ทั้งข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกันระหว่างเทคนิค ซึ่งอาจนำมาสู่ความเข้าใจถึงความผันแปรที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติที่ควรนำมาใช้ประกอบการพิจารณาเพื่อการจัดจำแนกที่สะดวกรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์ อาจนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการศึกษาและจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียมชนิดอื่นได้ด้วย ถึงอย่างไรก็ตามการจะเลือกใช้เทคนิคใดย่อมต้องคำนึงถึงวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนั้นเป็นหลักสำคัญ

5. การศึกษาความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม 32 ไอโซเลท

การศึกษาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี แต่ละวิธีล้วนแต่เป็นวิธีการจัดโดยทางอ้อมทั้งสิ้น เพราะการวัดปริมาณก๊าซไนโตรเจนที่พืชตรึงได้โดยตรงไม่สามารถทำได้ นอกจากจะต้องใช้สารไอโซโทป ^{15}N เข้าช่วย ซึ่งมีราคาแพงมาก (วิโรจ อิ่มพิทักษ์, 2524) ดังนั้น การประเมินประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนที่สามารถทำได้ก็ คือ การประเมินจากจำนวนปมที่เกิด น้ำหนักแห้งของต้นพืช น้ำหนักปมแห้ง และการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในปมรากถั่ว ซึ่งการจะตัดสินว่าเชื้อใดตรึงไนโตรเจนได้มากน้อยเพียงใดนั้น ขึ้นอยู่กับกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสของปมรากเป็นสำคัญ และเนื่องจากวิธีที่สะดวกและประหยัดในการตรวจวัดกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของปมราก คือ ARA (Acetylene Reduction Assay) แม้ว่าผลของการทดสอบจะแสดงถึงกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของปมรากในขณะที่ทำการเก็บเกี่ยวก็ตาม แต่ก็ได้รับการยอมรับกันอย่างแพร่หลายจากบรรดานักจุลินทรีย์ดินเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ซึ่งการวิเคราะห์ก๊าซอะเซทิลินควรกระทำภายใน 1 ชั่วโมงหลังการเก็บเกี่ยวรากเนื่องจากการวิเคราะห์ภายใน 1 ชั่วโมง หลังการเก็บเกี่ยวจะได้เอทิลีนเกิดขึ้น

คิดเป็น 100% activity และจะลดลงเหลือ 85% และ 35% หลังจากทิ้งไว้ 3 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้พบว่าน้ำหนักแห้งของต้นพืชมากจะมีแนวโน้มที่จะให้ค่า ARA มาก แต่ก็ไม่ได้เป็นเกณฑ์ตายตัวเสมอไป ดังจะพบปรากฏการณ์เช่นนี้ในการทดลองของ Romero และคณะ (1993) หากิจกรรมของไนโตรจีเนสในหน่วยของนาโนโมลเอทิลีน/พืช/ชั่วโมง โดยทดลองกับพืช *Cajanus cajan* ณัฐพร สุนทรวิจารณ์ (2534) ทดลองกับถั่วเหลืองได้ความสัมพันธ์เช่นเดียวกันอธิบายว่ากระบวนการตรึงไนโตรเจนเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนประกอบด้วย 1) การควบคุมสารต้นตอที่จะนำมาสร้างพลังงาน (ATP) และอำนาจการรีดิวซ์จะขึ้นอยู่กับพืช 2) การควบคุมการถอดรหัสของเอนไซม์ไนโตรจีเนส และการนำผลผลิตของเอนไซม์ไปใช้ขึ้นกับการเจริญของไรโซเบียมภายในปม ด้วยเหตุผลนี้เองจึงเป็นปกติที่จะพบว่าสายพันธุ์ที่ให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์ไนโตรจีเนสไม่สูงมากนัก แต่กลับให้ผลผลิตในรูปน้ำหนักแห้งของถั่วที่สูงกว่าสายพันธุ์ที่ให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูง (Shishido and Peper, 1990) อย่างไรก็ตามการที่พบว่าเชื้อในแต่ละไอโซเลทมีค่า ARA ไม่เท่ากันเมื่อเทียบที่น้ำหนักแห้งเดียวกันอธิบายได้ว่าปัจจัยทางพันธุกรรมของไรโซเบียมมีผลต่อการผลิตมวลชีวของพืชอาศัยในแง่พลังงาน photosynthetic supply มีบทบาทเป็นปัจจัยจำกัด (limiting factor) สำหรับการตรึงไนโตรเจนในปมราก นอกจากนี้แล้วยังพบว่าไอโซเลทส่วนใหญ่ที่นำมาศึกษานี้ให้ลักษณะการติดปมบริเวณส่วนของรากแขนงและบริเวณส่วนของรากแขนงกับรากแก้ว ซึ่งจะมีแนวโน้มที่จะให้ค่า ARA มากกว่าไอโซเลทที่สร้างปมได้เพียงบริเวณรากแก้ว ดังจะพบปรากฏการณ์เช่นนี้ได้ในการทดลองของวรวิชญ์ เกษมสุข (2521) กล่าวว่าระยะแรกของการเจริญเติบโตของต้นถั่วเขียวปมบริเวณส่วนของรากแก้วจะตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่าปมที่รากแขนง แต่เมื่อถั่วเริ่มออกดอกและสร้างฝักอ่อนแล้ว การตรึงไนโตรเจนของปมถั่วเขียวที่รากแขนงจะสูงกว่าปมที่รากแก้ว สำหรับความสัมพันธ์ของจำนวนปมและค่า ARA พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน ซึ่งจะสอดคล้องกับการทดลองของ Romero และคณะ (1993) เนื่องจากปริมาณปมที่เกิดขึ้นภายในรากในจำนวนปมเหล่านี้ อาจมีปมที่ไม่มีประสิทธิภาพอยู่จำนวนหนึ่งที่ขาดความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (ศุภมาศ พนิชศักดิ์, 2529)

บทที่ 7

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของดิน 6 บริเวณ ในพื้นที่โครงการศึกษา พบค่าเฉลี่ยของความเป็นกรด-ด่างและปริมาณความชื้นที่สะสมในดินมีค่าสูงที่สุดในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าครบุรีแปลงที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับการขุดคันดินกั้นน้ำ (GLPD) และมีค่าต่ำที่สุดในพื้นที่ป่าหนองระเวียง ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของปริมาณอินทรียวัตถุที่สะสมในดินมีค่าสูงที่สุดในแปลงศึกษาที่มีลักษณะเป็นป่าทุ่งหญ้าที่มีการปลูกกล้าไม้ (GLP) และมีค่าเฉลี่ยต่ำที่สุดในพื้นป่าหนองระเวียง (NT1R2)

2. การศึกษาปริมาณไรโซเบียม (*Rhizobium sp.*(cowpea)) ในดิน 6 บริเวณในพื้นที่โครงการศึกษา โดยใช้ถั่วเขียวเป็นพืชทดสอบ พบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณไรโซเบียมในดินจากแต่ละพื้นที่ป่าโดยค่าเฉลี่ยของปริมาณไรโซเบียมมากที่สุดในพื้นที่ป่าทุ่งหญ้าครบุรีแปลงที่มีการปลูกกล้าไม้ร่วมกับขุดคันดินกั้นน้ำ (GLPD) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6,541 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง และมีค่าต่ำที่สุดในบริเวณเส้นทางเดินสัญจร (way) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.88 เซลล์ต่อกรัมดินแห้ง โดยผลที่ได้จากการศึกษาเชิงปริมาณไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติกับคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของดินที่ทำการศึกษา (ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณอินทรียวัตถุ และปริมาณความชื้นในดิน) ซึ่งปริมาณไรโซเบียมที่ต่างกันในดินแต่ละบริเวณ สามารถนำมาใช้เป็นดัชนีชี้ความอุดมสมบรูณ์ของดินได้เพียงคราว ๆ เท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากการดำรงชีวิตของไรโซเบียมในดินมีหลายปัจจัยมาเกี่ยวข้อง แต่อย่างไรก็ตามบริเวณที่ตรวจพบปริมาณไรโซเบียมอยู่มากก็ไม่อาจคาดได้ว่าไม่จำเป็นต้องใช้ไรโซเบียมในการปรับปรุงดิน ทั้งนี้ก็เพราะว่าถ้าดินแห่งนั้นมีไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนต่ำก็ย่อมไม่เกิดประโยชน์อะไร และจำเป็นต้องใช้เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูง

3. การคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็ว จำนวนทั้งสิ้น 32 ไอโซเลท จากปมรากถั่วเขียว 2 สายพันธุ์จากดิน 2 ชนิดในพื้นที่โครงการฯ โดยในการทดลองนี้คัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างผลผลิตกรด เจริญได้ภายในระยะเวลาเพียง 2-3 วัน และมีคุณสมบัติในการเข้าสร้างปมได้กับรากถั่วเขียว

4. การจำแนกความแตกต่างของเชื้อไรโซเบียมกลุ่มเจริญเร็วทั้ง 32 ไอโซเลทที่นำมาศึกษานี้ไม่อาจทำได้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ แต่สามารถจำแนกความแตกต่างได้

โดยอาศัยพื้นฐานการต้านสารปฏิชีวนะและการวิเคราะห์แบบแผนพลาสมิดร่วมกับการวิเคราะห์รูปแบบ RAPD ผลการจำแนกความต่างของเชื้อบนพื้นฐานการต้านสารปฏิชีวนะ 7 ชนิด สามารถจำแนกความแตกต่างได้ 11 กลุ่ม ตามคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่ต่างกันของเชื้อ โดยพบคุณสมบัติการต้าน erythromycin และ penicillin ที่เหมือนกันทั้ง 32 ไอโซเลท

5. ผลการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อไรโซเบียม จากการวิเคราะห์แบบแผนพลาสมิด สามารถจำแนกความแตกต่างได้ 9 กลุ่มตามจำนวนและขนาดของพลาสมิดที่ต่างกัน ซึ่งในการทดลองนี้ พบพลาสมิดจำนวน 1-3 ชิ้นต่อไอโซเลทที่มีขนาดอยู่ในช่วง 164-600 เมกกะดาลตัน เมื่อพิจารณาร่วมกับการจัดจำแนกกลุ่มของไอโซเลทตามคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะ พบว่าคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะของเชื้อมีความสัมพันธ์เชื่อมโยงกับกลุ่มของพลาสมิดโพรไฟล์ที่จำเพาะ โดยไม่พบลักษณะเด่นของการจัดจำแนกตามแบบแผนพลาสมิดที่สัมพันธ์กับชนิดพืชและที่มาของเชื้อ

6. การจัดจำแนกความแตกต่างและศึกษาโครงสร้างวิวัฒนาการของเชื้อจากการวิเคราะห์รูปแบบ RAPD ร่วมกับไพรเมอร์ 5 ชนิด พบความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอจากแต่ละไพรเมอร์อยู่ในช่วง 10-18 แถบ และมีขนาดอยู่ในช่วง 0.29-3.0 กิโลเบส สามารถนำมาจำแนกความแตกต่างได้เป็น 5 กลุ่มจีโนไทป์ โดยชนิดของดินที่ต่างกันเป็นปัจจัยสำคัญทำให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมได้มากกว่าสายพันธุ์พืช และพบความไม่สอดคล้องกันระหว่างการจำแนกด้วยเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์กับผลการวิเคราะห์ด้วย RAPD จึงทำให้การวิเคราะห์ระดับความเหมือนกันบางส่วนมีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการศึกษาความหลากหลายที่เกิดภายในประชากรธรรมชาติ โดยความหลากหลายที่สังเกตได้ในประชากรขึ้นอยู่กับเทคนิคที่เลือกใช้ ซึ่งพลาสมิดโพรไฟล์ให้ความหลากหลายในการจัดจำแนกที่สูงกว่าเทคนิค RAPD มีประโยชน์สำหรับการจำแนกเชื้อที่มีพันธุกรรมใกล้ชิดกันมาก ๆ ออกจากกัน หรือมีความแตกต่างกันมาก ๆ ออกจากกันได้ แต่อย่างไรก็ตามที่ระดับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์นี้ก็มีข้อเสียของการจัดจำแนกเกิดขึ้นด้วย คือ สามารถแยกสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมที่มาจากแหล่งกำเนิดเดียวกันมีจีโนไทป์ที่เหมือนกันออกจากกันได้อย่างสิ้นเชิง ถึงอย่างไรก็ตามเทคนิคพลาสมิดโพรไฟล์ก็ถูกยอมรับและนำมาใช้เป็นมาตรฐานในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่มีจำนวน มาก ๆ ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ มีประโยชน์สำหรับการจำแนกเชื้อขั้นต้นในกรณีที่ไม่ต้องการความละเอียดมากนัก และสามารถนำมาใช้เสมือนเป็นเทคนิคประกอบร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD ในกรณีที่ต้องการข้อมูลการจัดจำแนกที่มีความละเอียดและถูกต้องมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะช่วยลดข้อผิดพลาดที่เกิดจาก

การจำแนกเพียงเทคนิคเดียวแล้วยังให้รายละเอียดของข้อมูลที่ครบถ้วนบนรากฐานของกระบวนการวิวัฒนาการที่แตกต่างภายในจีโนม ซึ่งข้อมูลการจำแนกบนพื้นฐานความต่างของแบบแผนพลาสมิดและเทคนิค RAPD จะแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นภายในพลาสมิดกลุ่มเดียวกัน ที่สามารถนำมาใช้จำแนกและยืนยันความสัมพันธ์ได้ร่วมกับคุณสมบัติการต้านสารปฏิชีวนะที่ต่างกันหลายชนิด ซึ่งการเปรียบเทียบข้อมูลการจัดจำแนกบนพื้นฐานทางจีโนไทป์และฟีโนไทป์ดังกล่าวนี้ พบข้อจำกัดที่เป็นได้ทั้งข้อดี และข้อเสียที่แตกต่างกันระหว่างเทคนิค อาจนำมาซึ่งความเข้าใจถึงความผันแปรที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติที่ควรนำมาประกอบการพิจารณา เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้กับงานการจัดจำแนกเชื้อไรโซเบียมชนิดอื่นๆได้อย่างสะดวกรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการจะเลือกใช้เทคนิคใดในการจัดจำแนกย่อมต้องขึ้นอยู่วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเป็นหลักสำคัญ นอกจากนี้แล้วข้อมูลการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตบางชนิดในแต่ละท้องที่ยังมีประโยชน์ต่อการพัฒนาองค์การความรู้ความหลากหลาย โดยจะนำมาซึ่งคำตอบและแนวทางการจัดการกับสภาพความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในแต่ละท้องถิ่นให้ดำรงอยู่มิให้สูญเสียไปได้

7. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน การเกิดปม และลักษณะการเกิดปม พบว่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ของเชื้อทั้ง 32 ไอโซเลท ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าไอโซเลทส่วนใหญ่ให้น้ำหนักของต้นแห้งที่สัมพันธ์กับค่า ARA (Acetylene Reduction Assay) และน้ำหนักปมแห้งมากกว่าจำนวนปม ลักษณะการเกิดปมแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม1 มีปมการกระจายตามรากแก้ว ส่วนกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 มีปมการกระจายตามรากแขนงและรากแขนงกับรากแก้ว อันได้แก่ ไอโซเลทของเชื้อส่วนใหญ่ที่นำมาศึกษา

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรรณิการ์ ว่องวุฒิญาณ. 2536. ผลกระทบทางจุลชีววิทยาของดิน ในป่าเบญจพรรณที่ผ่านการทำไม้บริเวณห้วยลิ้นถิ่น จังหวัดกาญจนบุรี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน. 2529. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรปุ๋ยชีวภาพ จัดพิมพ์โดยกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 270 .

กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน. 2541. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรปุ๋ยชีวภาพ จัดพิมพ์โดยกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 368 .

ณัฐพร สุนทรวิจารณ์. 2534. เรสทริกชั่นแฟรกเมนท์เลงธ์ โพลีมอฟิซึมของแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน *Bradyrhizobium japonicum*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นันทกร บุญเกิด , ปรีชา วดีศิริศักดิ์ และ วิทยาธนานุสนธิ์ . 2536. การสำรวจเชื้อไรโซเบียมถั่วลิสง ในดินที่ระบบการปลูกพืชต่างกัน. วารสารวิชาการเกษตร.11(3) : หน้า 114-119.

พิกุล หรรษานิมิตกุล. 2530. ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการทางระบบนิเวศต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรไรโซเบียม. วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรพรรณ จงสันติกุล. 2528. การคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมของกระถิน วิทยานิพนธ์ปริญญาบัณฑิตมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรรณราย ขันธรักษ์. 2541. ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระหว่างกลุ่มของข้าวเหนียวเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธงชัย คัมภีร์. 2530. จุลินทรีย์ในดิน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 211 น.

ประกิตต์สิน สีหนนท์. 2540. จุลินทรีย์ดิน เอกสารไม่ตีพิมพ์. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิฑูร ชินพันธุ์. 2537. ลักษณะของหญ้าแฝก. คู่มือการดำเนินงานเกี่ยวกับหญ้าแฝก. กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 15-24.

วิโรจ อิ่มพิทักษ์. 2524. การวัดปริมาณการตรึงไนโตรเจนของพืชตระกูลถั่วในสภาพไร่นาโดยใช้ N 15. วารสารดินและปุ๋ย 3 : 104-112.

วรวิชญ์ เกษมสุข. 2521. การตอบสนองของถั่วเขียวสายพันธุ์ต่างๆ ต่อการใช้เชื้อไรโซเบียม. ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หาดใหญ่, สงขลา.

วิไล หนุนภักดี. 2535. พีซีอาร์ เทคโนโลยี : หลักพื้นฐานและองค์ประกอบสำคัญ. ภาควิชาวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2532. ความหลากหลายทางชีวภาพ. 1-13. ใน ภาควิชาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. สาขาชีววิทยาสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ร่วมกับองค์การยูเสด (USAID). ความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : บริษัท ประชาชน จำกัด.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2538. สถานะภาพความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย (ตอนที่ 1). สารคดี. 11 (123) : 115-124.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2540. วิวัฒนาการกับทรัพยากรชีวภาพ. ภาควิชาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. 50 หน้า.

ศุภกิจ สอนประจักษ์. 2539. การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Lactobacillus pentosus* และ *Lactobacillus plantarum* จากอาหารหมักดองพื้นเมือง โดยวิธี Random Amplified DNA (GENOMIC DNA FINGERPRINTING OF *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* FROM TRADITIONAL FERMENTED FOOD USING RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA). ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา. 2529. จุลชีววิทยาของดินเพื่อผลิตผลทางการเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 335 น

ศรีศักดิ์ ธานี. 2540. การหมุนเวียนธาตุอาหารของป่าดิบแล้งธรรมชาติและป่าดิบแล้งที่กำลังคืนสภาพ จังหวัดฉะเชิงเทรา วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เศรษฐา ศิริพินท์. 2535. การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมศักดิ์ วังใน. 2525. การตรึงไนโตรเจน: ไรโซเบียม-พืชตระกูลถั่ว. พิมพ์ครั้งที่ 4, คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 260 หน้า.

สมศักดิ์ วังใน. 2528 จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน. ภาควิชาปฐพีวิทยา. คณะ เกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 192 หน้า.

ภาษาอังกฤษ

Abdel Basit, H., Kotob, S.I. and Van Berkum, P. 1991. Phenotypic diversity among strains of *Bradyrhizobium japonicum*. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 570-1572.

Achara, N., Mikiko, A., Toshiki, U., Nantakorn, B.K. and Shiro, H. 1997. Characterization of *Bradyrhizobium* strains isolated from soybean cultivation in Thailand. J. Gen. Appl. Microbiol. 43 :183-187.

Achara, N., Mikiko, A., Toshiki, U., Nantakorn, B.K. and Shiro, H. 1996. Characterization of *Rhizobibial strains isolation* from soybean. J. Gen. Appl. Microbiol. 43 :183-187.

Adachi, T. and Iyer, V.N. 1980. A procedure for the isolation and purification of plasmid DNA from *Rhizobium meliloti*.. Anal. Biochem. 101 : 271-274

Allen, O.N. and Allen, E.K., 1981. The leguminosae.A source Book of charecteristics, uses and Nodulation. of Wisconsin, Press, Madison, Wisconsin .812 pp.

Appleby, C.A. 1974. Leghemoglobin, pp. 521-582. In A. Quispel (ed.). The biology of nitrogen fixation. Co., Amsterdam : North-Holland Pub.

Ausubel, F.M. 1984. Developmental genetics of *Rhizobium*/ legume symbiosis, pp. 275-298. In R. Losick and L.Shopiro.(eds.) Microbial Development. New York :Cold Spring Harbar Laboratory Press. Cold Sporing Harbor,

Banfalvi, Z., Sakanyan, V. and Konez, C. 1981. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *R.meliloti*. Mol. Gen. Genet. 184 : 318-325.

Bauer, W.D. 1981. Infection of legumes by Rhizobia. Annu. Rev. Plant. physiol. 32:407.

Beatrice, A., Kate,. J,. JIM., L.B. and Ken,. E.G. 1995. Diversity of Rhizobia Phaseolus vulgaris L. in two Kenyan soil with contrasting pHs. Appl. Environ. Microbiol. 61 (11) : 4016-4021.

Bergey, 1983 . Manual of determinative bacteriology, 9 th ed.

Beynon, J.L. and Josey, D.P. 1981. Demonstration of heterogeneity in a natural population of *Rhizobium phaseoli* using variation of intrinsic antibiotic resistance. J. Gen. Microbiol. 118 : 437-442.

Beynon, J.L., Beringer , J.E. and Johnston, A.W.B. 1980. Plasmids and host range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli* . J. Gen. Microbiol. 120 :421-430.

Bohlool, B.B. and Schmidt, E.L. 1983. Presistence and competition aspects of *Rhizobium japonicum* observed by immunofluoresence microscopy. Soil. Sci. Soc. Am. Proc. 37 : 561-564.

Boonkerd, N. and Weaver, R.W. 1982. Survival of cowpea Rhizobia in soil as affected by soil temperature and moisture. Appl. Environ. Microbiol. 43 : 585-589.

Breed, R.S., Murray, E.G.D. and Smith ,N.R. 1957 . Bergey's manual of determinative bacteriology 7th ed. Baltimore : William and Wilkins. p.1,094.

Brewin, N.J., Beringer, J.E., and Johnston, A.W.B. 1982. Plasmid-mediate transfer to host-range specificity between two strains of *Rhizobium legumioosarum*. J. Gen Microbiol. 120 : 413-420.

Brewin, N.J., Dejong, T.M., Phillips, D.A. and Johnston, A.W.B. 1980. Go – transfer of determinants of hydrogenase activity and nodulation ability in *Rhizobium leguminosarum.* Nature 288 : 77-79

Brill, W.J. 1997. Biological nitrogenase fixation. Science. Amer. 236 (3) : 68-81.

Brinboim H.C. and Hardy, R.W. F. 1975. Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants Springer-Verleg New York.

Brockman, F.J. and Bezdicek, D. F. 1989. Diversity within serogroup of *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae in the palouse region of Eastern Washington as indicated by plasmid profiles, intrinsic antibiotic resistance, and topography. Appl.Environ. Microbiol. 55 :109-115.

Brockwell, J. and Katznelson, J. 1976. Symbiotic characteristics of *Rhizobium trifolii* from *Isreel* in assosiation with 10 species of *Trifolium*. Aust. J. Agric. Res. 27 :799-810.

Brom, S., Garcia de los Santos, A., Girard, M.L., Devila, G., Palacios, R. and Romero, D. 1991. High frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli plasmids. J. Bacteriol. 173, 1344-1346.

Bromfield, E.S.P., Thurman, N.P., Whitwill, S.T. and Burran, L.R. 1987. Plasmids and symbiotic effectiveness of representative phage types from two indigenous population of *Rhizobium meliloti* . J.Gen Microbiol .133: 3457-3466.

Broughton, W.J., Heyeke, N., Schneider, G.M., and Stanley, J. 1987. Ecological genetics of *Rhizobium meliloti* diversity and competitive dominance. FEMS. Microbiol. Lett. 40 : 245-249.

Burns, R.C. and Hardy, R.W.F. 1975 Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants Springer-Verleg New York.

Burton, J.C. 1965. The *Rhizobium*-legume assosiation, In : Microbiology and soil fertility. Ed.C.M. Gllmour and Allen. O.N. Oregon State University Press.

Cole, M.A. and Elkan, G.H. 1973. Transmissible resistance to penicillin , neomycin and Chloramphenicol in *Rhizobium spp.*. Antimicrob. Agents. Chemother 4 : 248-253.

Crozat, Y., Cleyet – Marel, J.C., Giraud, J. and Obaton, M. 1982. Survival rates of *Rhizobium japonicum* populations introduced into different soils. Soil. Biochem. 14 : 401-405

Currier, T.c. and Nester, E.W. 1976. Evidence of diverse types of diverse types of large plasmid in tumor-inducing stains of *Agrobacterium*. J. Bacteriol. 126. :157-165.

Cuttin, J.A. 1971. The biogenesis by leghemoglobin : The determinant in the *Rhizbium* legum symbiosis for leghemoglobin specificity. Biochem. Biophys Acta. 229 : 58-62.

Day, R., Thurman, N., Lewis, D.G. and Jone, D. 1978. The relationship of plasmid number to growth acid tolerance and symbiotic efficiency inisolates of *Rhizobium trifolii* J. Appl. Bacteriol. 58 : 1-6..

Denarie, J., Boistard, P ., Delbart, F.C., Atherly, A.G., Berry, J.O and Russel, P. 1981. Indigenous plasmids of *Rhizobium*, pp. 225-246. In K.Giles and A. Atherly (eds.). Biology of the Rhizobiaceae.Academic Press, New York.

Dilworth, M. 1966. Acetylene reduction by nitrogen fixing preparation of *Clostridium pasteurianum*. Biochem and Biophys. Acta. 127 : 285-294.

Djordjevic, M.A. Zurkowski, W. and Rolfe, B.G. 1981. Plasmids and stability of symbiotic properties of *Rhizobium trifolii*. J. Bacteriol. 151 : 560-568.

Dughre, M.H. and Bottomley, P.J. 1983. Effect of acidity on the composition of an indigenous soil population of *Rhizobium trifolii* found in nodules of *Trifolium* subterraneuml. Appl. Environ.Microbiol. 46 : 1207-1213.

Eckert' K.A. and Kunkel, T.A. 1991. The efidlity of DNA polymerase used the polymerase chain reaction. In PCR Practical Approach. Mc Pherson, M.J. Quirke, P. and Taylor, G.R.(eds). Oxford University Press, New York, U.S.A.

Eckhardt, J. 1978. A rapid method for the identication of plasmid DNA in bacteria . Plasmid 1: 584-588.

Flores, M., Gonzalez, V., Pardo, M.A., and Leija, A 1988. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. J. Bacteriol. 170 : 1191-1196.

Garcia – delos Santos, A., Brom, S. and Romero, D. 1996. *Rhizobium* plasmids in bacteria–legume interactions. World J. of Microbiol. Biotech. 12 : 119-125.

Glynn, P., Higgins, P., Sqartini, A. and O'Gara, F. 1985. Strain identification in *Rhizobium trifolii* using DNA restriction analysis, plasmid DNA profiles and intrinsic antibiotic resistance. FEMS. Micorbiol. Lett. 30 : 177-172.

Gross, D.C., Vidivar, A.K. and Klucas, R.V. 1979. Plasmids biological properties and efficacy of nitrogen fixation in *Rhizobium japonicum* strains indigenous to alkaline soils. J. Gen. Microbiol. 114 :257-266.

Hardy, R.W.F, Burns, R.C. and Holsten, R.D. 1973. Application of the acetylene- ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem. 5: 47-81.

Hardy, R.W.F., Hoisten, R.D., Jackson, E.K. and Burns., R.C. 1968. The acetylene-ethylene assay for N_2-fixation laboratory and field evalution. Plant Physiol. 43 :1185-1207.

Harrison, S.P., Mytton, L.R. and Cresswell, A. 1992. Characterisation of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphism using random primers. Can.J.Microbiol. 38 : 1009-1015. 143

Harrison, S.P., Young, J.P.W. and Jones, D.G.. 1989. *Rhizobium* population genetics: genetic variation within and between populations from diverse locations. J. Gen. Microbiol. 135 : 1061-1069.

Hartmann, A. and N. Amarger. 1991. Genotypic diversity of an indigenous *Rhizobium meliloti* field population assessed by plasmid profiles, DNA fingerprinting and insertion sequence typing. Can. J. Microbiol. 37 : 600-608.

Hashem, F.M., Kuykendall, L.D., Udell, S.E. and Thomas, P.M. 1996. Phage susceptibility and plasmid profile analysis of *Sinorhizobium fredii.* Plant and soil 186 : 127-134.

Hirsch, P.R., Montaru, M.V., Johnston, A.W.B., Brewin, N.J. and Schell, J. 1980. Physical identification of bacteriocinogenic nodulation and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum.* J. Gen. Microbiol. 120 : 403-412.

Hirsch, P.R. 1979. Plasmid-determined bacteriocin prodution by *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 113 : 219-228.

Jackson, M.L. 1956. Soil chemical analysis. London: Academic Press.

Johnston, D., Mytton, L., Livesey, F. and Len, P. 1978. Specific and general effectiveness of *Rhizobium trifolii* population from different agricultural locations. Plant soil. 73: 299-305.

Jordan, D.C. 1984. Family III, Rhizobiaceae Conn 1938. pp. 234-256. In Krieg, N.R., and Holt, J.G. (eds.). Berger's Manual of Systematic Bacteriology. Willians and Wilkins Co., Baltimore.

Kishinevsky, B., Sen, D., John, M. and Yang, G.1996. Diversity of Rhizobia isolated from various *Hedysaram* species. Plant and Soil 186 : 21-28.

Kuykendall, L.D., Roy, M.A., O'neill, J. J. and Devine, T.E. 1998. Fatty acids, antibiotic resistance and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. Int. J. Syst. Bacterial. 38 : 358-361.

Laguerre, Gl, Mazurier, S.I. and Amarger, N. 1992. Plasmid profile and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum bv. viciae* in field population. FEMS. Microbiol. Ecol. 101 : 17-26.

Laguerre, G., Allard, M.R., Revoy, F. and Amarger. 1994. Rapid identification of Rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR – amplified 16sr RNA genes. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 56-63.

Lance, R., Myton, L.H., Malcolm, D. and Cresswell. 1992.Characterisation of Rhizobium isolates by amplication of DNA polymorphisms using random primers.. Appl. Environ. Microbiol. 38 : 1009-1012.

Lindstrom, K., Jaris, B.D., Lindstrom, P.E. and Patel, C. 1983. DNA homology, phage-typing, and cross-nodulation studies of Rhizobia infecting Galega species. Can. J. microbiol 29: 781-789.

Long, S.R. 1984. Genetics of *Rhizobium* Nodulation. pp. 256-305. In T. Kester (eds.). Plant-Microbe Interactions. Molecular and Genetic Perspectives Macmillan Publish Company, New York.Lindstrom.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J .1982. Molecular cloning : a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Maria, D.L, Flopes,M., Brom, S. and Davila, G. 1991. Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli*. J. Bacteriol. 173(8): 2411-2419.

Masterson, R.V., Prakash, R.K. and Atherly, A.G. 1985. Conservation of symbiotic nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium japonicum* . J. Bacteriol. 163(1): 21-26.

Masterson, R.V., Russell, P.R. and Atherly, A.G. 1982. Nitrogen fixation (nif) genes and large plasmids of *Rhizobium japonicum*. J.Bacteriol. 152 : 928-931.

Mc Pherson, M.J., Quirke, P. and Taylor. G.R. 1991. Polymerase chain reaction .basic principle and autocation. PCR A Practical Approach. Oxford University Press, Walton street, Oxford, England.

Mozo, T., Cabrera ,E. and Ruiz-Argueso,T. 1988. Diversity of plasmid profiles and conservation of symbiotic nitrogen fixation gene in newly isolate *Rhizobium* nodulation sulla (*Hedysarum coronarium L.*) Appl. Environ. Microbiol. 54 : 1262-1267.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Fourth informational supplement : M100 – S4. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. NCCLS, Villanova, Pa.

Noel, K. D. and Brill, W. J. 1988 . Diversity and dynamis of indigeous R*hizobium japonicum* population . Appl. Environ. Microbiol. 40 : 931 - 938.

Norris, D.O. 1965. Acid product by *Rhizobium* ; A unifying concept. Plant Soil. 22 : 143-166.

Nuti, M.P., Ledeboer, A.W., Lepidi, A.A. and Scilperoort, R.A. 1977. Large plasmids in different *Rhizobium* species. J. Gen. Microbiol. 100 : 241-248

Nuti, M.P., Lepidi, A.A., Schilerootr, R.A. and Cannon, F.C. 1979. Evidence for nitrogen fixation (nif) gene on indigenous *Rhizobium* plasmids. Nature. 282 : 533-535.

Nuswantara, S., Araki, M., Sukiman, H. and Murooka, Y. 1996. Repetitive DNA sequences and RAPD patterns on some *Rhizobium* spp. Isolated from *Acacia mangium*. Report of Monbusho Internation Scientific Research Program.

Padmanabhan, S. Hirtz R.D. and Broughton, W.J. 1990. Rhizobial in tropical legumes : cultural characteristics of *Bradyrhizbium sp.* Soil. Biol. Biochem. 22 : 23-38.

Paffeti , D., Bazzicalupo, M., Scotti, C. and Gnocchi, S. 1996. Genetic Diversity of an italian *Rhizobium meliloti* Population from Different *Medicago sativa* varieties. Appl.Environ Microbiol .62 (7) : 2279-2285.

Prakash, R.K. and Atherly, A.G. 1986. Plasmids of *Rhizobium* and their role in symbiotic nitrogen fixation. Int. Rev. Cytol. 104 : 1-24.

Prakash, R.K., Schilperoort, R.A. and Nuti, M.P. 1981. Large plasmids of fast- growing *rhizobium* : homology studies and location of structural nitrogen fixation (nif) genes. J. Bacteriol. 145: 1129-1136.

Richards, D., Kupem, E., Sen, R. and Seland, U. 1994. Genetic Diversity and Relationship among isolate of *Rhizobium leguminosarum*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2825-2823 .

Rochelle, D., Casse, F., Boucher, D. and Michel, M. 1985. Identrification and characterization of large plasmids in *Rhizobium* meliloti using agarose gel . J. Gen. Microbiol. 113: 229-242.

Romero, D., Brom, S.,Martinez-Salazar, J. and Davila, G. 1991. Amplification and deletion of a *nod-nif* region in the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli*. J. Bacteriol. 173 (8): 2435-2441.

Romero, F., Datum, R., Claveria, A.B. and Ruiz-sainz, J.E. 1993. Broadhost-effective mutants of *Rhizobium fredii* strains. J. Appl. Bacteriol. 74 : 610-619.

Rosenberg, C., Boistard, P., Denaric, J. and Delbart, F.C. 1982. Genes controlling clearly and late function in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*. Mol. Gen. Genet.194: 326-333.

Saiki, R.K., Scarf, S., Faloona, K.B. and Amheim,N. 1985. Enzymatic amplication of beta-globin sequences. Scienence 230: 1350-1354.

Schofield, P.R., Gibson, A.H., Dudman, W.F. and Watson, J.M. 1987. Evidence for genetic exchange and recombination of Rhizobium Symbiotic plasmid in a soil population. Appl. Environ. Microbiol. 53 : 2942-2947.

Shishdo, M. and I.L. Pepper. 1990. Identification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance . Soil. Biol. Biochem. 22 : 11-16.

Somasegaran, P and Hoben, H.J. 1994. Method in Legume / *Rhizobium* Technology:Train. .NifTAL ,Project, .Univ of Hawaii. 250 p.146

Somasegaran, P. Hoben, H. J. and Halliday, J. 1985. Practical exercise Legume / *Rhizobium* Technology:Train manual. NifTAL , Dep.Of Agron. And Soil Sci.Univ of Hawaii. 250 p.

Starky, M.J., Wind, G., Hong, J.M. and Bohlool, B.B .1983. Possible involvement of a megaplasmid in nodulation of soybean by fast-growing rhizobia from china. Appl. Environ. Micobiol 46 : 906-911

Sulaiman, R. 1986. Survival rate of direct seeding and containerised planting of Acacia mangium, pp. 173-175. In J.W.Tubell (ed.). Acacias in Developing countries. Aciar Proc. No.16. Canbera, Australia.

Teaumroong, N.,Boonkerd, N and Murooka, Y.1996. Use of PCR Technology in conjunction with antibiotic resistance profile to differentiate *Bradyrhizobium* applied in Thailand .Report of Monbusho Internation Scientific Research Program.

Teaumroong, N., Murooka, Y. and Boonkerd, N. 1995. Acid tolerance and antibiotic resistance of some strains of *Bradyrhizobium* applied in Thailand. Suranaree J. Sci.Technol. 2 75-80.

Thurman, N.P., Lewis, D.M. and Jones, D.G. 1985. The relationship of plasmid number to growth, acid tolerance and symbiotic effeciency in isolates of *Rhizobium trifolil*. J. Appl. Bacteriol. 58 : 1-6.

Torvik, V., Goksoy, J. and Daae, F. L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol .56 : 782- 787.

Turk, D. and Keyser. 1992. Rhizobium that nodulate tree Legumes: specificity of the host for nodulation and effectiveness. Can. J. Microbiol: 451-460

Van Berkum, P., Gewaily, E.M. and Angle, J.S. 1993. Genotypic diversity among strains of *Bradyrhizobium japonicum* belonging to serogroup 110. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 3130-3133.

Verma, D.P.S. and long, S. 1983. The molcular biology of *Rhizobium*-legume symbiosis. Int. Rev. Cytol. 14 : 211.

Vincent, J.M. 1970. A Manual for the Practical Study of Root –nodule Bacteria. Blackwell Scientific Publications Oxford, UK.

Vincent, J.M. 1980. Factor control the *Rhizobium* -legume symbiosis. pp. 103-130. In Newton, W.F. and Orme-Johnson, W. H. (eds.). Nitrogen fixation, Vol.2 : Symbiotic Association and Cyanabacteria. University Park Press.

Wac Cleland, J.G. 1990. Genetic polymorphism in varietal identification and identification and genetic improvement. Theor. Appl. Genet. 67: 25-33.

Weaver, R.W. and Frederick, L.R. 1972. A new technique for most probable number (MPN) counts of Rhizobia. Plant and Soil. 36 : 219-222.

Weaver, R.W., Morris, N. and Boonkerd. 1987. Population of *Bradyrhizobium japonicum* in field cropped with soybean rice rotation. Soil . Sci.Soc.An. J. 51: 90-92.

Welsh, J and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genome using PCR with arbitary primer. Nucl.Acids Res. 18 : 7213-7218.

Willing, J. 1967. The effect of high temperature on certain root nodule bacteria. Aust.J. Agric. Res. 18: 299-304.

Williams, J. P. W., Young, K., Arada, P. and Quit, A. 1985. *Rhizobium* population Genetic : Enzyme polymorphism in isolate from Pea, Clover, Beans and Lucerne grow at the same site. J. Gen. Microbiol. 131 : 2399-2408.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และเลี้ยงต้นพืช

1. Yeast extract Manitol Agar (YMA)

Manitol	10 g
$K_2 HPO_4$	0.5 g
$MgSO_4$ 7H2O	0.2 g
NaCI	0.1 g
Yeast extract	1 g
น้ำกลั่น	1000 ml
agar	15 g

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.8-7.0

2. YMA-congo red

Manitol	10 g
$K_2 HPO_4$	0.5 g
$MgSO_4$ 7H2O	0.2 g
NaCI	0.1 g
$CaCO_3$	3 g
Yeast extract	1 g
น้ำกลั่น	1000 ml
agar	15 g
1% congo red	2.5 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที

3. L-broth (LB)

Peptone	5 g
Beef extract	3 g
Lactose	5 g
Bromthymal blue indicator	1 ml
น้ำกลั่น	1000 ml

4. Typtone Yeast extract (TYE)

Trypton	5 g
Yeast extract	3 g
$CaCl_2$ 6H2O	1.3 g
น้ำกลั่น	1000 g

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที

5. Plant nutrient solution (Somasegaram et al., 1985)

N-free nutrient solution

Stock Solution	Element	μM	Form	M
1	Ca	1000	$CaCl_2$ 2.H2 0	2.0
2	P	500	KH_2PO_4	1.0
3	Fe	10	Fe citrate	0.02
	Mg	250	$MgSO_4$.7 H2O	0.5
	K	250	K_2SO_4	0.5
	Mn	1		
4	B	2	$MnSO_4$. H_2O	0.002
	Zn	0.5	H_3BO_3	0.004
	Cu	0.2	$ZnSO_4$. $7H_2O$	0.001
	Cp	0.1	$CuSO_4$. 7 H_2O	0.0004
	Mo	0.1	$CoSO_4$. 5 H_2O	0.0002
			Na_2MOO_4. $2H_2O$	0.0002

การเตรียม N-free nutrient solution ผสม stock solution 1 ถึง 4 อย่างละ 5 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 5 ลิตร แล้วเจือจางให้มีปริมาณ 10 ลิตร

สำหรับ treatment ที่ใส่ไนโตรเจน 70 ส่วนในล้าน เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมไนเตรตใน N-free nutrient solution ให้มีความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์

ภาคผนวก ข

ตารางประมาณจำนวนไรโซเบียม โดยเทคนิค MPN (plant infection method)

Positive tubes		Dilution step(s)			
n=4	n=2	s=10	s=8	s=6	s=4
40	20				
39		$>2.0 \times 10^5$			
38	19	2.0×10^5			
37		1.2			
36	18	8.1×10^4			
35		5.5			
34	17	3.8			
33		2.6			
32	16	1.8	$>1.3 \times 10^4$		
31		1.3			
30	15	9.1×10^3	1.3×10^4		
29		6.3	7.9×10^3		
28	14	4.5	5.1		
27		3.5	3.5		
26	13	2.2	2.4		
25		1.6	1.7		
24	12	1.1	1.1	$>7.9 \times 10^2$	
23		8.0×10^2	8.0×10^2		
22	11	5.6	5.6	7.9×10^2	
21		4.0	4.0	5.0	
20	10	2.8	2.8	3.2	
19		2.0	2.0	2.2	
18	9	1.4	1.4	1.5	
17		1.0	1.0	1.0	
16	8	7.1×10^1	7.1×10^1	7.2×10^1	$>5.0\times10^1$
15		5.0	5.0	5.1	
14	7	3.5	3.5	3.5	5.0×10^1
13		2.5	2.5	2.5	3.2
12	6	1.8	1.8	1.8	2.0
11		1.3	1.3	1.3	1.4
10	5	8.9×10^0	8.9×10^0	8.9×10^0	9.6×10^0
9		6.3	6.3	6.3	6.6
8	4	4.5	4.5	4.5	4.6
7		3.2	3.2	3.2	3.2
6	3	2.2	2.2	2.2	2.2
5		1.6	1.6	1.6	1.6
4	2	1.1	1.1	1.1	1.1
3		7.2×10^{-1}	7.2×10^{-1}	7.2×10^{-1}	7.2×10^{-1}
2	1	4.4	4.4	4.4	4.4
1		<4.4	<4.4	<4.4	<4.4
0	0				
Approx range		5×10^5	3×10^4	2×10^3	1×10^2

Factor, 95% fiducial limits (x, ÷)

n=2 4·0

n=4 2·7

* Calculated from Table $VIII_2$ of Fisher and Yates (1963)

ภาคผนวก ค

ตารางแปลผลการต้านสารปฏิชีวนะ โดยใช้ Antibiotic disc (National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992)

Zone Diameter Interpretive Chart †

Antimicrobial Agent	Code	Disc Potency	Zone Diameter Interpretive Standards (mm)			Control Zone Diameter Limits (mm)						
			Resistant	Intermediate[a]	Susceptible[b]	*E. coli* ATCC 25922	*S. aureus* ATCC 25923	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*H. influenzae* ATCC 49247[c]	*H. influenzae* ATCC 49766[c]	*N. gonorrhoeae* ATCC 49226[d]	*S. pneumoniae* ATCC 49619[e]
Azlocillin	AZ-75	75 µg				—	—	24 - 30				
P. aeruginosa			≤ 17	—	≥ 18							
Aztreonam	ATM-30	30 µg				28 - 36	—	23 - 29				
Enterobacteriaceae, [t] *P. aeruginosa & Acinetobacter*			≤ 15	16 - 21	≥ 22							
Haemophilus spp. [c]			—	—	≥ 26				30 - 38[c]	–		
Bacitracin [f]	B-10	10 U	≤ 8	9 - 12	≥ 13	—	12 - 22	—				
Carbenicillin	CB-100	100 µg				23 - 29	—	18 - 24				
Enterobacteriaceae and *Acinetobacter*			≤ 19	20 - 22	≥ 23							
P. aeruginosa			≤ 13	14 - 16	≥ 17							
Cefaclor [h,i]	CEC-30	30 µg				23 - 27	27 - 31	—				
Enterobacteriaceae [u] and staphylococci [j]			≤ 14	15 - 17	≥ 18							
Haemophilus spp. [c,k]			≤ 16	17 - 19	≥ 20				—	25 - 31[c]		
Enoxacin	ENX-10	10 µg				28 - 36	22 - 28	22 - 28				
Enterobacteriaceae and staphylococci [aa,ff]			≤ 14	15 - 17	≥ 18							
N. gonorrhoeae [d,cc]			≤31	32 - 35	≥ 36						43 - 51[d]	
Erythromycin	E-15	15 µg				—	22 - 30	—				
Staphylococcus spp. [f] and enterococci [f,yy]			≤ 13	14 - 22	≥ 23							
S. pneumoniae and other streptococci [e,f,s]			≤ 15	16 - 20	≥ 21							25 - 30[e]
Imipenem [h,i]	IPM-10	10 µg				26 - 32	—	20 - 28				
Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, Acinetobacter and staphylococci [j]			≤ 13	14 - 15	≥ 16							
Haemophilus spp. [c]			—	—	≥ 16				21 - 29[c]	—		
Kanamycin	K-30	30 µg				17 - 25	19 - 26	—				
Enterobacteriaceae and staphylococci			≤ 13	14 - 17	≥ 18							
Oxolinic Acid [f]	OA-2	2 µg	≤ 10	—	≥ 11	20 - 24	10 - 13	—				
Penicillin [h]	P-10	10 U				—	26 - 37	—				
Staphylococcus spp. [j,pp]			≤ 28	—	≥ 29							
Enterococcus spp. [n,o]			≤ 14	—	≥ 15							
L. monocytogenes [f]			≤ 19	20 - 27	≥ 28							
N. gonorrhoeae [d,qq]			≤ 26	27 - 46[w]	≥ 47						26 - 34[d]	
Streptococci (non-*S. pneumoniae*) [e,i,rr]			≤ 19	20 - 27	≥ 28							24 - 30[e]
Piperacillin	PIP-100	100 µg				24 - 30	—	25 - 33				
Enterobacteriaceae and *Acinetobacter*			≤ 17	18 - 20	≥ 21							
P. aeruginosa			≤ 17	—	≥ 18							
Piperacillin/ Tazobactam [g]	TZP-110	100/10 µg				24 - 30[g]	27 - 36	25 - 33[ii]				
Enterobacteriaceae and *Acinetobacter*			≤ 17	18 - 20	≥ 21							
Staphylococcus spp. [j,ii] and *P. aeruginosa* [ii]			≤ 17	—	≥ 18							
Polymyxin B [f,dd]	PB-300	300 U	≤ 8	9 - 11	≥ 12	12 - 16	—	—				
Rifampin	RA-5	5 µg				8 - 10	26 - 34	—				
Staphylococcus spp. [ss] and *Enterococcus* spp. [yy]			≤ 16	17 - 19	≥ 20							
Haemophilus spp. [c]			≤ 16	17 - 19	≥ 20				22 - 30[c]	—		
S. pneumoniae [e,ss]			≤ 16	17 - 18	≥ 19							25 - 30[e]
Sparfloxacin	SPX-5	5 µg				30 - 38	27 - 33	21 - 29[ii]				
Staphylococcus spp. [aa]			≤ 15	16 - 18	≥ 19							
S. pneumoniae [e]			≤ 15[ii]	16 - 18[ii]	≥ 19							21 - 27[e]
Spectinomycin	SPT-100	100 µg				—	—	—				
N. gonorrhoeae [d]			≤ 14	15 - 17[w]	≥ 18						23 - 29[d]	
Streptomycin												
Testing enterococci for high level resistance [n,o,gg]	S-300	300 µg	6	7 - 9[hh]	≥ 10	—	—	—				
Enterobacteriaceae	S-10	10 µg	≤ 11	12 - 14	≥ 15	12 - 20	14 - 22	—				
Sulfisoxazole [tt]	G-.25	250 µg				15 - 23	24 - 34	—				
Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, Acinetobacter, staphylococci and *V. cholerae* [m]			≤ 12	13 - 16	≥ 17							
Tetracycline [ee]	Te-30	30 µg				18 - 25	24 - 30	—				
Enterobacteriaceae, P. aeruginosa, Acinetobacter, staphylococci, enterococci [yy] and *V. cholerae* [m]			≤ 14	15 - 18	≥ 19							
Haemophilus spp. [c]			≤ 25	26 - 28	≥ 29				14 - 22[c]	—		
N. gonorrhoeae [d,uu]			≤ 30	31 - 37[w]	≥ 38						30 - 42[d]	
S. pneumoniae and other streptococci [e]			≤ 18	19 - 22	≥ 23							27 - 31[e]
Vancomycin	Va-30	30 µg				—	17 - 21	—				
Staphylococcus spp. [vv]			—	—	≥ 15							
Enterococcus spp. [n,o,ww]			≤ 14	15 - 16	≥ 17							
S. pneumoniae and other streptococci [e,xx]			—	—	≥ 17							20 - 27[e]

† Adapted in part from NCCLS Document M100-S9: Ninth Informational Supplement, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, with permission. The complete standard may be obtained from the National Committee for Clinical Laboratory Standards, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA. Values not in M100-S9 are explained in other footnotes. For appropriate MIC correlates, refer to M100-S9.[6-8]

ภาคผนวก ง

ตารางผนวกที่ ง-1 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ 1 (SPH)กับไรโซเบียมทั้ง 16 ไอโซเลทจากป่าครบุรี โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1 " กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และ กำหนดสัญลักษณ์ "0 " กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

ขนาด DNA (Kb)	1.4	1.35	1.2	1.07	0.9	0.87	0.80	0.70	0.64	0.50
P1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
P2	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0
P3	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
P4	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
P5	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
P6	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
P7	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
P8	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
P9	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
P10	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
P11	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
P12	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
P13	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1
P14	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
P15	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
P16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ ง-2 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ 1 (SPH)กับไรโซเบียมทั้ง 16ไอโซเลทจากป่าหนองระเวียง โดยกำหนดสัญลักษณ์ “1 “ กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และสัญลักษณ์ “0 “ กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

ขนาด DNA (Kb)	1.4	1.35	1.2	1.07	0.9	0.87	0.80	0.70	0.64	0.50
N1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
N2	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
N3	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
N4	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
N5	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
N6	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
N7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
N8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
N9	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
N10	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
N11	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
N12	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1
N13	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
N14	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0
N15	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
N16	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1

ตารางผนวกที่ ง-3 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ 2 (RF) กับไรโซเบียมทั้ง 16 ไอโซเลทจากป่าครบุรี โดยกำหนดสัญลักษณ์ “1 “ กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และ สัญลักษณ์ “0 “ กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

ขนาดDNA(Kb)	1.6	1.5	1.45	1.4	1.2	1.01	0.9	0.87	0.80	0.70	0.60	0.50
P1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
P2	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0
P3	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
P4	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
P5	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
P6	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
P7	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
P8	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
P9	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
P10	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
P11	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
P12	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
P13	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
P14	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
P15	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
P16	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

ตารางผนวกที่ ง-4 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ 2 (RF) กับไรโซเบียมทั้ง 16 ไอโซเลทจากป่าหนองระเวียง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1 " กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และ สัญลักษณ์ "0 " กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

ขนาดDNA(Kb)	1.6	1.5	1.45	1.4	1.2	1.01	0.9	0.87	0.80	0.70	0.60	0.50
N1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
N2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
N3	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0
N4	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
N5	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
N6	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
N7	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
N8	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
N9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
N10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
N11	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
N12	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
N13	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
N14	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
N15	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
N16	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1

ตารางผนวกที่ ง-5 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ 4 กับไรโซเบียมทั้ง 16 ไอโซเลทจากป่าครบุรี โดยกำหนดสัญลักษณ์ “1 “ กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และ สัญลักษณ์ “0 “ กรณีที่ไม่เกิดแถบ ดีเอ็นเอ

ขนาด DNA (Kb)	3.0	2.0	1.8	1.7	1.6	1.4	1.35	1.25	1.1	1.07	1.01	0.87	0.82	0.80	0.70	0.60	0.50	0.29
P1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
P2	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1
P3	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
P4	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
P5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0
P6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0
P7	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
P8	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
P9	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
P10	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
P11	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
P12	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
P13	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
P14	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
P15	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
P16	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ ง-6 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ 4 กับไรโซเบียมทั้ง 16 ไอโซเลทจากป่าหนองระเวียง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1 " กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และ กำหนดสัญลักษณ์ "0 " กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

ขนาด DNA (Kb)	3.0	2.0	1.8	1.7	1.6	1.4	1.35	1.25	1.1	1.07	1.01	0.87	0.82	0.80	0.70	0.60	0.50	0.29
N1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1
N2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
N3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1
N4	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
N5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
N6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
N7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
N8	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
N9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N10	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N11	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
N12	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
N13	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1
N14	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
N15	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
N16	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ ง-7 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ 6 กับไรโซเบียมทั้ง 16 ไอโซเลทจากป่าครบุรี โดยกำหนดสัญลักษณ์ “1 “ กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และ กำหนดสัญลักษณ์ “0 “ กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

ขนาด DNA (Kb)	2.8	2..4	2.0	1.8	1.7	1.6	1.5	1.4	1.35	1.1	1.07	0.9	0.87	0.8	0.75	0.70	0.55	0.50
P1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
P2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
P3	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
P4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
P5	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
P6	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
P7	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
P8	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
P9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
P10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
P11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
P12	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
P13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
P14	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1
P15	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
P16	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1

ตารางผนวกที่ ง-8 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ 6 กับไรโซเบียมทั้ง 16 ไอโซเลทจากป่าหนองระเวียง โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1 " กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และ กำหนดสัญลักษณ์ "0 " กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

ขนาด DNA (Kb)	2.8	2..4	2.0	1.8	1.7	1.6	1.5	1.40	1.35	1.1	1.07	0.9	0.87	0.8	0.75	0.70	0.55	0.50
N1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
N3	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
N4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
N5	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N6	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
N7	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
N8	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
N9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
N10	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
N11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
N12	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
N13	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
N14	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1
N15	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
N16	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ ง-9 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ 7 กับไรโซเบียมทั้ง 16 ไอโซเลทจากป่าครบุรี โดยกำหนดสัญลักษณ์ “1 “ กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และ กำหนดสัญลักษณ์ “0 “ กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

ขนาดDNA (Kb)	2.7	2.1	2.0	1.7	1.6	1.4	1.35	1.20	1.07	1.01	0.9	0.87	0.80	0.75	0.60	0.50
P1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
P3	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
P4	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
P5	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
P6	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
P7	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
P8	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
P9	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
P10	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
P11	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P12	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0
P13	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1
P14	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
P15	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
P16	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0

ตารางผนวกที่ ง-10 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ 7 กับไรโซเบียมทั้ง 16 ไอโซเลทจากป่าครบุรี โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1 " กรณีที่เกิดแถบดีเอ็นเอ และ กำหนดสัญลักษณ์ "0 " กรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

ขนาดDNA (Kb)	2.7	2.1	2.0	1.7	1.6	1.4	1.35	1.20	1.07	1.01	0.9	0.87	0.80	0.75	0.60	0.50
N1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
N2	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
N3	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0
N4	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
N5	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
N6	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0
N7	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0
N8	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
N9	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
N10	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1
N11	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1
N12	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
N13	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
N14	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1
N15	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
N16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

ภาคผนวก จ

ตารางแสดงค่า Genetic distance จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16
P1																
P2	0.5600															
P3	0.6667	0.7222														
P4	0.7586	0.7272	0.2963													
P5	0.8000	0.8333	0.7568	0.8000												
P6	0.8181	0.7838	0.7105	0.7143	0.125											
P7	0.7879	0.7895	0.6486	0.6857	0.5625	0.5152										
P8	0.7931	0.7942	0.8159	0.8286	0.6333	0.6667	0.7143									
P9	0.6552	0.6364	0.5588	0.5000	0.7500	0.6667	0.5588	0.7059								
P10	0.5926	0.6250	0.6285	0.5806	0.7058	0.6571	0.7027	0.6563	0.4333							
P11	0.6190	0.7931	0.7000	0.7500	0.5417	0.5926	0.7000	0.7857	0.6428	0.6296						
P12	0.7273	0.8000	0.5946	0.7368	0.5882	0.5833	0.6667	0.8250	0.6923	0.6486	0.5357					
P13	0.7059	0.6486	0.6829	0.6111	0.7179	0.6750	0.6829	0.7105	0.4857	0.4242	0.7353	0.8085				
P14	0.6552	0.6765	0.7105	0.7143	0.8750	0.8571	0.6756	0.8108	0.5882	0.6176	0.8125	0.7857	0.5278			
P15	0.7714	0.7105	0.6410	0.6389	0.8333	0.7907	0.5675	0.8293	0.5946	0.6579	0.8000	0.7500	0.6744	0.595		
P16	0.8285	0.8809	0.7561	0.7949	0.4333	0.4848	0.5833	0.7895	0.7805	0.7435	0.6667	0.3939	0.7500	0.8372	0.7442	

ภาคผนวก จ (ต่อ)

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16
N1	0.8846	0.7931	0.8182	0.7500	0.7931	0.7333	0.8181	0.7857	0.8125	0.7667	0.8800	0.8919	0.8056	0.8824	0.8000	0.8571
N2	0.7727	0.6250	0.8065	0.8214	0.8620	0.8000	0.8065	0.8571	0.7586	0.7037	0.9167	0.8857	0.7576	0.8000	0.7097	0.8485
N3	0.8649	0.8000	0.8182	0.8000	0.7692	0.7250	0.7000	0.7632	0.7857	0.7179	0.8919	0.8000	0.6977	0.7857	0.7209	0.6750
N4	0.8148	0.7742	0.6452	0.6429	0.7742	0.6774	0.6452	0.7241	0.5862	0.6667	0.8077	0.7778	0.6857	0.7576	0.6765	0.7353
N5	0.7727	0.8214	0.8788	0.8214	0.9000	0.8387	0.7667	0.8966	0.8000	0.7500	0.9600	0.8529	0.8286	0.8000	0.8235	0.8485
N6	0.8929	0.9118	0.8919	0.8438	0.8788	0.8571	0.8286	0.9091	0.8889	0.8857	0.9655	0.8378	0.9024	0.9744	0.8421	0.8000
N7	0.8182	0.7500	0.7436	0.7143	0.8462	0.8000	0.7750	0.7428	0.7027	0.7297	0.8824	0.8139	0.7073	0.7368	0.7907	0.8095
N8	0.7931	0.6774	0.7500	0.6774	0.8286	0.7429	0.7500	0.7500	0.6250	0.6563	0.8667	0.8250	0.6388	0.7059	0.893	0.8205
N9	0.8333	0.8667	0.8125	0.7407	0.8276	0.8065	0.8485	0.8214	0.7667	0.7143	0.8750	0.8889	0.7647	0.8787	0.7941	0.7813
N10	0.9667	0.9429	0.8286	0.8065	0.9722	0.9744	0.8919	0.8750	0.8571	0.8857	0.9655	0.8974	0.8750	0.8571	0.7428	0.9231
N11	0.8333	0.7188	0.6765	0.5862	0.8919	0.8108	0.8158	0.7879	0.5333	0.6563	0.8667	0.7949	0.7105	0.7428	0.769	0.8500
N12	0.7778	0.7419	0.6563	0.6552	0.8529	08000	0.8056	0.7742	0.5517	0.6333	0.8148	0.7838	0.7297	0.7647	0.789	0.8421
N13	0.8846	0.7037	0.8529	0.8333	0.8333	0.8125	0.8182	0.8667	0.8485	0.8064	0.9629	0.9211	0.8378	0.8484	0.8000	0.8889
N14	0.8181	0.7838	0.7105	0.7500	0.8462	0.8293	0.7750	0.8108	0.7027	0.7297	0.8484	0.7250	0.767	0.8000	0.7317	0.7500
N15	0.6875	0.7027	0.7317	0.7368	0.8293	0.8139	0.7619	0.7948	0.7561	0.7500	0.8611	0.8000	0.7556	0.8410	0.6905	0.7955
N16	0.8519	0.8788	0.8286	0.7667	0.8788	0.8571	0.8919	0.8387	0.8889	0.7813	0.8889	0.8974	0.8462	0.9189	0.8108	0.9231

ภาคผนวก จ (ต่อ)

	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	N12	N13	N14	N15	N16
N1																
N2	0.7619															
N3	0.4815	0.7813														
N4	0.7083	0.6818	0.6667													
N5	0.8182	0.6667	0.7419	0.8400												
N6	0.8000	0.8800	0.6969	0.8621	0.7273											
N7	0.7333	0.8750	0.6216	0.6333	0.9091	0.8889										
N8	0.7407	0.8148	0.6571	0.6296	0.8571	0.9091	0.2400									
N9	0.6500	0.8095	0.6667	0.6956	0.7500	0.7391	0.8437	0.8214								
N10	0.8462	1.000	0.7714	0.8214	0.9231	0.8145	0.7500	0.8750	0.7917							
N11	0.8279	0.8148	0.7948	0.5769	0.8571	0.8000	0.4286	0.4615	0.7778	0.7143						
N12	0.8571	0.8000	0.8462	0.6538	0.8462	0.9032	0.6000	0.5384	0.7600	0.8276	0.3478					
N13	0.7273	0.8182	0.7187	0.8928	0.8182	0.8462	0.8125	0.8275	0.8261	0.8889	0.7857	0.7692				
N14	0.7742	0.8000	0.7250	0.6774	0.8387	0.7500	0.5000	0.5806	0.7667	0.6207	0.4828	0.5000	0.8125			
N15	0.7941	0.8529	0.6829	0.7778	0.8529	0.5667	0.6579	0.6944	0.7879	0.7353	0.6944	0.7500	0.8286	0.6216		
N16	0.6956	0.9231	0.7714	0.9000	0.8800	0.8148	0.7878	0.8000	0.7392	0.7200	0.8750	0.8667	0.8462	0.7879	0.5667	

ภาคผนวก ฉ

การเตรียมสารละลายต่าง ๆ ทางดีเอ็นเอ

สารละลายที่ใช้ในการศึกษาทางดีเอ็นเอ

ก. สารละลายบัฟเฟอร์ SET ประกอบด้วย ซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ (W/V) Tris – HCI 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.6 และ EDTA 50 มิลลิโมลาร์

ข. สารละลายไลโซไซม์ ประกอบด้วย 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กลูโคส 50 มิลลิโมลาร์ Tris – HCI 2.5 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 EDTA 10 มิลลิโมลาร์

ค. สารละลายบัฟเฟอร์ TE ประกอบด้วย Tris – HCI 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 EDTA 1 มิลลิโมลาร์ pH 8.0

ง. สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-borate ประกอบด้วย Tris-HCI 89 มิลลิโมลาร์ Boric acid 89 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA 2.5 มิลลิโมลาร์

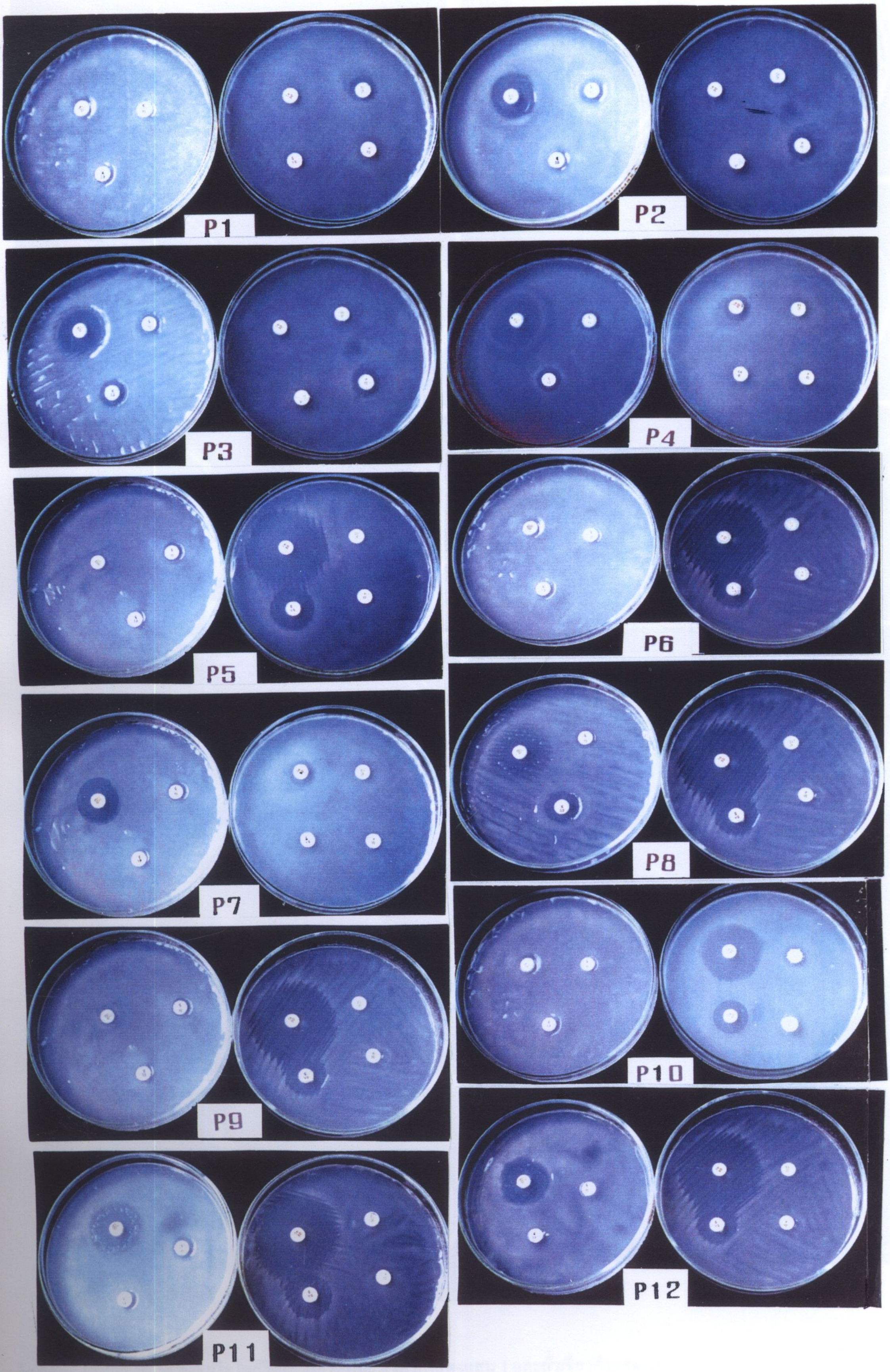
จ. สีติดตาม (Tracking dye) ใช้สำหรับผสมดีเอ็นเอก่อนทำอิเลคโตรโฟริซิส ประกอบด้วย Bromphenol blue 0.025 เปอร์เซ็นต์ (W/V), Ficoll 400 40 กรัมเปอร์เซ็นต์ SDS 0.5 กรัมเปอร์เซ็นต์

ฉ. สารละลาย phenol เตรียมโดยละลายฟีนอล 250 กรัม ใน 25 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ จำนวน 150 มิลลิลิตร เติม Tris-base ลงไป 2.5 กรัม และ Hydroxy quinoline 0.45 กรัม เก็บในขวดสีชา ที่ 4 องศาเซลเซียส

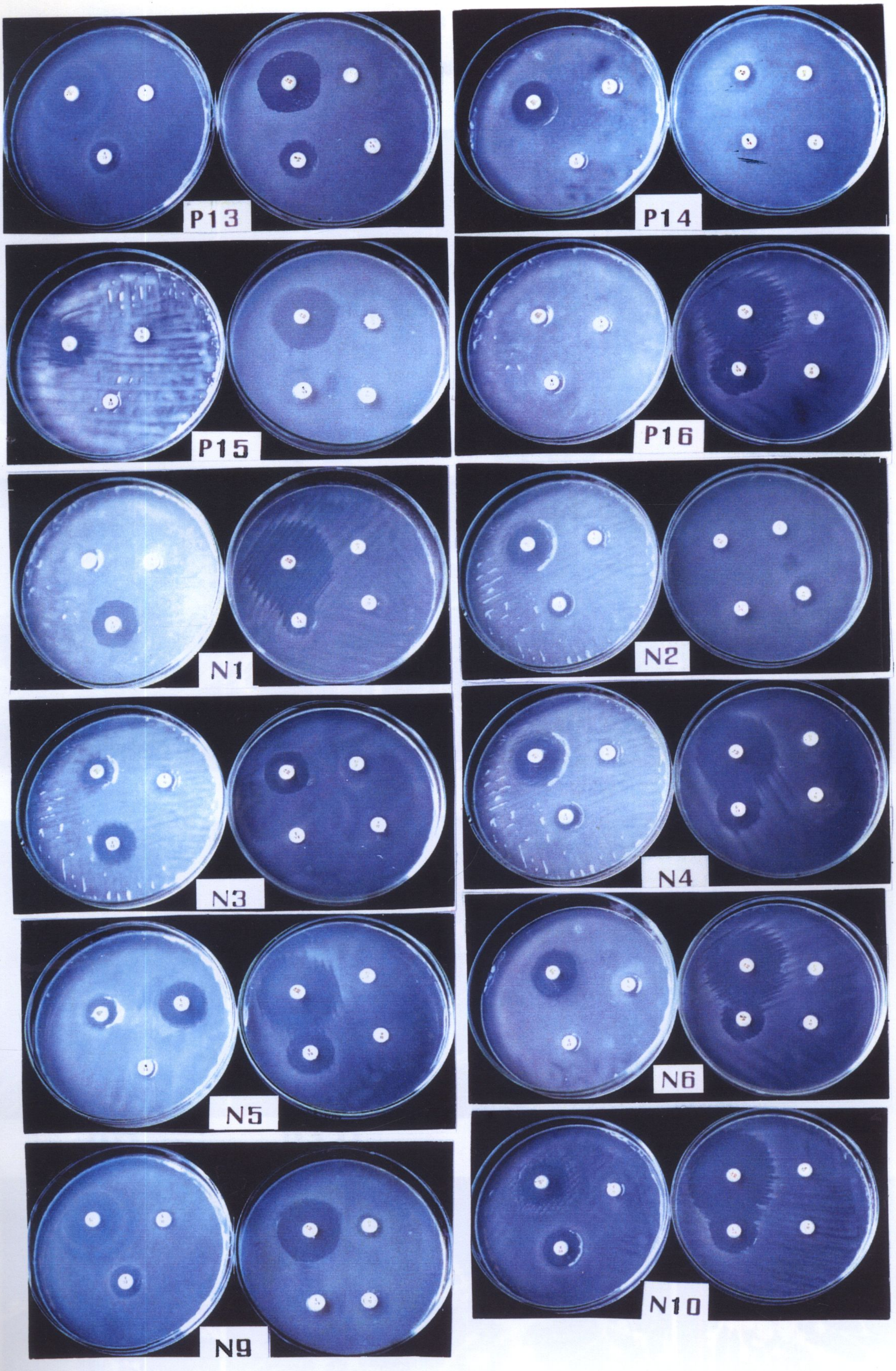
ช. สารละลาย chloroform : isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24 : 1, สารละลายโซเดียมอะซิเตต pH 4.8, แอบโซลูทแอลกอฮอล์, ไอโซโพรพานอล (2-propanol), 70% เอธานอล

ภาคผนวก ช

ภาพการต้านสารปฏิชีวนะของเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่ในโครงการฯ



ภาพภาคผนวก ช (ต่อ)

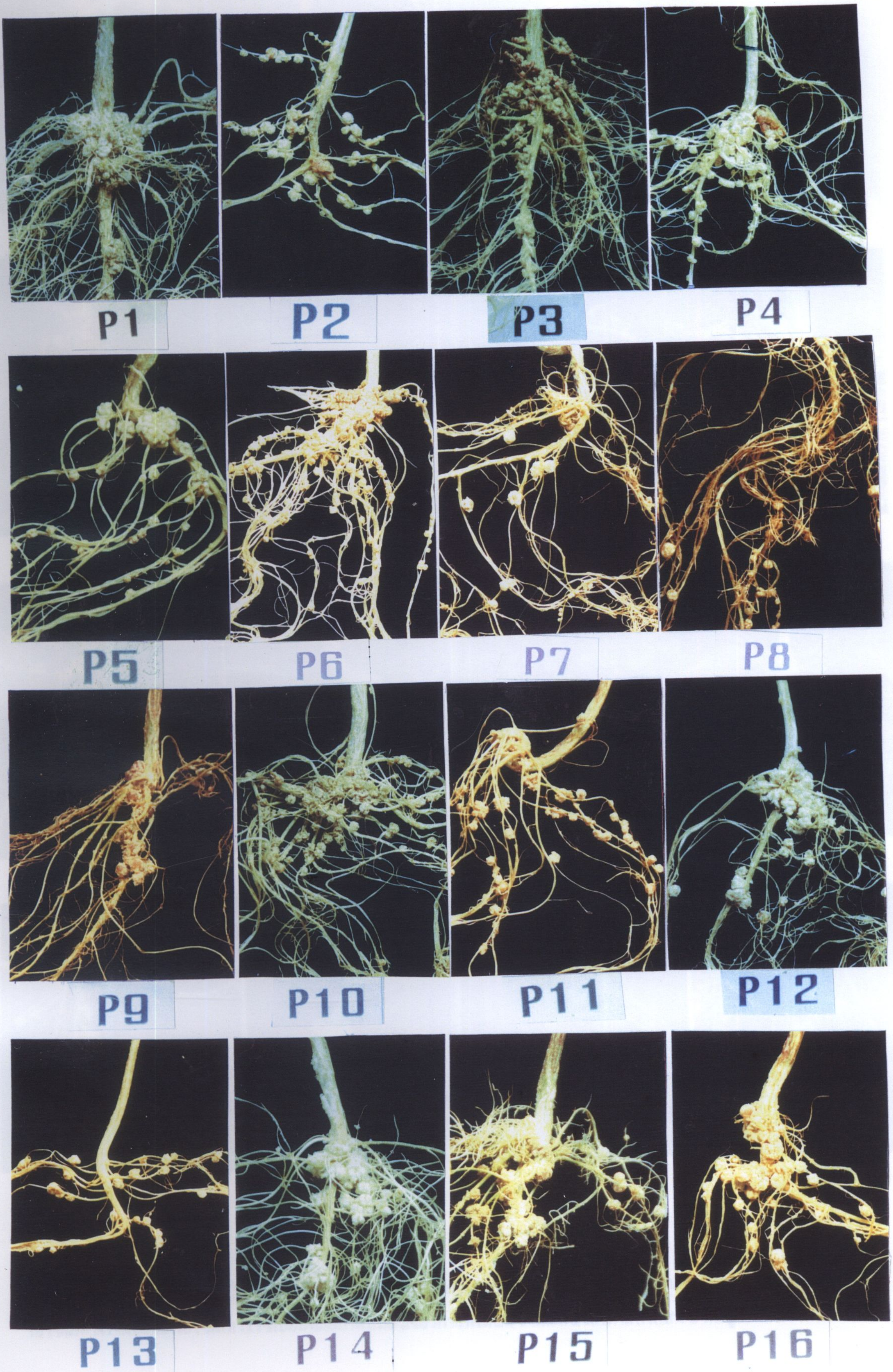


ไอโซเลท P1-P12 คือ ไอโซเลทไรโซเบียมที่แยกได้ปมถั่วเขียวกำแพงแสน 1 และถั่วเขียวกำแพงแสน 2 ที่ปลูกในดิน อ. ครบุรี

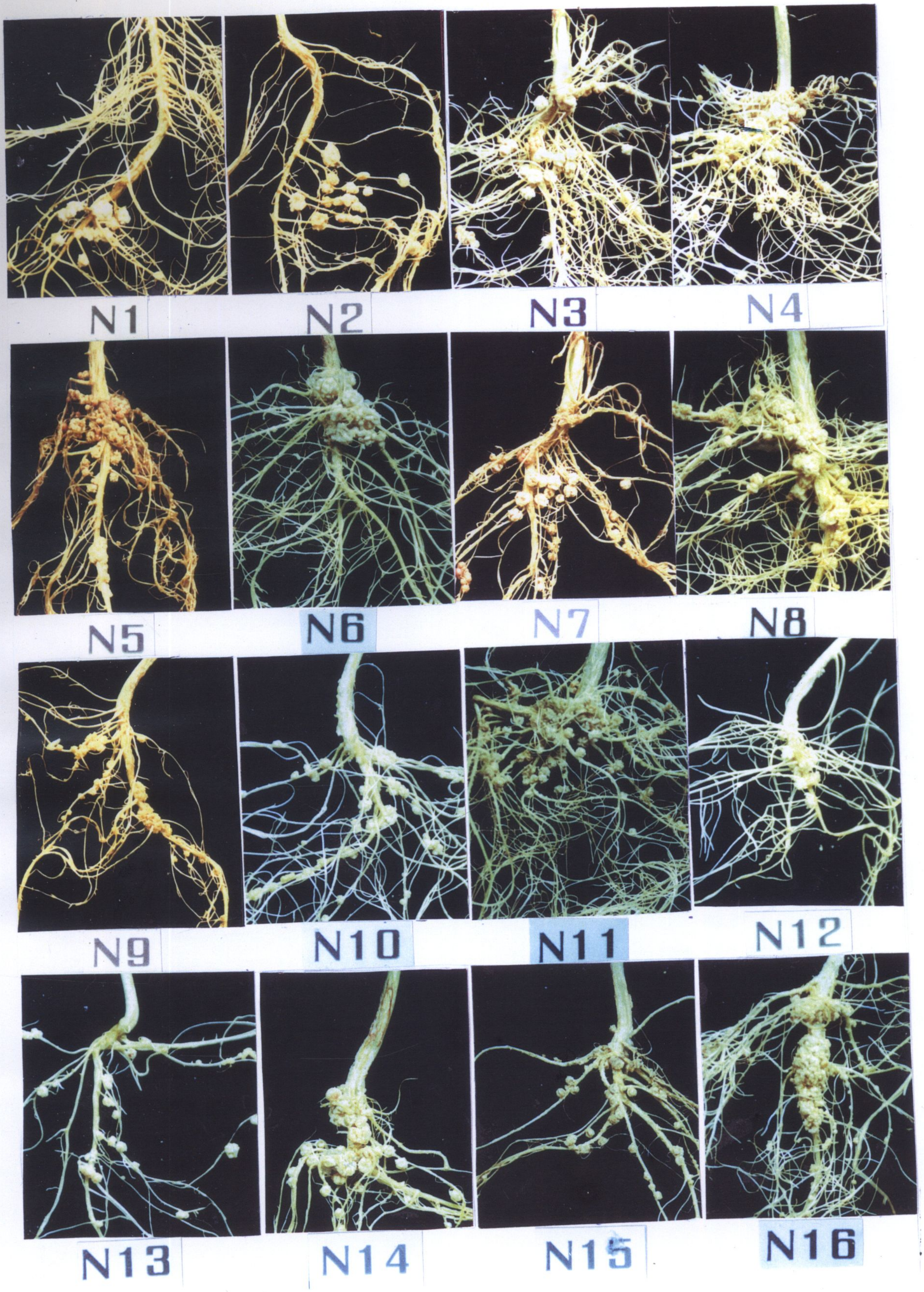
ไอโซเลท N1-N10 คือ ไอโซเลทไรโซเบียมที่แยกได้ปมถั่วเขียวกำแพงแสน 1 และถั่วเขียวกำแพงแสน 2 ที่ปลูกในดิน ต.หนองระเวียง

ภาคผนวก ซ

ภาพแสดงลักษณะการสร้างปมของเชื้อจากพื้นที่ในโครงการฯ



ภาพภาคผนวก ซ (ต่อ)



ไอโซเลท P1-P16 คือ ไอโซเลทไรโซเบียมที่แยกได้ปมถั่วเขียวกำแพงแสน 1 และถั่วเขียวกำแพงแสน 2 ที่ปลูกในดิน อ.ครบุรี
ไอโซเลท N1-N16 คือ ไอโซเลทไรโซเบียมที่แยกได้ปมถั่วเขียวกำแพงแสน 1 และถั่วเขียวกำแพงแสน 2 ที่ปลูกในดิน ต.หนองระเวียง

ประวัติผู้เขียน

นางสาว รัตนวดี หอมจันทร์ เกิดวันที่ 29 กันยายน 2517 ที่จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2539 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2540