SUT3-304-53-24-09

รายงานการวิจัย

การประยุกต์ใช้แนวทางต่าง ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของหัวเชื้อไรโซเบียม ในการแข่งขันเพื่อเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่ว

(Applications of different approaches for enhancing the competition efficiency of rhizobial inoculant for nodulation with leguminous plant)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

SUT3-304-53-24-09

รายงานการวิจัย

การประยุกต์ใช้แนวทางต่าง ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของหัวเชื้อไรโซเบียม ในการแข่งขันเพื่อเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่ว

(Applications of different approaches for enhancing the competition efficiency of rhizobial inoculant for nodulation with leguminous plant)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรรณลดา ติตตะบุตร
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย
รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นีลวรรณ พงศ์ศิลป์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีปีงบประมาณพ.ศ. 2553
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว
สิงหาคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553-2554 และดำเนินการภายใต้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ทดลอง และเครื่องมือวิเคราะห์โดย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) สำหรับการสนับสนุนการใช้รังสีแกมมาในงานวิจัย รวมทั้งกรมวิชาเกษตรสำหรับการสนับสนุนวัสดุพาหะในงานวิจัย และผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเป็นปัจจัยจำกัดต่อการเจริญของถั่วเหลือง ซึ่งส่งผลต่อเชื้อไรโซเบียมที่เข้าสร้างปมด้วยเช่นกัน โดยประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของหัวเชื้อขึ้นอยู่กับลักษณะแวดล้อมที่พืชเจริญอยู่ เชื้อไรโซเบียมที่ทนต่อสภาวะเครียดจะส่งผลต่อของถั่วเหลืองให้การเจริญเป็นปกติได้ ในการศึกษานี้ เป็นการศึกษาผลกระทบของสภาวะเครียดแบบต่างๆ ต่อการเจริญและการอยู่รอดของเซลล์ไรโซเบียมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมถึงพิจารณาผลการตรึงไนโตรเจน เพื่อส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเหลืองที่ปลูกในทราย และในดิน ซึ่งจากเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท นำมาทดสอบพบว่ามี 5 ไอโซเลท ที่เจริญได้ดีบนอาหารที่ใช้คัดเลือก โดยเมื่อทดสอบกับถั่วเหลืองที่ปลูกในสภาวะเครียดในทราย และในดินพบว่าเชื้อไอโซเลท 194 ให้ผลในการตรึงไนโตรเจน และน้ำหนักแห้งของถั่วสูงสุดในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อไอโซเลท 194 ยังมีความสามารถในการแข่งขันเพื่อเข้าสร้างปมกับถั่วเหลือง ได้ดีกว่าเชื้อ USDA110การทดลองที่ช่วยให้เชื้อไรโซเบียมทนต่อสภาวะเครียด โดยการเสริม compatible solute พบว่าน้ำตาลซูโครส ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ช่วยให้เชื้ออยู่รอด และเจริญได้ดีกว่าการเติมสารชนิดอื่นโดยเชื้อไอโซเลท 194 ที่เสริมซูโครส มีการเจริญในสภาวะแห้งแล้งหลังวันที่ 5 และเจริญในสภาวะกรดหลังวันที่ 3 มีการสะสมทรีฮาโรส และกลีเซอรอลอยู่ภายในเซลล์ส่วนการเจริญของเชื้อในสภาวะเครียดแบบอุณหภูมิสูง ที่เสริมและไม่เสริมซูโครสพบว่ามีการสะสมกลีเซอรอลภายในเซลล์ตลอดช่วงของการเจริญ แต่หลังจากวันที่ 10 ของการเจริญที่ไม่ได้เสริมน้ำตาลนั้นไม่พบการสะสมกลีเซอรอลอีกซึ่งสอดคล้องกับการเจริญที่ลดลงของเชื้อ จากการศึกษาทำให้ทราบว่า เชื้อไรโซเบียมที่สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะเครียด จะช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเหลือง อีกทั้งการเสริมซูโครส สามารถช่วยให้เชื้อไรโซเบียมอยู่รอดได้ในสภาวะเครียดโดยการสะสมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ภายในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลกลีเซอรอล และน้ำตาลทรีฮาโรส ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันเซลล์เมื่อเผชิญกับสภาะเครียดต่าง ๆ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Several adverse environmental conditions are the limiting factors for soybean growth and symbiosis capability of rhizobia. The process of N_2-fixation by symbiont is strongly related to physiological state development of the host plant. *Bradyrhizobium* spp. that can tolerate to environmental stress would increase soybean growth under stress conditions. This study examined the effect of single and mixed stress conditions on the growth and survival of *Bradyrhizobium* spp. in culture media, and the effect on symbiosis with soybean plant grew in the sand and soil conditions. Twenty isolates of bradyrhizobia were isolated from nodules of soybean grew in fields, and five isolates were selected according to their tolerant ability under stress conditions *in vitro*experiments. The efficiency of stress tolerant bradyrhizobia on soybean growth was investigated under various stress conditions. *Bradyrhizobium* sp. isolate 188 and 194 could promote high level of nitrogenase activity and plant biomass when plants were grown in sand and soil under stress conditions. *Bradyrhizobium* sp. isolate 194 also has higher nodulation competition ability than *Bradyrhizobiumjaponicum* USDA110 under stress conditions. Moreover, supplementation with compatible solute was used to improve the symbiosis efficiency of bradyrhizobialinoculant under stress conditions. The isolate 194 was supplemented with sucrose showing highest percent survival of bacteria when cultured in medium under various stress conditions. The appropriate concentration of 300 mMsucrose could promote the cell growth under stress conditions. It was found that the bacterial cells in sucrose supplemented medium were able to accumulated trehalose and glycerol after 5 days grow under drought condition.Trehalose and glycerol were also found to be accumulated in cell after 3 days grow under acid condition. The accumulation of glycerol was found in every bacterial growth periods under high temperature with and without sucrose supplementation, but it was not found in non-sucrose supplemented bacterial cell cultured after 10 days, This was related to the decreasing of cell survival. Results of this study suggested that the inoculation of stress tolerant bradyrhizobia could enhance the symbiosis efficiency and soybean growth under stress conditions and the sucrose supplementation in medium could improve their survival by accumulating several sugars, especially glycerol and trehalose inside the cell when encounter to the various stress.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง ...	จ
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	
- ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
- ขอบเขตของการวิจัย	3
- ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
- การทดสอบเชื้อแบรดีไรโซเบียมที่ทนต่อสภาวะเครียด.	4
- ขั้นตอนการตรวจสอบเชื้อแบรดีไรโซเบียมที่คัดเลือกได้ ในการเข้าสร้างปม และตรึงไนโตรเจนให้กับถั่วหลืองภายใต้สภาวะเครียด.	4
- การวัดประสิทธิภาพการแข่งขันเพื่อเข้าสร้างปมของเชื้อที่คัดเลือกกับเชื้อทางการค้า.	5 5
- คัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของ Compatible solute ที่ช่วยให้เซลล์แบคทีเรียอยู่รอด และเจริญได้ในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ	6
- การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลภายในเซลล์แบรดีไรโซเบียม เมื่อเลี้ยงและเสริม Compatible solute ในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ โดยใช้ HPLC ในการวิเคราะห์	
- วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	6
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
- เชื้อแบรดีไรโซเบียมที่ทนต่อสภาวะเครียด	7
- ประสิทธิภาพของเชื้อแบรดีไรโซเบียมในการตรึงไนโตรเจน และส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเหลืองโดยปลูกในทรายภายใต้สภาวะเครียดแบบต่างๆ	8
- ประสิทธิภาพของเชื้อแบรดีไรโซเบียมในการตรึงไนโตรเจน และส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเหลืองโดยปลูกในดินภายใต้สภาวะเครียดแบบต่างๆ	11

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
- การทดสอบประสิทธิภาพการแข่งขันเพื่อเข้าสร้างปมกับรากถั่วเหลืองระหว่างเชื้อไอโซเลท 194 และเชื้อมาตรฐานUSDA 110	13
- การเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญของเชื้อแบรดีไรโซเบียมที่คัดเลือก ในสภาวะเครียด	14

โดยการเสริม Compatible solute
- ผลของน้ำตาลซูโคสต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลภายในเซลล์ของเชื้อแบรดีไรโซเบียมไอโซเลท 194 โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC. 16

บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ
- สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 19

ภาคผนวก
ประวัติผู้วิจัย I

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1ผลการทดสอบการเจริญของเชื้อแบรดีไรโซเบียม ภายใต้สภาวะเครียดแบบต่างๆ 7

ตารางที่ 3.2 ก. ผลการทดสอบเชื้อแบรดี้ไรโซเบียมที่คัดเลือกกับถั่วเหลืองโดยการปลูกในทรายภายใต้สภาวะเครียดแบบต่างๆ 9

ตารางที่ 3.2 ข. ค่า Stress tolerance index (STI) ของน้ำหนักแห้งถั่วเหลืองที่ทดสอบกับเชื้อแบรดีไรโซเบียม ในสภาวะเครียดแบบต่างๆที่ปลูกในทราย 11

ตารางที่ 3.3 ก. ผลค่าวิเคราะห์ตัวอย่างดินที่ใช้ในการทดสอบ 11

ตารางที่ 3.3 ข. ผลการทดสอบเชื้อแบรดีไรโซเบียมที่คัดเลือกกับถั่วเหลืองโดยการปลูกในดินภายใต้สภาวะเครียดแบบต่างๆ 12

ตารางที่ 3.3 ค. ค่า Stress tolerance index (STI) ของน้ำหนักแห้งถั่วเหลืองที่ทดสอบกับเชื้อแบรดีไรโซเบียม ในสภาวะเครียดแบบต่างๆ ที่ปลูกในดิน 13

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะแบนของดีเอ็นเอบนแผ่นเจลอะกาโรส ที่ได้จากการทำ Box-PCR (ซ้าย) และแผนภาพแสดงการจัดจำแนกเชื้อด้วยวิธี Neighbor Joining method (ขวา) 8

รูปที่ 3.2กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเข้าสร้างปมของเชื้อผสมระหว่าง เชื้อไอโซเลท 194 และ USDA 110 ภายใต้สภาวะที่ใช้ปลูกถั่วเหลืองแบบต่างๆ 14

รูปที่ 3.3แสดงผลของอัตราการเจริญจำเพาะ(Specific growth rate (μ)) ที่มีการเสริมและไม่เสริม compatible solute ทั้ง 6 ชนิด ภายใต้สภาวะเครียดแบบต่างๆ ระหว่างเชื้อไอโซเลท 194 และ USDA 110 โดยเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ได้เสริม 15

รูปที่ 3.4 ผลของน้ำตาลซูโคสต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลภายในเซลล์ของเชื้อแบรดีไรโซเบียมไอโซเลท 194 ที่เจริญในสภาวะเครียดแบบต่างๆ โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC 18

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ประเทศไทยมีการใช้หัวเชื้อไรโซเบียมเพื่อเพิ่มผลผลิตของถั่วเหลืองมานานแล้ว โดยเชื้อแบคทีเรียชนิด แบรดีไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียที่มีความจำเพาะกับถั่วเหลืองในการเข้าสร้างปม และมีประสิทธิภาพในการตรึงในโตเจนในอากาศเพื่อเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบไนโตรเจนให้กับต้นถั่วเหลืองเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต การนำหัวเชื้อไปใช้ก็มีหลากหลายรูปแบบ ทั้งใช้ผสมกับพีท (peat)(Stephens และ Rask, 2000)ก่อนจะนำไปคลุกกับเมล็ดถั่วเหลืองเพื่อลงแปลงปลูก หรือใช้ในรูปของเหลว โดยนำไปผสมกับเมล็ดในอัตราส่วนที่แนะนำ หากจำนวนเซลล์ของเชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตเจนสามารถเกาะอยู่บริเวณรอบผิวของเมล็ดถั่วเหลืองในจำนวนมากกว่า 10^6เซลล์/เมล็ดทำให้อัตราการเข้าสร้างปมเพื่อส่งเสริมประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนให้กับพืชสูงขึ้น (Kucey, 1988) ทั้งนี้การมีประสิทธิภาพดังกล่าวขึ้นอยู่กับปัจจัยหลักดังนี้ ปัจจัยทางชีวภาพ (Biotic factors) เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิต ทั้งในด้านชนิดและปริมาณที่มีความสัมพันธ์กันทางด้านใดด้านหนึ่ง ในกรณีนี้ได้แก่ ชนิดพันธุ์ของถั่วเหลือง, เชื้อแบรดีไรโซเบียมที่คัดเลือก และจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินหรือบริเวณรอบๆ ที่ปลูกถั่วเหลืองปัจจัยที่ไม่ใช่ด้านชีวภาพ (Abiotic factors) หมายถึงสิ่งแวดล้อมในแหล่งที่อยู่อาศัยที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต เช่น อุณหภูมิ สารอาหาร ความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง ความเค็ม เป็นต้น (Sadowsky. 2000)ในโครงการวิจัยนี้ต้องการพัฒนาหัวเชื้อไรโซเบียมให้มีคุณสมบัติในการทนต่อAbiotic factors เนื่องจากเราไม่สามารถควบคุมหรือกำหนดสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติให้เหมาะสมต่อการปลูกถั่วเหลืองได้ ดังนั้น ในการปลูกถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนได้สูงแต่ไม่สามารถทนต่อสภาวะเครียดจากสภาพแวดล้อม อาจทำให้ไม่ประสบความสำเร็จในการเข้าสร้างปม และการตรึงไนโตรเจนกับพืชในที่สุด (Zahran, 1999) การคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่สามารถทนต่อสภาวะเครียดได้ และการปรับปรุงหัวเชื้อโดยการเสริมสารประกอบต่างๆ ที่เรียกว่า compatible solute หรือ osmoprotectant เพื่อให้เชื้อไรโซเบียมทนต่อสภาวะเครียด จึงเป็นแนวทางที่นำมาใช้ในการปรับปรุงหัวเชื้อให้มีประสิทธิภาพ(Poolman and Glaasker,1998) เพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรลดการใช้ปุ๋ยเคมีในการเพาะปลูกถั่วเหลืองในปัจจุบัน ทำให้เกษตรกรสามารถประหยัดต้นทุนการผลิตเนื่องจากเชื้อไรโซเบียมมีราคาถูก และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ไม่มีสารตกค้าง และไม่ก่อให้เกิดการเสื่อมสภาพของดินเมื่อใช้ในระยะยาว

เชื้อแบรดีไรโซเบียมสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาวะเครียดมีประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปมและการตรึงไนโตรเจนให้กับถั่วเหลืองได้ดีในสภาวะแวดล้อมแบบเครียด เมื่อปลูกเชื้อจะส่งเสริมให้ต้นถั่วอยู่รอด และเจริญในสภาวะเครียดได้เช่นกัน (Wei et al., 2007) ซึ่งกระบวนการเข้าสร้างปมของเชื้อแบรดีไรโซเบียมกับรากของถั่วเหลืองนั้น เป็นกระบวนการเริ่มต้นที่มีความสำคัญแม้จะอยู่ในสภาวะปกติ หรือสภาวะเครียด แต่ในสภาพแวดล้อมแบบเครียดนั้นจะมีผลกระทบต่อการเข้าสร้างปมของเชื้อมากกว่า เนื่องจากสภาวะดังกล่าว สามารถทำให้คุณสมบัติการรักษาสมดุลระดับเซลล์ของเชื้อ

เสียไป(Dimkpa et al. 2009)และทำให้เชื้อตายในที่สุด ดังนั้นเชื้อที่ทนทานต้องมีคุณสมบัติพิเศษในการปรับสมดุลระหว่างสภาวะเครียดภายนอกเซลล์กับภายในเซลล์ให้เป็นปกติได้ โดยอาศัยกลไกต่างๆ ของเซลล์ ทั้งการสร้างและดูดซึมสารประกอบหลากหลายชนิด โดยจะมีกระบวนการการเก็บสะสมไว้ในเซลล์ และปลดปล่อยออกภายนอกเซลล์เพื่อป้องกันการรบกวนจากสภาวะเครียดแบบต่างๆ (Kempf and Bremer 1998) ทำให้เชื้อสามารถมีชีวิตรอดได้ และเข้าสร้างปมกับถั่วเหลืองได้สำเร็จ การนำเชื้อแบรดีไรโซเบียมที่ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมนี้มาผลิตเป็นหัวเชื้อ เพื่อปลูกถั่วเหลืองในดินที่เริ่มมีการเสื่อมสภาพ ทั้งดินกรด ดินเค็ม หรือดินแห้งแล้ง จะช่วยปรับและฟื้นฟูสภาพแวดล้อมของดินนั้นๆให้กลับมาเป็นปกติได้ โดยหัวเชื้อที่สามารถเข้าสร้างปม และตรึงไนโตรเจนได้ดี จะทำให้การเจริญเติบโตของถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น (Ali et al, 2009)และเมื่อเกษตรกรเก็บเกี่ยวผลผลิตแล้วใช้ต้นถั่วเป็นปุ๋ยพืชสด จะช่วยเพิ่มปริมาณอินทรียวัตถุในดิน, เพิ่มธาตุไนโตรเจนซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักให้แก่พืช, บำรุงและรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดิน, รักษาความชุ่มชื้นในดินและให้ดินอุ้มน้ำได้ดีขึ้น, ทำให้ดินร่วนซุย สะดวกในการเตรียมดินและไถพรวนลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีลงได้

เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบรดีไรโซเบียมให้ทนต่อสภาวะเครียดมากยิ่งขึ้น ควรมีการทดลอง และปรับปรุงคุณภาพของหัวเชื้อโดยการเสริมสารประกอบ กลุ่มcompatible solute หรือ osmoprotectant ซึ่งจัดว่าเป็น polar small organic osmolyte (Smith et al., 1988)ช่วยป้องกันเชื้อจากสภาวะเครียด ทำให้อยู่รอด และแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนต่อไปได้ เมื่อเซลล์มีการดูดซึม เพื่อเก็บสะสม หรือใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารอินทรีย์ (Biosynthesis) และสลายสารอินทรีย์ (Catabolism) ภายในเซลล์ (Jennings and Burke 1990, Louis and Galinski 1997) คุณสมบัติในการป้องกันเซลล์แบคทีเรียเมื่อเจริญอยู่ในสภาวะเครียดของ compatible solute ก็ได้แก่ การเพิ่มแรงดันออสโมซิสภายในเซลล์ และปรับสมดุลของสารภายในให้เป็นปกติ เมื่อมีเจริญในสภาวะเครียดแบบที่มีความเข้มข้นของสารภายนอกเซลล์สูงมาก เช่น สภาวะที่มีเกลือสูงหรือแห้งแล้ง(Daniel, 2005) และคุณสมบัติในการป้องกันโครงสร้างของสารโมเลกุลใหญ่ไม่ให้สูญเสียสภาพ เมื่อเจริญในอุณหภูมิสูง และความชื้นต่ำ (Chen et al. 2007) นอกจากน้ำตาลจะช่วยให้เชื้อแบคทีเรียอยู่รอด และป้องกันเซลล์จากสภาวะเครียดได้แล้ว ยังพบว่าน้ำตาลบางชนิดสามารถเป็นแหล่งของคาร์บอน ให้กับเชื้อแบรดีไรโซเบียมได้ (Roland et al, 1994)ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่เชื้อจะสามารถดำรงชีวิตได้นานขึ้นเมื่อใส่เชื้อคลุกกับเมล็ดถั่วลงไปในดินเพื่อรอเข้าสร้างปมกับรากของถั่วเหลืองขณะที่ยังไม่งอก

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดแยกเชื้อแบรดีไรโซเบียมที่ทนต่อสภาวะเครียด

1.2.2 เพื่อคัดเลือกเชื้อแบรดีไรโซเบียมที่ทน และมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนให้กับถั่วเหลือง เมื่อเจริญในสภาวะเครียด

1.2.3 เพื่อปรับปรุง และเพิ่มประสิทธิภาพของหัวเชื้อไรโซเบียม ให้อยู่รอด และตรึงไนโตรเจนได้ในสภาวะเครียด โดยการเสริมด้วย compatible solute

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การทดสอบเพื่อคัดเลือกเชื้อแบรดีไรโซเบียมที่ทนต่อสภาวะเครียด ต้องแยกทดสอบในแต่ละสภาวะเครียด ได้แก่ สภาวะกรดสภาวะแห้งแล้ง และที่สภาวะอุณหภูมิ เชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในแต่ละสภาวะเครียดสูงๆ จะถูกคัดเลือกเพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการทดลองต่อไป โดยเปรียบเทียบกับเชื้อทางการค้า *Bradyrhizobium japonicum*USDA 110 และเชื้ออ้างอิง *Bradyrhizobium japonicum*CB 1809 ที่มีรายงานว่าสามารถทนต่อสภาวะเครียดได้โดยการทดสอบเชื้อกับถั่วเหลืองที่ปลูกในทรายที่มีการปรับให้มีสภาวะเครียด และใช้ตัวอย่างดินที่มีสภาวะเครียดเป็นดินกรดร่วมกับการปรับสภาวะเครียดอื่น ๆ ร่วมด้วยจากนั้นวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ เพื่อให้ได้เชื้อที่ทน และมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงให้กับถั่วเหลือง จากนั้นทดสอบเชื้อที่คัดเลือกได้กับ compatible solute ทั้งหมด6 ชนิด ได้แก่ glucose, mannitol, sucrose, trehalose, glycerol, และPolyvinyl alcohol (PVA)โดยนำมาใช้เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วพิจารณาผลกระทบต่อการอยู่รอด และการเจริญของเซลล์ในแต่ละสภาวะเครียด เพื่อคัดเลือกชนิดของ compatible solute แล้วจึงทำการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยการคัดเลือกจะคำนึงถึง compatible solute ชนิดที่มีราคาไม่สูง หาซื้อง่าย และต้องไม่เพิ่มต้นทุนการผลิตหัวเชื้อให้สูงขึ้นมากนัก แล้วจึงนำไปทดสอบกับถั่วเหลืองต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้เชื้อแบรดีไรโซเบียมที่ทนต่อสภาวะเครียดแบบต่างๆ
2. ได้เชื้อแบรดีไรโซเบียมที่ทนต่อสภาวะเครียด โดยสามารถเข้าสร้างปมได้ดี และมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน เมื่อใช้กับถั่วเหลือง
3. ได้ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของcompatible soluteเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้กับหัวเชื้อแบรดีไรโซเบียม ให้ทนต่อสภาวะเครียด

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การทดสอบเชื้อแบรดีไรโซเบียมที่ทนต่อสภาวะเครียด

2.1.1 คัดแยกและทดสอบคุณลักษณะทั่วไปของเชื้อแบรดีไรโซเบียม

เชื้อแบรดีไรโซเบียมที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้จากกรมวิชาการเกษตร รวมทั้งได้คัดแยกเชื้อจากปมถั่วเหลืองในพื้นที่อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมดในอาหาร YM แล้วตรวจสอบการติดสีเซลล์ที่ย้อมแกรม และย้อม Carbol fuchsin จากนั้นจึงนำเชื้อที่เลี้ยงไว้มาทดสอบความสามารถในการเข้าสร้างปมกับถั่วเหลืองอีกครั้ง (Somasegaran and Hoben, 1994)

2.1.2 การเตรียมสภาวะเครียด เพื่อใช้ทดสอบกับเชื้อแบรดีไรโซเบียม

นำอาหารแข็ง YM ที่ปรับค่าpHเป็น 4, 5, และ 6.8 เทลงบนจานเพาะเชื้อเพื่อใช้คัดเลือกเชื้อในสภาวะกรด โดยใช้เทคนิค drop plate แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ส่วนที่สภาวะอุณหภูมิสูงนั้นใช้อาหารแข็ง pH6.8 และใช้อุณหภูมิบ่มเชื้อที่ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียสตรวจสอบผลเมื่อบ่มเชื้อที่ทดสอบได้ 7 วัน และในสภาวะแห้งแล้ง ทำการทดลอง โดยการ

หยดเซลล์ของเชื้อจำนวน 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงบนกระดาษกรอง 0.2 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 มิลลิเมตร แล้วจึงนำไปบ่มในตู้บ่มขนาดเล็ก (desiccator chamber) ที่บรรจุด้วย silica gel, สารละลายอิ่มตัวของ $CH_3COOK.5H_2O$, $K_2CO_3.2H_2O$, และ KI ที่สามารถปรับค่า R.H. ในการบ่มเชื้อ เป็น3, 20, และ 67ตามลำดับ(ณ30 °เซลเซียส) (Boumahdi et al. 1999) การอยู่รอดของเซลล์แบคทีเรียในแต่ละสภาวะ ตรวจสอบด้วยการเจือจางเชื้อ และเลี้ยงบนอาหารหลังจากบ่มได้ 2 วัน

2.2 ขั้นตอนการตรวจสอบเชื้อแบรดีไรโซเบียมที่คัดเลือกได้ ในการเข้าสร้างปม และตรึงไนโตรเจนให้กับถั่วหลืองภายใต้สภาวะเครียด

2.2.1 การทดสอบถั่วเหลืองในทราย

นำถั่วเหลืองมาเพาะเพื่อรากงอกยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร วางลงในภาชนะปลูกที่บรรจุด้วยทรายฆ่าเชื้อแล้วจึงใส่เชื้อที่คัดเลือกเท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อเมล็ด โดยที่ภาชนะปลูกและทรายทำการฆ่าเชื้อก่อนการทดลอง ในสภาวะกรดทำโดยรดน้ำด้วยอาหารปราศจากไนโตรเจนที่ปรับpHเท่ากับ 4.5 และควบคุม pH ด้วยบัฟเฟอร์ชนิด MES buffer (Somasegaran and Hoben, 1994) ในสภาวะเครียดแห้งแล้งนั้น รดด้วยอาหารปราศจากไนโตรเจน ที่เติมสาร polyethylene glycol 8000 หรือ PEG8000 เพื่อปรับสภาวะให้เป็น -3.02 bars และในสภาวะอุณหภูมิสูง อุณหภูมิในการปลูกถั่วถูกควบคุม ที่ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้ตู้ควบคุมสภาวะการเจริญของพืช (Growth chamber) สำหรับสภาวะเครียดที่ทดสอบแบบสองสภาวะร่วมกันนั้น ใช้สภาวะดังกล่าวข้างต้นมารวมกันโดยที่สภาวะกรดรวมกับสภาวะแห้งแล้ง และสภาวะกรดรวมกับอุณหภูมิสูง เมื่ออายุของถั่วปลูกในแต่สภาวะได้ 30 วัน นำไปวัดค่าการตรึงไนโตรเจนของปม ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC) เพื่อพิจารณาร่วมกับน้ำหนักแห้งของปม และต้นถั่ว รวมไปถึงจำนวนปมที่เกิดขึ้น เมื่อเทียบกับถั่วเหลืองที่ปลูกเชื้อทางการค้า USDA 110

2.2.2 การทดสอบถั่วเหลืองในดิน

การทดลองนี้ใช้ตัวอย่างดิน 2 ชนิดได้แก่ ดิน pH4.4 และ pH6.95 นำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 95 นาที จำนวน 2 ครั้ง ห่างกันนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำดิน pH4.4 มาใช้คัดเลือกเชื้อแบรดีไรโซเบียมในสภาวะดินกรดที่ปลูกถั่วเหลือง ส่วน pH6.95 นั้นใช้คัดเลือกในสภาวะแห้งแล้ง และสภาวะอุณหภูมิสูง โดยควบคุมและปรับสภาวะเหมือนกับการปลูกในทราย และในสภาวะเครียดที่มีสองสภาวะร่วมกันนั้น ใช้ดินกรด pH4.4 แล้วปรับสภาวะให้เป็นไปตามการทดลองในทราย

2.3 การวัดประสิทธิภาพการแข่งขันเพื่อเข้าสร้างปมของเชื้อที่คัดเลือกกับเชื้อทางการค้า

นำพลาสมิด pCAM120 (ที่ตำแหน่งของ Tn5 เชื่อมด้วยยีน*gus*ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์β-glucuronidase (GUS) (Wilson et al. 1995) ส่งถ่ายให้กับเชื้อทางการค้า USDA 110 เพื่อใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการติดตามเชื้อในการทดลอง เพื่อทดสอบการแข่งขันในการเข้าสร้างปมกับถั่วเหลืองในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ โดยการผสมเชื้อแบรดีไรโซเบียมที่คัดเลือกได้กับเชื้อการค้าที่ติดยีนเครื่องหมาย ในอัตรา 1:1 ของ 10^8เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปทดสอบกับถั่วเหลือง ในปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อ 1 เมล็ด ซึ่งลักษณะการทดลองทำเหมือนกับการทดลองในข้อ 2.2.1 และเมื่อครบ

ระยะเวลา 1 เดือน ปมของถั่วเหลืองในทุกสภาวะของการทดลอง ถูกตรวจสอบด้วยสาร5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) ที่ย่อยได้ด้วยเอนไซม์β-glucuronidase (GUS) ทำให้แสดงสีฟ้า (Krause et al. 2002)บันทึกจำนวนของปมที่เปลี่ยนและไม่เปลี่ยนสี เพื่อนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นของความสามารถในการเข้าสร้างปม(nodule occupancy) (Payakapong et al. 2004)

2.4 คัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของ Compatible solute ที่ช่วยให้เซลล์แบคทีเรียอยู่รอดและเจริญได้ในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM (minimal salt medium) (Talibart et al. 1994) ที่ปรับ pH4.5 สำหรับเลี้ยงเชื้อในสภาวะกรด ส่วนอาหาร pH6.8 ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อในสภาวะแห้งแล้ง และอุณหภูมิสูง โดยที่จะเติม PEG8000 เพื่อปรับให้ได้ -3.02 bars ในสภาวะแห้งแล้ง อาหารที่เตรียมในแต่ละสภาวะเครียดจะเสริมด้วย Compatible solute ที่ใช้ทดสอบทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ glucose, mannitol, sucrose, trehalose, glycerol, และ PVA(Talibart et al. 1994, Gouffi et al. 1999, Le Rudulier 2005) นำอาหารที่เสริมด้วยสารแต่ละชนิดและในแต่ละความเข้มข้นมาทดสอบกับเชื้อที่คัดเลือก โดยการวัดการเจริญด้วยการนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ก่อนจะคำนวณออกมาเป็นค่าอัตราการเจริญ (μ/time)

2.5 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลภายในเซลล์แบรดีไรโซเบียม เมื่อเลี้ยงและเสริม Compatible solute ในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆโดยใช้ HPLC ในการวิเคราะห์

เลี้ยงเชื้อแบรดีไรโซเบียมในอาหาร MSM ที่เสริมด้วยความเข้มข้นของ compatible solute ชนิดที่เหมาะสม ทำการนับจำนวนเซลล์ในแต่ละวันจากทุกสภาวะเครียด และสกัดสารภายในเซลล์โดยทำการสกัด 2 ครั้ง ด้วย 70% ethanol ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที (Lai et al. 1991) สารสกัดจากเซลล์ที่ได้นำไประเหยให้ ethanol ออก ด้วยเครื่อง evaporator อุณหภูมิที่ใช้ระเหยเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำส่วนที่เหลือจากการระเหยมาเจือจางด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน และกรองผ่านกระดาษกรอง 0.2 ไมโครเมตร นำสารสกัดที่ผ่านการกรองมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อหาชนิดของน้ำตาล และความเข้มข้นต่อจำนวนเซลล์ของเชื้อโดยใช้คอลัมน์แบบ ion exchange (Aminex HPX-87H, 7.8x300 mm, Bio-Rad) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสโดยใช้4 mM กรดซัลฟูริกเป็นmobile phase และควบคุมอัตราการไหลที่ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที (Sangproo et al. 2012) และสำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลซูโครส ใช้อัตราการไหลที่ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 60องศาเซลเซียส

2.6วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์วาเรียนซ์ (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS v. 17for window (Levesque and SPSS Inc., 2006) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)(Duncan 1955)

บทที่ 3
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

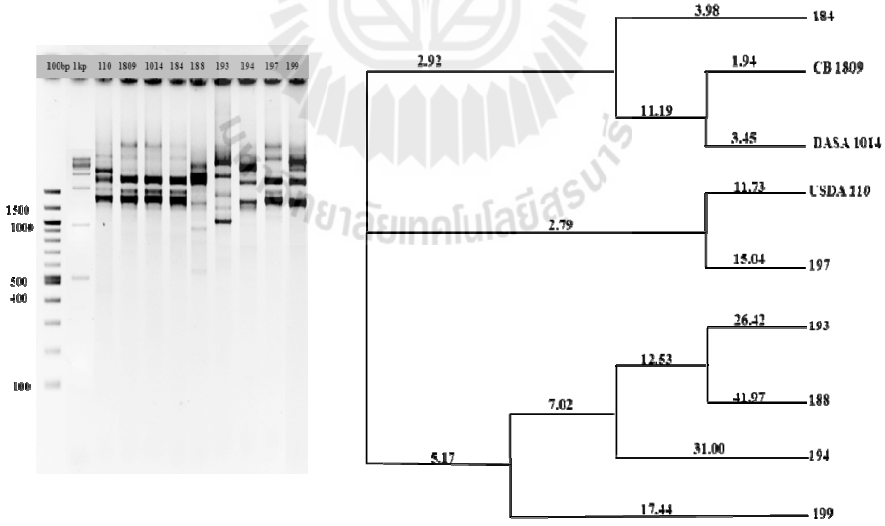
3.1เชื้อแบรดีไรโซเบียมที่ทนต่อสภาวะเครียด

เชื้อแบรดีไรโซเบียมทั้งหมด 20 ไอโซเลท เป็นเชื้อทดสอบแล้วว่าสามารถเข้าสร้างปมกับถั่วเหลืองได้ เมื่อนำมาทดสอบบนอาหารภายใต้สภาวะเครียดที่ได้ออกแบบไว้ พบว่าเชื้อไอโซเลท 184, 188, 193, 194, และ 197 สามารถเจริญได้ในสภาวะเครียดที่ทดสอบ โดยที่การเจริญในสภาวะกรดและอุณหภูมิสูง แสดงผลการทดลองด้วยการให้คะแนนการเจริญจากมาก จนถึงไม่มีการเจริญ ส่วนในสภาวะแล้งแสดงด้วยเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์แบคทีเรียดังแสดงในตารางที่ 3.1 โดยเปรียบเทียบผลกับเชื้อแบรดีไรโซเบียมทางการค้า USDA 110 และ CB 1809ซึ่งให้ผลดังนี้ การเจริญของเชื้อการค้า USDA 110 ในสภาวะแล้งไม่แตกต่างจากเชื้อไอโซเลทที่ทดสอบ ส่วนในสภาวะกรดและอุณหภูมิสูง พบว่าเชื้อเจริญได้ไม่ดี แตกต่างจากกับไอโซเลทอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับเชื้อ CB 1809 จากการทดลอง พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีในทุกสภาวะเครียด และให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับเชื้อทางการค้า USDA 110 ทั้งนี้มีหลายงานวิจัยที่พบว่าเชื้อ CB 1809 เป็นเชื้อที่ทนต่อสภาวะเครียดได้ ทั้งสภาวะกรด ด่าง (Botha et al. 2004, Indrasumunar et al. 2011) และมีรายงานว่าเชื้อนี้สามารถปรับตัวให้เจริญได้ในดินประเทศบราซิลที่มีอุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส (Ramos 1996) ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกเชื้อที่มีคุณสมบติที่ทนกว่า USDA 110 และเจริญในสภาวะเครียดได้เช่นเดียวกับเชื้อ CB 1809และเพื่อให้ผลการทดลองชัดเจนขึ้นจึงใช้เชื้อไอโซเลท 199 เป็นตัวแทนของเชื้อที่ไม่ทน และเจริญไม่ได้ในสภาวะเครียด

เชื้อแบรดี้ไรโซเบียมทั้ง 5 ไอโซเลทที่คัดเลือกจากการทดลองในข้างต้น เมื่อนำมาตรวจลักษณะความใกล้เคียงกันของเชื้อ โดยใช้เทคนิค Box-PCR พบว่าเชื้อไอโซเลท 197 มีความเหมือนของลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับ USDA 110 ส่วนเชื้อไอโซเลท 184 เหมือนกับเชื้ออ้างอิง CB 1809 และ DASA 1014 นอกจากนี้เชื้อไอโซเลท 193, 188 และ 194 ก็ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความคล้ายคลึงกัน (ดังที่แสดงในรูปที่ 3.1)เมื่อพิจารณาถึงผลการทดลองในตารางที่ 3.1และ รูปที่ 3.1จึงคัดเลือกเชื้อไอโซเลท 184 188 และ 194 เพื่อใช้ทดสอบในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 3.1 ผลการทดสอบการเจริญของเชื้อแบรดี้ไรโซเบียม ภายใต้สภาวะเครียดแบบต่างๆ

	Growth score								% survival of bacteria under drought stress(%RH)			
	Acidity(pH)				High temperature (˚C)							
Isolates	4	5	6.8	Average	30	40	45	Average	3	20	67	Average
UADA 110	1	1	3	1.67^{c}	3	1	0	1.33^{d}	7	23	100	43^{a}
CB 1809	1	3	3	2.33^{a}	3	2	2	2.33^{a}	11	27	100	46^{a}
184	1	1	3	1.67^{c}	3	1	1	1.67^{c}	7	11	85	34^{b}
188	1	3	3	2.33^{a}	3	2	2	2.33^{a}	10	15	100	42^{a}
193	1	2	3	2^{b}	3	1	1	1.67^{c}	10	20	100	43^{a}
194	1	2	3	2^{b}	3	2	0	1.67^{c}	15	29	100	48^{a}
197	1	3	3	2.33^{a}	3	2	1	2^{b}	9	13	94	39^{b}
199	0	0	3	1^{d}	2	1	0	1^{d}	1	5	56	21^{e}



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะbands ของดีเอ็นเอบน agarose gel ที่ได้จากการทำ Box-PCR (ซ้าย) และแผนภาพแสดงการจัดจำแนกเชื้อด้วยวิธี Neighbor Joining method (ขวา)

3.2 ประสิทธิภาพของเชื้อแบรดีไรโซเบียมในการตรึงไนโตรเจน และส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเหลืองโดยการปลูกในทรายภายใต้สภาวะเครียดแบบต่าง ๆ

จากการทดลองพบว่าในสภาวะปกติลักษณะการส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเหลือง เมื่อทดสอบกับเชื้อที่คัดเลือกได้ไม่แตกต่างกัน โดยพิจารณาจากน้ำหนักแห้งของถั่วเหลืองส่วนการตรึงไนโตรเจนของเชื้อที่อยู่ในปมถั่วนั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างไอโซเลท 194 ที่ตรึงไนโตเจนได้สูงกว่าไอโซเลท 184 แต่ไม่พบความแตกต่างเมื่อเทียบกับ USDA 110 และเชื้อไอโซเลทอื่น ส่วนในสภาวะเครียดนั้น พบว่าที่สภาวะกรดเชื้อไอโซเลท 188 และ194 ตรึงไนโตรเจนได้สูง แต่ไม่แตกต่างจาก USDA 110 โดยสัมพันธ์กับน้ำหนักแห้ง และจำนวนปมของถั่วเหลือง ที่อุณหภูมิสูงนั้นพบว่า ไอโซเลท 194 ให้ผลการทดสอบที่ดีกว่าไอโซเลทอื่น โดยมีค่าการตรึงไนโตรเจนที่สูง และสัมพันธ์กับน้ำหนังแห้งของต้น และปมถั่วเหลือง ขณะที่ผลการทดลองในสภาพแห้งแล้งนั้น ไอโซเลท 184 และ194 ให้ผลการตรึงไนโตรเจนที่สูงสัมพันธ์กับลักษณะการส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเหลืองด้วยเช่นกัน และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเชื้อ USDA 110(ตารางที่ 3.2 ก.) ในการทดลองที่มีการออกแบบให้มีสภาวะเครียดร่วมกันสองสภาวะ พบว่าสภาวะเครียดที่เป็นกรด และอุณหภูมิสูงขณะปลูกถั่วเหลือง ค่าการตรึงไนโตเจน น้ำหนักแห้งของพืช และจำนวนปมของถั่วเหลือง เมื่อทดสอบกับเชื้อทุกไอโซเลท และเชื้อทางการค้าที่เป็นเชื้อมาตรฐาน ไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนการทดลองในการปลูกในสภาพที่เป็นกรดกับแห้งแล้งพบว่า เชื้อไอโซเลท 194 ให้ผลการทดลองที่ดีกว่าเชื้อไอโซเลทอื่น แต่ไม่แตกต่างกับเชื้อทางการค้า ดังตารางที่ 3.2 ก. จากการทดลองนี้ยังพบว่าการที่ถั่วเหลืองใส่เชื้อไรโซเบียมก่อนปลูกจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดีกว่าพืชที่ไม่ใส่เชื้อ

ในการคัดเลือกเชื้อแบรดีไรโซเบียมที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเหลืองในสภาวะเครียดได้พิจารณาร่วมกับค่าดัชนีความสามารถในการทนต่อสภาวะเครียด(Stress tolerance index)หรือ STI (Shetty et al. 1995) ดังแสดงในตารางที่3.2 ข. ทั้งนี้พบว่าถั่วเหลืองที่ใช้เชื้อไอโซเลท 194 มีค่า STI สูงกว่าถั่วเหลืองที่ใช้กับเชื้อไอโซเลทอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญในสภาวะต่าง ๆ ดังนั้นไอโซเลท 194 จึงเป็นเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญการเจริญของถั่วเหลืองได้ดีในทุกๆสภาพการปลูกที่ทำการทดลอง ขณะที่เชื้อไอโซเลท 188 ให้ผลรองลงมา ส่วนเชื้อไอโซเลทอื่นพบว่าให้ค่าSTI ต่ำและไม่คงที่ในการทดสอบในสภาวะต่าง ๆ อย่างไรก็ตามพบว่าค่า STI ที่ได้จากการทดลองนี้สามารถยืนยันได้ว่าพืชที่ไม่ได้ใช้เชื้อไรโซเบียมมีค่า STI ต่ำกว่าพืชที่ใส่เชื้อ นอกจากนี้ค่า STI ของพืชที่ปลูกทดสอบในสภาวะเครียดต่าง ๆ ยังแสดงถึงผลกระทบจากสภาวะเครียดต่อการเจริญของถั่วเหลืองได้ (Zare and Mahdi, 2012)

ตารางที่ 3.2 ก. ผลการทดสอบเชื้อแบรดีไรโซเบียมที่คัดเลือกกับถั่วเหลือง ในสถาวะเครียดแบบต่างๆ ที่ปลูกในทราย

Conditions*	Isolates	Nitrogenase activity (μmole h^{-1} g $nodule^{-1}$)	Biomass dry weight (g $plant^{-1}$)	Nodule dry weight (g $plant^{-1}$)	Nodule number ($plant^{1}$)
Normal	Uninoculated	-	0.53±0.24^{b}	-	-
	USDA 110	70.01±31.51^{ab}	0.91±0.22^{a}	0.06±0.02	19±3
	184	35.01±6.00^{b}	0.83±0.11^{a}	0.07±0.02	24±2

	188	55.45±12.22 ab	0.80±0.28 ab	0.05±0.01	23±7
	194	89.21±16.43 a	0.89±0.137 a	0.06±0.01	20±6
Acidity	Uninoculated	-	0.24±0.03 c	-	-
	USDA 110	45.76±8.85 ab	0.55±0.11 ab	0.03±0.01	10±4 a
	184	22.59±2.93 b	0.47±0.13 b	0.02±0.01	9±2 ab
	188	33.69±5.08 a	0.51±0.05 ab	0.04±0.00	11±2 a
	194	60.17±9.42 a	0.59±0.16 a	0.04±0.01	9±3 ab
Drought	Uninoculated	-	0.14±0.02 c	-	-
	USDA 110	27.79±6.88 b	0.17±0.03 b	0.08±0.01 a	12±2 a
	184	64.22±6.15 a	0.27±0.03 a	0.03±0.02 b	7±2 b
	188	22.91±3.90 b	0.15±0.03 c	0.02±0.03 b	7±2 b
	194	48.10±6.74 ab	0.30±0.10 a	0.08±0.05 a	12±3 a
High temperature	Uninoculated	-	0.14±0.04 c	-	-
	USDA 110	88.37±39.06 a	0.19±0.02 ab	0.02±0.01 ab	8±1 a
	184	27.51±13.41 bc	0.18±0.03 b	0.04±0.01 a	5±1 b
	188	50.94±25.91 b	0.20±0.02 a	0.03±0.00 ab	7±1 ab
	194	96.36±24.16 a	0.25±0.01 a	0.03±0.01 ab	10±1 a
Mixed stress					
Acidity+Drought	Uninoculated	-	0.08±0.01 b	-	-
	USDA 110	71.03±12.87 a	0.14±0.02 a	0.01±0.00 ab	8±1 b
	184	25.64±6.22 b	0.17±0.11 a	0.01±0.01 a	10±4 a
	188	39.43±4.32 b	0.19±0.10 a	0.02±0.00 a	11±1 a
	194	67.65±13.38 a	0.19±0.04 a	0.01±0.00 a	8±2 b
Acidity+High temp.	Uninoculated	-	0.12±0.04 ab	-	-
	USDA 110	54.81±12.30 ab	0.14±0.01 ab	0.04±0.02 a	9±0 ab
	184	60.66±9.42 a	0.16±0.07 a	0.03±0.03 b	8±0 ab
	188	40.48±4.32 ab	0.13±0.01 ab	0.028±0.03 b	8±1 ab
	194	65.21±8.99 a	0.17±0.13 a	0.038±0.01 a	12±2 a

ตารางที่ 3.2 ข. ค่า Stress tolerance index (STI) ของน้ำหนักแห้งถั่วเหลืองที่ทดสอบกับเชื้อแบรดีไรโซเบียม ในสภาวะเครียดแบบต่างๆ

	Stress Tolerance Index (STI)				
Conditions	Uninoculated	USDA 110	184	188	194
Normal	1.00±0.00 b	1.70±0.23 a	1.55±0.40 ab	1.52±0.06 ab	1.66±0.04 a
Single stress					
Acidity	1.00±0.00 c	2.31±0.39 a	1.97±0.20 b	2.13±0.08 b	2.46±0.33 a
Drought	0.99±0.05 c	1.23±0.11 bc	1.93±0.41 ab	1.05±0.06 c	2.09±0.10 a
High temperature	0.99±0.02 b	1.43±0.14 a	1.46±0.11 a	1.22±0.11 a	1.80±0.53 a
Mixed stress					
Acidity and Drought	1.00±0.00 c	1.67±0.31 b	2.01±0.21 ab	2.21±0.54 a	2.26±0.23 a
Acidity and High temp.	1.00±0.00 c	1.23±0.22 ab	1.38±0.05 ab	1.12±0.09 b	1.45±0.25 a

3.3 ประสิทธิภาพของเชื้อแบรดีไรโซเบียมในการตรึงไนโตรเจน และส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเหลืองโดยการปลูกในดินทดสอบภายใต้สภาวะเครียดแบบต่าง ๆ

จากผลทดสอบในทรายได้คัดเลือกเชื้อไอโซเลท 188 และ 194 เพื่อทดสอบกับถั่วเหลืองที่ปลูกในดิน ซึ่งเป็นตัวอย่างดิน2 รูปแบบคือดินที่มี pH เป็นกลาง ซึ่งนำมาจากจังหวัดนครราชสีมา เพื่อใช้ทดสอบในสภาวะปกติ แห้งแล้ง และอุณหภูมิสูง และดินที่มี pH เป็นกรด จากจังหวัดปทุมธานี สำหรับทดสอบเชื้อในสภาวะที่เป็นกรด จากผลวิเคราะห์ดินก่อนปลูก แสดงว่าดินจากจังหวัดปทุมธานีเป็นดินกรดที่มีค่าpH 4.4 และเป็นดินกรดประเภทซัลเฟต (SO_4^{2-}) เนื่องจากมีค่าซัลเฟตสูง และมีการละลายของแคลเซียมอยู่มาก (Daud et Al. 2002) ส่วนดินจากจังหวัดนครราชสีมามีค่า pH 6.98 (ตารางที่ 3.3 ก.)

ตารางที่ 3.3 ก. ค่าวิเคราะห์ตัวอย่างดินที่ใช้ในการทดสอบ

Soil samples (Province)	pH	% OM	EC (mS/cm)	P (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	SO_2^{-4}(S/kg)
Phathum Thani	4.4	1.83	3.30	21.96	418.56	3,878.00	725
Nakhon ratchasima	6.98	0.08	1.87	157.60	227.47	430.00	51.22

ผลการทดลองให้ผลเช่นเดียวกับการทดสอบกับถั่วเหลืองที่ปลูกในทราย โดยที่ผลของเชื้อต่อการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองเมื่อพิจารณาจากน้ำหนักแห้งของถั่วนั้น ไม่แตกต่างกันในกลุ่มของถั่วที่มีการใส่เชื้อ แต่พบว่าค่าการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไอโซเลท 188 และ 194 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่เชื้อ 194 ให้ค่าการตรึงในโตรเจนได้สูงกว่าในทุกสภาวะที่ใช้ปลูกถั่วเหลือง แต่ในสภาพกรดและอุณหภูมิสูง การทดสอบของเชื้อ 188 194 และUSDA 110 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ในการทดสอบเชื้อกับถั่วเหลืองที่สภาวะแล้ง พบว่าเชื้อไอโซเลท 194 มีค่าการตรึงไนโตรเจนที่ดีกว่าไอโซเลท 188 และเชื้อทางการค้าUSDA110 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3.3 ข.)

เมื่อนำข้อมูลของน้ำหนักแห้งถั่วเหลืองที่ปลูกในทุกๆสภาวะ มาคำนวณเพื่อหาค่า STI ที่ได้พบว่ามีสัมพันธ์กับผลการทดลองที่ได้ในข้างต้น โดยที่เชื้อไอโซเลท 188, 194 และเชื้อการค้า ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันเมื่อทดสอบกับถั่วเหลืองที่ปลูกในทุกสภาวะ ยกเว้นที่สภาวะแล้ง และที่สภาวะกรดร่วมกับสภาวะแล้ง เชื้อไอโซเลท 194 มีค่า STI ที่สูงกว่า ไอโซเลท 188 (ดังตารางที่ 3.3 ค.) ดังนั้นเชื้อไอโซเลท194 เป็นเชื้อที่มีศักยภาพที่แนะนำมาพัฒนาเป็นหัวเชื้อต้นแบบในการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำหรับการปลูกถั่วเหลืองต่อไป

ตารางที่ 3.3 ข.ผลการทดสอบเชื้อแบรดี้ไรโซเบียมที่คัดเลือกกับถั่วเหลือง ในสถาวะเครียดแบบต่างๆ ที่ปลูกในดิน

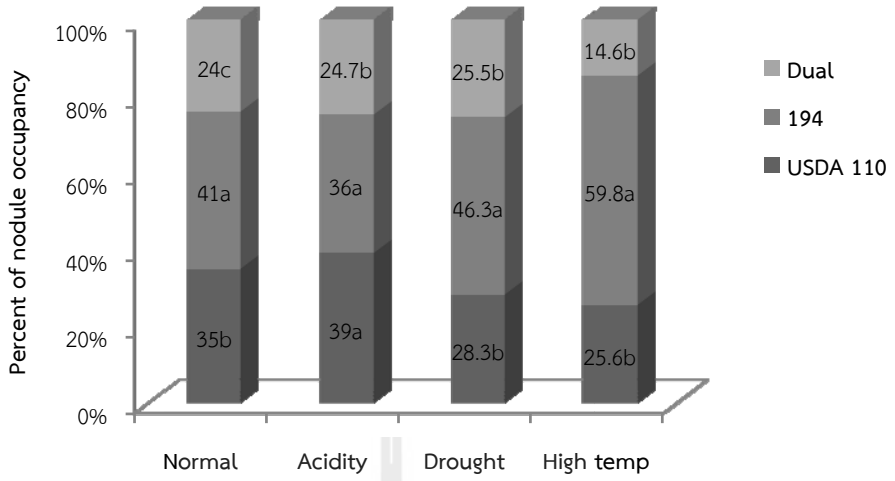
Conditions*	Isolates	Nitrogenase activity (μmole h^{-1} g $nodule^{-1}$)	Biomass dry weight (g $plant^{-1}$)	Nodule dry weight (g $plant^{-1}$)	Nodule number ($plant^{-1}$)
Normal	Uninoculated		0.46±0.00^{b}		
	USDA 110	107.50±6.97^{ab}	0.52±0.05^{a}	0.024±0.00	10±2
	188	66.51±20.79^{b}	0.63±0.04^{a}	0.036±0.01	13±2
	194	118.19±20.06^{a}	0.56±0.12^{a}	0.022±0.00	14±2
Single stress					
Acidity	Uninoculated		0.49±0.01^{b}		
	USDA 110	143.19±23.38^{ab}	0.57±0.11^{a}	0.01±0.00^{b}	9±2^{b}
	188	98.31±20.45^{b}	0.66±0.15^{a}	0.02±0.00^{a}	13±4^{a}
	194	165.98±27.60^{a}	0.62±0.01^{a}	0.02±0.00^{a}	9±1^{b}
Drought	Uninoculated		0.41±0.09^{b}		
	USDA 110	70.18±20.87^{b}	0.51±0.07^{ab}	0.03±0.00	14.5±6
	188	70.83±35.98^{b}	0.47±0.05^{ab}	0.02±0.00	15±5
	194	100.04±21.43^{a}	0.58±0.04^{a}	0.02±0.00	15±4
High temperature	Uninoculated		0.35±0.01^{b}		
	USDA 110	88.37±39.06^{a}	0.50±0.03^{a}	0.01±0.01	8±2
	188	50.94±25.91^{b}	0.50±0.03^{a}	0.01±0.00	9 ±3
	194	96.36±24.16^{a}	0.50±0.02^{a}	0.01±0.00	10±2
Mixed stress					
Acidity and Drought	Uninoculated		0.12±0.01^{c}		
	USDA 110	51.82±9.24^{ab}	0.47±0.03^{ab}	0.05±0.01	21±10^{a}
	188	42.56±3.48^{ab}	0.21±0.06^{b}	0.05±0.00	17±2^{b}
	194	67.41±10.76^{a}	0.57±0.13^{a}	0.05±0.01	21±7^{a}
Acidity and High temp.	Uninoculated		0.16±0.07^{b}		
	USDA 110	50.68±2.46	0.24±0.06^{ab}	0.04±0.00^{a}	6±2
	188	59.25±10.39	0.30±0.03^{a}	0.03±0.00^{ab}	7±2
	194	51.26±5.42	0.27±0.03^{ab}	0.05±0.00^{a}	8±4

ตารางที่ 3.3 ค. ค่า Stress tolerance index (STI) ของน้ำหนักแห้งถั่วเหลืองที่ทดสอบกับเชื้อแบรดี้ไรโซเบียม ในสภาวะเครียดแบบต่างๆที่ปลูกในดิน

	Stress Tolerance Index (STI)			
Conditions	Uninoculated	USDA 110	188	194
Normal	1.00±0.56[b]	1.14±0.11[ab]	1.381±0.09[ab]	1.22±0.26[ab]
Acidity	0.81±0.18[a]	1.51±0.29[a]	1.738±0.39[a]	1.59±0.02[a]
drought	1.00±0.17[c]	1.38±0.14[ab]	1.220±0.13[b]	1.66 ±0.39[a]
High temperature	1.00±0.02[ab]	1.13±0.06[a]	1.160±0.08[a]	1.14 ±0.02[a]
Mixed stress condition				
Acidity and Drought	1.00±0.05[c]	4.03±0.27[ab]	1.83±0.48[c]	4.851±1.08[a]
Acidity and High temp.	1.00±0.64[c]	1.50±0.36[ab]	2.15±0.18[a]	1.671±0.16[ab]

3.4 ผลทดสอบประสิทธิภาพการแข่งขันเพื่อเข้าสร้างปมกับถั่วเหลืองระหว่างเชื้อไอโซเลท 194 และเชื้อมาตรฐานUSDA 110

เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อต่อการเข้าสร้างปมที่จำเพาะกับถั่วเหลืองในสภาวะเครียดแบบต่างๆ ทำการใช้เชื้อผสมในการทดสอบกับถั่วเหลือง ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เชื้อผสมของไอโซเลท 194 กับ USDA 110 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีจำนวนเซลล์สายพันธุ์ละ10^8เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยที่ USDA 110มีการติดยีนเครื่องหมายเอาไว้ดังที่กล่าวในวิธีการศึกษา ผลการทดสอบพบว่า เชื้อไอโซเลท 194 มีจำนวนปมที่เชื้อสามารถเข้าสร้างได้มากกว่าเชื้อทางการค้า USDA 110 ในสภาวะการปลูกถั่วเหลืองภายใต้สภาวะปกติ แล้ง และที่อุณหภูมิสูงอย่างมีนัยสำคัญโดยแสดงข้อมูลเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเข้าครอบครองปม (% nodule occupancy) ในขณะที่สภาวะกรดของการปลูกถั่วเพื่อทดสอบมีค่าการเข้าสร้างปมของเชื้อไม่แตกต่างกัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า มีปมที่มีลักษณะติดสีฟ้าไม่ชัดเจนหลังการย้อม ซึ่งจะแสดงเป็น Dual nodule occupancy (Waraporn et al, 2003) ที่เกิดจากการเข้าสร้างปมของเชื้อผสม 194 และ USDA 110ซึ่งพบโดยเฉลี่ย24.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบกับถั่วในสภาวะปกติ กรด และแล้ง และพบลักษณะของการเป็น Dual nodule occupancy อีก 14.6เปอร์เซ็นต์ กับถั่วที่ทดสอบภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง ดังรูปที่ 3.2ดังนั้นจึงสรุปว่า เชื้อไอโซเลท 194 มีประสิทธิภาพในการแข่งขันเพื่อเข้าสร้างปมกับถั่วเหลืองได้ดีกว่าเชื้อมาตรฐานUSDA 110



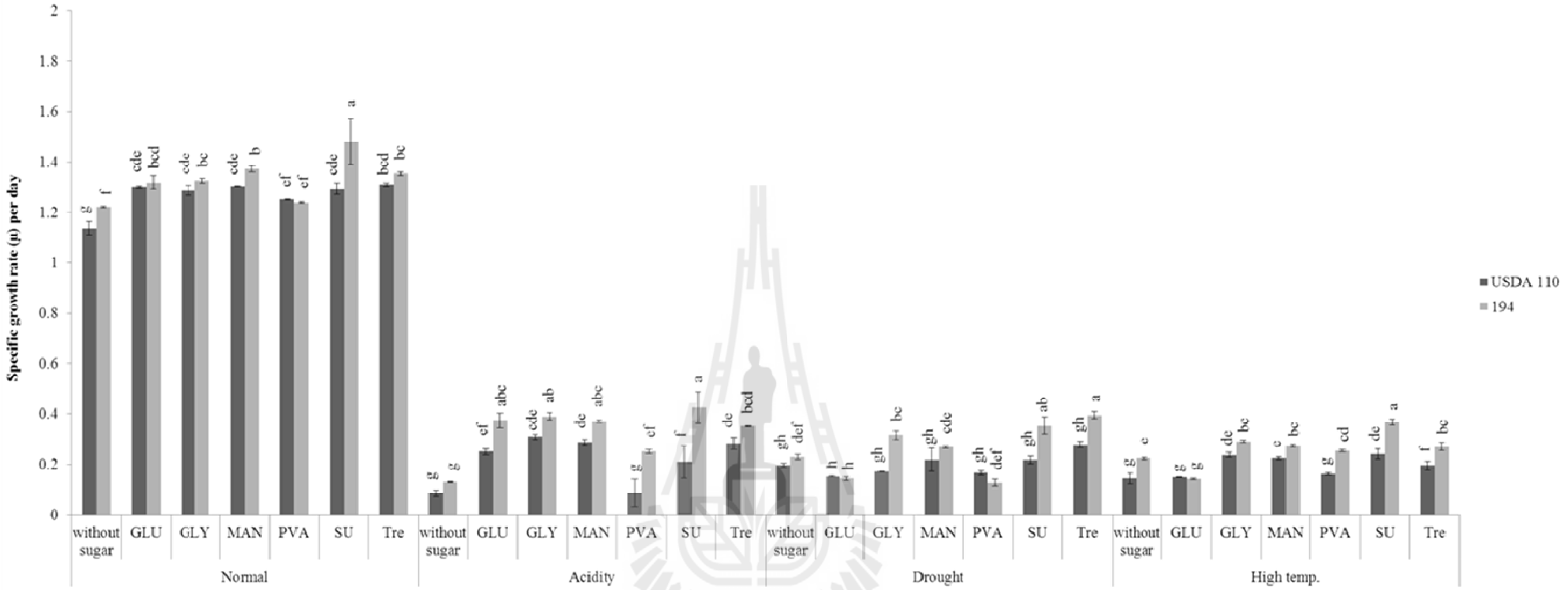
รูปที่ 3.2กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเข้าสร้างปมของเชื้อผสมระหว่าง เชื้อไอโซเลท 194 และ USDA 110 ภายใต้สภาวะที่ใช้ปลูกถั่วเหลืองแบบต่างๆ

3.5 ผลเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญของเชื้อแบรดีไรโซเบียมที่คัดเลือกในสภาวะเครียด โดยการเสริม Compatible solute

เพื่อตรวจสอบชนิดน้ำตาลที่เหมาะสมในการใช้เป็น compatible solute และส่งเสริมการเจริญของเชื้อไรโซเบียมในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ จึงได้ทำการทดลองโดยนำน้ำตาลชนิดต่าง ๆ คือ กลูโคส (GLU), กลีเซอรอล (GLY), แมนนิทอล (MAN), โพลีไวนิลแอลกอฮอลล์ (PVA), ซูโครส (SU), และทรีฮาโรส (Tre) มาเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (mM) แล้วตรวจสอบการเจริญภายใต้สภาวะปกติและสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบจากอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ (specific growth rate, μ) ในสภาวะต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 3.3 โดยผลการทดลองพบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อไรโซเบียมทั้งไอโซเลท 194 และ USDA110 ลดลงเมื่อถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียด โดยการเสริมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ไม่สามารถช่วยให้เชื้อเจริญได้เทียบเท่ากับการเจริญภายใต้สภาวะปกติ อย่างไรก็ตามพบว่าการเสริมน้ำตาลบางชนิดส่งผลให้อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อดีกว่าการไม่เสริมน้ำตาลเชื้อไรโซเบียมไอโซเลท 194 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่า USDA110 ในทุกสภาวะ โดยในสภาวะปกติพบว่าน้ำตาลซูโครส สามารถส่งเสริมให้เชื้อไรโซเบียมไอโซเลท 194 เจริญได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ในการทดสอบในสภาวะกรดพบว่าการเสริมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลทุกชนิดส่งผลให้ไอโซเลท 194 เจริญได้ดีกว่าตำรับที่ไม่ได้เสริมน้ำตาล โดยการเสริมด้วยน้ำตาลซูโครสให้ผลการเจริญสูงสุด สำหรับการทดสอบในสภาวะแห้งแล้งพบว่าการเสริมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลกลีเซลรอล ซูโครส และทรีฮาโลส สามารถเพิ่มอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อไอโซเลท 194 ได้ดีกว่าการไม่เสริมน้ำตาลอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่สามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อ USDA110 ในสภาวะแห้งแล้งได้ และเมื่อทดสอบการเจริญในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงพบว่าการเสริมด้วยน้ำตาลซูโครสสามารถทำให้เชื้อไรโซเบียมไอโซเลท 194 มีการเจริญได้ดีที่สุดและแตกต่าง

อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการเสริมด้วยน้ำตาลชนิดอื่น หรือการไม่เสริมน้ำตาล ดังนั้นจะเห็นได้ว่าน้ำตาลซูโครสมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อไรโซเบียมไอโซเลท 194 ได้ดีทั้งในสภาวะปกติ และสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ ดังนั้นจึงคัดเลือกน้ำตาลซูโครสเพื่อทำการทดสอบหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อภายใต้สภาวะเครียดต่อไป และเมื่อทำการทดสอบพบว่าระดับของน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ (mM) สามารถส่งเสริมให้เชื้อไรโซเบียมไอโซเลม 194 มีการเจริญในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ ได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ 300 มิลลิโมลาร์ ในการศึกษาเพื่อพัฒนาหัวเชื้อไรโซเบียมต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.3แสดงผลของอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate (μ)) ที่มีการเสริมและไม่เสริม compatible solute ทั้ง 6 ชนิด ภายใต้สภาวะเครียดแบบต่างๆ ระหว่างเชื้อไฮโซเลท 194 และ USDA 110 โดยเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ได้เสริม

*****ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานคำนวณจากการทดลอง 3 ซ้ำ และค่าค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันที่ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$

3.6 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลภายในเซลล์ของเชื้อแบรดีไรโซเบียมไอโซเลท 194 โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เมื่อพิจารณาลักษณะกราฟการเจริญของเชื้อไรโซเบียมไอโซเลท 194 ในแต่ละช่วงเวลาร่วมกับผลการวิเคาระห์น้ำตาลที่สะสมอยู่ภายเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 3.4พบว่าการสะสมน้ำตาลของเชื้อที่มีการเติม และไม่เติมน้ำตาลอยู่ในระดับใกล้เคียงกันในการเลี้ยงภายใต้สภาวะปกติ และพบว่ามีการสะสมน้ำตาลหลายชนิด เช่น น้ำตาลซูโครส แมนนิทอล กลูโคส และทรีฮาโลสในเชื้อที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสในช่วง 2-10 วันของการเจริญ ในขณะที่น้ำตาลแมนนิทอล และกลูโคสพบว่าเป็นน้ำตาลส่วนใหญ่ที่พบในเชื้อไรโซเบียมที่ไม่ได้มีการเสริมน้ำตาลซูโครส (รูปที่ 3.4a)

ในสภาวะกรดพบว่าเชื้อไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้นแต่สามารถดำรงชีวิตอยู่ในระดับ 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อที่มีการเสริมน้ำตาลซูโครสมีปริมาณเซลล์มากกว่า และเมื่อวิเคราะห์น้ำตาลที่สะสมในเซลล์พบว่าเชื้อไรโซเบียมไอโซเลท 194 ที่มีการเสริมน้ำตาลซูโครส มีการสะสมน้ำตาลซูโครส แมนนิทอล กลูโคส และทรีฮาโลส ในวันที่ 4-6 ของการเจริญ ในขณะที่พบเพียงการสะสมน้ำตาลแมนนิทอล และกลูโคสในเชื้อที่ไม่มีการเสริมน้ำตาลซูโครส แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ของเชื้อที่มีการเสริมด้วยน้ำตาลซูโครสสามารถช่วยให้เชื้อไรโซเบียมดำรงชีวิตในสภาวะกรดได้ดีขึ้น (รูปที่ 3.4b)

ในสภาวะแห้งแล้ง จากการวิเคราะห์น้ำตาลพบว่าการใช้ซูโครสเสริมทำให้จุลินทรีย์มีปริมาณน้ำตาลสะสมอยู่ในเซลล์สูงกว่าการไม่ให้น้ำตาลซูโครส และพบว่าถ้าไม่ใส่น้ำตาลซูโครส สามารถวิเคราะห์น้ำตาลได้เพียงสองชนิด ได้แก่ แมนนิทอล และกลูโคส การใช้น้ำตาลซูโครสทำให้การ uptake ของน้ำตาลซูโครสเข้าไปในเซลล์สูงขึ้นในวันที่ 2-10 และยังพบน้ำตาลทรีฮาโลส และกลีเซลรอล เพิ่มขึ้นในวันที่ 6-10 และการเจริญของเชื้อไรโซเบียมก็สูงขึ้นเช่นกัน (รูปที่ 3.4c)

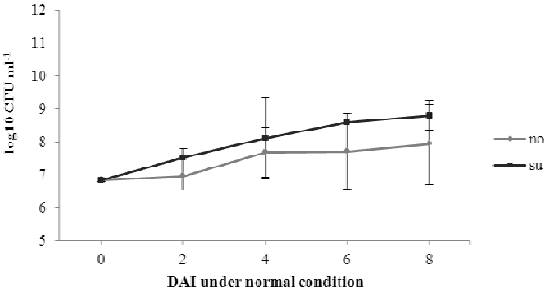
ในสภาวะอุณหภูมิสูง พบว่าเชื้อไรโซเบียมที่มีการเสริมน้ำตาลซูโครสสามารถเจริญได้ดีกว่าตำรับที่ไม่มีการเติมน้ำตาล และเมื่อวิเคราะห์น้ำตาลภายในเซลล์ พบว่าในการเจริญช่วงวันที่ 2-8 มีการสะสมน้ำตาลกลีเซอรอล ทั้งในเชื้อที่มีการเสริมและไม่เสริมน้ำตาลซูโครส แต่พบว่ามีการสะสมน้ำตาลกลีเซอรอลลดลงในวันที่ 10 ในเชื้อที่ไม่ได้เสริมซูโครสซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของเชื้อที่ลดลง ในขณะที่เซลล์ที่มีการเสริมน้ำตาลซูโครส มีปริมาณน้ำตาลทุกชนิดที่สะสมในเซลล์เพิ่มขึ้นในวันที่ 10 ของการเลี้ยง

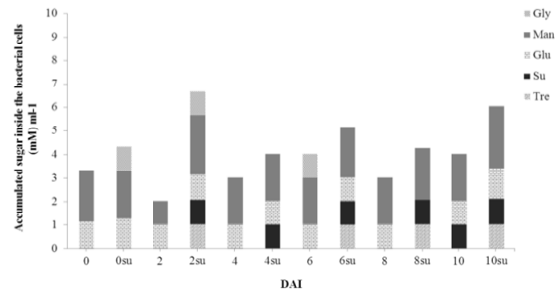
ทั้งนี้การสะสมน้ำชนิดต่างๆ ภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีการเจริญในสภาวะแตกต่างกันนั้น มีหลายงานวิจัยที่ศึกษาว่า การสะสมของสารภายในเซลล์แบคทีเรีย มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะที่เชื้อเจริญ และการปรับตัวเพื่อให้เซลล์สามารถอยู่รอด สามารถเจริญได้แม้ในสภาวะเครียด (Pedro et al., 1998) ส่วนการสะสมน้ำตาลที่พบในเซลล์ที่เจริญในสภาวะเครียดนั้นคาดว่าเซลล์แบคทีเรียมีการสะสมได้ด้วยการดูดซึมเอาสารที่อยู่รอบๆ เซลล์ เพื่อใช้ปรับระดับสมดุลของออสโมซิสภายใน และภายนอกเซลล์ให้กลับมาคงที่ (Gouffi et al., 1998) ยกตัวอย่างเช่นการสะสมน้ำตาล ซูโครส ทรีฮาโรส และสารในกลุ่มโพลีออล เช่น แมนนิทอล หรืออินโอสิทอล เป็นต้น (Matthias, 2008) นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อแบคทีเรียเองก็มีกระบวนการในการสังเคราะห์สารกลุ่มดังกล่าวเพื่อช่วยในการปกป้องเซลล์ให้อยู่รอดได้ในสภาวะเครียด โดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า *de novo* ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อเชื้อมีการเจริญในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญอย่างสภาวะเครียด

(Miller and Wood, 1996) โดยการนำสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมทาบอลิซึม และหรือเป็นสารที่เชื้อสามารถดูดซึมจากอาหาร หรือสิ่งแวดล้อมทั้งนี้ในแต่ละสภาวะเครียดที่เชื้อจะเจริญ ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารภายในเซลล์ที่แตกต่างกัน โดยที่กระบวนการที่เชื้อมีการสร้างความแข็งแรงให้กับเยื่อหุ้มเซลล์ และมีการสะสมสารในกลุ่มที่ขั้วบวก-ลบภายในเซลล์เพิ่มขึ้นนั้น พบในเซลล์ของเชื้อที่เจริญในสภาวะกรด (Boscari et al., 2002) ส่วนการสะสมสารกลุ่มที่มีโครงสร้างสมดุล หรือเสถียร และมีโครงสร้างที่ยึดติดกับโมเลกุลของน้ำได้ดี และไม่ได้เลย มักจะพบในเซลล์เชื้อที่มีการเจริญแบบสภาวะที่เกิดจากผลของแรงดันออสโมติก เช่น เกลือ แห้งแล้ง และที่อุณหภูมิสูง (Rosalind et al., 2006) จากข้อมูลการวิจัยเหล่านี้สอดคล้องกับการศึกษาในงานวิจัยนี้ ทำให้สามารถเข้าใจถึงกระบวนการที่เชื้อใช้ในการป้องกันเซลล์จากสภาวะเครียด

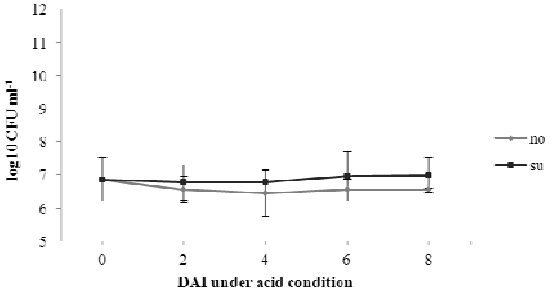
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

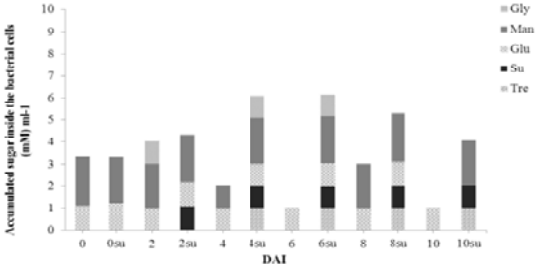
(a) Normal condition



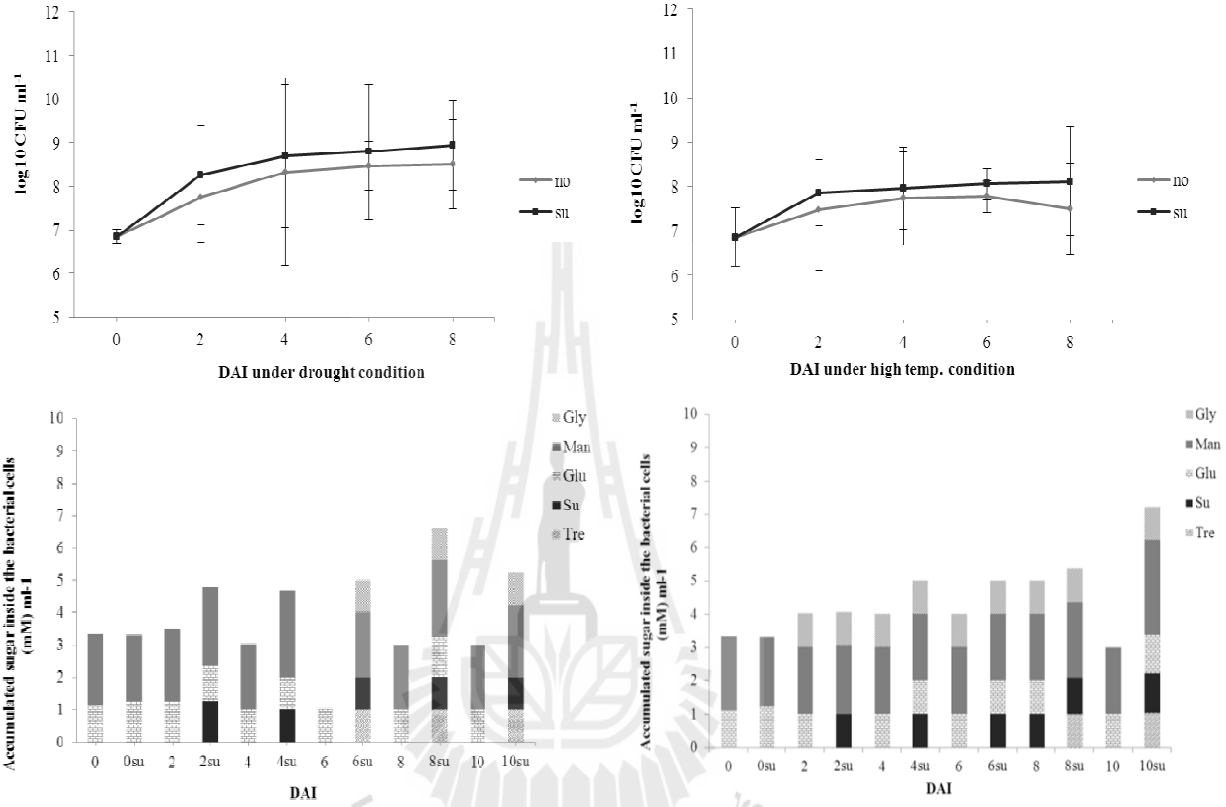


(b) Acid condition





(c) Drought condition (d) High temperature



รูปที่ 3.4ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลภายในเซลล์ของเชื้อแบรดีไรโซเบียมไอโซเลท 194 ที่เจริญในสภาวะเครียดแบบต่างๆ

บทที่ 4
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของหัวเชื้อไรโซเบียม เพื่อเป็นปุ๋ยชีวภาพให้กับการปลูกถั่วเหลืองภายใต้สภาวะเครียด สามารถสรุปผลการวิจัยได้ดังนี้

1. สามารถคัดเลือกเชื้อแบรดีไรโซเบียมสายพันธุ์ที่อยู่รอดได้ในสภาวะเครียดต่าง ๆ เช่น สภาวะกรด สภาวะแล้ง และสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง เชื้อที่คัดเลือกได้คือ เชื้อแบรดีไรโซเบียม ไอโซเลท 194 มี
2. เชื้อที่คัดเลือกได้นี้มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองได้ดีในสภาวะแล้งทั้งการทดสอบในทรายและในดิน

3. เชื้อที่คัดเลือกได้นี้สามารถเข้าสร้างปม(percent of nodule occupancy) ได้ดีกว่าเชื้อแบรดีไรโซเบียมมาตรฐาน USDA110 ทั้งในสภาวะการปลูกแบบปกติ และสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ

4. สารกลุ่มcompatible soluteสามารถเพิ่มการอยู่รอดของเชื้อไอโซเลท 194ในสภาวะปกติ และสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ ได้ โดยผลการทดลองพบว่าน้ำตาลซูโครสที่เสริมในระหว่างการเลี้ยงเชื้อในสภาวะเครียด ช่วยให้อัตราการเจริญของเชื้อในสภาวะเครียดดีกว่าการเจริญของเชื้อที่ไม่ได้เสริมซูโครส

5. ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบรดีไรโซเบียมในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ คือ 300 มิลลิโมลลาร์

6. เชื้อแบรดีไรโซเบียมที่เลี้ยงในอาหารที่มีการเสริมด้วยน้ำตาลซูโครส พบว่ามีการสะสมน้ำตาลหลายชนิดภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่เป็น compatible solute ซึ่งการสะสมน้ำตาลภายในเซลล์นี้สัมพันธ์กับการเจริญและการอยู่รอดของเซลล์ภายใต้สภาวะเครียดแบบต่าง ๆ

7. สภาวะเครียดที่แตกต่างกันส่งผลต่อปริมาณซูโครส ทรีฮาโรส กลูโคส แมนนิทอล และกลีเซอรอลที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะที่สภาวะแล้ง เมื่อมีการเสริมน้ำตาลซูโครส น้ำตาลจะสะสมอยู่ในเซลล์ และพบว่ามีการสะสม ทรีฮาโรส กับ กลีเซอรอล ในระหว่างการเจริญ และในสภาวะอุณหภูมิสูงที่มีการเสริมด้วยน้ำตาล พบว่ามีการสะสมของ กลีเซอรอล ในทุกช่วงของการเจริญ เมื่อเทียบกับเชื้อที่ไม่มีการเสริมซูโครส

8. น้ำตาลกลีเซอรอล และทรีฮาโลส สามารถถูกสังเคราะห์ได้ภายในเซลล์โดยการใช้น้ำตาลซูโครสเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นแหล่งของ compatible solute ภายนอกเซลล์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ข้อเสนอแนะ

1. เพื่อเป็นการพัฒนาหัวเชื้อให้มีประสิทธิภาพ ควรมีการทดลองและศึกษาการส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบรดีไรโซเบียมกับถั่วเหลืองในสภาพดินแบบต่าง ๆ ต่อไป รวมทั้งควรนำไปทดสอบในสภาพไร่
2. ควรมีการพัฒนาหัวเชื้อบราดีไรโซเบียม ในรูปแบบปุ๋ยชีวภาพที่สามารถนำไปใช้ได้จริง โดยควรพัฒนาในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ วัสดุพาหะ และตรวจสอบอายุการเก็บรักษาเพื่อเป็นแนวทางในการใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับการปลูกถั่วเหลืองต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

Boscari, A., K. Mandon, L. Dupont, M. C. Poggi, and D. Le Rudulier. (2002). BetS is a major glycine betaine/proline betaine transporter required for early osmotic adjustment in *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 184: 2654–2663.

Botha, W. J., J. B. Jaftha, J. F. Bloem, J. H. Habig and I. J. Law (2004). "Effect of soil bradyrhizobia on the success of soybean inoculant strain CB 1809." Microbiol Res 159(3): 219-231.

Boumahdi, M., P. Mary and J. P. Hornez (1999). "Influence of growth phases and desiccation on the degrees of unsaturation of fatty acids and the survival rates of rhizobia." Appl Micro 87(4): 611-619.

Chen, Z., T. A. Cuin, M. Zhou, A. Twomey, B. P. Naidu and S. Shabala (2007)."Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance."Experimental Botany 58(15-16): 4245-4255.

Daniel, L. R. (2005). Osmoregulation in rhizobia: the key role of compatible solutes. Grain legumes. 42: 18-19.

Dimkpa, C., T. Weinand and F. Asch (2009). "Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions." Plant, Cell & Environment 32(12): 1682-1694.

Duncan, D. B. (1955)."Multiple range and multiple F tests."Biometrics 11(1): 1-42.

Gouffi, K., N. Pica, V. Pichereau and C. Blanco (1999)."Disaccharides as a new class of nonaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*."Appl Environ Microbiol 65(4): 1491-1500.

Indrasumunar, A., P. J. Dart and N. W. Menzies (2011). "Symbiotic effectiveness of *Bradyrhizobium japonicum* in acid soils can be predicted from their sensitivity to acid soil stress factors in acidic agar media." Soil Biology and Biochemistry 43(10): 2046-2052.

Jennings, D. H. and R. M. Burke (1990)."Compatible solutes – the mycological dimension and their role as physiological buffering agents."New Phytologist 116(2): 277-283

Krause, A., A. Doerfel and M. Gottfert (2002)."Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*."Mol Plant Microbe Interact 15(12): 1228-1235.

Kempf B., Bremer E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. Arch. Microbiol. 170: 319-330.

Kucey, R. M. N., P. Snitwongse, P., Chaiwanakupt, P., Wadisirisuk,P. , SiripaiboolC., Arayangkool, T., Boonkerd, N. and Rennie, R. J. (1988) Nitrogen fixation (^{15}N dilution) with soybeans under Thai field conditions. Plant and Soil.108: 33-41.

Lai, M. C., K. R. Sowers, D. E. Robertson, M. F. Roberts and R. P. Gunsalus (1991)."Distribution of compatible solutes in the halophilic methanogenic archaebacteria."Bacteriol 173(17): 5352-5358.

Le Rudulier, D. (2005). "Osmoregulation in rhizobia: The key role of compatible solutes." Grain Legume 42: 18-19.

Louis, P. and E. A. Galinski (1997)."Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*."Microbiology 143(4): 1141-1149.

Matthias, K. (2008). Compatible solute influence on nucleic acids: Many questions but few answers. Saline systems. 4: 1-14

Miller KJ, Wood JM (1996) Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. Annu Rev Microbiol 50:101–136

Payakapong, W., P. Tittabutr, N. Teaumroong and N. Boonkerd (2004). "Soybean cultivars affect nodulation competition of *Bradyrhizobium japonicum* strains." Microbiology and Biotechnology 20(3): 311-315.

Poolman, B. and Glaasker, E. (1998).Regulation of compatible solute accumulation in Bacteria.Mol Microbiol. 29: 397-407.

Rassam, D. and F. Cook (2002). "2. Numerical simulations of water flow and solute transport applied to acid sulfate soils." Irrigation and drainage engineering 128(2): 107-115.

Roland, T., Mohamed, J., Gwenola, G., Souad, H., Henri, W., Carlos, B., and Th.ophile, B. (1994). Osmoadaptation in Rhizobia: Ectoine-Induced Salt Tolerance.Bacteriol 176: 5210-5217.

Rosalind, D., Rodney, J. R., and Ivan, R. K. (2007).Desiccation tolerance of rhizobia when protected by synthetic polymers. Soil Bio & Biochem. 39: 573–580.

Sadowsky, M. J. (2000). Competition for nodulation in the soybean /Bradyrhizobium symbiosis. In: E. W. Triplett (ed.). Prokaryotic nitrogen fixation: A model system for analysis of biological process. (pp. 279-294). Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.

Sangproo, M., P. Polyiam, S. S. Jantama, S. Kanchanatawee and K. Jantama (2012). "Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* M5a1 to produce optically pure d-lactate in mineral salts medium." Bioresource Technology 119(0): 191-198.

Shetty, K. G., B. A. D. Hetrick and A. P. Schwab (1995)."Effects of mycorrhizae and fertilizer amendments on zinc tolerance of plants."Environmental Pollution 88(3): 307-314.

Stephens, J. H., and H. M. Rask.(2000). Inoculant production and formulation.Field Crops Research.

Smith, L. T., J.-A.Pocard, T. Bernard and D. Le Rudulier (1988)."Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*."Bacteriol 170(7): 3142-3149.

Somasegaran, P. and H. J. Hoben (1994). Handbook for Rhizobia : methods in legume-rhizobium technology. New York, Springer-Verlag.

Talibart, R., M. Jebbar, G. Gouesbet, S. Himdi-Kabbab, H. Wroblewski, C. Blanco and T. Bernard (1994). "Osmoadaptation in rhizobia: ectoine-induced salt tolerance." Bacteriol 176(17): 5210-5217.

Wei, G. H., Yang, X. Y., Zhang, Z. X., Yang, Y. Z. and LINDSRÖM, K, (2007). Strain Mesorhizobium sp. CCNWGX035: A stress-tolerant isolate from *Glycyrrhiza glabra* displaying a wide host range of nodulation. Mole Bio for Agri 18;102-112.

Wilson, K. J., A. Sessitsch, J. C. Corbo, K. E. Giller, A. D. Akkermans and R. A. Jefferson (1995). "β-Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria."Microbiology 141(7): 1691-1705.

Yardin, R., I. R. Kennedy, and J. E. Thies. (2000). Development of high quality carrier materials for field delivery of key microorganisms used as bio-fertilisers and bio-pesticides. Radiation Physics and Chemis

Zahran, H. H., (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate.Micro &Mol , 63: 968–989.

Zare, M. (2012)."Evaluation of drought tolerance indices for the selection of Iranian barley (*Hordeum vulgare* L.)cultivars." African Journal of Biotechnology 11(93): 15975-15981.

ประวัติคณะผู้วิจัย

นางสาวพรรณลดา ติตตะบุตร (MissPanladaTittabutr) ปัจจุบันดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ม.เทคโนโลยีสุรนารี จบการศึกษาระดับปริญญาตรีสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ม.เทคโนโลยีสุรนารีปีการศึกษา 2541 และระดับปริญญาเอก สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ม.เทคโนโลยีสุรนารี ปีการศึกษา 2548 มีความชำนาญทางด้าน Nitrogen fixation technology, Inoculant production technology, Microbiology and Molecularmicrobiologyมีประสบการณ์ในการเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัยเรื่องการเพิ่มประสิทธิภาพของแหนแดงในการเป็นปุ๋ยพืชสดเพื่อใช้ในนาข้าว และเป็นหัวหน้าโครงการวิจัยต่าง ๆ เช่นการประยุกต์ใช้แนวทางต่าง ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของหัวเชื้อไรโซเบียมในการแข่งขันเพื่อเข้าสร้างปมกับพืชตระกูลถั่ว,การทดสอบประสิทธิภาพของการใช้หัวเชื้อไรโซเบียมที่ปรับปรุงแล้วในระดับกระถาง,ผลของเอทธิลีน และการใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase ร่วมกับหัวเชื้อไรโซเบียม ต่อการเจริญของพืชตระกูลถั่วภายใต้สภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียดกับพืช, การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส และผลกระทบที่มีต่อโครงสร้างจุลินทรีย์ท้องถิ่นภายในดิน และผลผลิตของพืช,การปรับปรุงปุ๋ยชีวภาพ PGPR และไมคอร์ไรซ่าให้ทนต่อสภาวะเครียดที่เกิดจากภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง และการตรวจสอบกลไกการดำรงอยู่ของเชื้อ และผลกระทบของภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงต่อโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์บริเวณรอบรากพืช ทั้งนี้สามารถติดต่อได้ที่ โทรศัพท์ 044-224159 โทรสาร 044-224154E-mail panlada@sut.ac.th

ผลงานทางวิชาการ

PanladaTittabutr, PongdetPiromyou, AphakornLongtonglang, RujirekNoisa-ngiam, NantakornBoonkerd, and NeungTeaumroong. (2013). Alleviation of the effect of environmental stresses using co-inoculation of mungbean by bradyrhizobium and rhizobacteria containing stress induced ACC deaminase enzyme. Soil Science and Plant Nutrition.Accepted.

NantidaWatanarojanaporn, NantakornBoonkerd, PanladaTittabutr, AphakornLongtonglang, Peter W. Young, NeungTeaumroong (2013). Effect of rice cultivation systems on indigenous arbuscularmycorrhizal fungal community structure. Microbes Environ. 28(3): Accepted.

ThiThiAung, PanladaTittabutr, NantakornBoonkerd, David Herridge, NeungTeaumroong. (2013) Co-inoculation effects of *Bradyrhizobiumjaponicum* and *Azospirillum* sp. on competitive nodulation and rhizosphereeubacterial community structures of soybean under rhizobia-established soil conditions. African Journal of Biotechnology. 12(20): 2850-2862.

MonchaiManassila, AcharaNuntagij, PanladaTittabutr, NantakornBoonkerd, NeungTeaumroong (2012). Growth, symbiotic, and proteomics studies of

soybean *Bradyrhizobium* in response to adaptive acid tolerance. African Journal of Biotechnology. 11: 14899-14910.

PanladaTittabutr, KamonluckTeamthisong, BanchaBuranabanyat, NeungTeaumroong, NantakornBoonkerd (2012). Gamma irradiation and autoclave sterilization peat and compost as the carrier for rhizobial inoculant production.Journal of Agricultural Science.4: 59-64.

RujirekNoisangiam, KamonluckTeamtisong, PanladaTittabutr, NantakornBoonkerd, Uchiumi Toshiki, KiwamuMinamisawa and NeungTeaumroong (2012). Genetic diversity, symbiotic evolution, and proposed infection process of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Aeschynomeneamericana* L. in Thailand. Appl. Environ. Microbiol. 78: 6236-6250.

WatcharinYuttavanichakul, PruksaLawongsa, SoponeWongkaew, NeungTeaumroong, NantakornBoonkerd, Nobuhiko Nomura, PanladaTittabutr. (2012). Improvement of peanut rhizobial inoculant by incorporation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biocontrol against the seed borne fungus, *Aspergillusniger*. Biological Control.63: 87-97.

JenjiraWongdee, NantakornBoonkerd, NeungTeaumroong, and PanladaTittabutr.(2012). Improving of Bradyrhizobial inoculant for soybean cultivation under environmental stress conditions.Burapha University International Conference 2012, Burapha University, Thailand, July 9-11, 2012. (full paper).

พรรณลดา ติตตะบุตร (2555). ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ และการนำไปใช้. วารสารเกษตรสุรนารี'55. บทความ. หน้า 53-60.

Tittabutr, P., Cho, I. K. and Li Q. X. (2011).Phn and nag-like dioxygenase metabolize polycyclic aromatic hydrocarbons in *Burkholderia* sp. C3. Biodegradation. 22(6): 1119-1133.

Piromyou, P., Buranabanyat, B., Tantasawat, P., Tittabutr, P., Boonkerd, N. and Teaumroong, N. (2011). Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. European J. Soil Biol. 47: 44-54.

W. Yuttavanichakul, S. Wongkaew, N. Teaumroong, N. Boonkerd and P. Tittabutr. (2010). Improvement of rhizobial inoculants by incorporation biocontrol of seed borne pathogenic fungi of peanut. In Proceeding of The 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. Organized by King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) and Khonkaen University Nongkhai Campus, October 4-6, 2010.Pattaya, Chonburi, Thailand.pp.30-38. (full paper)

พงษ์เดช ภิรมย์อยู่, อาภากร หล่องทองหลาง, สมพร ชุนห์ลือชานนท์, พรรณลดา ติตตะบุตร, โสภณ วงศ์แก้ว, นันทกร บุญเกิดและหนึ่ง เตียอำรุง. (2553). การใช้ *Bacillus subtilis*เพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดฝักอ่อน. วารสารแก่นเกษตร 38: 155-162.

Tanthanuch, W., Tittabutr, P., Mohammed, S., Matthisen, R., Yamabhai, M., Manassila, M., Jensen, O. N., Boonkerd, N. and Teaumroong, N. (2010). Identify of salt-tolerant Sinorhizobium sp. Strain BL3 membrane proteins based on proteomics. Microbes Environ. 25(4): 275-280.

พรรณลดา ติตตะบุตร (2552). แนวทางการพัฒนาปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม “ทำอะไรได้มากกว่าการตรึงไนโตรเจน”. วารสารเกษตรสุรนารี’52. บทความ. หน้า 27-34.

พรรณลดา ติตตะบุตร, กมลลักษณ์ เทียมไธสง, วชิราภรณ์ ผิวล่อง, หนึ่ง เตียอำรุง, สิรินาฎ เลาหะโรจนพันธ์และ นันทกร บุญเกิด (2552). การใช้รังสีแกมมาเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนในวัสดุพาหะที่ใช้ในการผลิตหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพ. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีนิวเคลียร์ ครั้งที่ 11. pp.BA03: 1-10. (บทความฉบับเต็ม)

J. D. Awaya, Tittabutr P., Q. X. Li, and D. Borthakur. (2008). Pyruvate carboxylase is involved in metabolism of mimosine to 3-hydroxy-4-pyridone by *Rhizobium* sp. strain TAL1145. Archives in Microbiology 190: 409-415.

Tittabutr P., J. D. Awaya, Q. X. Li, and D. Borthakur. (2008). The cloned 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase from *Sinorhizobium* sp. strain BL3 in *Rhizobium* sp. strain TAL1145 promotes nodulation and growth of *Leucaenaleucocephala*. Systematic and Applied Microbiology 31: 141-150.

Tittabutr P., W. Payakapong, N. Teaumroong, P.W. Singleton, and N. Boonkerd. (2007). Growth, survival and field performance of Bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. ScienceAsia. 33: 069-077.

Tittabutr P., W. Payakapong, N. Teaumroong, N. Boonkerd, P. W. Singleton, and D. Borthakur. (2006). The alternative sigma factor RpoH2 is required for salt tolerance in *Sinorhizobium* sp. strain BL3. Research in Microbiology. 157: 811-818.

Payakapong W., P. Tittabutr, N. Teaumroong, N. Boonkerd, P. W. Singleton, and D. Borthakur. (2006). Identification of two clusters of genes involved in salt tolerance in *Sinorhizobium* sp. strain BL3. Symbiosis. 41: 47-53.

Tittabutr P., W. Payakapong, N. Teaumroong, N. Boonkerd, P. W. Singleton, and D. Borthakur. (2006). Ahistidine kinase sensor protein gene is necessary for induction of low pH tolerance in *Sinorhizobium* sp. strain BL3. Antonie van Leeuwenhoek. 89(1): 125-134.

Tittabutr P., W. Payakapong, N. Teaumroong and N. Boonkerd. (2005). Development of rhizobial culturing media production by using low-cost starch compounds as

a sole of carbon source. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 21: 823-829.

Kaufusi P. H., L. S. Forsberg, P. Tittabutrand D. Borthakur. (2004). Regulation of exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium* sp. strain TAL1145 involves an alternative sigma factor gene, *rpoH2*. Microbiology, 150: 3473-3482.

Payakapong W., Tittabutr P., Teaumroong N., Boonkerd N. (2004). Soybean cultivars affect nodulation competition of *Bradyrhizobiumjaponicum* strains. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 20: 311-315.

Payakapong W., Tittabutr P., Boonkerd N. (2003). Strain-specific antisera to identify Thai *Bradyrhizobiumjaponicum* strains in preserved soybean nodules. World Journal of Microbiology& Biotechnology. 19: 981-983.

Tittabutr P., W. Payakapong, N. Teaumroong and N. Boonkerd. (2002-2003) Development of Rhizobial inoculant production and formulation: Dilution technique and solid state fermentation. In Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in Tropics. 16: 105-112.

Tittabutr P., W. Payakapong, N. Teaumroong and N. Boonkerd. (2001) Development of Rhizobial inoculant production and formulation: Carbon sources utilization and sugar producing from various raw starch materials by using amylase-producing fungi. In Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in Tropics. 15: 197-200.

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช (Screening Rhizobia that can Inhibit the Growth of Plant Pathogenic Microorganisms). สถาบันวิจัยและพัฒนา. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. เมษายน 2554.

โครงการผลิตปุ๋ยอินทรีย์จากเปลือกไม้ยูคาลิปตัส (Production of Organic Fertilizer from Eucalyptus Bark). โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และบริษัทสุวรรณภูมิวู๊ดชิพ จำกัด. กันยายน 2554.

โครงการ ผลของเอทธิลีน และการใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase ร่วมกับหัวเชื้อไรโซเบียม ต่อการเจริญของพืชตระกูลถั่วภายใต้สภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียดกับพืช. สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนันสนุนการวิจัย. เมษายน 2555.

โครงการการผลิตปุ๋ยอินทรีย์เคมีจากเปลือกไม้ยูคาลิปตัส (Production of Chemo-Organic Fertilizer from Eucalyptus Bark). โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และบริษัทคลัสเตอร์ต้นน้ำทุ่งกุลาออร์แกนิกส์ จำกัด. กรกฎาคม 2555.

โครงการการศึกษาความหลากหลายของพืชตระกูลถั่ว และเชื้อไรโซเบียมที่อาศัยในปมราก บริเวณเขื่อนน้ำพุง (Diversity of Leguminous Plants and their associated root nodule rhizobia at Numpung Dam). มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. ตุลาคม 2555.

โครงการการผลิตปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยอินทรีย์เคมีจากวัสดุในท้องถิ่น (Production of Organicand Chemo-organic Fertilizer from Local materials). โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และบริษัทอินเตอร์อโกรเทค (ประเทศไทย) จำกัด. มิถุนายน. 2556.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี