รายงานการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายของพืชตระกูลถั่ว และเชื้อไรโซเบียมที่อาศัยในปมราก บริเวณเขื่อนน้ำพุง

(Diversity of Leguminous Plants and their associated root nodule rhizobia at Numpung Dam)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

SUT3-304-55-12-32

รายงานการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายของพืชตระกูลถั่ว และเชื้อไรโซเบียมที่อาศัยในปมราก บริเวณเขื่อนน้ำพุง

(Diversity of Leguminous Plants and their associated root nodule rhizobia at Numpung Dam)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรรณลดา ติตตะบุตร

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

อาจารย์ ดร. พอล เจ โกรดิ

นางสาวกมลลักษณ์ เทียมไธสง

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2555 และดำเนินการภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณการไฟฟ้าฝ่ายผลิต และเจ้าหน้าที่ประจำเขื่อนน้ำพุงสำหรับการอำนวนความสะดวกในการเข้าสำรวจพื้นที่ป่า รวมทั้งขอขอบคุณเทคโนธานี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับการประสานงานการดำเนินการตลอดโครงการ

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

เขื่อนน้ำพุง จังหวัดสกลนคร เป็นแหล่งผลิตกระแสไฟฟ้าเพื่อเสริมสร้างประสิทธิภาพในการส่งกระแสไฟฟ้าให้ประชาชนในภูมิภาค และพักผ่อนทางธรรมชาติซึ่งมีพื้นที่ป่าไม้เหนือเขื่อนที่อุดมสมบูรณ์จึงควรได้รับการอนุรักษ์ไว้สืบไป ดังนั้นเพื่อสนองพระราชดำริโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ในพื้นที่ป่าเหนือเขื่อนน้ำพุง โครงการวิจัยนี้จึงได้ทำการสำรวจความหลากหลายของพืชตระกูลถั่ว และความหลากหลายของเชื้อไรโซเบียมที่เข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วนั้น ๆ รวมทั้งตรวจสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจน จากการสำรวจพื้นที่ป่าใน 3 เส้นทาง ซึ่งเป็นป่าเต็งรัง ป่าเบญจพรรณ และป่าผสมระหว่างป่าเต็งรังและป่าเบญจพรรณ พบมีความหลากหลายของพืชตระกูลถั่วทั้งที่เป็นไม้ยืนต้น ไม้พุ่มขนาดกลาง และชนิดเถาเลื้อยจำนวนทั้งสิ้น 68 สายพันธุ์ โดยสามารถจำแนกสายพันธุ์ได้จำนวน 23 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้พบว่าเป็นพืชตระกูลถั่วในสกุล *Crotalaria* sp., *Flemingia* sp., *Desmodium* sp., *Abrus* sp., *Mimosa* sp., *Indigofera* sp., *Bauhinia penicilliloba*, *Clitoria* sp., *Sindora siamensis* var. *siamensis*, และ *Bauhinia* sp. และพบไรโซเบียมที่สามารถคัดแยกได้จากรากปมรากพืช และดินบริเวณรอบรากพืชที่เข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วเหล่านี้จำนวนทั้งสิ้น 46 ไอโซเลท ที่มีลายพิมพ์ DNA ที่แตกต่างกัน โดยพบไรโซเบียมในสกุล *Bradyrhizobium* sp., *B. japonicum*, *B. elkanii*, และ *Rhizobium loeguminosarum* โดยพบไรโซเบียมส่วนใหญ่อยู่ในชนิด *B. elkanii* และเมื่อนำไรโซเบียมที่คัดแยกได้เหล่านี้ไปตรวจสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนพบว่าไรโซเบียม ไอโซเลท S4/T3 1a ซึ่งเป็นไรโซเบียมในกลุ่ม *B. elkanii* แยกได้จากปมรากของถั่วหิงหาย มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงที่สุด คือ 75.70 nmole/mg/h เมื่อเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วที่เป็นพืชอาศัย (host plant) ดังนั้นไรโซเบียมนี้สามารถพัฒนาให้เป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับการฟื้นฟูป่าไม้ หรือเพื่อการบำรุงดินให้เกิดความอุดมสมบูรณ์สำหรับการเกษตรต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Nampung Dam is located at Sakonnakhon province and the forest in this area should be preserverd. As the plant genetic conservation project under the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn, this research survey the diversity of leguminous plants and their associated root nodule rhizobia as well as their nitrogen fixing ability. The survey was done in three different types of forest trails including dipterocarp forest, mixed deciduous forest, and the combination between dipterocarp forest and mixed deciduous forest. Total of 68 species of leguminous plants have been found, and only 23 species were identified such as *Crotalaria* sp., *Flemingia* sp., *Desmodium* sp., *Abrus* sp., *Mimosa* sp., *Indigofera* sp., *Bauhinia penicilliloba*, *Clitoria* sp., *Sindora siamensis* var. *siamensis*, and *Bauhinia* sp.. Rhizobia were isolated from root nodules and rhizosphere soil, and the DNA fingerprint of each rhizobial isolate was determined. It was found that 46 isolates of rhizobia had different DNA fingerprints indicated different species and strains of rhizobia. The 16S rRNA sequence of these isolates was determined and they were highly homology to 4 groups of rhizobia, *Bradyrhizobium* sp. *B. japonicum*, *B. elkanii*, and *Rhizobium loeguminosarum*. However, most of them belong to *B. elkanii*. The nitrogen fixation ability of these rhizobia was determined as nitrogenase activity. It was found that B. elkanii isolate S4/T3 1a provided the highest nitrogenase activity at 75.70 nmole/mg/h when symbiosis with its host legume plant. Thus, this rhizobium can be further developed as biofertilizer for reforestration or increase soil fertility for agriculture application.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
การเก็บข้อมูลภาคสนาม	3
การสำรวจพืชตระกูลถั่วที่พบในบริเวณป่าเหนือเขื่อนน้ำพุง	3
การเก็บตัวอย่างพืชตระกูลถั่ว (Voucher herbarium specimens)	3
การตรวจสอบลักษณะทางอนุกรมวิธาน	5
การคัดแยกเชื้อไรโซเบียมจากปมรากพืชตระกูลถั่ว	5
การคัดแยกเชื้อไรโซเบียมจากดินบริเวณรอบรากพืชตระกูลถั่ว	7
การตรวจสอบลายพิมพ์ DNA (DNA fingerprint) โดยเทคนิค BOX-PCR	8
การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกได้	8
การหาความสัมพันธ์ของลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยการสร้าง Phylogenetic tree	9
การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส	9
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
ผลการเก็บข้อมูลภาคสนาม และการตรวจสอบทางอนุกรมวิธาน	10
การศึกษาความหลากหลายของไรโซเบียม	58
ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมที่คัดแยกได้	63
อภิปรายผล	69
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	71
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก. เส้นทางสำรวจบริเวณป่าเหนือเขื่อนน้ำพุง	I

ภาคผนวก ข. สูตรอาหารและวิธีการเตรียม..... I
ภาคผนวก ค. การเตรียมสารละลายธาตุอาหารพืช..... II
ประวัติผู้วิจัย..... III

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 วิธีการกำจัดเชื้อปนเปื้อนบนผิวเมล็ดก่อนการเพาะให้งอก..... 6
ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างพืชตระกูลถั่ว เส้นทางสำรวจที่ 1 ป่าเต็งรัง เก็บตัวอย่างวันที่ 14 ธันวาคม 2554..... 11
ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างพืชตระกูลถั่ว เส้นทางสำรวจที่ 2 ป่าเต็งรัง ผสมป่าเบญจพรรณ เก็บตัวอย่าง วันที่ 15 ธันวาคม 2554..... 25
ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างพืชตระกูลถั่ว เส้นทางสำรวจที่ 3 ป่าเบญจพรรณ เก็บตัวอย่างวันที่ 15 ธันวาคม 2554..... 31
ตารางที่ 3.4 ตัวอย่างพืชตระกูลถั่ว เส้นทางสำรวจที่ 2 ป่าเต็งรังผสมป่าเบญจพรรณ เก็บตัวอย่าง วันที่ 29 กุมภาพันธ์ 2555..... 40
ตารางที่ 3.5 ตัวอย่างพืชตระกูลถั่ว เส้นทางสำรวจที่ 3 ป่าเบญจพรรณ เก็บตัวอย่างวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2555..... 47
ตารางที่ 3.6 การบ่งชี้สายพันธุ์ของไรโซเบียมที่สามารถเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่ว..... 60
ตารางที่ 3.7 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสของเชื้อไรโซเบียมไอโซเลทต่าง ๆ ที่เข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่ว (Host plant) ที่พบในป่าบริเวณเหนือเขื่อนน้ำพุง และกับถั่ว Siratro..... 68

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 การนำตัวอย่างพืชสดอัดลงในแผงอัดพรรณไม้..... 4
รูปที่ 2.2 การปลูกพืชในถุงปลูกเพื่อทดสอบการเข้าสร้างปมของแบคทีเรียที่คัดแยกได้..... 8
รูปที่ 3.1 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S1T1 ต้นขี้เหล็กบ้านหรือเรียงเม็ด..... 14
รูปที่ 3.2 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S2T1 ต้นเครือขน..... 14
รูปที่ 3.3 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S3T1 unidentified..... 15
รูปที่ 3.4 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S4T1 มะขามป่า *Abrus* sp..... 15
รูปที่ 3.5 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S5T1 unidentified..... 16

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 3.6 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S6T1 กระดิ่งหายป่า *Crotalaria* sp..... 16
รูปที่ 3.7 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S7T1 *Crotalaria* sp..... 17
รูปที่ 3.8 แสดงภาพของใบ และฝักของพืชตระกูลถั่ว S8T1 *Crotalaria* sp..... 17
รูปที่ 3.9 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S9T1 *Crotalaria* sp..... 18
รูปที่ 3.10 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S10T1 กาวกะปอม..... 18
รูปที่ 3.11 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว กาสามปีก *Flemingia* sp..... 19
รูปที่ 3.12 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว *Desmodium* sp..... 19
รูปที่ 3.13 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S13T1 unidentified..... 20
รูปที่ 3.14 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S14T1 *Desmodium* sp..... 20
รูปที่ 3.15 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S16T1 unidentified..... 21
รูปที่ 3.16 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S17T1 มะกล่ำตาแดง *Abrus* sp..... 21
รูปที่ 3.17 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S18T1 unidentified..... 22
รูปที่ 3.18 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S19T1 unidentified..... 22
รูปที่ 3.19 แสดงภาพของใบ และฝักของพืชตระกูลถั่ว S20T1 *Desmodium* sp..... 23
รูปที่ 3.20 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S21T1 unidentified..... 23
รูปที่ 3.21 แสดงภาพของใบ ดอกและฝักของพืชตระกูลถั่ว S22T1 unidentified..... 24
รูปที่ 3.22 แสดงภาพของใบ ฝักและปมของพืชตระกูลถั่ว S1T2 unidentified..... 27
รูปที่ 3.23 แสดงภาพของใบ ฝัก เมล็ดและปมของพืชตระกูลถั่ว S2T2 unidentified..... 27
รูปที่ 3.24 แสดงภาพของใบ ฝัก และดอกของพืชตระกูลถั่ว S3T2 คราม่ป่า *Indigofera* sp..... 28
รูปที่ 3.25 แสดงภาพของใบ และฝักของพืชตระกูลถั่ว S4T2 *Dendrolobium* sp..... 28
รูปที่ 3.26 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S5T2 เสี้ยวใหญ่ *Bauhinia* sp..... 29
รูปที่ 3.27 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S6T2 คราม่น้อย *Indigofera* sp..... 29
รูปที่ 3.28 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S7T2 *Crotalaria* sp..... 30
รูปที่ 3.29 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S1T3 เสี้ยวแดง *Bauhinia penicilliloba*..... 33
รูปที่ 3.30 แสดงภาพของใบ ฝัก ดอก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S2T3 ถั่วป่า..... 33
รูปที่ 3.31 แสดงภาพของใบ ฝัก ดอก และปมของพืชตระกูลถั่ว S3T3 กระตีกแป..... 34
รูปที่ 3.32 แสดงภาพของใบ ฝัก เมล็ด และปมของพืชตระกูลถั่ว S4T3 ถั่วหิงหาย..... 34
รูปที่ 3.33 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S5T3 ชงโค..... 35
รูปที่ 3.34 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S6T3 ชงโคเล็ก *Bauhinia* sp..... 35
รูปที่ 3.35 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S7T3 *Clitoria* sp..... 36
รูปที่ 3.36 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S8T3 *Sindora siamensis* var. *siamensis*..... 36

รูปที่ 3.37 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S9T3 ไมยราพเล็ก *Mimosa* sp..... 37
รูปที่ 3.38 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S10T3 กาวกะปอม..... 37
รูปที่ 3.39 แสดงภาพของใบ ฝัก ปมและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S11T3 มะขามป่า *Abrus* sp..... 38
รูปที่ 3.40 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S12T3 *Desmodium* sp..... 38
รูปที่ 3.41 แสดงภาพของใบ ฝักและต้นของพืชตระกูลถั่ว S13T3 *Desmodium* sp..... 39
รูปที่ 3.42 แสดงภาพของใบ และต้นของพืชตระกูลถั่ว S1-T2-2 unidentified..... 41
รูปที่ 3.43 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S2-T2-2 unidentified..... 41
รูปที่ 3.44 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S3-T2-2 unidentified..... 42
รูปที่ 3.45 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S4-T2-2 unidentified..... 42
รูปที่ 3.46 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S5-T2-2 ขามป่า..... 43
รูปที่ 3.47 แสดงภาพของใบ ฝัก เมล็ดและปมของพืชตระกูลถั่ว S6-T2-2 unidentified..... 43
รูปที่ 3.48 แสดงภาพของฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S7-T2-2 unidentified..... 44
รูปที่ 3.49 แสดงภาพของต้น ใบ และปมของพืชตระกูลถั่ว S8-T2-2 กวาวเครือ จานเครือ..... 44
รูปที่ 3.50 แสดงภาพของต้น ใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S9-T2-2 unidentified..... 45
รูปที่ 3.51 แสดงภาพของใบ และฝักของพืชตระกูลถั่ว S10-T2-2 unidentified..... 45
รูปที่ 3.52 แสดงภาพของใบ และฝักของพืชตระกูลถั่ว S11-T2-2 unidentified..... 46
รูปที่ 3.53 แสดงภาพของใบ และต้นของพืชตระกูลถั่ว S1-T3-2 มะขามเครือ..... 50
รูปที่ 3.54 แสดงภาพของใบ ต้นและปมของพืชตระกูลถั่ว S2-T3-2 unidentified..... 50
รูปที่ 3.55 แสดงภาพของใบ ต้นและปมของพืชตระกูลถั่ว S3-T3-2 unidentified..... 51
รูปที่ 3.56 แสดงภาพของใบ ต้นและปมของพืชตระกูลถั่ว S4-T3-2 unidentified..... 51
รูปที่ 3.57 แสดงภาพของใบ ต้นและปมของพืชตระกูลถั่ว S5-T3-2 unidentified..... 52
รูปที่ 3.58 แสดงภาพของใบ ต้นและปมของพืชตระกูลถั่ว S6-T3-2 unidentified..... 52
รูปที่ 3.59 แสดงภาพของใบ ฝัก ต้นและปมของพืชตระกูลถั่ว S7-T3-2 unidentified..... 53
รูปที่ 3.60 แสดงภาพของใบ ต้นและปมของพืชตระกูลถั่ว S8-T3-2 unidentified..... 53
รูปที่ 3.61 แสดงภาพของใบ ต้นและปมของพืชตระกูลถั่ว S9-T3-2 unidentified..... 54
รูปที่ 3.62 แสดงภาพของใบ ต้นและฝักของพืชตระกูลถั่ว S10-T3-2 unidentified..... 54
รูปที่ 3.63 แสดงภาพของใบ ต้นและฝักของพืชตระกูลถั่ว S11-T3-2 unidentified..... 55
รูปที่ 3.64 แสดงภาพฝักของพืชตระกูลถั่ว S12-T3-2 หันแดง..... 55
รูปที่ 3.65 แสดงภาพฝักของพืชตระกูลถั่ว S13-T3-2 unidentified..... 56
รูปที่ 3.66 แสดงภาพต้น ใบ เมล็ดและฝักของพืชตระกูลถั่ว S14-T3-2 คำพี้ควาย..... 56
รูปที่ 3.67 แสดงภาพฝักของพืชตระกูลถั่ว S15-T3-2 unidentified..... 57
รูปที่ 3.68 แสดงภาพต้น ใบ เมล็ดและฝักของพืชตระกูลถั่ว S16-T3-2 แสมสารหรือ ขี้เหล็กบ้าน..... 57
รูปที่ 3.69 ตัวอย่าง DNA fingerprint จากไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากปมรากถั่ว โดยใช้วิธี

BOX-PCR..... 59
รูปที่ 3.70 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของไรโซเบียมที่พบจากการสำรวจ..... 64
รูปที่ 3.71 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของไรโซเบียมกลุ่ม *Bradyrhizobium* ที่พบจากการสำรวจ..... 65
รูปที่ 3.72 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของไรโซเบียมกลุ่ม *Rhizobium* ที่พบจากการสำรวจ..... 66
รูปที่ 3.73 ภาพแสดงการเจริญเติบโตของพืชตระกูลถั่วที่เข้าสร้างปมโดยเชื้อไรโซเบียมในกลุ่มที่ไม่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน (Ineffective nitrogen fixation) และกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน (Effective nitrogen fixation)..... 67

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

พืชตระกูลถั่ว เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Fabaceae หรือ Leguminosae เป็นพืชกลุ่มใหญ่เป็นอันดับ 3 มีสมาชิกประมาณ 720 สกุล 19,500 สปีชีส์ (Mabberley, 2008) พบกระจายอยู่ทั่วไป ทั้งนี้พบว่าพืชตระกูลถั่วมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกับแบคทีเรียกลุ่มหนึ่ง คือ ไรโซเบียม ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยในดิน มีความสามารถพิเศษในการเข้าสร้างปมที่รากพืชตระกูลถั่ว และสามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศเปลี่ยนเป็นปุ๋ยไนโตรเจนให้กับพืชตระกูลถั่ว ได้มีการประยุกต์ใช้ไรโซเบียมในระบบเกษตร โดยการใช้ไรโซเบียมเป็นปุ๋ยชีวภาพโดยเฉพาะปุ๋ยไนโตรเจน โดยใช้ไรโซเบียมในรูปของปุ๋ยพืชสด สามารถอนุรักษ์ธาตุอาหารในดิน โดยพืชที่เป็นปุ๋ยพืชสด (พืชตระกูลถั่ว) เมื่อถูกไถกลบ จะสลายตัวและปล่อยธาตุอาหาร โดยเฉพาะไนโตรเจนในชั้นดิน ซึ่งเป็นประโยชน์แก่พืชเศรษฐกิจ อันเป็นพืชหลักต่อไป และยังใช้เป็นการหมุนเวียนใช้ทรัพยากรในไร่นาให้เกิดประโยชน์สูงสุด

นอกจากบทบาทของไรโซเบียมที่มีต่อพืชตระกูลถั่วที่เป็นปุ๋ยพืชสดแล้ว ยังมีบทบาทต่อไม้ยืนต้นที่เป็นพืชตระกูลถั่วอีก ดังเช่นในประเทศไทยในปี ค.ศ. 1961 มีรายงานว่ายังคงมีพื้นที่ป่า คิดเป็น 53% ของพื้นที่ แต่มาในปี ค.ศ. 1989 ประเทศไทยเหลือพื้นที่ป่าเพียง 28% ทำให้เกิดการรื้อฟื้นนโยบายชาติที่ว่า การฟื้นฟูสภาพป่าภายในประเทศ โดยตั้งเป้าในการเพิ่มจำนวนพื้นที่ป่าให้เป็น 40% ให้ได้ ทำให้กลุ่มไม้ยืนต้นเป้าหมายที่กรมป่าไม้ใช้ในการปลูกป่าเพิ่มส่วนใหญ่เป็นไม้ยืนต้นตระกูลถั่ว ได้แก่กลุ่มกระถินณรงค์ (*Acacia auriculaeformis* A. Cunn. ex Benth.) กระถินเทพา (*A. mangium* Willd.) ไม้แดง (*Xylia xylocarpa* (Roxb.) Taub.) และประดู่ (*Pterocarpus indicus* Willd.) จากการศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจน และทำให้กลุ่มไม้ยืนต้นดังกล่าวเจริญเติบโตได้ดี พบว่าไรโซเบียมที่สร้างปมและตรึงไนโตรเจนได้ดี อยู่ในสกุล *Bradyrhizobium* ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *B. japonicum* และ *B. elkanii* เป็นส่วนใหญ่ (Manassila และคณะ, 2007) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่าพืชตระกูลถั่วที่พบในบริเวณเขื่อนน้ำพุงนั้นมีชนิดใดบ้าง และมีความหลากหลายของเชื้อไรโซเบียมที่สามารถเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วเหล่านั้นเป็นอย่างไร

ทั้งนี้เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายของเชื้อไรโซเบียม นอกจากจะใช้เทคนิคพื้นฐานทางด้านจุลินทรีย์ และชีวเคมีแล้ว ในการจัดทำอนุกรมวิธานของไรโซเบียม (ตั้งแต่ประมาณปี ค.ศ. 2002) นั้นจะต้องมีการใช้เทคนิค PCR ร่วมกับ DNA primer ที่เป็นตัวระบุลายนิ้วมือที่เหมาะสม เช่น rep-PCR เป็นต้น รวมเข้ากับข้อมูลที่ได้จากเทคนิคที่เรียกว่า multilocus sequences analysis (MLSA) โดยข้อมูลนี้ต้องได้มาจากยีนที่แตกต่างกัน 3 ชุด เช่น ยีน *recA*, ยีน *rpoB* เป็นต้น นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการอ่านลำดับเบสสมบูรณ์จากยีนสำคัญ เช่น *nifH*, *nodA* หรือ 16S rDNA ก็มีความจำเป็นเช่นกัน ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายของพืชตระกูลถั่ว และชนิดของเชื้อไรโซเบียมที่มีอยู่ในบริเวณเขื่อนน้ำพุง รวมทั้งความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของเชื้อไรโซเบียม กับชนิดของพืชตระกูลถั่ว นอกจากนี้ยังจะได้สายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมให้พืชตระกูลถั่วแต่ละชนิดดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตได้ดีอีกด้วย

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาการวิจัย

เขื่อนน้ำพุง จังหวัดสกลนคร ถูกสร้างขึ้นและเริ่มเปิดใช้อย่างเป็นทางการตั้งแต่ปี พ.ศ. 2508 โดยเขื่อนน้ำพุงทำหน้าที่ในการเก็บกักน้ำ ป้องกันน้ำท่วม รวมทั้งเป็นแหล่งผลิตกระแสไฟฟ้าเพื่อเสริมสร้างประสิทธิภาพในการส่งกระแสไฟฟ้าให้ประชาชนในภูมิภาค นอกจากนี้เขื่อนน้ำพุงยังเป็นสถานที่ท่องเที่ยว และพักผ่อนทางธรรมชาติให้แก่ประชาชนอีกด้วย เนื่องจากมีทัศนียภาพของอ่างเก็บน้ำที่สวยงาม รวมทั้งพื้นที่ป่าไม้เหนือเขื่อนที่ยังมีความอุดมสมบูรณ์ อย่างไรก็ดีพื้นที่ป่าไม้แห่งนี้ยังไม่ได้มีการสำรวจถึงความหลากหลายทางชีวภาพของพืช สัตว์ รวมทั้งจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อผืนป่า โดยในงานวิจัยนี้ให้ความสำคัญกับพืชตระกูลถั่ว และเชื้อไรโซเบียมที่อาศัยภายในปมรากของพืชตระกูลถั่วชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีความสัมพันธ์กันในแบบพึ่งพาอาศัย โดยส่งเสริมการเจริญซึ่งกันและกัน ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของพืชตระกูลถั่ว และความหลากหลายของเชื้อไรโซเบียมที่เข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วชนิดต่าง ๆ สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการบำรุงรักษาผืนป่า พันธุ์พืช หรือดินในบริเวณเขื่อนน้ำพุง ให้มีความสมบูรณ์ต่อไป อีกทั้งเพื่อเป็นฐานข้อมูลความรู้ให้แก่นักวิชาการ หรือประชาชนทั่วไปที่สนใจ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสนองพระราชดำริโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ในพื้นที่ป่าเหนือเขื่อนน้ำพุง
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายของพืชตระกูลถั่วที่พบในบริเวณป่าเหนือเขื่อนน้ำพุง
3. เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อไรโซเบียมที่เข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วชนิดต่าง ๆ ที่พบในบริเวณป่าเหนือเขื่อนน้ำพุง
4. เพื่อเก็บรวมรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนที่พบในป่าเหนือเขื่อนน้ำพุง

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการศึกษาความหลากหลายของพืชตระกูลถั่ว และความหลากหลายของเชื้อไรโซเบียมที่เข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิดโดยเทคนิคทางจุลินทรีย์ ชีวเคมี และอณูชีววิทยา จากนั้นตรวจสอบศักยภาพในการเข้าสร้างปม และการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียม และเก็บรวมรวมสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีศักยภาพเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. เป็นฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพของพืชตระกูลถั่ว และเชื้อไรโซเบียมที่อาศัยในปมรากของพืชตระกูลถั่วชนิดนั้น ๆ ในบริเวณป่าเหนือเขื่อนน้ำพุง
2. ได้สายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียมที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูง สามารถนำไปใช้ประยุกต์ในเชิงปุ๋ยชีวภาพ กับการปลูกพืชตระกูลถั่วต่อไปได้
3. ได้ผลงานทางวิชาการที่สามารถเผยแพร่ความรู้ในที่ประชุม หรือวารสารวิชาการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุประสงค์ 1. เพื่อสนองพระราชดำริโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ในพื้นที่ป่าเหนือเขื่อนน้ำพุง

2. เพื่อศึกษาความหลากหลายของพืชตระกูลถั่วที่พบในบริเวณป่าเหนือเขื่อนน้ำพุง

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ข้อที่ 1 และ 2 ได้ดำเนินการดังต่อไปนี้

1. การเก็บข้อมูลภาคสนาม: เขื่อนน้ำพุง จ.สกลนคร

ดำเนินการเก็บข้อมูลภาคสนาม โดยเดินทางสำรวจ ณ บริเวณป่าเหนือเขื่อนน้ำพุง จำนวน 2 ครั้ง คือ

ครั้งที่ 1 วันที่ 13-16 ธันวาคม 2554 จำนวน 3 เส้นทาง

เส้นทางสำรวจที่ 1 ป่าเต็งรัง

เส้นทางสำรวจที่ 2 ป่าเต็งรังผสมป่าเบญจพรรณ

เส้นทางสำรวจที่ 3 ป่าเบญจพรรณ

ครั้งที่ 2 วันที่ 27 กุมภาพันธ์ – 1 มีนาคม 2555 จำนวน 2 เส้นทาง

เส้นทางสำรวจที่ 2 ป่าเต็งรังผสมป่าเบญจพรรณ

เส้นทางสำรวจที่ 3 ป่าเบญจพรรณ

*แผนที่เส้นทางสำรวจแสดงในภาคผนวกที่ 1

2. การสำรวจพืชตระกูลถั่วที่พบในบริเวณป่าเหนือเขื่อนน้ำพุง

ดำเนินการเก็บข้อมูล โดยทำการบันทึกภาพของลักษณะต้น ใบ ดอก ฝัก เมล็ด และบันทึกชื่อท้องถิ่นของพืชนั้น ๆ จากนั้นเก็บตัวอย่างพืชสดในส่วนของกิ่ง ใบ ดอก ฝัก ราก และปมราก จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง สำหรับการทำ Voucher herbarium specimens นอกจากนี้เก็บตัวอย่างดินประมาณ 200 กรัม จากบริเวณรอบรากพืช เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

3. การเก็บตัวอย่างพืชตระกูลถั่ว (Voucher herbarium specimens) เพื่อการศึกษาทางอนุกรมวิธาน

3.1 นำตัวอย่างพืชสดที่เก็บได้จากการสำรวจมาทำให้แห้งโดยการอัดในแผงอัดพรรณไม้ (plant press) ทำด้วยไม้เนื้อแข็ง ขนาด 12×18 นิ้ว โดยเลือกกิ่งที่มีใบ ดอก และฝัก (ถ้ามี) ที่สมบูรณ์ที่สุด 2 – 3 กิ่ง ต่อพรรณไม้ 1 ชนิด (ผูกป้ายหมายเลขลำดับประจำตัวอย่าง) จากนั้นใช้กรรไกรตัดกิ่งไม้ หรือมีดคม ๆ ตัด แล้ววางตัวอย่างพืชลงบนกระดาษหนังสือพิมพ์ โดยวางเป็นชั้น ๆ ซ้อนกัน และใช้กระดาษลูกฟูกคั่นระหว่างพรรณไม้แต่ละชิ้นตัวอย่าง ทั้งนี้พรรณไม้ที่มีความยาวเกินขนาดของแผ่นกระดาษ ได้พับใบและต้นให้มีลักษณะคล้ายรูป L หรือ V ตามความเหมาะสม โดยพลิกใบพืชให้เห็นทั้งส่วนเหนือใบและใต้ใบ เมื่อเรียงตัวอย่างเสร็จแล้วให้อัดพรรณไม้โดยใช้เชือกรัดแผงอัดพรรณไม้ให้แน่น (รูปที่ 2.1) จากนั้นนำไปตากแดดโดยตั้งแผงไม้ขึ้น เป็นเวลา 3-5 วัน จนพรรณไม้แห้ง

รูปที่ 2.1 การนำตัวอย่างพืชสดอัดลงในแผงอัดพรรณไม้

3.2 ตัวอย่างพรรณไม้ที่แห้งแล้ว นำมาวางบนกระดาษแข็งสีขาว โดยจัดตำแหน่งให้เหมาะสม และสวยงาม โดยไม่ให้มีส่วนของพืชเลยขอบกระดาษออกมา แล้วใช้กาวลาเท็กซ์ทาเป็นระยะบาง ๆ บนกระดาษเพื่อตรึงตัวอย่างพรรณไม้ไว้บนกระดาษ และแยกส่วนของฝักที่หลุดร่วงง่ายบรรจุลงในซอง แล้วติดซองนี้บนกระดาษติดแผ่นไม้ พร้อมทั้งติดกระดาษบันทึกข้อมูลของ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ (ชื่อพรรณไม้ท้องถิ่น) สถานที่ และวันที่เก็บตัวอย่าง รวมทั้งลักษณะอื่น ๆ ที่สำคัญของพรรณไม้แต่ละชนิด และชื่อผู้เก็บตัวอย่างลงบนกระดาษติดพรรณไม้

4. พรรณไม้ที่ได้นำมาตรวจสอบลักษณะทางอนุกรมวิธาน และทำการจำแนกเบื้องต้นภายในห้องปฏิบัติการ และตรวจสอบยืนยันโดยการเปรียบเทียบกับตัวอย่างพืช ณ หอพรรณไม้ จ. กรุงเทพมหานคร

วัตถุประสงค์ 3. เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อไรโซเบียมที่เข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วชนิดต่าง ๆ ที่พบในบริเวณป่าเหนือเขื่อนน้ำพุง

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ข้อที่ 3 ได้ดำเนินการดังต่อไปนี้

1. การคัดแยกเชื้อไรโซเบียมจากปมรากพืชตระกูลถั่ว

พืชตระกูลถั่วที่สามารถเก็บตัวอย่างปมรากที่สมบูรณ์ นำมาคัดแยกเชื้อไรโซเบียมออกจากปมรากได้ตามวิธีการของ Somasegaran and Hoben (1994) ดังนี้

1.1 นำปมถั่วมาล้างในน้ำ และแช่ในแอลกอฮอล์ 95% นาน 10 วินาที แล้วเทออก จากนั้นล้างปมในสารละลาย 3% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนภายนอกปม (surface sterilization) จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้ออย่างน้อย 5 ครั้ง

1.2 ใช้ใบมีดปลอดเชื้อ (sterilized blade) ผ่าปม แล้วใช้ loop แตะเชื้อจากภายในปมถั่ว นำมาขีดเชื้อ (streak) ลงบนอาหาร Yeast extract mannitol (YEM) ที่ผสมสารละลาย congo read แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (°C) แล้วตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

1.3 คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว (single colony) ของแบคทีเรียที่แยกได้เพื่อทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสี (Gram's staining) และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะเบื้องต้นคล้ายกับเชื้อไรโซเบียม

1.4 ยืนยันการเข้าสร้างปมของเชื้อที่คัดแยกได้ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ได้ในอาหาร YEM จนกระทั่งมีเซลล์เจริญอยู่ในปริมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการปลูกเชื้อ (inoculate) 1 มิลลิลิตรต่อเมล็ด ลงบนเมล็ดของพรรณพืชตระกูลถั่วซึ่งเป็นพืชอาศัย (host plant) ที่พบการสร้างปมนั้น ๆ (กรณีสามารถเก็บเมล็ดตัวอย่างจากพรรณพืชนั้นได้) หรือทำการปลูกเชื้อลงบนเมล็ดของ Siratro (*Macroptilium atropurpureum*) ซึ่งเป็นพืชตระกูลถั่วที่เชื้อไรโซเบียมส่วนใหญ่สามารถเข้าสร้างปมได้ (ในกรณีที่ไม่สามารถเก็บเมล็ดของพืชตัวอย่างได้) ทั้งนี้เมล็ดพืชแต่ละชนิดที่ใช้ทดสอบต้องทำการกำจัดเชื้อปนเปื้อนบนผิวนอกของเมล็ด ก่อนนำไปเพาะเพื่อให้เมล็ดงอก (germination) แล้วจึงนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ โดยวิธีการกำจัดเชื้อปนเปื้อนบนผิวนอกของเมล็ดแตกต่างกันไปในเมล็ดพืชแต่ละชนิดตามลักษณะของเปลือกหุ้มเมล็ด ดังแสดงในตารางที่ 2.1 โดยเมล็ดที่มีเปลือกบางใช้วิธีแช่ใน sodium hypochlorite เข้มข้น 2.5% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5-6 ครั้ง ในขณะที่เมล็ดที่มีเปลือกหนาใช้วิธีแช่ในกรด sulfuric เข้มข้นนาน 10-30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5-6 ครั้ง แล้วเพาะในอาหารแข็ง 0.8% (0.8% water agar) เป็นเวลา 2 วัน

1.5 ปลูกพืชลงในถุงปลูกดังแสดงในรูปที่ 2.2 โดยใช้สารละลายธาตุอาหารพืชที่ไม่มีไนโตรเจน (N-free nutrient solution, Somasegaran and Hoben, 1994) รดพืชเพื่อทดสอบการเข้าสร้างปมและการตรึงไนโตรเจนจากนั้นนำไปวางไว้บนชั้นแสงในห้องปฏิบัติการโดยควบคุมให้มีการให้แสงที่ 12/12 ชั่วโมง (มืด/สว่าง) ณ อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส จากนั้นติดตามการเข้าสร้างปมของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ แบคทีเรียไอ

โซเลทใดที่สามารถเข้าสร้างปมกับพืชอาศัย (host plant) หรือกับ Siratro ได้สามารถยืนยันการเป็นเชื้อไรโซเบียมและนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 2.1 วิธีการกำจัดเชื้อปนเปื้อนบนผิวเมล็ดก่อนการเพาะให้งอก

ตัวอย่าง	ชื่อ	สารเคมีที่ใช้ในการกำจัดเชื้อปนเปื้อน	ระยะเวลาการแช่เมล็ด (นาที)
Control	Siratro (*Macroptilium atropurpureum*)	กรดซัลฟิวริก	10
S1/T1	ขี้เหล็กบ้าน, เรียงเม็ด (*Senna occidentalis*)	กรดซัลฟิวริก	10
S2/T1	เครือขน	กรดซัลฟิวริก	10
S3/T1	ด่านราชสีห์ (*Tephrosia vestita*)	กรดซัลฟิวริก	10
S4/T1	มะขามป่า (*Abrus pulchellus*)	กรดซัลฟิวริก	10
S5/T1	อัญชันป่า (*Clitoria macrophylla*)	โซเดียมไฮโปคลอไรท์	5
S6/T1	กระดิ่งหายป่า (*Crotalaria alata*)	กรดซัลฟิวริก	10
S7/T1	หิ่งหายใบเล็ก (*Crotalaria albida*)	กรดซัลฟิวริก	10
S8/T1	*Crotalaria* sp.	กรดซัลฟิวริก	10
S9/T1	*Crotalaria* sp.	กรดซัลฟิวริก	30
S10/T1	กาวกะปอม (*Cajanus scarabaeoides*)	กรดซัลฟิวริก	15
S11/T1	กาสามปีก (*Flemingia macrophylla*)	กรดซัลฟิวริก	10
S12/T1	อีเหนียว (*Desmodium gangeticum*)	โซเดียมไฮโปคลอไรท์	5
S13/T1	ช้อยนางรำ (*Codoriocalyx motorius* (Houtt.) H.Ohashi)	กรดซัลฟิวริก	15
S14/T1	*หญ้าสองปล้อง* (*Desmodium velutinum*)	กรดซัลฟิวริก	10
S16/T1	*ลูกพรวนหมา* (*Pycnospora lutescens*)	กรดซัลฟิวริก	10
S17/T1	มะกล่ำตาแดง (*Abrus precatorius*)	กรดซัลฟิวริก	10

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

S18/T1	หิ่งหาย (*Crotalaria retusa*)	กรดซัลฟิวริก	10
S19/T1	ชะคราม (*Indigofera galegoides*)	กรดซัลฟิวริก	10
S20/T1	ตาลส้านดอย (*Desmodium renifolium*)	กรดซัลฟิวริก	10
S21/T1	มะขามเบี้ย (*Chamaecrista pumila*)	กรดซัลฟิวริก	10
S22/T1	*Crotalaria* sp.	กรดซัลฟิวริก	10
S2/T2	Unidentified	กรดซัลฟิวริก	10
S4/T2	แกลบหนู (*Dendrolobium lanceolatum*)	กรดซัลฟิวริก	10
S5/T2	เสี้ยวใหญ่ (*Bauhinia saccocalyx*.)	โซเดียมไฮโปคลอไรท์	5
S6/T2	คราม้อย (*Indigofera wightii*)	กรดซัลฟิวริก	10
S7/T2	*Crotalaria* sp.	กรดซัลฟิวริก	10
S1/T3	เสี้ยวแดง (*Bauhinia penicilliloba*)	โซเดียมไฮโปคลอไรท์	5
S2/T3	ถั่วป่า (*Vigna minima*)	กรดซัลฟิวริก	10
S3/T3	กะตีกแป (*Desmodium heterocarpon*)	กรดซัลฟิวริก	10
S4/T3	ถั่วหิงหาย (*Tephrosia coccinea*)	กรดซัลฟิวริก	10
S5/T3	ชงโค (*Bauhinia saccocalyx*)	โซเดียมไฮโปคลอไรท์	5
S6/T3	ชงโคเล็ก (*Bauhinia* sp.)	กรดซัลฟิวริก	10
S7/T3	อีเหนียว (*Desmodium gangeticum*)	โซเดียมไฮโปคลอไรท์	10
S8/T3	มะค่าแต้หนาม (*Sindora siamensis* var. *siamensis*)	กรดซัลฟิวริก (ใช้กระดาษทรายขัดผิวด้านนอกก่อนการแช่กรด)	30
S9/T3	ไมยราพเล็ก (*Mimosa pudica*)	กรดซัลฟิวริก	10
S10/T3	กาวกะปอม (*Cajanus scarabaeoides*)	กรดซัลฟิวริก	15
S11/T3	มะขามป่า (*Abrus pulchellus*)	กรดซัลฟิวริก	10
S12/T3	อีเหนียว (*Desmodium gangeticum*)	โซเดียมไฮโปคลอไรท์	5
S13/T3	หญ้าสองปล้อง (*Desmodium velutinum*)	กรดซัลฟิวริก	10

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2. การคัดแยกเชื้อไรโซเบียมจากดินบริเวณรอบรากพืชตระกูลถั่ว

พืชตระกูลถั่วบางตัวอย่างที่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างปมรากที่สมบูรณ์ได้ จึงนำดินบริเวณรอบรากพืช มาคัดแยกเชื้อไรโซเบียมที่มีความสามารถในการเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วชนิดนั้น ๆ แทนการคัดแยกจากปมรากพืชโดยตรง ดังนี้

2.1 นำดินตัวอย่างที่เก็บได้บริเวณรอบรากพืชปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 200 รอบต่อนาที (rpm) นาน 30 นาที เพื่อให้แบคทีเรียหลุดออกจากอนุภาคของดิน

2.2 เพาะเมล็ดของพืชตระกูลถั่วอาศัย (host plant) โดยทำการกำจัดเชื้อปนเปื้อนที่ผิวเมล็ดตามวิธีการในตารางที่ 2.1 แล้วปลูกพืชลงในถุงปลูกโดยใช้สารละลายธาตุอาหารพืชที่ไม่มีไนโตรเจนรดพืชเพื่อทดสอบการเข้าสร้างปมและการตรึงไนโตรเจน

2.3 นำสารละลายดินที่ได้จากข้อ 2.1 ไปรดลงบนเมล็ดพืชอาศัย (host plant) ที่งอกแล้วในปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อเมล็ด จากนั้นนำไปวางไว้บนชั้นแสงเช่นเดียวกัน แบคทีเรียไอโซเลทใดที่สามารถเข้าสร้างปมกับพืชอาศัย (host plant) สามารถยืนยันการเป็นเชื้อไรโซเบียม และนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

รูปที่ 2.2 การปลูกพืชในถุงปลูกเพื่อทดสอบการเข้าสร้างปมของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3. การตรวจสอบลายพิมพ์ DNA (DNA fingerprint) ของเชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกได้โดยเทคนิค BOX-PCR

ทำการสกัด genomic DNA ของเชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกได้ จากนั้นทำการตรวจสอบลายพิมพ์ DNA ของเชื้อไรโซเบียมแต่ละไอโซเลทโดยใช้เทคนิค BOX-PCR ด้วย primer BOX A 1R (5’- CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3’) โดยเตรียมสารละลาย 25 ไมโครลิตร ภายในหลอดปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วย ไพรเมอร์ 10 พิโคโมล, dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ 25 มิลลิโมลาร์, Taq DNA polymerase 0.5 U และบัฟเฟอร์ 1X GoTaq Flexi DNA Polymerase ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ดังนี้ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน

5 นาที, annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที, และ extension ที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 16 นาที ซึ่งทั้งหมดทำซ้ำ 35 รอบ หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ไปทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) เพื่อตรวจสอบว่าเชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกได้แต่ละไอโซเลทเป็นเชื้อชนิดเดียวกันหรือไม่ โดยคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่มีลายพิมพ์ DNA ที่แตกต่างกันไปวิเคราะห์ต่อไป

4. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกได้ โดยใช้เทคนิคการหาลำดับเบสสมบูรณ์ ของยีน 16S rRNA

นำ genomic DNA ของเชื้อไรโซเบียมที่คัดเลือกได้มาจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ของยีน 16S rRNA คือ 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGAC TT-3') โดยใน 50 µl ประกอบด้วยไพรเมอร์จำนวน 20 pmol, dNTP จำนวน 200 µM , $MgCl_2$ จำนวน 1.5 mM, Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega, Germany) จำนวน 0.5 U และบัฟเฟอร์ 1X GoTaq Flexi DNA Polymerase และอุณหภูมิที่ใช้ในการทำ PCR ได้แก่ denaturation ที่ 95°C นาน 5 นาที หลังจากนั้น denaturation ที่ 95°C นาน 1 นาที, annealing ที่ 55°C นาน 30 วินาที, และ extension ที่ 72°C นาน 1 นาที 50 วินาที ทำซ้ำ 35 รอบ และรอบสุดท้ายได้แก่ extension ที่ 72°C นาน 10 นาที (Weisburg et al., 1991) หลังจากนั้นนำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ และนำไปหาลำดับเบสโดยใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกัน โดยส่ง PCR product ไปวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen (Korean)

5. การหาความสัมพันธ์ของลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยการสร้าง Phylogenetic tree

ลำดับดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ยีนส่วน 16S rRNA นำมาจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกันกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรมออนไลน์ BLASTN และใช้ ลำดับดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์ใน family *Bradyrhizobiaceae* ลำดับดีเอ็นเอจากไรโซเบียม และลำดับดีเอ็นเอของแบคทีเรียกลุ่มอื่น จากฐานข้อมูล GenBank เพื่อใช้ในการทำ multiple alignment โดยใช้รูปแบบ MUSCLE จากโปรแกรมออนไลน์ phylogene.fr (Dereeper et al., 2008) ซึ่งการสร้าง phylogenetic tree ใช้วิธี maximum likelihood method ในโปรแกรม PhyML (Guindon and Gascuel, 2003) และที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 1,000 ซ้ำ การสร้าง phylogenetic tree สำหรับใช้เปรียบเทียบ จะสร้างโดยใช้ วิธี distance neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) โดยใช้โปรแกรม MEGA 5

วัตถุประสงค์ 4. เพื่อเก็บรวมรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนที่พบในป่าเหนือเขื่อนน้ำพุง

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ข้อที่ 4 ได้ดำเนินการดังต่อไปนี้

ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกได้ ตรวจสอบโดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ nitrogenase เมื่อเชื้อไรโซเบียมนั้น ๆ เข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วอาศัย (host plant) หรือเข้าสร้างปมกับ Siratro (ในกรณีไม่มีเมล็ดจากพืชอาศัยในการทดสอบ)

1. กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสวัดได้โดยใช้วิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) (Somasegaran and Hoben, 1994) โดยนำพืชตระกูลถั่วที่มีการเข้าสร้างปมของไรโซเบียมแต่ละชนิดไปบ่มในภาชนะที่มีก๊าซ acethylene อยู่ 5% ของปริมาตรอากาศทั้งหมด แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. จากนั้นตรวจสอบปริมาณของก๊าซ ethylene ที่ถูกผลิตขึ้นโดยใช้ Gas Chromatography (GC) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของก๊าซ ethylene ที่ทราบปริมาณที่แน่นอนแล้ว สภาวะของเครื่อง GC ที่ใช้ในการทดสอบกำหนดให้ oven temperature 50 องศาเซลเซียส, injector 150 องศาเซลเซียส, และ detector 200 องศาเซลเซียส

2. เก็บรวมรวมเชื้อไรโซเบียมที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงไว้ที่สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ม. เทคโนโลยีสุรนารี เพื่อใช้ในการศึกษาสำหรับใช้พัฒนาเป็นหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ผลการเก็บข้อมูลภาคสนาม และการตรวจสอบทางอนุกรมวิธานของพืชตระกูลถั่วที่เก็บได้

การสำรวจครั้งที่ 1 วันที่ 13-16 ธันวาคม 2554

- เส้นทางที่ 1 ป่าเต็งรัง เก็บตัวอย่างพืชได้ทั้งหมด 21 ตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 3.1-3.21 และตารางที่ 3.1

  ทราบชื่อสามัญจำนวน 7 ตัวอย่าง

  ทราบชื่อวิทยาศาสตร์ระดับสกุลจำนวน 10 ตัวอย่าง

  ไม่ทราบชื่อจำนวน 8 ตัวอย่าง

- เส้นทางที่ 2 ป่าเต็งรังผสมป่าเบญจพรรณ เก็บตัวอย่างพืชได้ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 3.22-3.28 และตารางที่ 3.2

  ทราบชื่อสามัญจำนวน 3 ตัวอย่าง

  ทราบชื่อวิทยาศาสตร์ระดับสกุลจำนวน 5 ตัวอย่าง

  ไม่ทราบชื่อจำนวน 2 ตัวอย่าง

- เส้นทางที่ 3 ป่าเบญจพรรณ เก็บตัวอย่างพืชได้ทั้งหมด 13 ตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 3.29-3.41 และตารางที่ 3.3

  ทราบชื่อสามัญจำนวน 10 ตัวอย่าง

  ทราบชื่อวิทยาศาสตร์ระดับสกุลจำนวน 8 ตัวอย่าง

การสำรวจครั้งที่ 2 วันที่ 27 กุมภาพันธ์ – 1 มีนาคม 2555

- เส้นทางที่ 2 ป่าเต็งรังผสมป่าเบญจพรรณ เก็บตัวอย่างพืชได้ทั้งหมด 11 ตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 3.42-3.52 และตารางที่ 3.4

  ทราบชื่อสามัญจำนวน 2 ตัวอย่าง

  ไม่ทราบชื่อจำนวน 9 ตัวอย่าง

- เส้นทางที่ 3 ป่าเบญจพรรณ เก็บตัวอย่างพืชได้ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 3.53-3.68 และตารางที่ 3.5

  ทราบชื่อสามัญจำนวน 4 ตัวอย่าง

  ไม่ทราบชื่อจำนวน 12 ตัวอย่าง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างพืชตระกูลถั่ว เส้นทางสำรวจที่ 1 ป่าเต็งรัง เก็บตัวอย่างวันที่ 14 ธันวาคม 2554 เวลา 10.30-15.30 น.

ตัวอย่าง	ชื่อ	Subfamily/Tribe	ลักษณะต้น	ฝัก	ใบ	ดอก	เมล็ด	ปม	ดิน	หมายเหตุ
S1/T1	ขี้เหล็กบ้าน, เรียงเม็ด, **ชุมเห็ดเล็ก** *Senna occidentalis* (L.) Link	Caesalpinioidieae/ Cassieae	ไม้พุ่มเตี้ย สูงประมาณ 1 เมตร	สีน้ำตาล ยาว 5-7 ซม. ฝักไม่มีขน	ใบออกเป็นคู่ ๆ ก้านใบตรงกัน มีกลิ่นเหม็น	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S2/T1	เครือขน		เถาเลื้อย	ฝักกลมสีดำ ยาว 5 ซม. คล้ายฝักถั่วเขียว มีขนสีขาวสั้นละเอียด	หนึ่งก้านใบมี 3 ใบ กว้างประมาณ 3-5 ซม. ใบมีขน	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	พบปมที่ราก	เก็บดิน	
S3/T1	ด่านราชสีห์ *Tephrosia vestita* Vogel	Faboideae/ Millettieae	ไม้พุ่ม พบทั่วไปในป่าเต็งรัง สูงประมาณ 50 ซม.	ฝักสีน้ำตาลแก่ ลักษณะแบนมีขนยาว ความยาว 3-5 ซม.	ใบลักษณะเป็นวงรี หนึ่งกิ่งมี 9 ใบ มีขนาดเล็ก กว้าง 1-2 ซม.	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S4/T1	มะขามป่า, มะขามย่าน *Abrus pulchellus* Wall. ex Thwaites	Faboideae/Abreae	เถาเลื้อย	ฝักแบนใหญ่ สีน้ำตาลอ่อน ยาวประมาณ 3 ซม.	ใบเหมือนใบมะขาม	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	พบปม	เก็บดิน	ใช้เป็นตัวยาในการรักษาโรคกระเพาะ
S5/T1	อัญชันป่า (*Clitoria macrophylla*)	Faboideae/ Phasioleae/Subtribe Clotoriinae	ไม้พุ่ม สูง 80-100 ซม.	ฝักกลม สีน้ำตาล 5-7 ซม. ฝักเดี่ยว	ใบรีปลายแหลม ยาว 10-15 ซม.	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	พบปม	เก็บดิน	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตัวอย่าง	ชื่อ	Subfamily/Tribe	ลักษณะต้น	ฝัก	ใบ	ดอก	เมล็ด	ปม	ดิน	หมายเหตุ
S6/T1	กระดิ่งหายป่า, หิ่งเม่นน้อย *Crotalaria alata* Buch.-Ham. ex D.Don	Faboideae/ Crotalarieae	ไม้พุ่ม สูง 50-80 ซม.	ฝักแก่สีดำ ฝักอ่อนสีเขียว ยาว 2-3 ซม.	ใบรี ปลายแหลม ขนาดเล็ก ยาว 2-3 ซม. บริเวณลำต้นพบลักษณะคล้ายใบยื่นออกมาเป็นแถบยาวสีเขียว	ดอกสีเหลือง	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S7/T1	หิ่งหายใบเล็ก *Crotalaria albida* Heyne ex Roth	Faboideae/ Crotalarieae	ไม้พุ่มเตี้ย สูง 20-30 ซม. คล้ายกระดิ่งหายป่าแต่ต้นเล็กกว่า	ฝักแก่สีน้ำตาลอ่อน มีขนาดเล็ก ยาว 0.5-1 ซม.	ใบรีขนาดเล็กปลายมน ยาว 1 ซม.	ไม่แน่ใจ	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S8/T1	*Crotalaria* sp.	Faboideae/ Crotalarieae	ไม้พุ่มเตี้ย สูง 20-30 ซม.	ฝักทรงกลม สีดำ เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม.	ใบรีขนาดเล็ก ปลายมน ยาว 1-2 ซม.	ไม่พบข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S9/T1	*Crotalaria* sp.	Faboideae/ Crotalarieae	ไม้พุ่ม สูง 80-100 ซม.	ฝักเป็นพวง ฝักแก่สีน้ำตาล ฝักอ่อนสีเขียว ฝักยาว 1.5-2 ซม.	ใบรี มี 2 ลักษณะ ใบใหญ่ ยาว 4-5 ซม. และใบเล็ก 1-2 ซม. อยู่ใต้พวงฝัก	ไม่พบข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S10/T1	กาวกะปอม, ถั่วแปบ *Cajanus scarabaeoides* (L.) Thouars	Faboideae/Phaseoleae/Subtribe Cajaninae	เถาเลื้อย ลำต้นเล็ก 0.1-0.2 ซม. (เส้นผ่านศก.)	ฝักแบน มีขน บรรจุ 4-5 เมล็ดต่อฝัก สีน้ำตาล ความยาวฝัก 2 ซม.	ใบกลมขนาดเล็ก ยาว 2 ซม. หนึ่งก้านประกอบด้วย 3 ใบ	ไม่พบข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S11/T1	กาสามปีก, ขมิ้นนาง *Flemingia macrophylla* (Willd.) Kuntze	Faboideae/Phaseoleae/Subtribe Cajaninae	ไม้พุ่ม สูง 50-80 ซม.	ฝักเป็นพวง สีน้ำตาล มีขน มีลายบนฝัก	ใบขนาดใหญ่ ยาว 12-15 ซม. หนึ่งก้านมี 3 ใบ	ไม่พบข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตัวอย่าง	ชื่อ	Subfamily/Tribe	ลักษณะต้น	ฝัก	ใบ	ดอก	เมล็ด	ปม	ดิน	หมายเหตุ
	ex Merr.									
S12/T1	อีเหนียว *Desmodium gangeticum* (L.) DC.	Faboideae/ Desmodieae	ไม้พุ่ม สูง 80-100 ซม.	ฝักแบน มีขน ฝักคล้ายโสนขน เรียงตัวเป็นข้อ ๆ สีน้ำตาลเข้ม ฝักอยู่เป็นช่อ ฝักยาว 2 ซม. ติดเสื้อผ้า	ใบขนาดใหญ่ ยาว 7-10 ซม. ปลายแหลม เห็นเส้นใบชัดเจน	ไม่พบข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S13/T1	ช้อยนางรำ *Codoriocalyx motorius* (Houtt.) H.Ohashi	Faboideae/ Desmodieae	ไม้พุ่ม สูง 80-100 ซม.	ฝักแบน ฝักแก่สีดำ ฝักอ่อนสีเขียวเหลือง ยาว 1.5-2 ซม. เรียงเป็นข้อ ๆ	ใบยาวรี ปลายมน ยาว 2-3 ซม.	ไม่พบข้อมูล	เก็บ	พบปม	เก็บดิน	
S14/T1	หญ้าสองปล้อง *Desmodium velutinum* (Willd.) DC.	Faboideae/ Desmodieae	ไม้พุ่ม สูง 50-80 ซม.	ฝักเป็นพวง แต่ละฝักเรียงเป็นข้อ ๆ ยาว 2-3 ซม. ฝักแก่สีน้ำตาล ฝักอ่อนสีเขียว ฝักมีลักษณะแบน มีขน	ใบใหญ่ ยาว 7-8 ซม.	ไม่พบข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S16/T1	ลูกพรวนหมา *Pycnospora lutescens* (Poir.) Schindl.	Faboideae/ Desmodieae	ไม้พุ่ม สูง 20-30 ซม.	ฝักกลมอ้วน ฝักแก่สีดำ มีขน	ใบเล็ก ยาว 3-5 ซม.	ไม่พบข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S17/T1	มะกล่ำตาแดง, มะกล่ำตาหนู *Abrus precatorius* L.	Faboideae/Abreae	เถาเลื้อย	ฝักสีน้ำตาลแบน ยาว 2-3 ซม. ประกอบกันเป็นพวง	ใบประกอบ คล้ายใบมะขาม	ไม่พบข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	เมล็ดสีแดง ตรงขั้วส่วนบนสีดำ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตัวอย่าง	ชื่อ	Subfamily/Tribe	ลักษณะต้น	ฝัก	ใบ	ดอก	เมล็ด	ปม	ดิน	หมายเหตุ
S18/T1	หิ่งหาย *Crotalaria retusa* L.	Faboideae/ Crotalarieae	ไม้พุ่ม สูง 100-120 ซม.	ฝักแก่สีดำ ขนาด 3-5 ซม.	ใบยาวรี ปลายมน ขนาด 5-7 ซม. ไม่มีแผงใบตรงลำต้น	ไม่พบข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	คล้ายกระดิ่งหายป่า แต่ฝักขนาดใหญ่กว่ามาก
S19/T1	ชะคราม *Indigofera galegoides* DC.	Faboideae/ Indigofereae	ไม้เลื้อย ออกฝักที่โคน มีใบที่ส่วนปลายของต้น	ฝักแก่สีดำ เป็นพวงเรียงกัน คล้ายพัด ฝักแข็ง ปลายแหลม ยาว 5-7 ซม.	ใบประกอบ รีปลายมน ยาว 2 ซม.	ไม่พบข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S20/T1	ตาลส้านดอย *Desmodium* renifolium (L.) Schindl.	Faboideae/ Desmodieae	ไม้พุ่มเล็ก สูง 20-30 ซม.	ฝักแบน เรียงกันเป็นข้อ สีน้ำตาล ยาว 2-3 ซม.	ใบรูปพัด ขนาด 2-3 ซม.	ไม่พบข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S21/T1	มะขามเบี้ย *Chamaecrista pumila* (Lam.) V.Singh	Caesalpinioideae/ Cassieae	ไม้พุ่มเตี้ย สูง 5-10 ซม. ลำต้นไม่มีหนาม	ฝักแบน ฝักแก่สีน้ำตาล ฝักอ่อนสีเขียว ยาว 2-3 ซม.	ใบประกอบคล้ายไมยราพ ไม่มีหนาม	ไม่พบข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S22/T1	*Crotalaria* sp.	Faboideae/ Crotalarieae	ไม้พุ่ม สูง 20-30 ซม.	ไม่มีข้อมูล	ใบรี คล้ายพินโบลิ่ง ยาว 2-3 ซม.	สีเหลือง	ไม่มีข้อมูล	ไม่พบ	ไม่ได้เก็บ	

รูปที่ 3.1 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S1T1 ต้นขี้เหล็กบ้านหรือเรียงเม็ด

รูปที่ 3.2 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S2T1 ต้นเครือขน

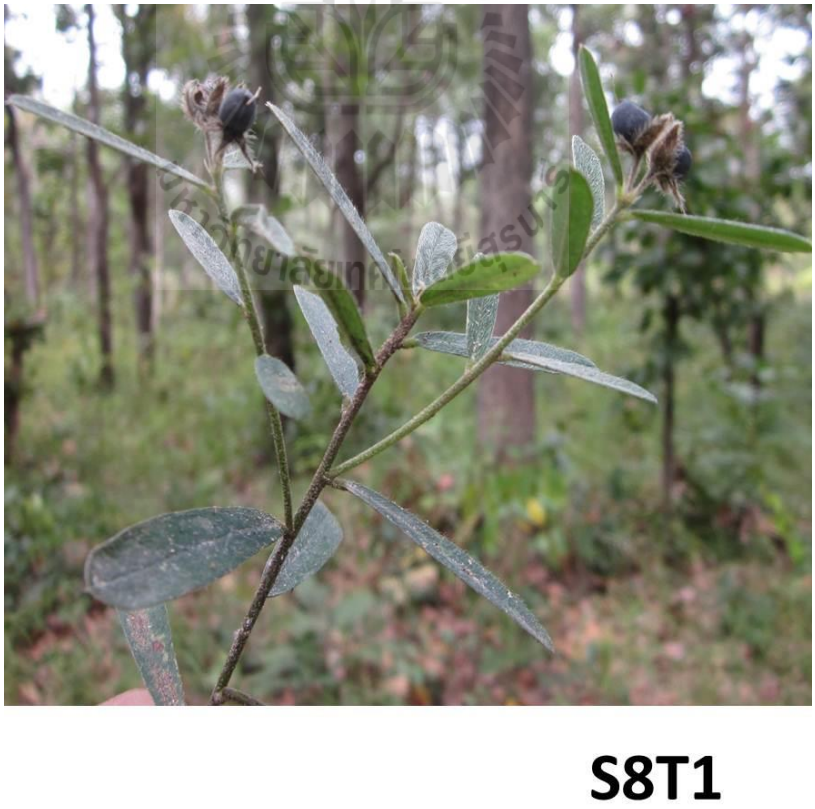
รูปที่ 3.3 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S3T1 ด่านราชสีห์

รูปที่ 3.4 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S4T1 มะขามป่า มะขามย่าน

รูปที่ 3.5 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S5T1 อัญชันป่า

รูปที่ 3.6 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S6T1 กระดิ่งหายป่า หิ่งเม่นน้อย

รูปที่ 3.7 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S7T1 หิ่งหายใบเล็ก



รูปที่ 3.8 แสดงภาพของใบ และฝักของพืชตระกูลถั่ว S8T1 *Crotalaria* sp.

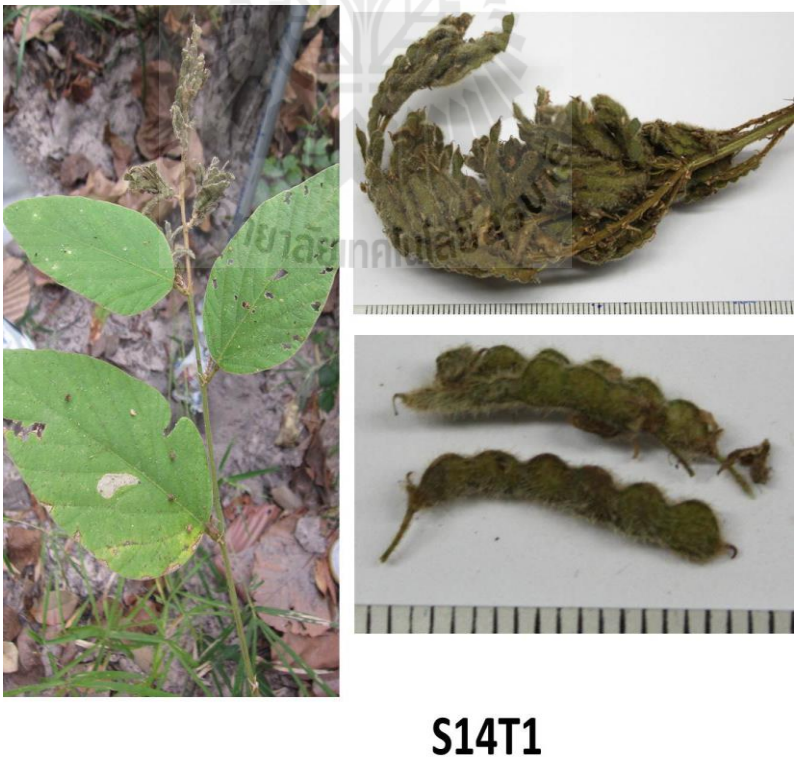
รูปที่ 3.9 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S9T1 *Crotalaria* sp.

รูปที่ 3.10 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S10T1 กาวกะปอม

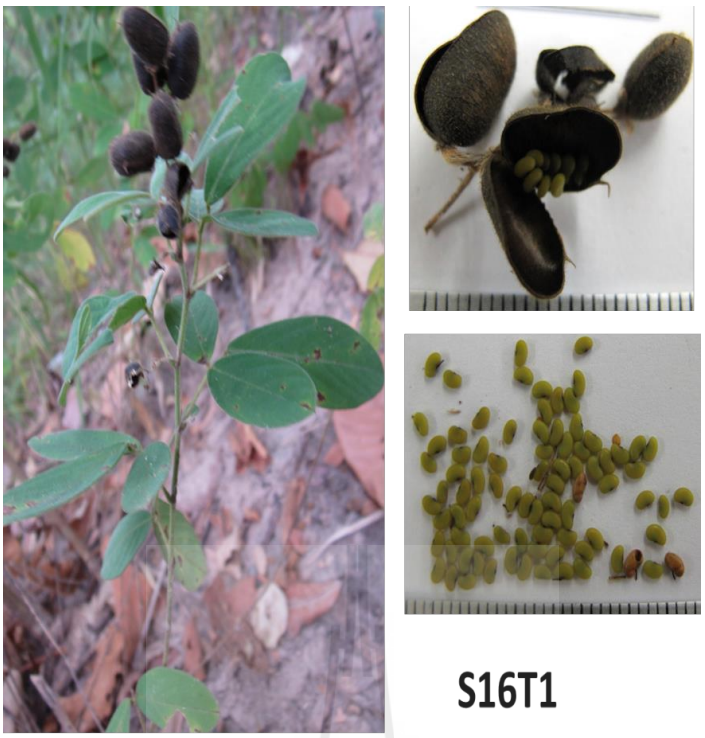
รูปที่ 3.11 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S11T1 กาสามปีก ขมิ้นนาง

รูปที่ 3.12 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S12T1 อีเหนียว

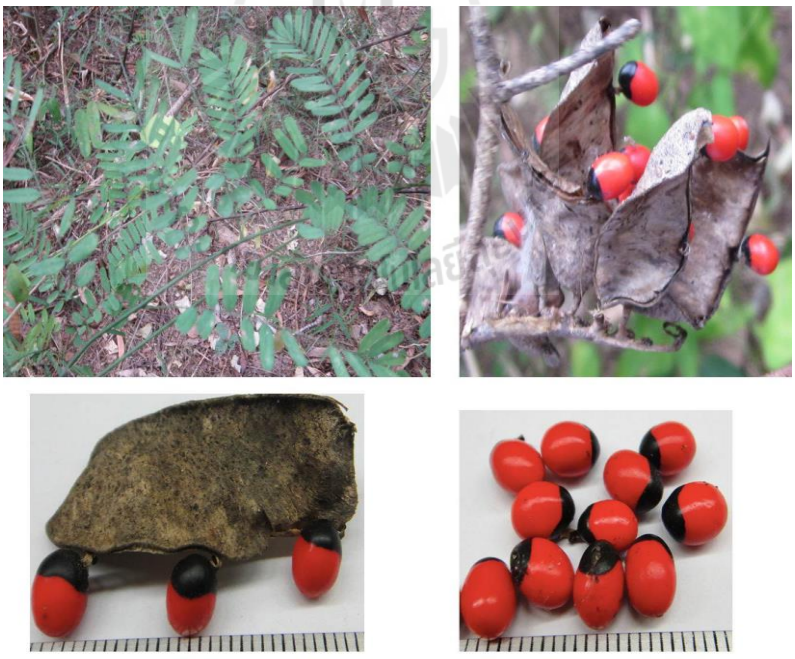
รูปที่ 3.13 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S13T1 ช้อยนางรำ



รูปที่ 3.14 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S14T1 หญ้าสองปล้อง



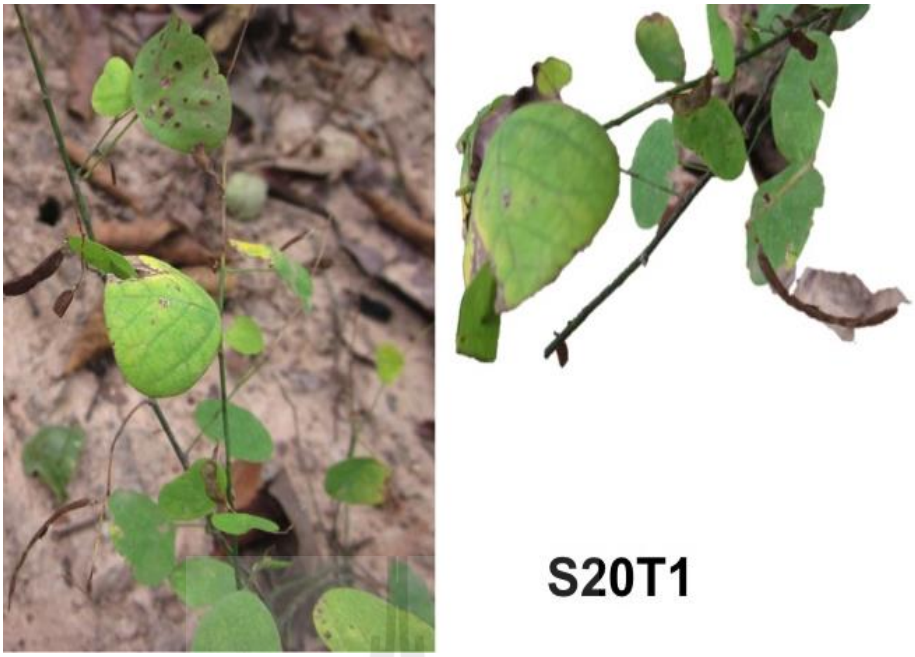
รูปที่ 3.15 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S16T1 ลูกพรวนหมา



รูปที่ 3.16 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S17T1 มะกล่ำตาแดง มะกล่ำตาหนู

รูปที่ 3.17 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S18T1 หิ่งหาย

รูปที่ 3.18 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S19T1 ชะคราม



รูปที่ 3.19 แสดงภาพของใบ และฝักของพืชตระกูลถั่ว S20T1 ตาลส้านดอย

รูปที่ 3.20 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S21T1 มะขามเบี้ย

รูปที่ 3.21 แสดงภาพของใบ ดอกและฝักของพืชตระกูลถั่ว S22T1 *Crotalaria* sp.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างพืชตระกูลถั่ว เส้นทางสำรวจที่ 2 ป่าเต็งรัง ผสมป่าเบญจพรรณ เก็บตัวอย่างวันที่ 15 ธันวาคม 2554 เวลา 12.30-15.30 น.

ตัวอย่าง	ชื่อ	Subfamily/Tribe	ลักษณะต้น	ฝัก	ใบ	ดอก	เมล็ด	ปม	ดิน	หมายเหตุ
S1/T2	Unidentified	Faboideae	เถาเลื้อย	ฝักอ่อนสีเขียว มีเส้นขอบฝักสีเขียวเข้ม ฝักแบน ยาว 7-10 ซม.	ใบประกอบ มี 3 ใบในก้านเดียว ใบกว้างปลายใบแหลม ยาว 5-7 ซม.	ไม่มีข้อมูล	ไม่ได้เก็บ เนื่องจากฝักอ่อน	พบปมราก	เก็บดิน	
S2/T2	Unidentified		เถาเลื้อย	ฝักแก่สีน้ำตาล ฝักยาว 3-5 ซม. มีขน ฝักไม่แบน	ใบลักษณะคล้ายรูปหัวใจแคบ ปลายใบยาวแหลม ยาวประมาณ 5-7 ซม.	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	พบปมราก	เก็บดิน	Pods unknown; the leaves are *Aristolochia*, not legume
S3/T2	คราม่ป่า, คราม่ดอย *Indigofera cassioides* Rottl. ex DC.	Faboideae/ Indigofereae	ไม้พุ่ม สูงประมาณ 2 ม.	ฝักอ่อนสีเขียว ความยาว 3-5 ซม. ฝักออกเป็นพวงตามตำแหน่งของดอกบนก้านช่อดอก	ใบประกอบคล้ายใบขี้เหล็ก ปลายใบมนใบยาว 1-2 ซม.	ดอกสีชมพูเข้ม กลีบดอกด้านนอนกบริเวณฐานกลีบมีสีม่วง ดอกออกเป็นช่อ	ไม่ได้เก็บ เนื่องจากฝักอ่อน	ไม่พบ	เก็บดิน	
S4/T2	แกลบหนู *Dendrolobium lanceolatum* (Dunn.) Schindl.	Faboideae/ Desmodieae	ไม้พุ่มขนาดกลาง สูง 70-100 ซม.	ฝักกลมแบนขนาดเล็ก 1 ซม. ในหนึ่งฝักประกอบด้วย 1 เมล็ด เมล็ดแก่มีสีน้ำตาล เมล็ดอ่อนสีเขียว	ใบประกอบ 3 ใบต่อก้าน ใบยาวรีปลายแหลม ใบยาว 2-3 ซม.	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตัวอย่าง	ชื่อ	Subfamily/Tribe	ลักษณะต้น	ฝัก	ใบ	ดอก	เมล็ด	ปม	ดิน	หมายเหตุ
S5/T2	เสี้ยวใหญ่, เสี้ยวป่า *Bauhinia saccocalyx* Pierre	Caesalpinioideae/ Cercideae	ไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ สูง 10 ม.	ฝักแบนสีน้ำตาล ปลายกว้าง ฝักยาว 7-10 ซม.	ใบลักษณะคล้ายกีบเท้าสัตว์ ปลายใบแยกเป็น 2 แฉก ยาว 5 ซม. กว้าง 7 ซม.	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S6/T2	คราม้อย *Indigofera wightii* Graham ex Wight & Arn.	Faboideae/Indigofereae	ไม้พุ่ม สูง 50-80 ซม.	ฝักแก่สีน้ำตาลอ่อน ฝักอ่อนสีเขียว ยาว 1-2 ซม.	ใบประกอบ ลักษณะใบรี ปลายมน ยาว 0.5 ซม.	ไม่มีข้อมูบล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	คล้ายโสนขน
S7/T2	*Crotalaria* sp.	Faboideae/Crotalarieae	ไม้พุ่มเตี้ย สูง 50-80 ซม.	ฝักแก่สีน้ำตาลอ่อน ฝักอ่อนสีเขียวอ่อน มีขนาดยาว 3-5 ซม. ลักษณะยาวป้อม	ใบยาวรีปลายแหลม มีเส้นใบสีขาวชัดเจนตัดกับสีใบ ยาว 5 ซม.	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

S1T2

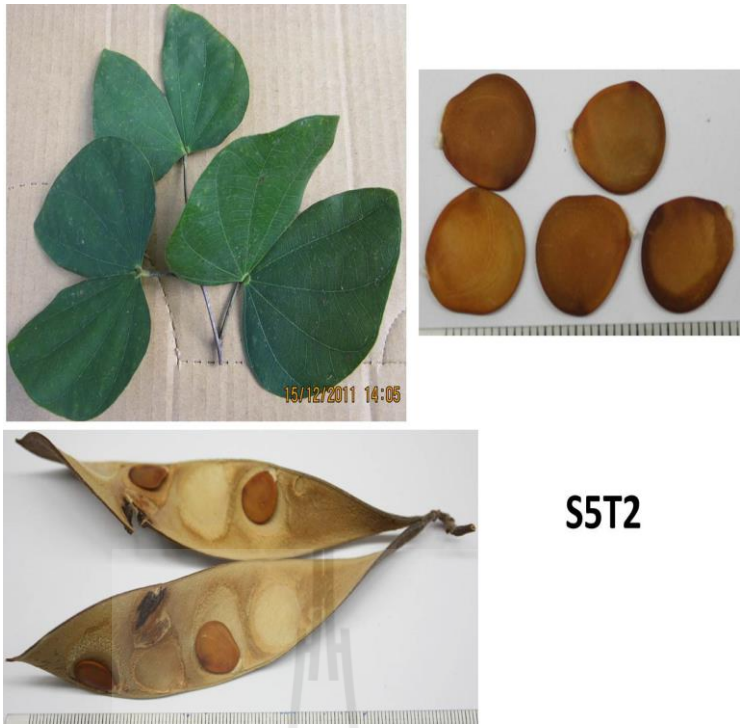
รูปที่ 3.22 แสดงภาพของใบ ฝักและปมของพืชตระกูลถั่ว S1T2 unidentified

S2T2

รูปที่ 3.23 แสดงภาพของใบ ฝัก เมล็ดและปมของพืชตระกูลถั่ว S2T2 unidentified

รูปที่ 3.24 แสดงภาพของใบ ฝัก และดอกของพืชตระกูลถั่ว S3T2 คราม่ป่า คราม่ดอย

รูปที่ 3.25 แสดงภาพของใบ และฝักของพืชตระกูลถั่ว S4T2 แกลบหนู



รูปที่ 3.26 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S5T2 เสี้ยวใหญ่ เสี้ยวป่า

รูปที่ 3.27 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S6T2 คราม้อย

รูปที่ 3.28 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S7T2 *Crotalaria* sp.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างพืชตระกูลถั่ว เส้นทางสำรวจที่ 3 ป่าเบญจพรรณ เก็บตัวอย่างวันที่ 15 ธันวาคม 2554 เวลา 8.30-12.00 น.

ตัวอย่าง	ชื่อ	Subfamily/Tribe	ลักษณะต้น	ฝัก	ใบ	ดอก	เมล็ด	ปม	ดิน	หมายเหตุ
S1/T3	เสี้ยวแดง *Bauhinia penicilliloba* Pierre ex Gagnep.	Caesalpinioideae/ Cercideae	เถาเลื้อย	ฝักสีน้ำตาลแดง ฝักแบน ยาว 3-5 ซม.	ใบคล้ายกีบเท้าสัตว์ ปลายใบแยกเป็น 2 แฉก ยาว 3-4 ซม.	ไม่มีข้อมูล (สีแดง ตามคำบอกเล่าของพราน)	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	รากใช้ทำยา
S2/T3	ถั่วป่า *Vigna minima* (Roxb.) Ohwi & H.Ohashi	Faboideae/ Phaseoleae/Subtribe Phaseolinae	เถาเลื้อย	ฝักแก่สีน้ำตาลเข้ม ฝักอ่อนสีเขียว ฝักยาว 5-7 ซม. เจอในที่ลุ่มชื้น	ใบประกอบ มี 3 ใบใน 1 ก้าน ยาวประมาณ 5-7 ซม.	ดอกสีเหลืองสด	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S3/T3	กะตึกแป, เชียดน้อย *Desmodium heterocarpon* (L.) DC.	Faboideae/ Desmodieae	ไม้พุ่มเตี้ย สูงประมาณ 50-80 ซม.	ฝักอ่อนสีเขียว ฝักแก่สีน้ำตาล ความยาว 1-2 ซม. ฝักแบนเรียงเป็นข้อ ๆ ต่อกัน ฝักออกเป็นพวง	ใบประกอบ มี 3 ใบใน 1 ก้าน ใบยาวรีปลายมน ยาวประมาณ 3-5 ซม.	ดอกสีม่วงอมขาว ขนาดเล็ก ยาว 1-1.5 ซม.	เก็บ	พบปมราก	เก็บดิน	
S4/T3	ถั่วหิงหาย, ดาบฤาษี *Tephrosia coccinea* Wall.	Faboideae/ Millettieae	ไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 30-50 ซม. พบเจริญบนดินตะกอนแทรกอยู่ในร่องหิน	ฝักแบนผิวเรียบ ยาว 5-7 ซม. ฝักแก่มีสีน้ำตาล	ใบประกอบ 3 ใบต่อก้าน ใบเล็ก ปลายมน ใบยาว 2-3 ซม.	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	พบปมราก รากมีขนาดสั้น	เก็บดิน	
S5/T3	ชงโค, เสี้ยวป่า *Bauhinia saccocalyx* Pierre	Caesalpiniodeae/ Cercideae	ไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ สูง 8-10 ม.	ฝักแบนสีน้ำตาล ปลายกว้าง ฝักยาว 8-10 ซม.	ใบลักษณะคล้ายกีบเท้าสัตว์ ปลายใบแยกเป็น 2 แฉก ยาว 5 ซม. กว้าง 7 ซม.	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	ไม่ได้เก็บดิน	

ตัวอย่าง	ชื่อ	Subfamily/Tribe	ลักษณะต้น	ฝัก	ใบ	ดอก	เมล็ด	ปม	ดิน	หมายเหตุ
S6/T3	ชงโคเล็ก *Bauhinia* sp.	Caesalpiniodeae/ Cercideae	ไม้พุ่ม สูง 30-50 ซม.	ฝักแก่สีน้ำตาลเข้ม ขอบฝักเรียบ ฝักแบน ยาว 5-7 ซม.	ใบลักษณะคล้ายกีบเท้าสัตว์ ปลายใบแยกเป็น 2 แฉก ยาว 3-5 ซม. กว้าง 5-7 ซม.	ไม่มีข้อมูบล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S7/T3	อีเหนียว *Desmodium gangeticum* (l.) DC.	Faboideae/ Desmodieae	ไม้พุ่มเตี้ย สูง 50-80 ซม.	ฝักแก่สีน้ำตาลเข้า ฝักอ่อนสีเขียวอ่อน มีขนาดยาว 1 ซม. ลักษณะแบนต่อเป็นข้อ ๆ ออกเรียงต่อกันเป็นช่อ	ใบกว้างปลายแหลม ยาว 5 ซม.	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	คล้าย S12/T1
S8/T3	มะค่าแต้หนาม, มะค่าแต้ *Sindora siamensis* Teijsm. & Miq. var. *siamensis*	Caesalpinioideae/ Detarieae	ไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ สูง 10 ม.	ฝักแก่มีสีดำแบน มีหนามบนฝัก ภายในมีเมล็ดกลมสีดำ ฝักยาว 7-10 ซม.	ใบอ่อนระยะงอกจากเมล็ดมีลักษณะเป็นใบรีปลายมน ผิวมันเรียบ สีเขียว ยาว 5-7 ซม. (ไม่แน่ใจใบแก่บนต้น)	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S9/T3	ไมยราพเล็ก, หญ้าปันยอด *Mimosa pudica* L.	Mimosoideae/ Mimoseae	ไม้เลื้อยขนาดเล็กมีหนามตามใบและก้าน	ฝักมีขนหนามยาว ออกเป็นช่อ ฝักเป็นข้อ ยาว 0.5-1 ซม. ฝักอ่อนสีเขียว ฝักแก่สีน้ำตาล	ใบประกอบ ขนาดเล็ก คล้ายใบมะขาม เมื่อสัมผัสใบจะหุบลีบ	ดอกสีม่วงฝอย ขนาดเล็ก 0.5 ซม. ดอกกลมเป็นฝอย คล้ายดอกกระถิน	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S10/T3	กาวกะปอม, ถั่วแปบ *Cajanus scarabaeoides* (L.) Thouars	Faboideae/Phaseoleae/ Subtribe Cajaninae	เถาเลื้อย ลำต้นเล็ก 0.1-0.2 ซม. (เส้นผ่านศก.)	ฝักแบน มีขน บรรจุ 4-5 เมล็ดต่อฝัก สีน้ำตาล ความยาวฝัก 2 ซม.	ใบกลมขนาดเล็ก ยาว 2 ซม. หนึ่งก้านประกอบด้วย 3 ใบ	ไม่พบข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	ไม่ได้เก็บดิน	คล้าย S10/T1

ตัวอย่าง	ชื่อ	Subfamily/Tribe	ลักษณะต้น	ฝัก	ใบ	ดอก	เมล็ด	ปม	ดิน	หมายเหตุ
S11/T3	มะขามป่า, มะขามย่าน *Abrus pulchellus* Wall. ex Thwaites	Faboideae/Abreae	เถาเลื้อย	ฝักแบนใหญ่ สีน้ำตาลอ่อน ยาวประมาณ 3 ซม.	ใบเหมือนใบมะขาม	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	พบปม	ไม่ได้เก็บดิน	คล้าย S4/T1
S12/T3	อีเหนียว *Desmodium gangeticum* (L.) DC.	Faboideae/ Desmodieae	ไม้พุ่ม สูง 80-100 ซม.	ฝักแบน มีขน ฝักคล้ายโสนขน เรียงตัวเป็นข้อ ๆ สีน้ำตาลเข้ม ฝักอยู่เป็นช่อ ฝักยาว 2 ซม. ติดเสื้อผ้า	ใบขนาดใหญ่ ยาว 7-10 ซม. ปลายแหลม เห็นเส้นใบชัดเจน	ไม่พบข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	ไม่ได้เก็บดิน	คล้าย S12/T1
S13/T3	หญ้าสองปล้อง *Desmodium velutinum* (Willd.) DC.	Faboideae/ Desmodieae	ไม้พุ่ม สูง 50-80 ซม.	ฝักเป็นพวง แต่ละฝักเรียงเป็นข้อ ๆ ยาว 2-3 ซม. ฝักแก่สีน้ำตาล ฝักอ่อนสีเขียว ฝักมีลักษณะแบน มีขน	ใบใหญ่ ยาว 7-8 ซม.	ไม่พบข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	ไม่ได้เก็บดิน	คล้าย S14/T1

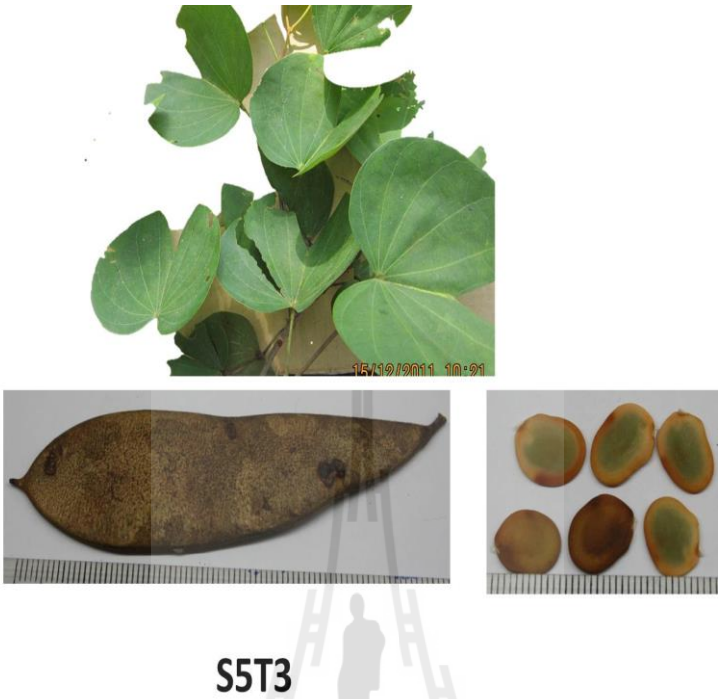
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 3.29 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S1T3 เสี้ยวแดง *Bauhinia penicilliloba*

รูปที่ 3.30 แสดงภาพของใบ ฝัก ดอก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S2T3 ถั่วป่า

รูปที่ 3.31 แสดงภาพของใบ ฝัก ดอก และปมของพืชตระกูลถั่ว S3T3 กระตีกแป เชียดน้อย

รูปที่ 3.32 แสดงภาพของใบ ฝัก เมล็ด และปมของพืชตระกูลถั่ว S4T3 ถั่วหิ่งหาย ดาบฤาษี



รูปที่ 3.33 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S5T3 ชงโค เสี้ยวป่า

รูปที่ 3.34 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S6T3 ชงโคเล็ก *Bauhinia* sp.

S7T3

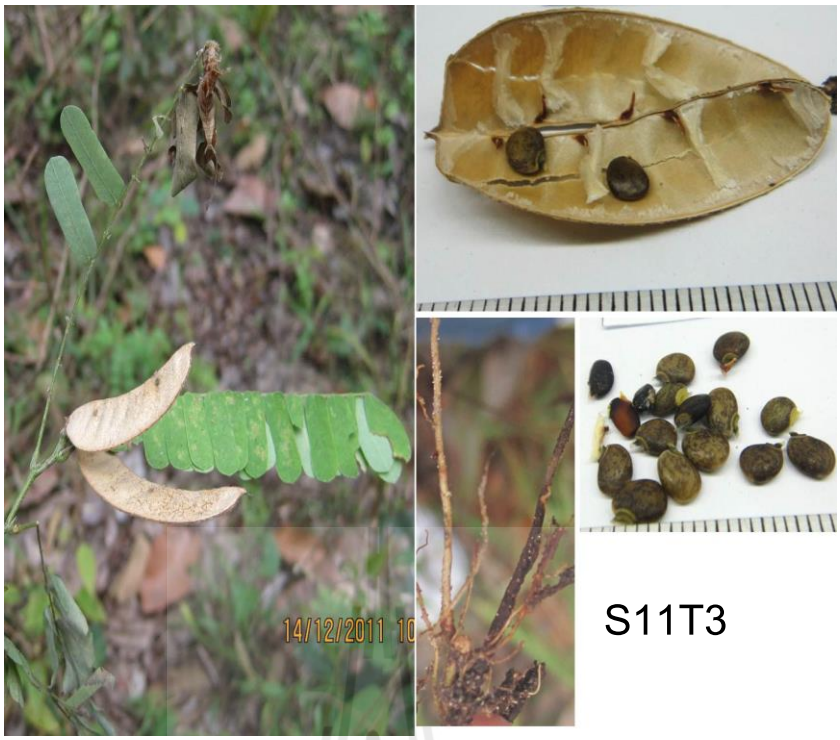
รูปที่ 3.35 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S7T3 อีเหนียว

S8T3

รูปที่ 3.36 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S8T3 มะค่าแต้หนาม มะค่าแต้

รูปที่ 3.37 แสดงภาพของใบ ฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S9T3 ไมยราพเล็ก หญ้าปันยอด

รูปที่ 3.38 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S10T3 กาวกะปอม ถั่วแปบ



รูปที่ 3.39 แสดงภาพของใบ ฝัก ปมและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S11T3 มะขามป่า มะขามย่าน

รูปที่ 3.40 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S12T3 อีเหนียว

รูปที่ 3.41 แสดงภาพของใบ ฝักและต้นของพืชตระกูลถั่ว S13T3 หญ้าสองปล้อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

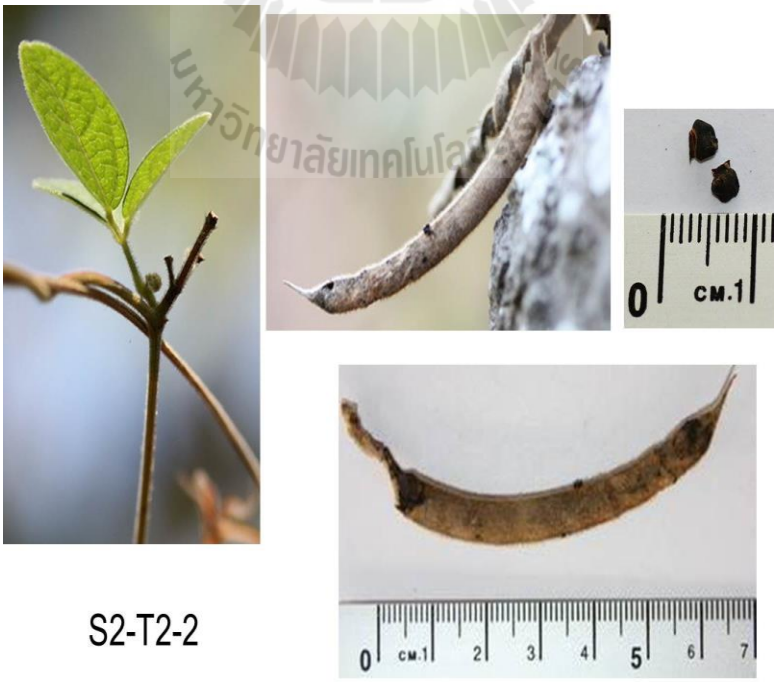
ตารางที่ 3.4 ตัวอย่างพืชตระกูลถั่ว เส้นทางสำรวจที่ 2 ป่าเต็งรังผสมป่าเบญจพรรณ เก็บตัวอย่างวันที่ 29 กุมภาพันธ์ 2555 เวลา 8.30-14.30 น.

ตัวอย่าง	ชื่อ	Subfamily/Tribe	ลักษณะต้น	ฝัก	ใบ	ดอก	เมล็ด	ปม	ดิน	หมายเหตุ
S1/T2-2	*Tephrosia vestita* Vogel	Faboideae/ Millettieae	ไม้พุ่ม สูง 30-50 cm คล้ายคราม	ฝักสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะแบน มีขน	ใบลักษณะคล้ายมะขาม แต่มีขนาดใหญ่กว่า	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	พบ	เก็บดิน	
S2/T2-2	unidentified		เถาเลื้อยขนาดเล็ก พันรอบต้นไม้ใหญ่	ฝักสีน้ำตาลอ่อน มีขน	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	พบ	เก็บดิน	
S3/T2-2	*Codoriocalyx motorius* (Houtt.) H.Ohashi	Faboideae/ Desmodieae	ไม้ต้นขนาดเล็ก สูงประมาณ 30-50 ซม.	ฝักสีดำหยัก ตอนพบฝัก เมล็ดแตกกระจายออกแล้ว เหลือเพียงเมล็ดเดียว	ใบเรียวปลายมน	ไม่มีข้อมูล	เก็บ 1 เมล็ด	พบ	เก็บดิน	
S4/T2-2	unidentified		เถาเลื้อยขนาดเล็ก	ไม่พบฝัก	ใบใหญ่สามใบใน 1 ก้าน	ไม่มีข้อมูล	ไม่มี	พบ	เก็บดิน	
S5/T2-2	ขามป่า *Abrus pulchellus* Wall. ex Thwaites	Faboideae/ Abreae	เถาเลื้อยขนาดเล็ก	ฝักสีขาว ขนาดเล็ก	ใบคล้ายใบมะขาม	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	พบ	เก็บดิน	
S6/T2-2	unidentified		เถาเลื้อย	ฝักสีน้ำตาลอ่อน มีขน เก็บได้มา 1 ฝัก	ใบเรียวแคบ ปลายแหลม ใน 1 ก้านมี 3 ใบ	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	พบ	เก็บดิน	
S7/T2-2	unidentified		ไม้พุ่มสูง 2 m.	ฝักแก่สีน้ำตาล ยาว 3-4 cm	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S8/T2-2	กวาวเครือ, จานเครือ *Butea superba* Roxb.	Faboideae/ Phaseoleae/ Subtribe Erythrininae	เถาเลื้อยขนาดใหญ่ สามารถเลื้อยขึ้นต้นไม้ใหญ่ได้ มีหัวเนื้อด้านในสีแดง	ไม่พบฝัก	ใบกว้าง ปลายมน ยาว 5 ซม. มี 3 ใบใน 1 ก้าน	ไม่มีข้อมูล	ไม่มี	พบ	เก็บดิน	

ตัวอย่าง	ชื่อ	Subfamily/Tribe	ลักษณะต้น	ฝัก	ใบ	ดอก	เมล็ด	ปม	ดิน	หมายเหตุ
S9/T2-2	*Millettia* sp.	Faboideae/ Millettieae	ไม้ยืนต้นสูง 5 m	พบฝักแบนยาวประมาณ 10 cm สีน้ำตาลอ่อน มีขนละเอียด	ใบเล็ก คล้ายใบประดู่ แต่เก็บไม่ถึง	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	
S10/T2-2	เสี้ยวแดง *Bauhinia penicilliloba* Pierre ex Gagnep.	Caesalpinioideae / Cercideae	ไม้เถาเลื้อย (คล้ายเสี้ยวแดง)	ฝักแบนสีน้ำตาลแดง ค่อนข้างหนา	ใบคล้ายใบต้นเสี้วย แต่แฉกลึกกว่า มีขนาดใหญ่ และหนากว่า	ไม่มีข้อมูล	เก็บ มี 1 ฝัก	ไม่พบ	เก็บดิน	
S11/T2-2	คราม*ดอย* *Indigofera cassioides* Rottl. ex DC.	Faboideae/ Indigofereae	ไม้พุ่มสูง 2 m (คล้ายครามป่า)	ฝักยาวประมาณ 2-3 cm สีน้ำตาล	ใบประกอบเล็กคล้ายใบมะขาม แต่มีขนาดกว้าง และกลมกว่า	ดอกช่อสีม่วง	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 3.42 แสดงภาพของใบ ฝัก เมล็ด ต้น และปมของพืชตระกูลถั่ว S1-T2-2 *Tephrosia vestita* Vogel



รูปที่ 3.43 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S2-T2-2 unidentified

รูปที่ 3.44 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S3-T2-2 *Codoriocalyx motorius*

รูปที่ 3.45 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S4-T2-2 unidentified

รูปที่ 3.46 แสดงภาพของใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S5-T2-2 ขามป่า

รูปที่ 3.47 แสดงภาพของใบ ฝัก เมล็ดและปมของพืชตระกูลถั่ว S6-T2-2 unidentified

รูปที่ 3.48 แสดงภาพของฝัก และเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S7-T2-2 unidentified

รูปที่ 3.49 แสดงภาพของต้น ใบ และปมของพืชตระกูลถั่ว S8-T2-2 กวาวเครือ จานเครือ

รูปที่ 3.50 แสดงภาพของต้น ใบ ฝักและเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว S9-T2-2 *Millettia* sp.

รูปที่ 3.51 แสดงภาพของใบ และฝักของพืชตระกูลถั่ว S10-T2-2 เสี้ยวแดง

รูปที่ 3.52 แสดงภาพของใบ และฝักของพืชตระกูลถั่ว S11-T2-2 คราม ดอย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.5 ตัวอย่างพืชตระกูลถั่ว เส้นทางสำรวจที่ 3 ป่าเบญจพรรณ เก็บตัวอย่างวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2555 เวลา 8.30-15.30 น.

ตัวอย่าง	ชื่อ	Subfamily/Tribe	ลักษณะต้น	ฝัก	ใบ	ดอก	เมล็ด	ปม	ดิน	หมายเหตุ
S1/T3-2	มะขามเครือ, สะบ้าลิง *Entada glandulosa* Pierre ex Gagnep.	Mimosoideae/ Mimoseae	ไม้เถาเลื้อย มีกิ่งยืดออกมาเป็นมือจับเพื่อพันกิ่งไม้อื่น	ไม่พบฝัก	ใบคล้ายใบมะขาม	ไม่มีข้อมูล	ไม่มี	ไม่พบ	เก็บดิน	
S2/T3-2	*Acacia* sp.	Mimosoideae/ Acacieae	ไม้ต้นขนาดเล็ก ลักษณะคล้ายกระถิน	ไม่พบฝัก	ใบคล้ายต้นกระถิน	ไม่มีข้อมูล	ไม่มี	พบปมที่รากบริเวณโคนต้น	เก็บดิน	
S3/T3-2	*Acacia* sp.	Mimosoideae/ Acacieae	ไม้ต้นขนาดเล็ก สูงประมาณ 20 ซม. อายุประมาณ 3 ปี	ไม่พบฝัก	ใบคล้ายใบกระถิน แต่มีขนาดใบเล็กกว่า	ไม่มีข้อมูล	ไม่มี	พบ แต่คล้ายปุ่มที่เตรียมแตกตาออกมา	เก็บดิน	
S4/T3-2	*Acacia* sp.	Mimosoideae/ Acacieae	ไม้ต้นขนาดเล็ก คล้ายกระถิน หรือ Mimosoi พบมีหนามใต้ก้านใบ	ไม่พบฝัก	ใบเหมือนใบมะขาม แต่ขนาดใบเล็กละเอียดกว่า S3/T3-2	ไม่มีข้อมูล	ไม่มี	พบปม	เก็บดิน	
S5/T3-2	unidentified		ไม้ต้นขนาดเล็ก คล้ายมะขาม ไม่มีหนามใต้ก้านใบ	ไม่พบฝัก	ใบคล้ายใบมะขาม	ไม่มีข้อมูล	ไม่มี	พบปม	เก็บดิน	

ตัวอย่าง	ชื่อ	Subfamily/Tribe	ลักษณะต้น	ฝัก	ใบ	ดอก	เมล็ด	ปม	ดิน	หมายเหตุ
S6/T3-2	unidentified (อาจเป็นแกลบหนู)	Faboideae	ไม้ต้นขนาดเล็ก สูง 10 cm	ไม่พบฝัก	ใบรีมน ปลายแหลม ขนาดเล็ก ประกอบด้วยสามใบใน 1 ก้าน	ไม่มีข้อมูล	ไม่มี	พบปม	เก็บดิน	
S7/T3-2	*Vigna minima* (Roxb.) Ohwi & H.Ohashi	Faboideae/ Phaseoleae/Subtribe Phaseolinae	ไม้เลื้อย	ไม่พบฝัก	ใบรีขนาดเล็กปลายแหลม ยาว 1-2 ซม.	ไม่มีข้อมูล	ไม่มี	พบปมขนาดใหญ่	เก็บดิน	
S8/T3-2	*Vigna minima* (Roxb.) Ohwi & H.Ohashi	Faboideae/ Phaseoleae/Subtribe Phaseolinae	ไม้ขนาดเล็ก	ไม่พบฝัก	ใบรีแคบขนาดเล็กปลายแหลม ยาว 2-3 ซม. จะมีใบแยกมาออกมาเป็น 2 ข้างจากกิ่งด้านล่าง แล้วกิ่งด้านบนมี 3 ใบใน 1 ก้าน	ไม่มีข้อมูล	ไม่มี	พบปม	เก็บดิน	
S9/T3-2	มะขามป่า, มะขามย่าน *Abrus pulchellus* Wall. ex Thwaites	Faboideae/Abreae	ไม้เล็กสูง 4-5 cm (น่าจะเป็นต้นอ่อน)	ไม่พบฝัก	ใบคล้ายใบมะขาม	ไม่มีข้อมูล	ไม่มี	พบปม	เก็บดิน	
S10/T3-2	แก้วตาไว *Pterolobium macropterum* Kurz	Caesalpiniodeae/ Caesalpinieae	ไม้เลื้อยขนาดใหญ่ ลำต้นหนา กิ่งใหญ่ มีหนามโค้งทั่วก้านใบ	ฝักแบนสีน้ำตาล คล้ายปีก 1 ปีก เมล็ดอยู่บริเวณขั้ว 1 ฝักมี 1 เมล็ด	ใบประกอบคล้ายมะขาม สีเขียวเข้ม มีหนามใต้ก้านใบคมโค้ง	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	ไม่ได้เก็บดิน เนื่องจากพบอยู่บริเวณหน้าผา	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตัวอย่าง	ชื่อ	Subfamily/Tribe	ลักษณะต้น	ฝัก	ใบ	ดอก	เมล็ด	ปม	ดิน	หมายเหตุ
S11/T3-2	อะราง *Peltophorum dasyrachis* (Miq.) Kurz	Caesalpinioideae/ Caesalpinieae	ไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ สูงประมาณ 8 m	ฝักเดี่ยวคล้ายรูปหยดน้ำปลายแหลม สีน้ำตาลอ่อน 1 ฝักมี 1 เมล็ด	ใบประกอบคล้ายใบต้นหางนกยูง	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	อยู่บริเวณทางออกของ Trail 3
S12/T3-2	หันแดง		ไม่มีข้อมูล	ฝักยาวแบน คล้ายฝักกระถิน เมล็ดเรียงกันสีน้ำตาล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดินผสม	
S13/T3-2	unidentified		ไม่มีข้อมูล	ฝักยาวแบนสั้นและกว้างกว่า S12/T3-2 คล้ายฝักกระถิน เมล็ดเรียงกันสีน้ำตาล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดินผสม	
S14/T3-2	คำพี้ควาย	Faboideae	ไม้เถาเลื้อยขนาดใหญ่	ฝักแก่สีดำ ลักษณะคล้ายฝักถั่วแขก ยาวประมาณ 8-10 cm เมื่อแกะฝักภายในพบเมล็ดถูกห่อหุ้มด้วยเลือกสีขาวคล้ายใบพัดอีกชั้นหนึ่ง	ใบใหญ่ 2-3 cm เรียงกันประมาณ 5 ใบใน 1 ก้านใบ (เรียงจากด้านล่าง 2 และด้านปลาย 3 ใบ)	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดินผสม	

ตัวอย่าง	ชื่อ	Subfamily/Tribe	ลักษณะต้น	ฝัก	ใบ	ดอก	เมล็ด	ปม	ดิน	หมายเหตุ
S15/T3-2	unidentified		ไม่มีข้อมูล	ฝักยาวแบน คล้ายฝักกระถิน (ยาวกว่า S12, 13/T3-2 เมล็ดเรียงกันสีน้ำตาล	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดินผสม	
S16/T3-2	แสมสาร, ขี้เหล็กป่า *Senna garrettiana* (Craib) Irwin & Barneby	Caesalpinioideae/ Cassieae	ไม้ยืนต้น	ฝักสีน้ำตาลแบน ยาว 4-5 ซม. คล้ายฝักกระถิน แต่กว้างกว่า	ใบคล้ายใบขี้เหล็ก	ไม่พบข้อมูล	เก็บ	ไม่พบ	เก็บดิน	อยู่บริเวณทางออก Trail 3

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 3.53 แสดงภาพของใบ และต้นของพืชตระกูลถั่ว S1-T3-2 มะขามเครือ

รูปที่ 3.54 แสดงภาพของใบ ต้นและปมของพืชตระกูลถั่ว S2-T3-2 *Acacia* sp.

รูปที่ 3.55 แสดงภาพของใบ ต้นและปมของพืชตระกูลถั่ว S3-T3-2 *Acacia* sp.

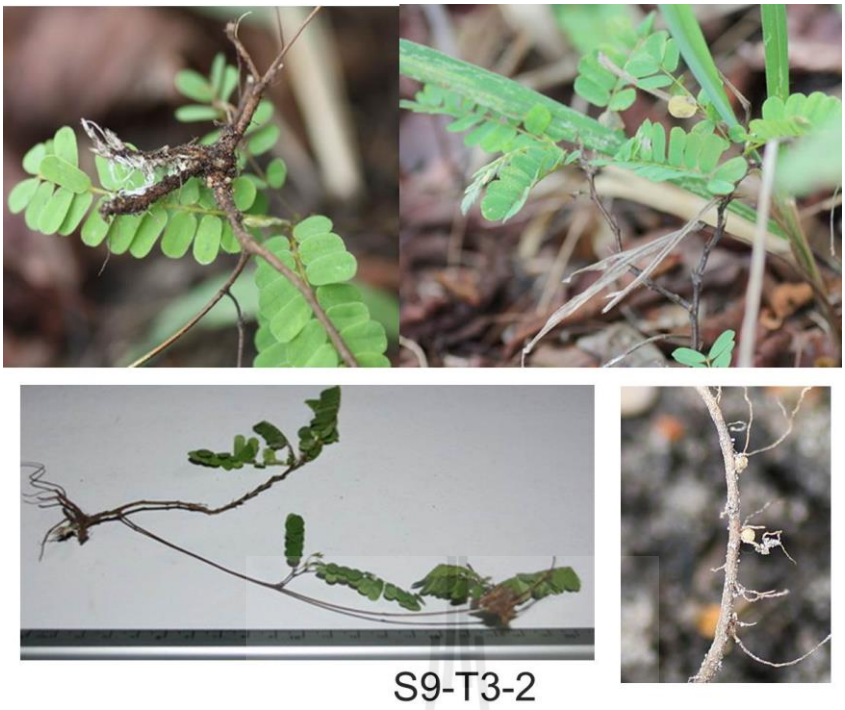
รูปที่ 3.56 แสดงภาพของใบ ต้นและปมของพืชตระกูลถั่ว S4-T3-2 unidentified

รูปที่ 3.57 แสดงภาพของใบ ต้นและปมของพืชตระกูลถั่ว S5-T3-2 unidentified

รูปที่ 3.58 แสดงภาพของใบ ต้นและปมของพืชตระกูลถั่ว S6-T3-2 unidentified

รูปที่ 3.59 แสดงภาพของใบ ฝัก ต้นและปมของพืชตระกูลถั่ว S7-T3-2 *Vigna minima*

รูปที่ 3.60 แสดงภาพของใบ ต้นและปมของพืชตระกูลถั่ว S8-T3-2 *Vigna minima*



รูปที่ 3.61 แสดงภาพของใบ ต้นและปมของพืชตระกูลถั่ว S9-T3-2 มะขามป่า มะขามย่าน

รูปที่ 3.62 แสดงภาพของใบ ต้นและฝักของพืชตระกูลถั่ว S10-T3-2 แก้วตาไว

รูปที่ 3.63 แสดงภาพของใบ ต้นและฝักของพืชตระกูลถั่ว S11-T3-2 อะราง

รูปที่ 3.64 แสดงภาพฝักของพืชตระกูลถั่ว S12-T3-2 หันแดง

S13-T3-2

รูปที่ 3.65 แสดงภาพฝักของพืชตระกูลถั่ว S13-T3-2 unidentified

S14-T3-2

รูปที่ 3.66 แสดงภาพต้น ใบ เมล็ดและฝักของพืชตระกูลถั่ว S14-T3-2 คำพี้ควาย

รูปที่ 3.67 แสดงภาพฝักของพืชตระกูลถั่ว S15-T3-2 unidentified

รูปที่ 3.68 แสดงภาพต้น ใบ เมล็ดและฝักของพืชตระกูลถั่ว S16-T3-2 แสมสารหรือ ขี้เหล็กบ้าน

ดังนั้นจากการสำรวจพื้นที่ป่าบริเวณเหนือเขื่อนน้ำพุง รวมสามารถเก็บตัวอย่างพืชตระกูลถั่วได้ทั้งหมด 68 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้ทราบชื่อสามัญจำนวน 26 ตัวอย่าง และทราบชื่อทางวิทยาศาสตร์ในระดับสกุลจำนวน 23 ตัวอย่าง โดยพืชส่วนใหญ่อยู่ในสกุล โดยพบว่าพืชส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Abrus* sp., *Crotalaria* sp., *Flemingia* sp. และ *Desmodium* sp. และพบตัวอย่างพืชที่ไม่ทราบทั้งชื่อสามัญและชื่อวิทยาศาสตร์จำนวน 31 ตัวอย่าง

2. การศึกษาความหลากหลายของเชื้อไรโซเบียมที่เข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วชนิดต่าง ๆ ที่พบในบริเวณป่าเหนือเขื่อนน้ำพุง

2.1 การคัดแยกเชื้อไรโซเบียมจากปมรากพืชตระกูลถั่ว

การสำรวจครั้งที่ 1 วันที่ 13-16 ธันวาคม 2554

- เส้นทางที่ 1 ป่าเต็งรัง เก็บตัวอย่างพืชได้ทั้งหมด 21 ตัวอย่าง
  - พืชตระกูลถั่วที่พบปมราก จำนวน 4 ตัวอย่าง
  - จำนวนเชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกได้จากปม จำนวน 48 ไอโซเลท
- เส้นทางที่ 2 ป่าเต็งรังผสมป่าเบญจพรรณ เก็บตัวอย่างพืชได้ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง
  - พืชตระกูลถั่วที่พบปมราก จำนวน 2 ตัวอย่าง
  - ไม่สามารถคัดแยกเชื้อไรโซเบียมจากปมได้
- เส้นทางที่ 3 ป่าเบญจพรรณ เก็บตัวอย่างพืชได้ทั้งหมด 13 ตัวอย่าง
  - พืชตระกูลถั่วที่พบปมราก จำนวน 3 ตัวอย่าง
  - จำนวนเชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกได้จากปม จำนวน 24 ไอโซเลท

ครั้งที่ 2 วันที่ 27 กุมภาพันธ์ – 1 มีนาคม 2555

- เส้นทางที่ 2 ป่าเต็งรังผสมป่าเบญจพรรณ เก็บตัวอย่างพืชได้ทั้งหมด 11 ตัวอย่าง
  - พืชตระกูลถั่วที่พบปมราก จำนวน 7 ตัวอย่าง
  - จำนวนเชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกได้จากปม จำนวน 36 ไอโซเลท
- เส้นทางที่ 3 ป่าเบญจพรรณ เก็บตัวอย่างพืชได้ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง
  - พืชตระกูลถั่วที่พบปมราก จำนวน 7 ตัวอย่าง
  - จำนวนเชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกได้จากปม จำนวน 29 ไอโซเลท

ดังนั้นจากการสำรวจทั้งสองครั้งพบพืชตระกูลถั่วที่มีการสร้างปมจำนวน 23 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกเชื้อไรโซเบียมจากปมรากของพืชตระกูลถั่วตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ได้จำนวน 137 ไอโซเลท

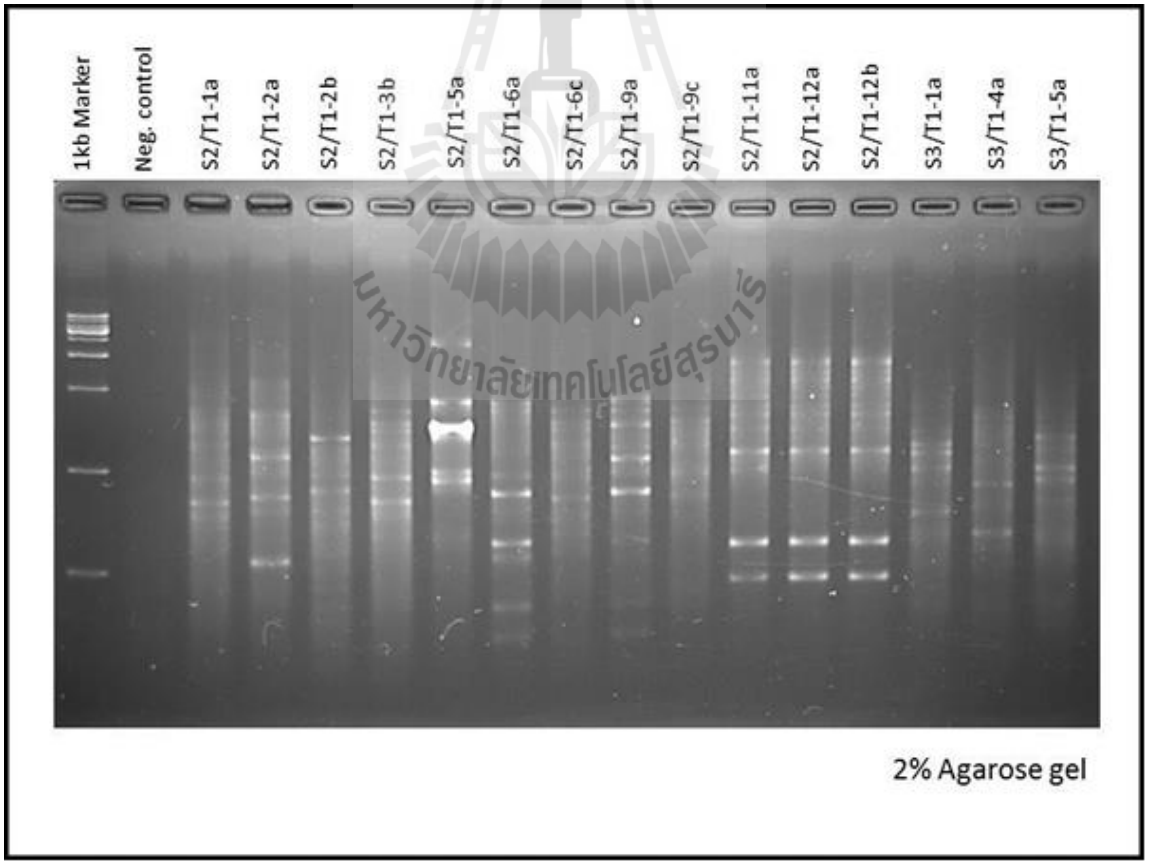
2.2 การคัดแยกเชื้อไรโซเบียมจากดินบริเวณรอบรากพืชตระกูลถั่ว

ในกรณีที่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างปมรากจากพืชตระกูลถั่วที่ทำการสำรวจ หรือปมรากตัวอย่างที่ได้ไม่สมบูรณ์ จึงทำการคัดแยกเชื้อไรโซเบียมจากดินบริเวณรอบรากพืชโดยใช้พืชตระกูลถั่วอาศัย (host plant) เป็นพืชคัดเลือกให้เชื้อไรโซเบียมที่อยู่ในดินบริเวณรอบรากพืชเข้ามาสร้างปมกับพืชอาศัย โดยจากการทดสอบพบว่า

สามารถคัดแยกเชื้อไรโซเบียมจากดินที่สามารถเข้าสร้างปมรากกับพืชอาศัย (host plant) ได้จำนวน 34 ไอโซเลท จากการเก็บตัวอย่างในครั้งที่ 1 อย่างไรก็ตามไม่สามารถคัดแยกได้จากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 เนื่องจากเมล็ดของพืชตระกูลถั่วอาศัยมีน้อย และมีความงอกต่ำ

2. 3 การตรวจสอบลายพิมพ์ DNA (DNA fingerprint) ของเชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกได้จากปมรากพืชตระกูลถั่ว และจากดินบริเวณรอบรากพืชโดยเทคนิค BOX-PCR

ในจำนวนเชื้อที่คัดแยกได้อาจมีกลุ่มเชื้อที่ซ้ำกัน จึงทำการตรวจสอบลายพิมพ์ DNA (DNA fingerprint) ของเชื้อไรโซเบียมในแต่ละไอโซเลทเปรียบเทียบกันโดยใช้เทคนิค BOX-PCR ดังตัวอย่างในรูปที่ 3.69 แสดงให้เห็นว่าไอโซเลท S2/T1-11a มี DNA fingerprint เช่นเดียวกับไอโซเลท S2/T1-12a และ S2/T1-12b เป็นต้น ทั้งนี้จากการเก็บตัวอย่างทั้งสองครั้งพบไอโซเลทของเชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกได้จากปมราก และจากดินบริเวณรอบรากพืช ที่มีลักษณะของ DNA fingerprint แตกต่างกันจำนวน 45 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็นเชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกมาจากปมที่มีลายพิมพ์ DNA ต่างกันจำนวน 20 ไอโซเลท (จากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 จำนวน 13 ไอโซเลท และจากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 จำนวน 7 ไอโซเลท) และเชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกจากดินบริเวณรอบรากพืชจากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 จำนวน 25 ไอโซเลท ซึ่งถูกนำไปตรวจสอบต่อไป



รูปที่ 3.69 ตัวอย่าง DNA fingerprint จากไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากปมรากถั่ว โดยใช้วิธี BOX-PCR

2.4 การจำแนกสายพันธุ์ของไรโซเบียมที่คัดแยกได้ โดยใช้เทคนิคการหาลำดับเบสสมบูรณ์ ของยีน 16S rRNA

ไรโซเบียมที่มีลายพิมพ์ DNA แตกต่างกันได้ถูกนำมาตรวจสอบเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียมที่ได้ โดยผลการตรวจสอบสายพันธุ์แสดงในตารางที่ 3.6 ทั้งนี้พบว่าไรโซเบียมที่พบส่วนมากอยู่ในสกุล *Bradyrhizobium* และพบบางไอโซเลทอยู่ในสกุล *Rhizobium*

ตารางที่ 3.6 การบ่งชี้สายพันธุ์ของไรโซเบียมที่สามารถเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่ว

รหัส	ไอโซเลท	ชนิดพืช	สกุลของแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึง	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% homology)
N4	N4-SH-S2/T1-3b	เครือขน	*Bradyrhizobium* sp. CCGE-LA001	99%
N7	N7-SH-S2/T1-6c	เครือขน	*Bradyrhizobium* sp. CCGE-LA001	99%
N9	N9-SH-S2/T1-9c	เครือขน	*Bradyrhizobium* sp. CCGE-LA001	99%
SH-2	SH-S2/T1 (2)	เครือขน	*Bradyrhizobium* sp. PRNB-21	99%
SH-3	SH-S2/T1 (3)	เครือขน	*Bradyrhizobium* genosp. TUXTLAS-12 strain 1648v	99%
SH-6	SH-S2/T1 (6)	เครือขน	*Bradyrhizobium* sp. CCBAU	99%
SH-8	SH-S2/T1 (8)	เครือขน	*Bradyrhizobium* sp. H10	99%
N14	N14-S3/T1-4a	ด่านราชสีห์ (*Tephrosia vestita*)	*Bradyrhizobium elkanii* CCBAU 43297	99%
N15	N15-S3/T1-5a	ด่านราชสีห์ (*Tephrosia vestita*)	*Bradyrhizobium elkanii* CCBAU 43297	99%
N16	N16-S3/T1-6a	ด่านราชสีห์ (*Tephrosia vestita*)	*Bradyrhizobium elkanii* CCBAU 43297	99%
N17	N17-S4/T1-1a	มะขามป่า (*Abrus pulchellus*)	*Bradyrhizobium* sp. CCGE-LA001	99%
N26	N26-S5/T1-2a	อัญชันป่า (*Clitoria macrophylla*)	*Bradyrhizobium* sp. CCGE-LA001	99%

SH-13	SH-S5/T1 (1)	อัญชันป่า (*Clitoria macrophylla*)	*Bradyrhizobium* sp. PRNB-21	99%
SH-14	SH-S5/T1 (2)	อัญชันป่า (*Clitoria macrophylla*)	*Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 4348	99%
SH-16	SH-S5/T1 (4)	อัญชันป่า (*Clitoria macrophylla*)	*Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 4348	100%
SH-17	SH-S5/T1 (5)	อัญชันป่า (*Clitoria macrophylla*)	*Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 4348	100%
SH-18	SH-S5/T1 (6)	อัญชันป่า (*Clitoria macrophylla*)	*Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 4348	100%
SH-20	SH-S6/T1 (2)	กระดิ่งหายป่า (*Crotalaria alata*)	*Bradyrhizobium* sp. UNPA324	100%
N29	N29-S9/T1-1a	*Crotalaria* sp.	*Bradyrhizobium* sp. CCGE-LA001	99%
N32	N32-S9/T1 8b	*Crotalaria* sp.	*Bradyrhizobium* sp. CCGE-LA001	99%
SH-23	SH-S11/T1 (1)	กาสามปีก (*Flemingia macrophylla*)	*Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 4348	100%
SH-24	SH-S11/T1 (2)	กาสามปีก (*Flemingia macrophylla*)	*Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 4348	100%
SH-26	SH-S11/T1 (4)	กาสามปีก (*Flemingia macrophylla*)	*Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 4348	100%
SH-27	SH-S17/T1 (1)	มะกล่ำตาแดง (*Abrus precatorius*)	*Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 4348	100%
SH-28	SH-S17/T1 (2)	มะกล่ำตาแดง (*Abrus precatorius*)	*Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 4348	99%
SH-29	SH-S17/T1 (3)	มะกล่ำตาแดง	*Bradyrhizobium elkanii* strain USDA	99%

		(*Abrus precatorius*)	4348	
SH-30	SH-S17/T1 (4)	มะกล่ำตาแดง (*Abrus precatorius*)	*Bradyrhizobium* sp. PRNB-21	99%
SH-31	SH-S17/T1 (5)	มะกล่ำตาแดง (*Abrus precatorius*)	*Bradyrhizobium* sp. 21.4C.1	99%
SH-34	SH-S17/T1 (8)	มะกล่ำตาแดง (*Abrus precatorius*)	*Bradyrhizobium* sp. wssl4	99%
SH-35	SH-S17/T1 (10)	มะกล่ำตาแดง (*Abrus precatorius*)	*Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 4348	100%
SH-38	SH-S17/T1 (13)	มะกล่ำตาแดง (*Abrus precatorius*)	*Bradyrhizobium* genosp. TUXTLAS-22 strain 1234v	100%
SH-39	SH-S18/T1 (1)	หิ่งหาย (*Crotalaria retusa*)	*Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 4348	100%
SH-40	SH-S18/T1 (2)	หิ่งหาย (*Crotalaria retusa*)	*Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 4348	100%
SH-41	SH-S18/T1 (3)	หิ่งหาย (*Crotalaria retusa*)	*Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 4348	99%
N59	N59-S4/T3-1a	ถั่วหิ่งหาย (*Tephrosia coccinea*)	*Bradyrhizobium elkanii*	100%
N71	N71-S4/T3-8	ถั่วหิ่งหาย (*Tephrosia coccinea*)	*Bradyrhizobium elkanii* CCBAU 43297	99%

SH-9	SH-S4/T3 (1)	ถั่วหิ่งหาย (*Tephrosia coccinea*)	*Bradyrhizobium* genosp. TUXTLAS-21 strain 107m	99%
SH-12	SH-S4/T3 (4)	ถั่วหิ่งหาย (*Tephrosia coccinea*)	*Bradyrhizobium elkanii* strain USDA 4348	100%
N72	N72-S8/T3-1a	มะค่าแต้หนาม (*Sindora siamensis* var. *siamensis*)	*Bradyrhizobium elkanii* strain CCBAU 83387	99%
N2-2	N2-2-S1/T2-2 2b	ด่านราชสีห์ (*Tephrosia vestita*)	*Bradyrhizobium elkanii* USDA 4348	99%
N2-14	N2-14-S1/T2-2 7c	ด่านราชสีห์ (*Tephrosia vestita*)	*Bradyrhizobium elkanii* USDA 4348	99%
N2-20	N2-20-S8/T2-2 3c	ด่านราชสีห์ (*Tephrosia vestita*)	*Rhizobium* sp. IPR-Pv680	100%
N2-13	N2-13-S1/T3-2 1a	มะขามเครือ (*Entada glandulosa*)	*Bradyrhizobium* sp. H10	99%
N2-19	N2-19-S6/T3-2 2d	Unidentified	*Bradyrhizobium* genosp. TUXTLAS-12 strain 1648v	99%
N2-1	N2-1-S8/T3-2 1a	*Vigna minima*	*Rhizobium* sp. vgs-5	99%
N2-16	N2-16-S9/T3-2 3b	มะขามป่า (*Abrus pulchellus*)	*Rhizobium* sp. 8317	99%

2.5 การหาความสัมพันธ์ของลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยการสร้าง Phylogenetic tree

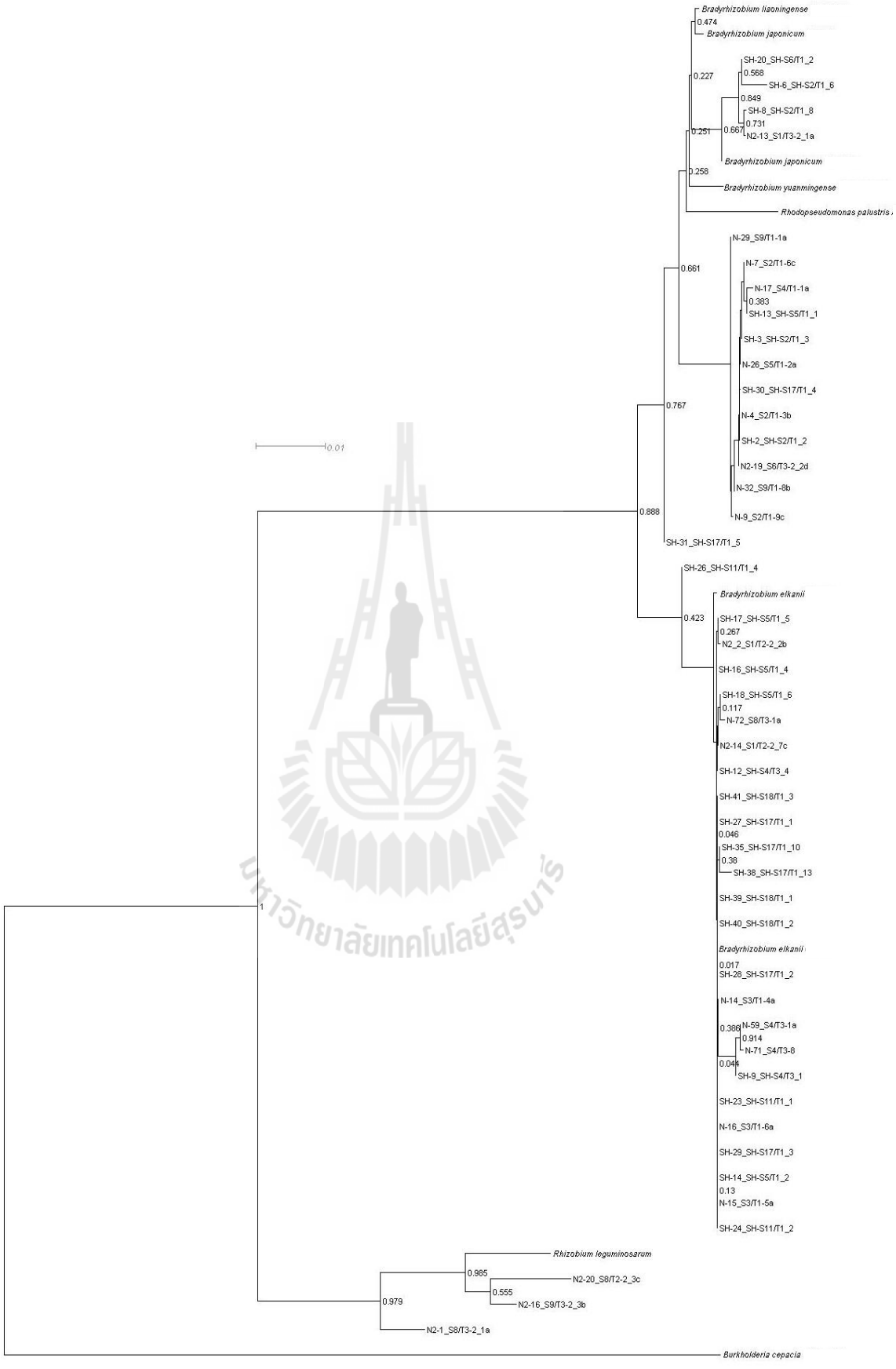
จากการสร้าง Phylogenetic tree เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของไรโซเบียมที่แยกได้จากปมรากพืชและดินบริเวณรอบรากพืช สามารถแยกไรโซเบียมออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium* sp., *B. japonicum* และ *Rhizobium leguminosarum* โดยพบว่าไรโซเบียมที่ตรวจสอบได้ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม *B. elkanii* รองลงมาได้แก่กลุ่ม *Bradyrhizobium* sp., *B. japonicum* และ *R.*

leguminosarum ตามลำดับ (รูปที่ 3.70) ทั้งนี้ในเส้นทางสำรวจที่ 1 ซึ่งเป็นป่าเต็งรัง พบไรโซเบียมในกลุ่ม *B. elkanii*, *Bradyrhizobium* sp. และ *B. japonicum* ในขณะที่เส้นทางสำรวจที่ 2 ซึ่งเป็นป่าเต็งรังผสมป่าเบญจพรรณ พบไรโซเบียมในกลุ่ม *B. elkanii* และ *R. leguminosarum* และในเส้นทางสำรวจที่ 3 ซึ่งเป็นป่าเบญจพรรณ พบไรโซเบียมทั้ง 4 กลุ่ม (รูปที่ 3.71 และ 3.72)

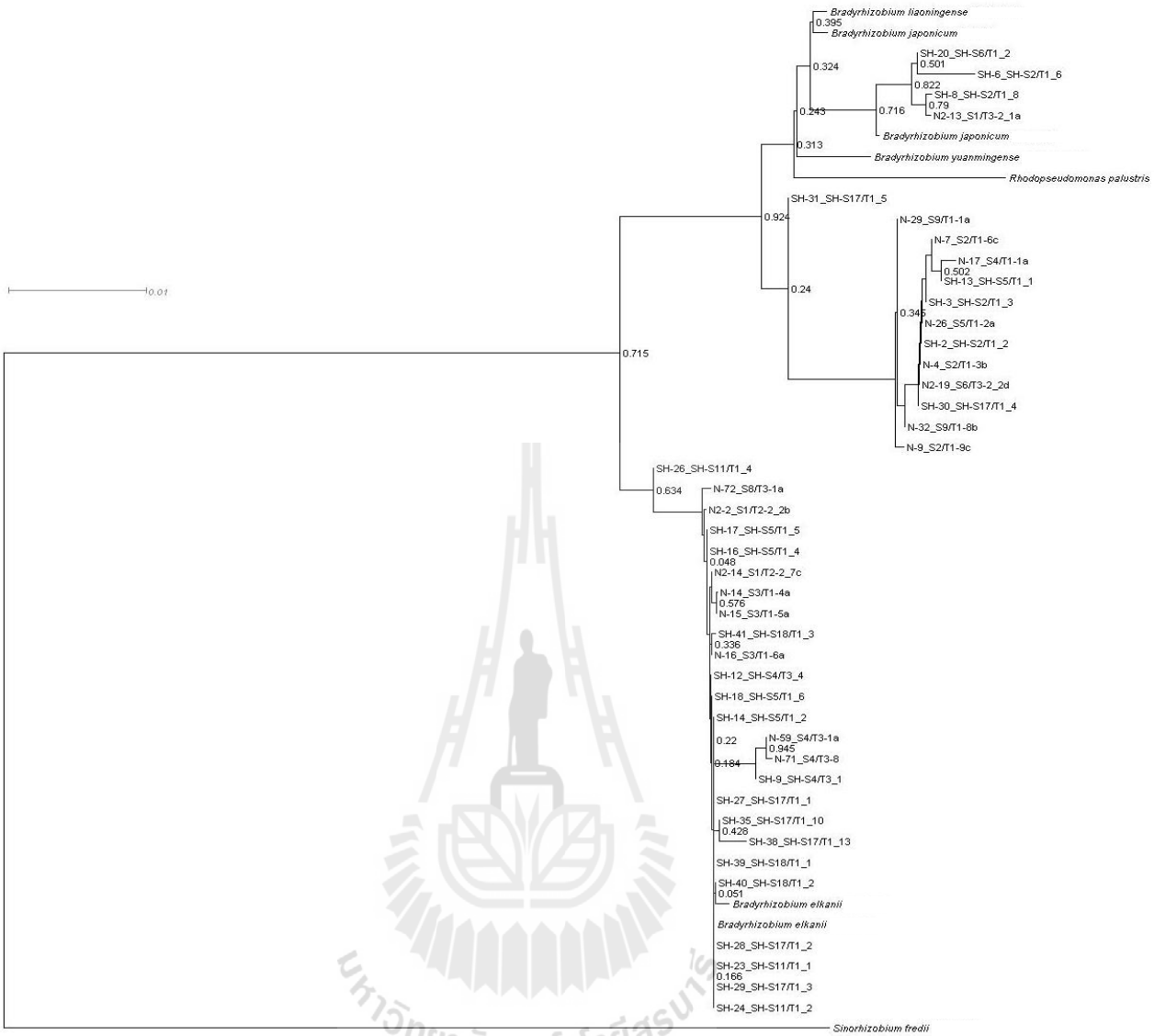
3. ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกได้

ได้ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมที่คัดแยกได้กับพืชตระกูลถั่วชนิดนั้น ๆ (Host plant) และกับถั่ว Siratro โดยใช้วิธีการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสด้วยวิธี Acethylene Reduction Assay (ARA) โดยทำการปลูกพืชในสภาพที่ขาดไนโตรเจน ดังนั้นเชื้อไรโซเบียมที่ไม่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนจะส่งผลให้ต้นพืชมีอาการเหลืองเนื่องจากขาดธาตุไนโตรเจน ในขณะที่เชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนจะสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาเปลี่ยนให้เป็นปุ๋ยแก่พืชได้ ทำให้พืชมีลักษณะที่เจริญเติบโตได้ดีกว่า (รูปที่ 3.73) ทั้งนี้พบไรโซเบียมไอโซเลท S4/T3 1a ซึ่งเป็นไรโซเบียมในกลุ่ม *B. elkanii* แยกได้จากปมรากของถั่วหิงหาย มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงที่สุด (75.70 nmole/mg/h) เมื่อเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วที่เป็น Host plant ซึ่งสูงกว่าเมื่อเข้าสร้างปมกับถั่ว Siratro ซึ่งไม่ใช่ Host plant ดังแสดงในตารางที่ 3.7 ซึ่งจะทำการเก็บรวบรวมไอโซเลทเหล่านี้ไว้ใช้ประโยชน์ต่อไป

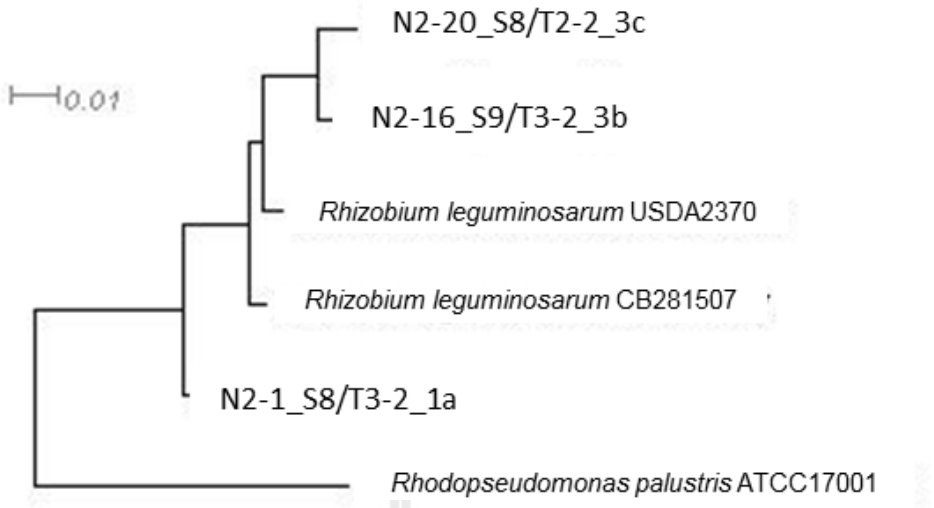
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.70 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของไรโซเบียมที่พบจากการสำรวจ



รูปที่ 3.71 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของไรโซเบียมกลุ่ม *Bradyrhizobium* ที่พบจากการสำรวจ



รูปที่ 3.72 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของไรโซเบียมกลุ่ม *Rhizobium* ที่พบจากการสำรวจ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 3.73 ภาพแสดงการเจริญเติบโตของพืชตระกูลถั่วที่เข้าสร้างปมโดยเชื้อไรโซเบียมในกลุ่มที่ไม่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน (Ineffective nitrogen fixation) และกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน (Effective nitrogen fixation)

ตารางที่ 3.7 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสของเชื้อไรโซเบียมไอโซเลทต่าง ๆ ที่เข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่ว (Host plant) ที่พบในป่าบริเวณเหนือเขื่อนน้ำพุง และกับถั่ว Siratro

ตัวอย่างพืชตระกูลถั่วที่ใช้ทดสอบ	ไอโซเลทที่เข้าสร้างปม	กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nmole/mg/h)
เครือขน	S2/T1 1a	8.26
	S2/T1 2b	14.55
	S2/T1-9a	3.72
ด่านราชสีห์ (*Tephrosia vestita*)	S3/T1 1a	5.59
	S3/T1 4a	4.18
	S3/T1 5a	15.68
	S3/T1 6a	16.55
มะขามป่า (*Abrus pulchellus*)	S4/T1 1a	55.65
หิ่งหายใบเล็ก (*Crotalaria albida*)	S7/T1 4a	16.35
ช้อยนางรำ (*Codoriocalyx motorius*)	S13/T1 3b	71.37
มะกล่ำตาแดง (*Abrus precatorius*)	S17/T1 d	0.63
	S17/T1 f	1.55
ถั่วหิ่งหาย (*Tephrosia coccinea*)	S4/T3 1a	75.70
	S4/T3 1b	18.01
	S4/T3 5	31.93
	S4/T3 8	68.33
Siratro (*Macroptilium atropurpureum*)	S2/T1 1a	2.36
	S2/T1 3b	5.38
	S2/T1 6c	7.42
	S2/T1 9c	2.76
	S3/T1 1a	18.38
	S3/T1 4a	10.01
	S3/T1 5a	0.89
	S3/T1 6a	10.73
	S4/T1 1a	2.90

	S4/T1 3a	1.94
	S4/T1 5b	2.65
	S4/T1 7a	7.25
	S5/T1 2a	2.43
	S7/T1 1a	8.12
	S7/T1 4a	5.20
	S9/T1 1a	0.91
	S9/T1 8b	2.75
	S13/T1 3b	17.74
	S13/T1 2c	3.84
	S4/T3 1a	33.62
	S4/T3 1b	16.34
	S4/T3 5	11.58
	S4/T3 8	12.31
	S8/T3 1a	15.28
	S1/T2-2 7c	0.50
	S1/T2-2 8a	0.60
	S1/T2-2 8a	0.86
	S1/T2-2 3b	0.11
	S3/T2-2 3b	2.49
	S4/T2-2 1b	0.72
	S8/T2-2 3a	2.09
	S8/T2-2 3b	2.56
	S2/T3-2 1a	15.28

4. การอภิปรายผล

จากการสำรวจพืชตระกูลถั่วบริเวณป่าเหนือเขื่อนน้ำพุงพบว่ามีความหลากหลายของพืชตระกูลถั่วในระดับหนึ่งโดยชนิดของพืชตระกูลถั่วที่พบแตกต่างกันไปตามแต่ละเส้นทางสำรวจซึ่งมีทั้งป่าเต็งรัง ป่าเบญจพรรณและป่าผสมระหว่างป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรัง อย่างไรก็ตามพืชตระกูลถั่วหลายชนิดยังอยู่ในขั้นตอนการจำแนกสายพันธุ์ซึ่งอาจทำให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของพืชตระกูลถั่วและชนิดของป่าได้มากขึ้น ทั้งนี้ในจำนวนพืชตระกูลถั่วที่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้แล้วพบว่ามีทั้งที่เป็นพืชตระกูลถั่วไม้ยืนต้นและพืชตระกูลถั่วขนาดเล็ก

โดยพืชตระกูลถั่วยืนต้นที่พบ ได้แก่ เสี้ยวใหญ่ ซึ่งพบในเส้นทางสำรวจที่ 2 (ป่าเต็งรังผสมป่าเบญจพรรณ) นอกจากนี้ยังพบ ชงโค มะค่าแต้หนาม และแสมสาร (ขี้เหล็กป่า) ในเส้นทางสำรวจที่ 3 (ป่าเบญจพรรณ) ในขณะที่พบพืชตระกูลถั่วขนาดเล็ก และพืชตระกูลถั่วเถาเลื้อยจำนวนมากในแต่ละเส้นทาง ทั้งนี้การศึกษาความหลากหลายของพืชตระกูลถั่วป่าหรือถั่วพื้นเมืองที่เป็นถั่วขนาดเล็กยังไม่มีข้อมูลมากนัก เนื่องจากการวิจัยที่ผ่านมาส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาพืชตระกูลถั่วไม้ยืนต้น เช่น จากการศึกษาของ พงษ์ศักดิ์ สหุนาพุ (2542) ได้ทำการสำรวจพืชตระกูลถั่วไม้ยืนต้นในป่าเต็งรังบริเวณป่าสะแกราช โดยพบว่า มีพรรณไม้ยืนต้นตระกูลถั่ว 8 ชนิด คือ ก๋างขี้มอด เสี้ยวป่า เก็ดดำ ประดู่ มะค่าแต้ แดง ชงโคดำ และกระพี้เขาควาย

เมื่อศึกษาความหลากหลายของไรโซเบียมที่สามารถเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วที่พบบริเวณป่าเหนือเขื่อนน้ำพุง พบว่ามีความหลากหลายทั้งในระดับ genus และ specie โดยพบไรโซเบียมทั้งในจีนัส *Rhizobium* และ *Bradyrhizobium* โดยในจีนัส *Rhizobium* ไม่พบความหลากหลายของไรโซเบียม แต่พบความหลากหลายสูงในจีนัส *Bradyrhizobium* ซึ่งพบไรโซเบียมมีความสัมพันธ์กับ 3 species ได้แก่ *Bradyrhizobium* sp., *B. japonicum* และ *B. elakanii* ทั้งนี้จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าไรโซเบียมที่สามารถเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วในประเทศไทยมีหลายชนิด ทั้งในกลุ่ม *Bradyrhizobium, Rhizobium, Sinorhizobium, Azorhizobium* และ *Allorhizobium* แต่ที่พบส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่ม *Bradyrhizobium* เช่น จากการศึกษาของ Manassila et al. (2007) พบไรโซเบียมในกลุ่ม *Bradyrhizobium* ทั้งที่เป็น *Bradyrhizobium* sp. และ *B. elkanii* สามารถเข้าสร้างปมรากกับพืชตระกูลถั่วไม้ยืนต้น เช่น *Acacia auriculaformis* Cunn., *A. mangium* Willd., *Millettia leucantha* Kurz, *Pterocarpus indicus* Willd. และ *Xylia xylocarpa* Taub. นอกจากนี้จากการศึกษาของ Pongsilp et al. (2010) ซึ่งทำการศึกษาไรโซเบียมที่สามารถเข้าสร้างปมกับกวาวเครือ (*Pueraria mirifica*) พบไรโซเบียมจำนวน 12 ไอโซเลทสามารถเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่วชนิดนี้ได้ โดยพบว่าไรโซเบียมจำนวน 9 ไอโซเลทอยู่ในกลุ่ม *Rhizobium* และอีกจำนวน 3 ไอโซเลท อยู่ในกลุ่ม *Bradyrhizobium* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบไรโซเบียมในกลุ่ม *Rhizobium leguminosarum* สามารถเข้าสร้างปมกับกวาวเครือได้เช่นกัน และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วอาศัย (host plant) พบว่าพืชอาศัยมีความจำเพาะเจาะจงกับไรโซเบียมที่เข้าสร้างปมสูง อย่างไรก็ตามพบพืชตระกูลถั่วบางชนิดที่สามารถเกิดปมรากได้กับเชื้อไรโซเบียมหลายสกุล เช่น พบไรโซเบียมในสกุล *Bradyrhizobium* sp. และ *B. japonicum* สามารถเข้าสร้างปมรากกับพืชตระกูลถั่วในกลุ่ม *Crotalaria*, เครือขน หรือไรโซเบียมในกลุ่ม *Bradyrhizobium* sp. และ *B. elkanii* สามารถเข้าสร้างปมกับ มะกล่ำตาแดง (*Abrus* sp.) เป็นต้น

ไรโซเบียมที่คัดแยกได้จากพืชตระกูลถั่วจากงานวิจัยนี้เมื่อนำไปตรวจสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจน พบว่าบางสายพันธุ์ของไรโซเบียมมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูงเมื่อเข้าสร้างปมกับพืชอาศัย (host plant) ทั้งนี้สามารถนำไปใช้ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับการฟื้นฟูป่าไม้ได้ต่อไป

บทที่ 4
สรุปผลการวิจัยและข้อแนะนำ

งานวิจัยนี้พบว่าบริเวณป่าเหนือเขื่อนน้ำพุงพบความหลากหลายของพืชตระกูลถั่วทั้งที่เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ ขนาดเล็ก และพืชตระกูลถั่วชนิดเถาเลื้อย ซึ่งพบความหลากหลายของไรโซเบียมโดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ *Bradyrhizobium* sp., *B. japonicum*, *B. elkanii* และ *Rhizobium leguminosarum* โดยไรโซเบียมกลุ่ม *B. elkanii* ถูกพบมากที่สุด และไรโซเบียม *B. elkanii* ไอโซเลท S4/T3-1a ซึ่งแยกได้จากถั่วหิงหายมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนได้สูงสุดเมื่อเข้าสร้างปมกับพืชอาศัย (host plant) ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแหล่งข้อมูลที่สำคัญสำหรับผู้สนใจศึกษาพืชตระกูลถั่วและความสัมพันธ์กับไรโซเบียมที่เข้าสร้างปม ซึ่งในอนาคตสามารถนำไปพัฒนาให้อยู่ในรูปของปุ๋ยชีวภาพเพื่อใช้สำหรับการฟื้นฟูป่าไม้ หรือเพื่อการบำรุงดินให้เกิดความอุดมสมบูรณ์สำหรับการเกษตรต่อไป

เอกสารอ้างอิง

พงษ์ศักดิ์ สหุนาพุ (2542). การศึกษาด้านนิเวศวิทยาของพรรณไม้ยืนต้นตระกูลถั่ว ในป่าเต็งรัง. วารสารวนศาสตร์. 18(2) หน้า 149-166.

Dereeper A., et al. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res.36:W465–W469.

Guindon S., Gascuel O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst. Biol. 52: 696–704.

Manassila M., Nuntagij A., Kotepong S., Boonkerd N., and Teaumroong N. (2007). Characterization and monitoring of selected rhizobial strains isolated from tree legumes in Thailand. African Journal of Biotechnology. 6 (12): 1393-1402.

Pongsilp N., Leelahawonge C., Nuntagij A., Teaumroong N., and Boonkerd N. (2010) Characterization of Pueraria mirifica-nodulating rhizobia present in Thai soil. African Journal of Microbiology Research. 4(12): 1307-1313.

Sadowsky M.J., Kinkel L.L., Bowers J.H., Schottel J.L. (1996). Use of repetitive intergenic DNA sequences to classify pathogenic and disease-suppressive Streptomyces strains. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3489-3493.

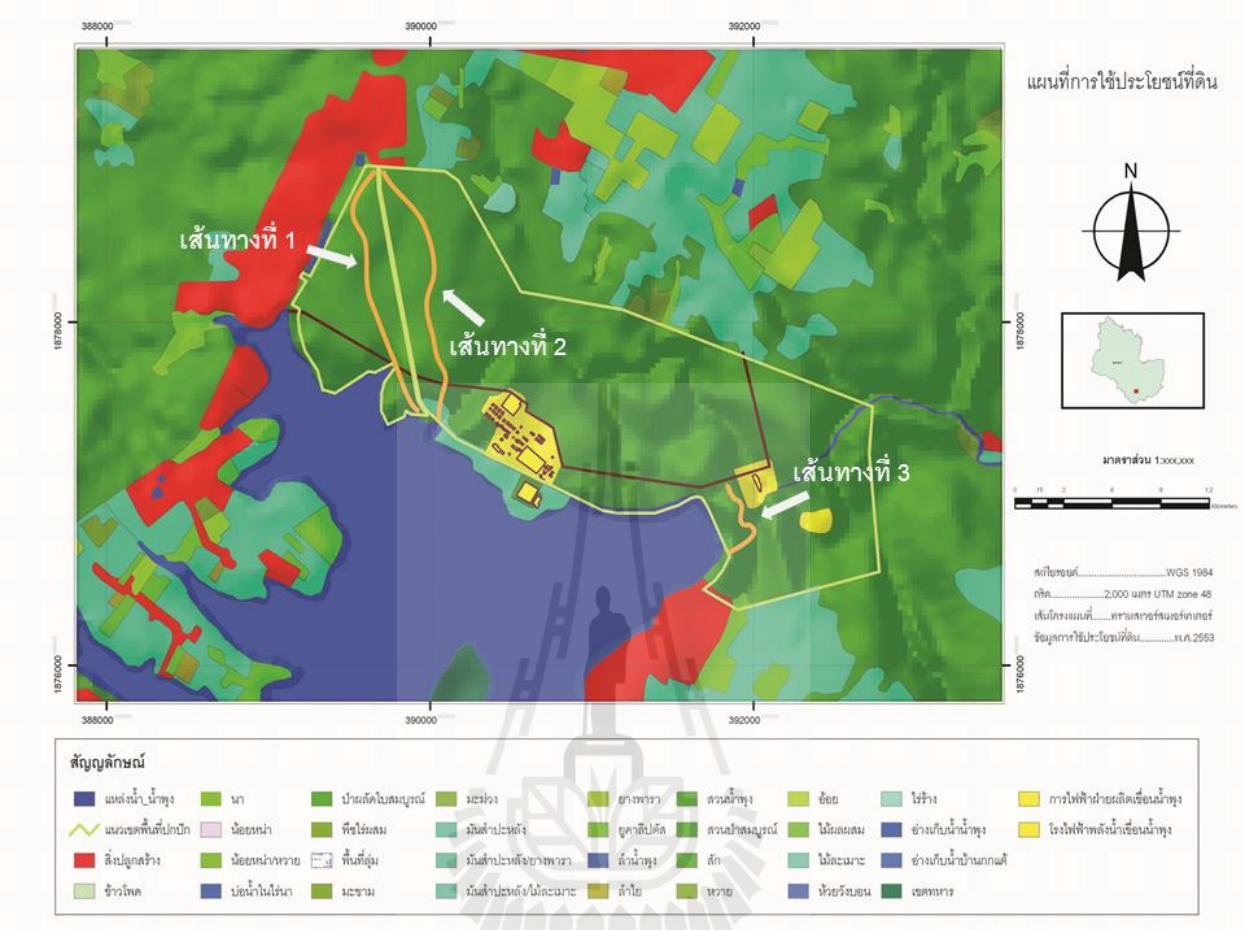
Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol.4: 406–425.

Somasegaran P., Hoben H.J. (1994). Handbook for Rhizobia: Method in Legume Rhizobium Technology. Spring-Verlag, New York.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173: 697-703.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. เส้นทางสำรวจบริเวณป่าเหนือเขื่อนน้ำพุง



ภาคผนวก ข. สูตรอาหารและวิธีการเตรียม

Yeast Extract-Mannitol Agar (YEM)

Yeast extract	0.4 กรัม
Mannitol	10 กรัม
K_2HPO_4	0.5 กรัม
$MgSO_4.7H_20$	0.2 กรัม
NaCl	0.1 กรัม
$CaCO_3$	4 กรัม
ผงวุ้น	16 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลลิตร

เติมสารลงในน้ำ 1 ลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 6.8-7.0 แล้วเติมผงวุ้น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Congo red เตรียม stock solution 250 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร H_2O แล้วเติม 10 มิลลิลิตร ต่ออาหารที่เตรียม 1 ลิตร

ภาคผนวก ค. การเตรียมสารละลายธาตุอาหารพืช

N-free solution

Stock Solution 1 (ต่อลิตร)

$CaCl_2.2H_2O$	294.1 กรัม

Stock Solution 2 (ต่อลิตร)

KH_2PO_4	136.1 กรัม

Stock Solution 3 (ต่อลิตร)

$FeC_6H_5O_7.H_20$	4.99 กรัม
$MgSO_4$	87.0 กรัม
$MnSO_4.H_2O$	0.338 กรัม

Stock Solution 4 (ต่อลิตร)

H_3BO_3	0.247 กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.288 กรัม
$CuSO_4$.$5H_2O$	0.100 กรัม
$CoSO_4.7H_2O$	0.056 กรัม
$Na_2MoO_2.2H_2O$	0.048 กรัม

นำ Stock Solution ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยใช้ระยะเวลา 15 นาที และเติม 1 มิลลิลิตร ของแต่ละ stock solution ลงน้ำ 1 ลิตร ที่ผ่านระบบรีเวอร์สออสโมซิส (Reverse Osmosis water) ที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอแล้วปรับค่าความกรดด่างให้เป็น pH 6.5 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

ประวัติคณะผู้วิจัย

นางสาว พรรณลดา ติตตะบุตร (Miss Panlada Tittabutr) ปัจจุบันดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ม.เทคโนโลยีสุรนารี จบการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ม.เทคโนโลยีสุรนารี ปีการศึกษา 2541 และระดับปริญญาเอก สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ม.เทคโนโลยีสุรนารี ปีการศึกษา 2548 มีความชำนาญทางด้าน Nitrogen fixation technology, Inoculant production technology, Microbiology and Molecular microbiology มีประสบการณ์ในการเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัยเรื่องการเพิ่มประสิทธิภาพของแหนแดงในการเป็นปุ๋ยพืชสดเพื่อใช้ในนาข้าว และเป็นหัวหน้าโครงการวิจัยต่าง ๆ เช่น การประยุกต์ใช้แนวทางต่าง ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของหัวเชื้อไรโซเบียมในการแข่งขันเพื่อเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่ว, การทดสอบประสิทธิภาพของการใช้หัวเชื้อไรโซเบียมที่ปรับปรุงแล้วในระดับกระถาง, ผลของเอทธิลีน และการใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase ร่วมกับหัวเชื้อไรโซเบียม ต่อการเจริญของพืชตระกูลถั่วภายใต้สภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียดกับพืช, การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และผลกระทบที่มีต่อโครงสร้างจุลินทรีย์ท้องถิ่นภายในดิน และผลผลิตของพืช, การปรับปรุงปุ๋ยชีวภาพ PGPR และไมคอร์ไรซ่า ให้ทนต่อสภาวะเครียดที่เกิดจากภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง และการตรวจสอบกลไกการดำรงอยู่ของเชื้อ และผลกระทบของภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์บริเวณรอบรากพืช ทั้งนี้สามารถติดต่อได้ที่ โทรศัพท์ 044-224159 โทรสาร 044-224154 E-mail panlada@sut.ac.th

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี