การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรวจความสามารถของไรโซเบียมถั่วเหลือง ในการแข่งขันเข้าสร้างปมภาคสนาม[1]

ธันปภา จันทเพ็ชร[1] และ กาญจนา ชาญสง่าเวช[2]

บทคัดย่อ

ไรโซเบียมถั่วเหลืองเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลืองและเปลี่ยนไนโตรเจนจากอากาศให้เป็นแอมโมเนียสำหรับถั่วเหลืองใช้ในการเจริญ การปลูกถั่วเหลืองเป็นพืชหมุนเวียนสลับกับการปลูกพืชเช่น ข้าว จึงเป็นการลดการใช้ปุ๋ยเคมีประเภทไนโตรเจน เป็นการลดการขาดดุลการค้าจากการนำเข้าปุ๋ยเคมี และการลดมลภาวะทางน้ำประเภทยูโทรฟิเคชั่น บรรทัดฐานแรกในการพัฒนาปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลืองประกอบด้วยการคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่สามารถแข่งขันกับไรโซเบียมท้องถิ่น ในการเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลือง หลังจากนั้นจะคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน ในการทดลองนี้ได้คัดเลือกไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 เพิ่มจำนวนเซลล์โดยเลี้ยงในอาหารสูตร yeast extract mannitol และคลุกเซลล์กับดินพีต (peat) ในสัดส่วน $2x10^8$ เซลล์ต่อกรัมพีต คลุกเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 กับปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม NA7 และปลูกเมล็ดถั่วเหลืองที่คลุกหรือไม่คลุกกับปุ๋ยไรโซเบียม NA7 ลงในแปลงขนาด 15 x 24 เมตรที่ตำบลน้ำมวบ อำเภอเวียงสา จังหวัดน่านในปีเพาะปลูก 2550/2551 แยกแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลืองหลังการเพาะปลูก 1 เดือน และนำมาหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยวิธี RAPD-PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ RPO1 หรือ CRL-7 เพื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ NA7 หากตรวจพบลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังกล่าวจากแบคทีเรียที่แยกได้จากปมราก แสดงว่าไรโซเบียมสายพันธุ์ NA7 สามารถแข่งขันกับไรโซเบียมท้องถิ่นในการเข้าสร้างปมที่ตำบลน้ำมวบ ผลการทดลองได้แยกแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง 198 ไอโซเลต แบ่งเป็นประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว 147 ไอโซเลต และประเภทเพิ่มจำนวนช้า 51 ไอโซเลต เนื่องจากสายพันธุ์ NA7 เป็นไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า จึงหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนช้า 51 ไอโซเลต และพบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ NA7 ในสัดส่วน 25.5%

คำสำคัญ: ไรโซเบียมถั่วเหลือง การแข่งขันเข้าสร้างปม

บทนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจที่เป็นอาหารและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่นน้ำมันถั่วเหลือง เต้าหู้ เต้าเจี้ยว ซีอิ๊ว นอกจากนี้ที่ปมรากถั่วเหลืองมีแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้แก่ ไรโซเบียมถั่วเหลือง (soybean rhizobia) ซึ่งเปลี่ยนไนโตรเจนในอากาศให้เป็นแอมโมเนียซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ถั่วเหลืองนำไปใช้ในการเจริญ ในขณะเดียวกันถั่วเหลืองให้พลังงานในรูปเอทีพีแก่ไรโซเบียมถั่วเหลือง จึงเป็นการตรึงไนโตรเจนแบบพึ่งพา (symbiotic nitrogen fixation) ในประเทศไทยเกษตรกรไถคราดลำต้นและใบถั่วเหลืองหลังการเก็บเกี่ยว เพื่อเป็นปุ๋ยบำรุงดิน จึงปลูกถั่วเหลืองเป็นพืชหมุนเวียนสลับกับพืชเศรษฐกิจอื่นเช่น ข้าวและข้าวโพด เป็นต้น

---

[1] สนับสนุนงานวิจัยโดยทุนโครงการสร้างกำลังคนเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมระดับปริญญาโท (สกว.-สสว.)

[2] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท กทม. 10330

ในปัจจุบันพื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองในประเทศไทยลดลงดังแสดงในตารางที่ 1 เพราะเกษตรกรนิยมปลูกพืชเศรษฐกิจชนิดอื่นที่ราคาขายสูงกว่าถั่วเหลืองเช่น ข้าว ข้าวโพด อ้อย อย่างไรก็ตาม การปลูกถั่วเหลืองเป็นพืชหมุนเวียน มีประโยชน์ด้านการอนุรักษ์ดินและแหล่งน้ำ ดังนั้นจึงควรส่งเสริมการปลูกถั่วเหลืองและการวิจัยคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองและพันธุ์ถั่วเหลืองที่ให้ผลผลิตสูงกว่าผลผลิตเฉลี่ยในประเทศไทยในปัจจุบัน ซึ่งมีประมาณครึ่งหนึ่งของประเทศที่เป็นผู้นำด้านการส่งออกถั่วเหลือง(ตารางที่2)

ตารางที่ 1 เนื้อที่เพาะปลูกถั่วเหลืองในฤดูฝนและฤดูแล้ง รวมทั้งผลผลิตเฉลี่ย

ปี พ.ศ.	พื้นที่เพาะปลูก (1000ไร่)	ผลผลิตเฉลี่ย (กก./ไร่)
2541	1,467	234
2542	1,451	227
2543	1,396	232
2544	1,154	236
2545	1,130	238
2546	961	246
2547	945	238
2548	929	250
2549	886	250
2550	831	253

ที่มา : http://www.oae.go.th/statistic/yearbook50/section2/sec2table26.pdf

ตารางที่ 2 ผลผลิตเฉลี่ยถั่วเหลือง (กก./ไร่) ในประเทศไทยมีค่าประมาณครึ่งหนึ่งของผลผลิตเฉลี่ยถั่วเหลืองในประเทศที่เป็นผู้นำด้านการส่งออกถั่วเหลือง

ลำดับที่	ประเทศ / พ.ศ.	ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ (กก.)			
		2547	2548	2549	2550
1	สหรัฐอเมริกา	454	463	465	370
2	บราซิล	368	357	381	451
3	อาร์เจนตินา	352	437	429	452
4	จีน	291	273	273	280
21	ไทย	238	250	250	253

ที่มา : http://www.oae.go.th/statistic/yearbook50/section2/sec2table25.pdf

ในประเทศที่เป็นผู้นำด้านการส่งออกถั่วเหลืองมีการวิจัยด้านการคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองเพื่อผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม สำหรับคลุกกับเมล็ดถั่วเหลืองก่อนปลูกลงดิน (Aguilar และคณะ, 2001; Brutti และคณะ, 1998; de Jensen และคณะ, 2004; Hungria และคณะ, 2001; Thomas-Oates และคณะ, 2003) ในประเทศไทย Chanthapetch and Chansa-ngavej (2008) คัดเลือกไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพคลุกกับเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ เชียงใหม่ 60 และทดลองปลูกภาคสนามในแปลงทดลองขนาด 15 x 24 เมตร ที่ตำบลน้ำมวบ อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ผลการทดลองได้ผลผลิตเฉลี่ยของถั่วเหลือง 223.2 กิโลกรัมต่อไร่ ในแปลงควบคุมที่ไม่คลุกเมล็ดถั่วเหลืองกับปุ๋ยใดๆ และ 231.0 กิโลกรัมต่อไร่ ในแปลงที่ปลูกเมล็ดถั่วเหลืองหลังจากคลุกกับปุ๋ยชีวภาพฯ NA 7 คิดเป็นการเพิ่มผลผลิตเพียง 4% ทั้งนี้อาจเป็นเพราะไรโซเบียมถั่วเหลือง NA 7 ไม่สามารถแข่งขันกับไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีอยู่เดิมในแปลงทดลองที่ตำบลน้ำมวบ อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน วัตถุประสงค์ของการทดลองเพื่อหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองที่ปลูกในแปลงทดลองที่ตำบลน้ำมวบ อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ในปีเพาะปลูก 2550/2551 และเปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ NA 7 เพื่อตรวจระดับความสามารถของสายพันธุ์ NA 7 ในการแข่งขันกับไรโซเบียมท้องถิ่นในการเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลือง ในการทดลองนี้ หาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไรโซเบียมถั่วเหลือง โดยวิธี RAPD-PCR โดยใช้ RPO1 หรือ CRL-7 เป็นไพร์เมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RPO1 ได้แก่ 5'AATTTTCAAGCGTCGTGCCA3' ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ที่เกาะ (anneal) บริเวณอนุรักษ์ของโพรโมเตอร์ *nifH* ของ *Rhizobium meliloti* 3 สายพันธุ์ (Schofield and Watson, 1985) สาเหตุที่เลือก RPO1 เป็นไพร์เมอร์ เพราะอาจใช้การเกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ระบุการมีหน่วยย่อย Fe protein ของเอนไซม์ไนโตรจีเนสซึ่งระบุการสังเคราะห์โดยยีน *nifH* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ CRL-7 คือ 5'GCCCGCCGCC3' ตามที่ระบุโดย Mathis and McMillin (1996) สาเหตุที่เลือกใช้ไพร์เมอร์นี้ในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพราะตั้งสมมติฐานว่า แบคทีเรียที่ดีเอ็นเอมีบริเวณที่มี GC สูงอาจทนร้อน เพราะนิวคลีโอไทด์ G เชื่อมกับ

นิวคลีโอไทด์ C ด้วยพันธะไฮโดรเจนจำนวน 3 พันธะ ย่อมใช้พลังงานในการทำลายพันธะไฮโดรเจนมากกว่าการทำลายพันธะไฮโดรเจน 2 พันธะที่เชื่อมนิวคลีโอไทด์ A กับ T ดังนั้นจึงต้องการข้อมูลเบื้องต้นเรื่องจำนวนแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้ CRL-7 เป็นไพร์เมอร์ประกอบการหาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการทนร้อนของไรโซเบียมถั่วเหลืองกับจำนวนแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ดังกล่าว ทั้งนี้เพราะดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่มีบริเวณ GC-rich มาก จะเกิดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากการเกาะของไพร์เมอร์ CRL-7 ที่บริเวณหลายแห่งในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนโดยวิธีพีซีอาร์ การคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภททนร้อน อาจมีประโยชน์ในการใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำหรับใช้ในภาวะโลกอุ่น นอกจากนี้ความสำคัญของการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมทนร้อนมีดังนี้

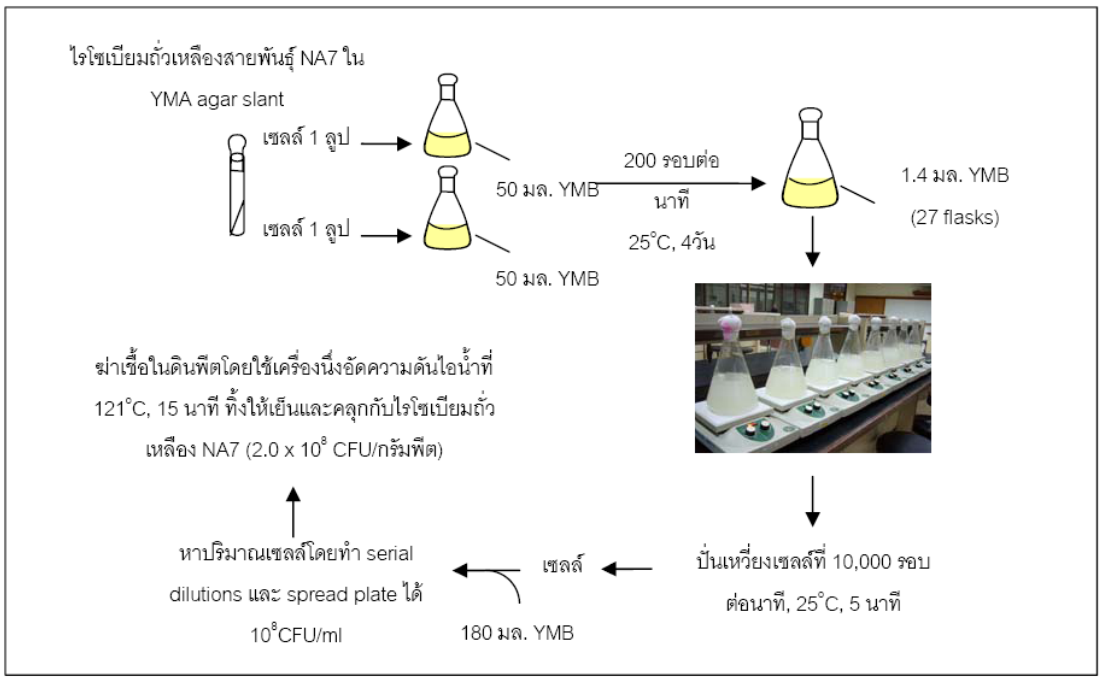
ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมที่มีจำหน่ายในท้องตลาดในปัจจุบัน ต้องเก็บรักษาในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำหรือในตู้เย็นเพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ในปุ๋ยชีวภาพฯ แบ่งเซลล์จนกระทั่งเซลล์มีจำนวนเกิน 10^8 เซลล์ต่อกรัมปุ๋ย ซึ่งอาจมีผลต่อความสามารถของเซลล์ในการเข้าสร้างปม ในปี ค.ศ. 2003 Loh และ Stacey รายงานว่า ถ้าความหนาแน่นของไรโซเบียมประเภทเพิ่มจำนวนช้า สูงกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะเกิดการกระตุ้นการแสดงออกของ $nodD_2$ ซึ่งยับยั้งการแสดงออกของ *nodYABC* ซึ่งระบุรหัสการสังเคราะห์เอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์ Nod factors ที่มีส่วนช่วยให้เซลล์เมมเบรนของรากขนอ่อนของถั่วเหลือง เว้าเป็น infection sac และยืดยาวเป็น infection thread นำไรโซเบียมเข้าไปในเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ (cortex) ของรากขนอ่อน เหนี่ยวนำให้เซลล์ในชั้นคอร์เทกซ์แบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว จนเกิดเป็นปม (Banfalvi et al. 1988 ; Stacey, 1995)

ไรโซเบียมถั่วเหลืองทนร้อนหมายถึงไรโซเบียมถั่วเหลืองที่เพิ่มจำนวนได้ที่อุณหภูมิสูงเช่น 37°C และ 40°C หากใช้ไรโซเบียมถั่วเหลืองทนร้อนผลิตปุ๋ยชีวภาพ คาดว่าจะสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30°C - 32°C) ได้โดยเซลล์ไม่เพิ่มจำนวนมากจนกระทั่งความหนาแน่นเซลล์สูง ทำให้เกิดการยับยั้งการเข้าสร้างปมดังกล่าวข้างต้น การเก็บปุ๋ยชีวภาพที่อุณหภูมิห้องทำให้สะดวกและลดต้นทุนในการผลิต การขนส่ง และการเก็บรักษา

วัสดุและวิธีวิจัย

การผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม NA7

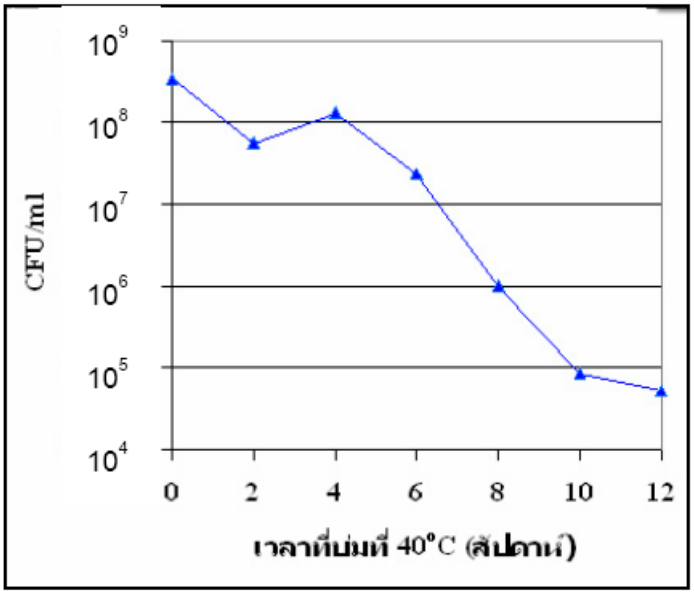
เมื่อเดือนธันวาคม ค.ศ. 2007 Chanthapetch และ Chansa-ngavej (2008) ได้ผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมถั่วเหลือง NA7 โดยเลี้ยงไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า สายพันธุ์ NA7 ซึ่งทำให้ลำต้นถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดตามวิธีที่ระบุโดย Somasegaran และ Hoben (1994) มีค่าน้ำหนักแห้งสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์อื่น จำนวน 124 สายพันธุ์ที่แยกจาก 11 ตำบลที่ปลูกถั่วเหลืองใน อ.เวียงสา จ.น่าน ได้แก่ ต.ส้าน, นาเหลือง, กลางเวียง, อ่ายนาไลย, ขึ่ง, น้ำมวบ, ปงสนุก, แม่สา, น้ำปั้ว, ไหล่น่าน และตาลชุม เก็บไรโซเบียมถั่วเหลือง NA7 แบบระยะยาวใน YMB (yeast extract mannitol broth) ที่มี 10% กลีซีรอลที่ -80°C สูตรอาหาร YMB ดังรายงานใน Somasegaran and Hoben (1994) เก็บรักษาเซลล์ระยะสั้น โดยใช้สายพันธุ์ NA7 หนึ่งลูป (loop) จาก YMB ที่มี 10% กลีซีรอลเขี่ยบนจานอาหารเพาะเชื้อที่บรรจุ YMA (yeast extract mannitol agar) เก็บโคโลนีเดี่ยว (single colony)ใน YMA slants ที่ 4 °C ผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม NA7 โดยเลี้ยงเซลล์ 1 ลูปใน YMB ปริมาตร 50 มล. จนถึงกึ่งระยะทวีคูณ ใช้เป็น seed culture เติม 100 มล. seed culture ลงใน YMB ปริมาตร 1.4 ลิตร ซึ่งบรรจุใน ฟลาสต์ขนาดจุ 2.0 ลิตร จำนวน 27 ฟลาสก์ เลี้ยงเซลล์ที่ 25 °C - 28°C เป็นเวลา 4 วัน เก็บเซลล์ทุกฟลาสต์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 25°C หลังจากนั้นเติม YMB ปริมาตร 180 มล. ลงในเซลล์ ทำ serial dilutions และ spread plate ได้ค่า 10^8 CFU/ml ซึ่งใช้ผสมกับดินพีตในสัดส่วน 2 x 10^8 CFU/กรัมพีต ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมทนร้อน NA7 เมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ. 2550 โดย Chanthapetch และ Chansa-ngavej (2008)

การตรวจความทนร้อนของปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมถั่วเหลือง NA7

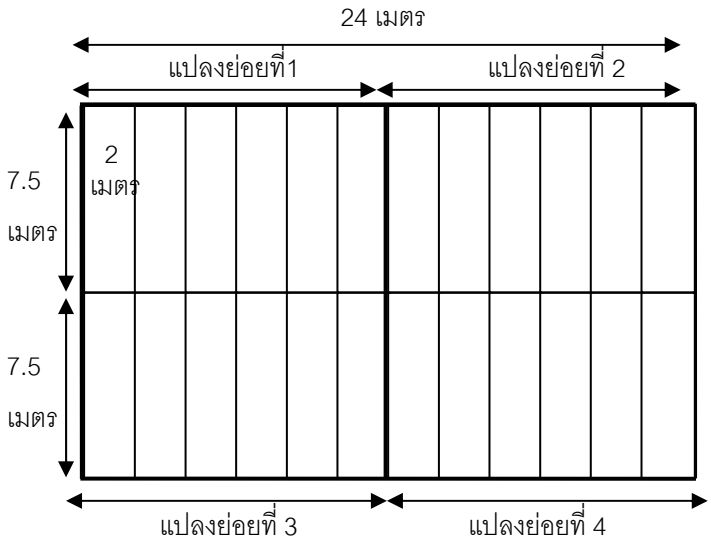
นำปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม NA7 มาทำ serial dilutions และ spread plate หลังจากบ่มที่ 40°C เป็นเวลา 0-12 สัปดาห์ สร้างกราฟแสดงจำนวนเซลล์ของไรโซเบียมถั่วเหลือง NA7 ในปุ๋ยฯดังแสดงในภาพที่ 2



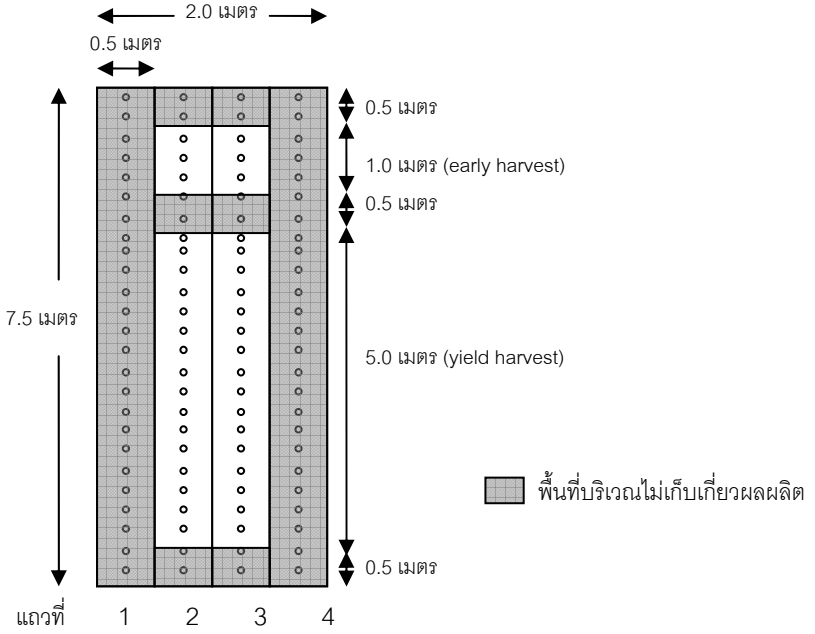
ภาพที่ 2 ผลของอุณหภูมิ (40°C) ต่อจำนวนเซลล์ของไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 ในดินพีตที่ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 ทนร้อน (40°C) เป็นเวลาอย่างน้อย 4 สัปดาห์

การทดลองใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม NA7 ภาคสนาม

เกษตรกรร่วมโครงการในตำบลน้ำมวบ ได้ให้ใช้ที่ดินเพื่อเป็นแปลงปลูกถั่วเหลืองในการทดลองใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม NA7 จำนวน 1 แปลงขนาด 15 x 24 เมตร ซึ่งประกอบด้วยแปลงย่อย 4 แปลง (แปลงย่อยที่ 1-4 ภาพที่ 3) ได้เลือกแปลงเล็ก (2.0 เมตร X 7.5 เมตร) แบบสุ่มจำนวน 2 แปลงเล็กในแต่ละแปลงย่อย เพื่อปลูกเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่คลุกกับปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม NA7 ในสัดส่วนเมล็ดถั่วเหลือง 100 กรัม ต่อปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมถั่วเหลือง NA7 ปริมาณ 1 กรัม และโมลาส 10 มล. เลือกแปลงเล็กแบบสุ่มอีก 2 แปลงต่อแปลงย่อย เพื่อปลูกเมล็ดถั่วเหลืองที่ไม่คลุกกับปุ๋ยใดๆ หยอดเมล็ดถั่วเหลือง 3 เมล็ดต่อหลุม แต่ละหลุมอยู่ห่างกัน 30 ซม. หยอดเมล็ดถั่วเหลืองที่คลุกปุ๋ยชีวภาพ NA7 ในแถวที่ 2 และ 3 ของแปลงเล็กแต่ละแปลงดังแสดงในภาพที่ 4 ส่วนแถวที่ 1 และ 4 หยอดเมล็ดถั่วเหลืองที่ไม่คลุกปุ๋ยใดๆเพื่อเป็นบัฟเฟอร์โซน (Somasegaran และ Hoben, 1994) หลังจากเพาะเมล็ดถั่วเหลืองเป็นเวลา 1 เดือน เก็บรากติดปมจากต้นถั่วเหลืองในแต่ละแปลงเล็ก บริเวณ early harvest เพื่อนำมาแยกแบคทีเรียจากปมราก



ภาพที่ 3 แผนผังแปลงย่อย (1-4) และแปลงเล็ก (2.0 เมตร X 7.5 เมตร) ในตำบลน้ำมวบ อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน (Somasegaran และ Hoben, 1994)



ภาพที่ 4 แผนผังแปลงเล็ก (2.0 เมตร X 7.5 เมตร) แสดงบริเวณเก็บถั่วเหลือง (early harvest) เพื่อนำปมมาแยกแบคทีเรีย วงกลมแต่ละวงแทนถั่วเหลืองซึ่งอยู่ห่างกัน 30 ซม.(Somasegaran และ Hoben, 1994)

การแยกและทำให้บริสุทธิ์แบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง

เก็บต้นถั่วเหลืองรวมทั้งรากและปมทั้งหมดในบริเวณ early harvest ที่แสดงในภาพที่ 4 ตัดปมขนาดใหญ่ (ประมาณเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มม.) บริเวณรอยต่อระหว่างรากและลำต้น (crown) ทั้งนี้เพราะบริเวณนี้เป็นบริเวณที่เกิดปมเป็นครั้งแรก (Spriggs and Dakora ,2007) ฆ่าเชื้อที่ผิวปมโดยใช้ 3% ไฮโดรเจนเปอรอกไซด์ และล้างด้วยน้ำกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตามวิธีที่ระบุโดย Jordan(1984)ใช้มีดโกนฆ่าเชื้อแล้วผ่าปมเป็น 2 ซีก และใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะ

บริเวณปมที่มีสีชมพูของ leghaemoglobin เขี่ยเชื้อบน YMA ผสม congo red ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 25 $\mu g \cdot ml^{-1}$ บ่มเชื้อที่ 30°C เป็นเวลา 1 วัน เพื่อแยกแบคทีเรียที่ไม่ดูดสี congo red ประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว และบ่มเชื้อต่อที่ 30°C เป็นเวลา 5 วันเพื่อแยกแบคทีเรียที่ไม่ดูดสี congo red ประเภทเพิ่มจำนวนช้า เขี่ยเชื้อให้บริสุทธิ์และเก็บรักษาใน YMA slants ที่ 4°C

การแยกโครโมโซมัลดีเอ็นเอ

เลี้ยงแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต หนึ่งลูป (loop)ใน YMB ปริมาตร 50 มล. ที่ 30°C, 200 รอบต่อนาที จนถึงกึ่งระยะทวีคูณ ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์และทำให้เซลล์แตกโดยบ่มกับ 80 µl ไลโซไซม์ (2.5 $mg.ml^{-1}$) ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นบ่มเซลล์ที่ 80°C เป็นเวลา 5 นาที และ -20°C เป็นเวลา 5 นาที รวม 4 รอบ แยกดีเอ็นเอโดยใช้สารละลายสำเร็จรูป DNAzol™ (Molecule Research Center) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอธานอล ละลายดีเอ็นเอในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ หาค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร คำนวนปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ค่า OD_{260} ตามวิธีมาตรฐาน (Sambrook และคณะ, 1989)

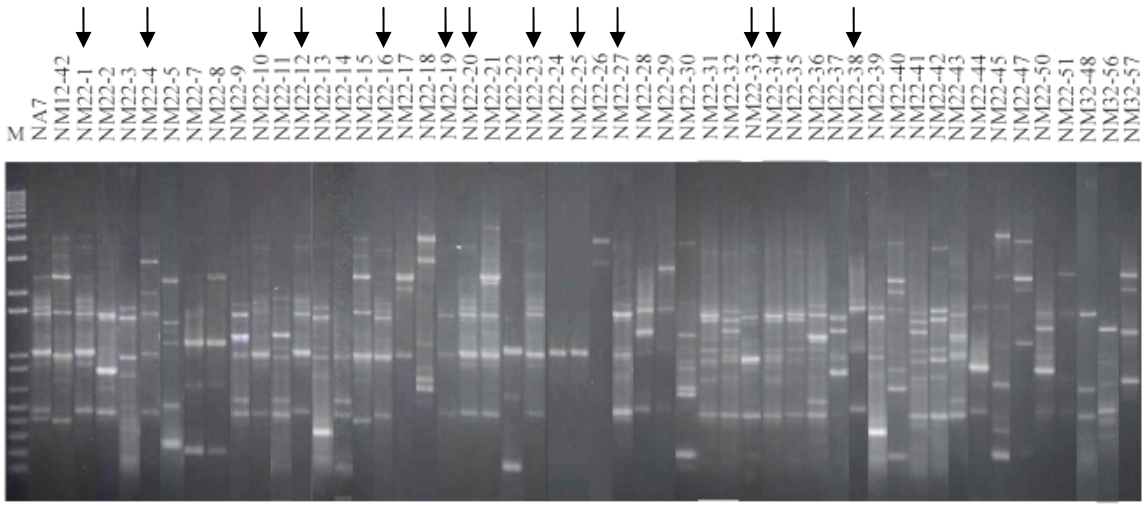
การหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี RAPD-PCR

หาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ RPO1 หรือ CRL-7 เป็นไพร์เมอร์ ส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 10x PCR buffer 2 µl, 10mM dNTPs 2 µl, ไพร์เมอร์ RPO1(10 $pmol \cdot \mu l^{-1}$) หรือไพร์เมอร์ CRL-7 (10 $pmol \cdot \mu l^{-1}$) 1 µl, DNA 200 ng, *Taq* polymerase (5 $units \cdot \mu l^{-1}$) 0.2 µl, เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตร 20 µl โปรแกรมพีซีอาร์ได้แก่ 95°C 15 วินาที, 55°C 30 วินาที, 72°C 90 วินาที, (จำนวน 5 รอบ) 95°C 15 วินาที 60°C 60 วินาที, 72°C 30 วินาที (จำนวน 25 รอบ) 72 °C 10 นาที ใช้ 1 kb ladder (Invitrogen®) เป็นขนาดโมเลกุลมาตรฐาน เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไอโซเลตที่แยกได้กับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ NA7 ซึ่งหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอควบคู่กัน หากตรวจพบว่าไอโซเลตมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเช่นเดียวกับดีเอ็นเอของสายพันธุ์ NA7 แสดงว่าไรโซเบียม NA7 สามารถเข้าสร้างปมได้ในภาคสนามที่ ต.น้ำมวบ จ.น่าน

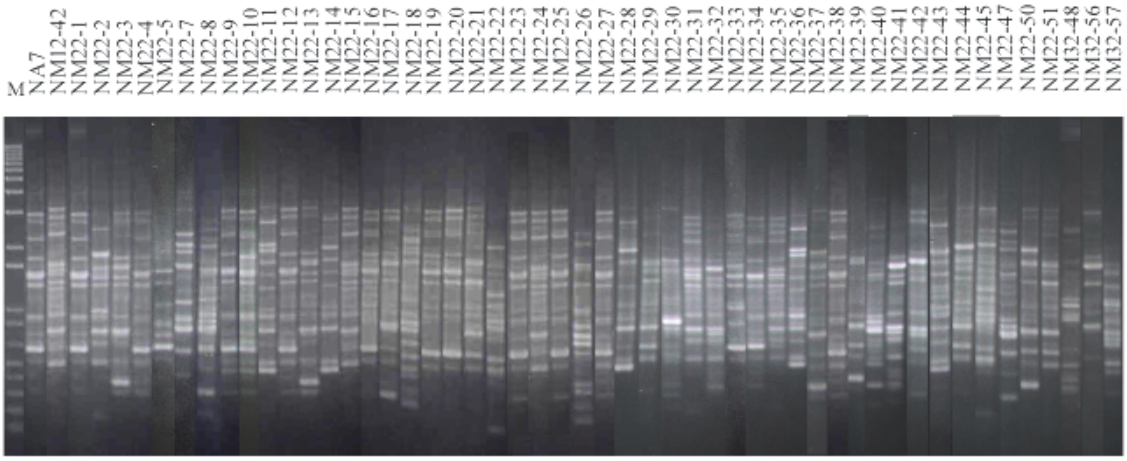
ผลการวิจัย

ได้แยกแบคทีเรีย 198 ไอโซเลตจากปมรากถั่วเหลืองในบริเวณ early harvest (รูปที่ 4) แบ่งเป็นแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็วซึ่งปรากฏเป็นโคโลนีบนอาหารวุ้น YMA หลังการบ่มเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส ภายใน 24 ชั่วโมง จำนวน 147 ไอโซเลต และแบ่งเป็นแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนช้าซึ่งปรากฏเป็นโคโลนีบนอาหารวุ้น YMA หลังการบ่มเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน จำนวน 51 ไอโซเลต ภาพที่ 5 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนช้าจำนวน 51 ไอโซเลตเปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 ผลการวิจัยพบ 13 ไอโซเลตคือไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 ที่เข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลือง คิดเป็นสัดส่วน 25.5 %

RPO1



CRL-7



ภาพที่ 5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หาโดยวิธี RAPD-PCR ของไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7และแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนซ้ำจำนวน 51 ไอโซเลตที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองที่ปลูกในแปลงทดลองที่ตำบลน้ำมวบ อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน โดยใช้ไพร์เมอร์ RPO1 หรือ CRL-7 ลูกศรแสดงไอโซเลตที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเช่นเดียวกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 แถวแรก (M) เป็นขนาดโมเลกุลมาตรฐาน

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ได้หาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่แยกได้จากปมรากถั่วเหลืองที่คลุกกับปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม NA7 และปลูกในแปลงปลูกพืชทดลองขนาด 15 x 24 ตารางเมตรที่ ตำบลน้ำมวบ อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน เมื่อปีเพาะปลูก 2550/2551 แยกแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลืองได้ 198 ไอโซเลต ได้หาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนซ้ำ จำนวน 51 ไอโซเลต โดยวิธี RAPD-PCR โดยใช้ RPO1 หรือ CRL-7 เป็นไพร์เมอร์ หลังจากนั้นเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่แยกจากปมรากถั่วเหลือง กับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 ที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลือง พบว่าสายพันธุ์ NA7 เข้าสร้างปมใน

สัดส่วน 25.5% ของแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนช้าที่แยกได้จากปมรากถั่วเหลือง จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่าความสามารถของไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 ในการแข่งขันกับไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ท้องถิ่นในการเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลืองอยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างต่ำ

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2552."ถั่วเหลือง : เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ของประเทศผู้ผลิตที่สำคัญ ปี 2548-2550." [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.oae.go.th/statistic/yearbook50/section2/sec2table25.pdf (12 พฤษภาคม 2552)

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2552."ถั่วเหลือง : เนื้อที่ ผลผลิต ผลผลิตต่อไร่ ราคาและมูลค่าของผลผลิตตามราคาที่เกษตรกรขายได้ปี 2541-2550." [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.oae.go.th/statistic/yearbook50/section2/sec2table26.pdf (12 พฤษภาคม 2552)

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

Banfalvi, Z., A. Nieuwkoop, M. Schell, L. Besl, and G. Stacey. 1988. Regulation of *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. ***Mol. Gen. Genet***. 214 : 420-424.

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

Chanthapetch, T. and K. Chansa-ngavej. 2008. Field trials of soybean rhizobial biofertilizers NA7 and NA4 at Nam Moub subdistrict, Wiangsa district, Nan province, Thailand. Abstract Book. 13th Biological Sciences Graduate Congress. Singapore. p. 64.

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

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

Jordan, D.C. 1984. Family III Rhizobiaceae. In: Krieg, N.R., and Holt, J.G. (eds). ***Bergey's Manual of Systematic Bacteriology***. Baltimore : Williams & Wilkin. p. 234-244.

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

Mathis, J.N. and D.E. McMillin. 1996. Detection of genetic variation in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 variants using DNA fingerprints generated with GC rich arbitrary PCR primers. ***Plant and Soil***. 186 : 81-85.

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

Schofield, P.R. and J.M. Watson. 1985. Conservation of *nif*- and species-specific domains within repeated promoter sequences from fast-growing *Rhizobium* species. ***Nucleic Acids Res***. 13 (10) : 3407-3418.

Somasegaran, P. and H.J. Hoben. 1994. ***Handbook for Rhizobia*** : ***Methods in Legume-Rhizobium Technology***. New York : Springer Verlag , p. 340, 370-1, 392-398.

Spriggs, A.C. and F.D. Dakora. 2007. Competitive ability of selected *Cyclopia* Vent. rhizobia under glasshouse and field conditions. ***Soil Biol. & Biochem***. 39: 58-67.

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

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