

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ประเทศไทยมีการใช้หัวเชื้อไรโซเบียมเพื่อเพิ่มผลผลิตของถั่วเหลืองมานานแล้ว โดยเชื้อแบคทีเรียชนิด แบรดีโรโซเบียมเป็นแบคทีเรียที่มีความจำเพาะกับถั่วเหลืองในการเข้าสร้างปม และมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนในอากาศเพื่อเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบไนโตรเจนให้กับต้นถั่วเหลืองเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต การนำหัวเชื้อไปใช้ก็มีหลากหลายรูปแบบ ทั้งใช้ผสมกับพีท (peat) (Stephens และ Rask, 2000) ก่อนจะนำไปคลุกกับเมล็ดถั่วเหลืองเพื่อลงแปลงปลูก หรือใช้ในรูปแบบของเหลว โดยนำไปผสมกับเมล็ดในอัตราส่วนที่แนะนำ หากจำนวนเซลล์ของเชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน สามารถเกาะอยู่บริเวณรอบผิวของเมล็ดถั่วเหลืองในจำนวนมากกว่า 10^6 เซลล์/เมล็ด ทำให้อัตราการเข้าสร้างปมเพื่อส่งเสริมประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนให้กับพืชสูงขึ้น (Kucey, 1988) ทั้งนี้การมีประสิทธิภาพดังกล่าวขึ้นอยู่กับปัจจัยหลักดังนี้ ปัจจัยทางชีวภาพ (Biotic factors) เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิต ทั้งในด้านชนิด และปริมาณ ที่มีความสัมพันธ์กันทางด้านใดด้านหนึ่ง ในกรณีนี้ได้แก่ ชนิดพันธุ์ของถั่วเหลือง, เชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมที่คัดเลือก และจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินหรือบริเวณรอบๆ ที่ปลูกถั่วเหลือง ปัจจัยที่ไม่ใช่ด้านชีวภาพ (Abiotic factors) หมายถึง สิ่งแวดล้อมในแหล่งที่อยู่อาศัย ที่มีผลต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต เช่น อุณหภูมิ สารอาหาร ความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง ความเค็ม เป็นต้น (Sadowsky, 2000) ในโครงการวิจัยนี้ ต้องการพัฒนาหัวเชื้อไรโซเบียมให้มีคุณสมบัติในการทนต่อ Abiotic factors เนื่องจากเราไม่สามารถควบคุมหรือกำหนดสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติให้เหมาะสมต่อการปลูกถั่วเหลืองได้ ดังนั้น ในการปลูกถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนได้สูง แต่ไม่สามารถทนต่อสภาวะเครียดจากสภาพแวดล้อม อาจทำให้ไม่ประสบความสำเร็จในการเข้าสร้างปม และการตรึงไนโตรเจนกับพืชในที่สุด (Zahran, 1999) การคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่สามารถทนต่อสภาวะเครียดได้ และการปรับปรุงหัวเชื้อโดยการเสริมสารประกอบต่างๆ ที่เรียกว่า compatible solute หรือ osmoprotectant เพื่อให้เชื้อไรโซเบียมทนต่อสภาวะเครียด จึงเป็นแนวทางที่นำมาใช้ในการปรับปรุงหัวเชื้อให้มีประสิทธิภาพ (Poolman and Glaeser, 1998) เพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรลดการใช้ปุ๋ยเคมีในการเพาะปลูกถั่วเหลืองในปัจจุบัน ทำให้เกษตรกรสามารถประหยัดต้นทุนการผลิตเนื่องจากเชื้อไรโซเบียมมีราคาถูก และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ไม่มีสารตกค้าง และไม่ก่อให้เกิดการเสื่อมสภาพของดินเมื่อใช้ในระยะเวลา

เชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาวะเครียด มีประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปม และการตรึงไนโตรเจนให้กับถั่วเหลืองได้ดีในสภาวะแวดล้อมแบบเครียด เมื่อปลูกเชื้อจะส่งเสริมให้ต้นถั่วอยู่รอด และเจริญในสภาวะเครียดได้เช่นกัน (Wei et al., 2007) ซึ่งกระบวนการเข้าสร้างปมของเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมกับรากของถั่วเหลืองนั้น เป็นกระบวนการเริ่มต้นที่มีความสำคัญแม้จะอยู่ในสภาวะปกติ หรือสภาวะเครียด แต่ในสภาพแวดล้อมแบบเครียดนั้นจะมีผลกระทบต่อกระบวนการเข้าสร้างปมของเชื้อมากกว่า เนื่องจากสภาวะดังกล่าว สามารถทำให้คุณสมบัติการรักษาสมดุลระดับเซลล์ของเชื้อ

เสียไป (Dimkpa et al. 2009) และทำให้เชื้อตายในที่สุด ดังนั้นเชื้อที่ทนทานต้องมีคุณสมบัติพิเศษในการปรับสมดุลระหว่างสภาวะเครียดภายนอกเซลล์กับภายในเซลล์ให้เป็นปกติได้ โดยอาศัยกลไกต่างๆ ของเซลล์ ทั้งการสร้าง และดูดซึมสารประกอบหลากหลายชนิด โดยจะมีกระบวนการการเก็บสะสมไว้ในเซลล์ และปลดปล่อยออกภายนอกเซลล์เพื่อป้องกันการรบกวนจากสภาวะเครียดแบบต่างๆ (Kempf and Bremer 1998) ทำให้เชื้อสามารถมีชีวิตรอดได้ และเข้าสร้างปมกับถั่วเหลืองได้สำเร็จ การนำเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมที่ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมนี้มาผลิตเป็นหัวเชื้อ เพื่อปลูกถั่วเหลืองในดินที่เริ่มมีการเสื่อมสภาพ ทั้งดินกรด ดินเค็ม หรือดินแห้งแล้ง จะช่วยปรับและฟื้นฟูสภาพแวดล้อมของดินนั้น ๆ ให้กลับมาเป็นปกติได้ โดยหัวเชื้อที่สามารถเข้าสร้างปม และตรึงไนโตรเจนได้ดี จะทำให้การเจริญเติบโตของถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น (Ali et al, 2009) และเมื่อเกษตรกรเก็บเกี่ยวผลผลิตแล้วใช้ต้นถั่วเป็นปุ๋ยพืชสด จะช่วยเพิ่มปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน, เพิ่มธาตุไนโตรเจนซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักให้แก่พืช, บำรุงและรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดิน, รักษาความชุ่มชื้นในดินและให้ดินอุ้มน้ำได้ดีขึ้น, ทำให้ดินร่วนซุย สะดวกในการเตรียมดินและไถพรวน ลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีลงได้

เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของหัวเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมให้ทนต่อสภาวะเครียดมากยิ่งขึ้น ควรมีการทดลอง และปรับปรุงคุณภาพของหัวเชื้อโดยการเสริมสารประกอบ กลุ่ม compatible 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 สภาวะที่มีเกลือสูง หรือแห้งแล้ง (Daniel, 2005) และคุณสมบัติในการป้องกันโครงสร้างของสารโมเลกุลใหญ่ไม่ให้สูญเสียสภาพ เมื่อเจริญในอุณหภูมิสูง และความชื้นต่ำ (Chen et al. 2007) นอกจากน้ำตาลจะช่วยให้เชื้อแบคทีเรียอยู่รอด และป้องกันเซลล์จากสภาวะเครียดได้แล้ว ยังพบว่าน้ำตาลบางชนิดสามารถเป็นแหล่งของคาร์บอน ให้กับเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมได้ (Roland et al, 1994) ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่เชื้อจะสามารถดำรงชีวิตได้นานขึ้น เมื่อใส่เชื้อคลุกกับเมล็ดถั่วลงไปในดินเพื่อรอเข้าสร้างปมกับรากของถั่วเหลืองขณะที่ยังไม่ออก

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมที่ทนต่อสภาวะเครียด
- 1.2.2 เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมที่ทน และมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนให้กับถั่วเหลือง เมื่อเจริญในสภาวะเครียด
- 1.2.3 เพื่อปรับปรุง และเพิ่มประสิทธิภาพของหัวเชื้อไรโซเบียม ให้อยู่รอด และตรึงไนโตรเจนได้ในสภาวะเครียด โดยการเสริมด้วย compatible solute

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การทดสอบเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมที่ทนต่อสภาวะเครียด ต้องแยกทดสอบในแต่ละสภาวะเครียด ได้แก่ สภาวะกรด สภาวะแห้งแล้ง และที่สภาวะอุณหภูมิ เชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในแต่ละสภาวะเครียดสูงๆ จะถูกคัดเลือกเพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการทดลองต่อไป โดยเปรียบเทียบกับเชื้อทางการค้า *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 และเชื้ออ้างอิง *Bradyrhizobium japonicum* CB 1809 ที่มีรายงานว่าสามารถทนต่อสภาวะเครียดได้ โดยการทดสอบเชื้อกับถั่วเหลืองที่ปลูกในทรายที่มีการปรับให้มีสภาวะเครียด และใช้ตัวอย่างดินที่มีสภาวะเครียดเป็นดินกรดร่วมกับการปรับสภาวะเครียดอื่น ๆ ร่วมด้วย จากนั้นวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ เพื่อให้ได้เชื้อที่ทน และมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงให้กับถั่วเหลือง จากนั้นทดสอบเชื้อที่คัดเลือกได้กับ compatible solute ทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ glucose, mannitol, sucrose, trehalose, glycerol, และ Polyvinyl alcohol (PVA) โดยนำมาใช้เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วพิจารณาผลกระทบต่อการอยู่รอด และการเจริญของเซลล์ในแต่ละสภาวะเครียด เพื่อคัดเลือกชนิดของ compatible solute แล้วจึงทำการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยการคัดเลือกจะคำนึงถึง compatible solute ชนิดที่มีราคาไม่สูง หาซื้อง่าย และต้องไม่เพิ่มต้นทุนการผลิตหัวเชื้อให้สูงขึ้นมากนัก แล้วจึงนำไปทดสอบกับถั่วเหลืองต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้เชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมที่ทนต่อสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ
2. ได้เชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมที่ทนต่อสภาวะเครียด โดยสามารถเข้าสร้างปมได้ดี และมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน เมื่อใช้กับถั่วเหลือง
3. ได้ชนิด และความเข้มข้นที่เหมาะสมของ compatible solute เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้กับหัวเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียม ให้ทนต่อสภาวะเครียด

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การทดสอบเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมที่ทนต่อสภาวะเครียด

2.1.1 คัดแยกและทดสอบคุณลักษณะทั่วไปของเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียม

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

2.1.2 การเตรียมสภาวะเครียด เพื่อใช้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียม

นำอาหารแข็ง YM ที่ปรับค่า pH เป็น 4, 5, และ 6.8 เติลงบนจานเพาะเชื้อเพื่อใช้คัดเลือกเชื้อในสภาวะกรด โดยใช้เทคนิค drop plate แล้วจึงนำไปปมที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ส่วนที่สภาวะอุณหภูมิสูงนั้นใช้อาหารแข็ง pH 6.8 และใช้อุณหภูมิปมเชื้อที่ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลเมื่อปมเชื้อที่ทดสอบได้ 7 วัน และในสภาวะแห้งแล้ง ทำการทดลอง โดยการหยดเซลล์ของเชื้อจำนวน 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงบนกระดาษกรอง 0.2 ไมโครเมตร ขนาดเส้น

ผ่านศูนย์กลาง 2.5 มิลลิเมตร แล้วจึงนำไปบ่มในตู้บ่มขนาดเล็ก (desiccator chamber) ที่บรรจุด้วย silica gel, สารละลายอิมมัลชันของ $\text{CH}_3\text{COOK} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, และ KI ที่สามารถปรับค่า R.H. ในการบ่มเชื้อ เป็น 3, 20, และ 67 ตามลำดับ (ณ 30 °เซลเซียส) (Boumahdi et al. 1999) การอยู่รอดของเซลล์แบคทีเรียในแต่ละสภาวะ ตรวจสอบด้วยการเจือจางเชื้อ และเลี้ยงบนอาหาร หลังจากบ่มได้ 2 วัน

2.2 ขั้นตอนการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียโรโซเปียมที่คัดเลือกได้ ในการเข้าสร้างปม และตรึงไนโตรเจนให้กับถั่วเหลืองภายใต้สภาวะเครียด

2.2.1 การทดสอบถั่วเหลืองในทราย

นำถั่วเหลืองมาเพาะเพื่อรากงอกยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร วางลงในภาชนะปลูกที่บรรจุด้วยทรายฆ่าเชื้อแล้วจึงใส่เชื้อที่คัดเลือกเท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิตรต่อเมล็ด โดยที่ภาชนะปลูกและทรายทำการฆ่าเชื้อก่อนการทดลอง ในสภาวะกรดทำโดยรดน้ำด้วยอาหารปราศจากไนโตรเจนที่ปรับ pH เท่ากับ 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 ใช้สภาวะดังกล่าวข้างต้น มารวมกันโดยที่สภาวะกรดรวมกับสภาวะแห้งแล้ง และสภาวะกรดรวมกับอุณหภูมิสูง เมื่ออายุของถั่วปลูกในแต่ละสภาวะได้ 30 วัน นำไปวัดค่าการตรึงไนโตรเจนของปม ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC) เพื่อพิจารณาพร้อมกับน้ำหนักแห้งของปม และต้นถั่ว รวมไปถึงจำนวนปมที่เกิดขึ้น เมื่อเทียบกับถั่วเหลืองที่ปลูกเชื้อทางการค้า USDA 110

2.2.2 การทดสอบถั่วเหลืองในดิน

การทดลองนี้ใช้ตัวอย่างดิน 2 ชนิด ได้แก่ ดิน pH 4.4 และ pH 6.95 นำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 95 นาที จำนวน 2 ครั้ง ห่างกันนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำดิน pH 4.4 มาใช้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียโรโซเปียมในสภาวะดินกรดที่ปลูกถั่วเหลือง ส่วน pH 6.95 นั้นใช้คัดเลือกในสภาวะแห้งแล้ง และสภาวะอุณหภูมิสูง โดยควบคุม และปรับสภาวะเหมือนกับการปลูกในทราย และในสภาวะเครียดที่มีสองสภาวะร่วมกันนั้น ใช้ดินกรด pH 4.4 แล้วปรับสภาวะให้เป็นไปตามการทดลองในทราย

2.3 การวัดประสิทธิภาพการแข่งขันเพื่อเข้าสร้างปมของเชื้อที่คัดเลือกกับเชื้อทางการค้า

นำพลาสมิด pCAM120 (ที่ตำแหน่งของ Tn5 เชื่อมด้วยยีน *gus* ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ β -glucuronidase (GUS) (Wilson et al. 1995) ส่งถ่ายให้กับเชื้อทางการค้า USDA 110 เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายในการติดตามเชื้อในการทดลอง เพื่อทดสอบการแข่งขันในการเข้าสร้างปมกับถั่วเหลืองในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ โดยการผสมเชื้อแบคทีเรียโรโซเปียมที่คัดเลือกได้กับเชื้อการค้าที่ติดยีนเครื่องหมาย ในอัตรา 1:1 ของ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิตร จากนั้นนำไปทดสอบกับถั่วเหลือง ในปริมาตร 1 มิลลิตรต่อ 1 เมล็ด ซึ่งลักษณะการทดลองทำเหมือนกับการทดลองในข้อ 2.2.1 และเมื่อครบ

ระยะเวลา 1 เดือน ปมของถั่วเหลืองในทุกสภาวะของการทดลอง ถูกตรวจสอบด้วยสาร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) ที่ย่อยได้ด้วยเอนไซม์ β -glucuronidase (GUS) ทำให้แสดงสีฟ้า (Krause et al. 2002) บันทึกจำนวนของปมที่เปลี่ยน และไม่เปลี่ยนสี เพื่อนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของความสามารถในการเข้าสร้างปม (nodule occupancy) (Payakapong et al. 2004)

2.4 คัดเลือกชนิด และความเข้มข้นของ Compatible solute ที่ช่วยให้เซลล์แบคทีเรียอยู่รอด และเจริญได้ในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ MSM (minimal salt medium) (Talibart et al. 1994) ที่ปรับ pH 4.5 สำหรับเลี้ยงเชื้อในสภาวะกรด ส่วนอาหาร pH 6.8 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) นำอาหารที่เสริมด้วยสารแต่ละชนิด และในแต่ละความเข้มข้นมาทดสอบกับเชื้อที่คัดเลือก โดยการวัดการเจริญด้วยการนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ก่อนจะคำนวณออกมาเป็นค่าอัตราการเจริญ (μ /time)

2.5 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลภายในเซลล์แบคทีเรียไรโซเบียม เมื่อเลี้ยงและเสริม Compatible solute ในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ โดยใช้ HPLC ในการวิเคราะห์

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมในอาหาร MSM ที่เสริมด้วยความเข้มข้นของ compatible solute ชนิดที่เหมาะสม ทำการนับจำนวนเซลล์ในแต่ละวันจากทุกสภาวะเครียด และสกัดสารภายในเซลล์ โดยทำการสกัด 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 และความเข้มข้นต่อจำนวนเซลล์ของเชื้อ โดยใช้คอลัมน์แบบ ion exchange (Aminex HPX-87H, 7.8x300 mm, Bio-Rad) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้ 4 mM กรดซัลฟูริก เป็น mobile phase และควบคุมอัตราการไหลที่ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที (Sangproo et al. 2012) และสำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลซูโครส ใช้อัตราการไหลที่ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส

2.6 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

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

บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

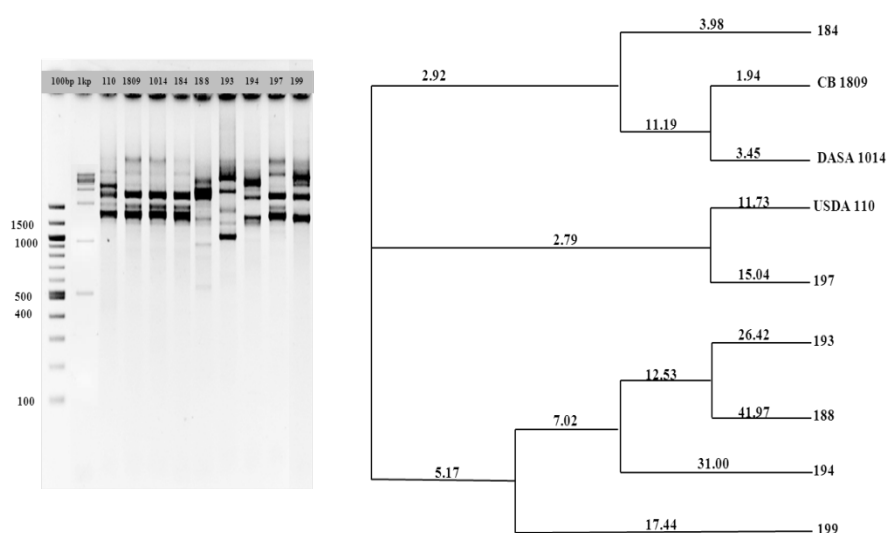
3.1 เชื้อแบคทีเรียโรโซเปียมที่ทนต่อสภาวะเครียด

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

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

ตารางที่ 3.1 ผลการทดสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียม ภายใต้สภาวะเครียดแบบต่างๆ

Isolates	Growth score								% survival of bacteria under drought stress (%RH)			
	Acidity (pH)				High temperature (°C)							
	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 แสดงลักษณะ bands ของดีเอ็นเอบน agarose gel ที่ได้จากการทำ Box-PCR (ซ้าย) และแผนภาพแสดงการจัดจำแนกเชื้อด้วยวิธี Neighbor Joining method (ขวา)

3.2 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมในการตรึงไนโตรเจน และส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเหลืองโดยการปลูกในทรายภายใต้สภาวะเครียดแบบต่าง ๆ

จากการทดลองพบว่า ในสภาวะปกติลักษณะการส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเหลือง เมื่อทดสอบกับเชื้อที่คัดเลือกได้ไม่แตกต่างกัน โดยพิจารณาจากน้ำหนักแห้งของถั่วเหลือง ส่วนการตรึงไนโตรเจนของเชื้อที่อยู่ในปมถั่วเหลืองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างไอโซเลท 194 ที่ตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่าไอโซเลท 184 แต่ไม่พบความแตกต่างเมื่อเทียบกับ USDA 110 และเชื้อไอโซเลทอื่น ส่วนในสภาวะเครียดนั้น พบว่าที่สภาวะกรดเชื้อไอโซเลท 188 และ 194 ตรึงไนโตรเจนได้สูง แต่ไม่แตกต่างจาก USDA 110 โดยสัมพันธ์กับน้ำหนักแห้ง และจำนวนปมของถั่วเหลือง ที่อุณหภูมิสูงนั้นพบว่า ไอโซเลท 194 ให้ผลการทดสอบที่ดีกว่าไอโซเลทอื่น โดยมีค่าการตรึงไนโตรเจนที่สูง และสัมพันธ์กับน้ำหนักแห้งของต้น และปมถั่วเหลือง ขณะที่ผลการทดลองในสภาพแห้งแล้งนั้น ไอโซเลท 184 และ 194 ให้ผลการตรึงไนโตรเจนที่สูงสัมพันธ์กับลักษณะการส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเหลืองด้วยเช่นกัน และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเชื้อ USDA 110 (ตารางที่ 3.2 ก.) ในการทดลองที่มีการออกแบบให้มีสภาวะเครียดร่วมกันสองสภาวะ พบว่าสภาวะเครียดที่เป็นกรด และอุณหภูมิสูงขณะปลูกถั่วเหลือง ค่าการตรึงไนโตรเจน น้ำหนักแห้งของพืช และจำนวนปมของถั่วเหลือง เมื่อทดสอบกับเชื้อทุกไอโซเลท และเชื้อทางการค้าที่เป็นเชื้อมาตรฐาน ไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนการทดลองในการปลูกในสภาพที่เป็นกรดกับแห้งแล้งพบว่า เชื้อไอโซเลท 194 ให้ผลการทดลองที่ดีกว่าเชื้อไอโซเลทอื่น แต่ไม่แตกต่างกับเชื้อทางการค้า ดังตารางที่ 3.2 ก. จากการทดลองนี้ยังพบว่า การที่ถั่วเหลืองใส่เชื้อไรโซเบียมก่อนปลูกจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ดีกว่าพืชที่ไม่ใส่เชื้อ

ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นถั่วเหลืองในสภาวะเครียด ได้พิจารณาร่วมกับค่าดัชนีความสามารถในการทนต่อสภาวะเครียด (Stress tolerance index) หรือ STI (Shetty et al. 1995) ดังแสดงในตารางที่ 3.2 ข. ทั้งนี้พบว่าถั่วเหลืองที่ใช้เชื้อไอโซเลท 194 มีค่า STI สูงกว่าถั่วเหลืองที่ใช้กับเชื้อไอโซเลทอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญในสภาวะต่าง ๆ ดังนั้นไอโซเลท 194 จึงเป็นเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญการเจริญของถั่วเหลืองได้ดีในทุก ๆ สภาพการปลูกที่ทำการทดลอง ขณะที่เชื้อไอโซเลท 188 ให้ผลรองลงมา ส่วนเชื้อไอโซเลทอื่นพบว่าให้ค่า STI ต่ำและไม่คงที่ในการทดสอบในสภาวะต่าง ๆ อย่างไรก็ตามพบว่าค่า STI ที่ได้จากการทดลองนี้สามารถยืนยันได้ว่าพืชที่ไม่ได้ใช้เชื้อไรโซเบียมมีค่า STI ต่ำกว่าพืชที่ใส่เชื้อ นอกจากนี้ ค่า STI ของพืชที่ปลูกทดสอบในสภาวะเครียดต่าง ๆ ยังแสดงถึงผลกระทบจากสภาวะเครียดต่อการเจริญของถั่วเหลืองได้ (Zare and Mahdi, 2012)

ตารางที่ 3.2 ก. ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมที่คัดเลือกกับถั่วเหลือง ในสภาวะเครียดแบบต่างๆ ที่ปลูกในทราย

Conditions*	Isolates	Nitrogenase	Biomass dry weight (g plant ⁻¹)	Nodule dry weight (g plant ⁻¹)	Nodule number (plant ⁻¹)
		activity ($\mu\text{mole h}^{-1}$ g nodule ⁻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) ของน้ำหนักแห้งแก้วเหลืองที่ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียโรโซเปียม ในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ

Conditions	Stress Tolerance Index (STI)				
	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 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียโรโซเปียมในการตรึงไนโตรเจน และส่งเสริมการเจริญของต้นแก้วเหลืองโดยการปลูกในดินทดสอบภายใต้สภาวะเครียดแบบต่าง ๆ

จากผลทดสอบในทรายได้คัดเลือกเชื้อไอโซเลท 188 และ 194 เพื่อทดสอบกับแก้วเหลืองที่ปลูกในดิน ซึ่งเป็นตัวอย่างดิน 2 รูปแบบคือ ดินที่มี pH เป็นกลาง ซึ่งนำมาจากจังหวัดนครราชสีมา เพื่อใช้ทดสอบในสภาวะปกติ แห้งแล้ง และอุณหภูมิสูง และดินที่มี pH เป็นกรด จากจังหวัดปทุมธานี สำหรับทดสอบเชื้อในสภาวะที่เป็นกรด จากผลวิเคราะห์ดินก่อนปลูก แสดงว่าดินจากจังหวัดปทุมธานีเป็นดินกรดที่มีค่า pH 4.4 และเป็นดินกรดประเภทซัลเฟต (SO_4^{2-}) เนื่องจากมีค่าซัลเฟตสูง และมีการละลายของแคลเซียมอยู่มาก (Daud et Al. 2002) ส่วนดินจากจังหวัดนครราชสีมา มีค่า 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_4^{2-} (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

ผลการทดลอง ให้ผลเช่นเดียวกับการทดสอบกับถั่วเหลืองที่ปลูกในทราย โดยที่ผลของเชื้อต่อการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองเมื่อพิจารณาจากน้ำหนักแห้งของถั่วนั้น ไม่แตกต่างกันในกลุ่มของถั่วที่มีการใส่เชื้อ แต่พบว่าค่าการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไอโซเลท 188 และ 194 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่เชื้อ 194 ให้ค่าการตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่าในทุกสภาวะที่ใช้ปลูกถั่วเหลือง แต่ในสภาพกรด และอุณหภูมิสูง การทดสอบของเชื้อ 188 194 และ USDA 110 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ในการทดสอบเชื้อกับถั่วเหลืองที่สภาวะแล้ง พบว่าเชื้อไอโซเลท 194 มีค่าการตรึงไนโตรเจนที่ดีกว่าไอโซเลท 188 และเชื้อทางการค้า USDA110 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3.3 ข.)

เมื่อนำข้อมูลของน้ำหนักแห้งถั่วเหลืองที่ปลูกในทุก ๆ สภาวะ มาคำนวณเพื่อหาค่า STI ที่ได้พบว่า มีสัมพันธ์กับผลการทดลองที่ได้ในข้างต้น โดยที่เชื้อไอโซเลท 188, 194 และเชื้อการค้า ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน เมื่อทดสอบกับถั่วเหลืองที่ปลูกในทุกสภาวะ ยกเว้นที่สภาวะแล้ง และที่สภาวะกรดร่วมกับสภาวะแล้ง เชื้อไอโซเลท 194 มีค่า STI ที่สูงกว่า ไอโซเลท 188 (ดังตารางที่ 3.3 ค.) ดังนั้นเชื้อไอโซเลท 194 เป็นเชื้อที่มีศักยภาพที่แนะนำมาพัฒนาเป็นหัวเชื้อต้นแบบในการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำหรับการปลูกถั่วเหลืองต่อไป

ตารางที่ 3.3 ข. ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมที่คัดเลือกกับถั่วเหลือง ในสภาวะเครียดแบบต่างๆ ที่ปลูกในดิน

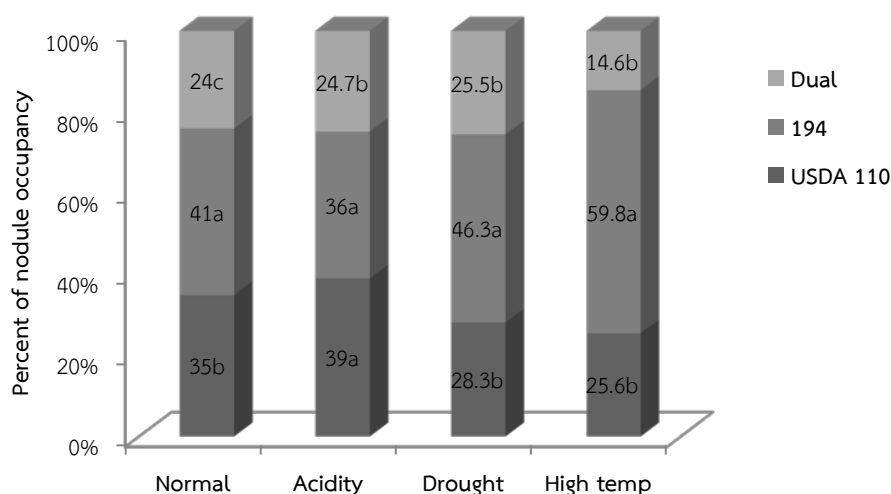
Conditions*	Isolates	Nitrogenase activity ⁻¹ ($\mu\text{mole h}^{-1} \text{g}^{-1}$ nodule ⁻¹)	Biomass dry weight ⁻¹ (g plant^{-1})	Nodule dry weight ⁻¹ (g plant^{-1})	Nodule number ⁻¹ (plant^{-1})
Normal	Uninoculated		0.46 $\pm$ 0.00 ^b		
	USDA 110	107.50 $\pm$ 6.97 ^{ab}	0.52 $\pm$ 0.05 ^a	0.024 $\pm$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

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

Conditions	Stress Tolerance Index (STI)			
	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 ผลทดสอบประสิทธิภาพการแข่งขันเพื่อเข้าสู่รากปมกับถั่วเหลืองระหว่างเชื้อไอโซเลท 194 และเชื้อมาตรฐาน USDA 110

เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อต่อการเข้าสู่รากปมที่จำเพาะกับถั่วเหลืองในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ ทำการใช้เชื้อผสมในการทดสอบกับถั่วเหลือง ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เชื้อผสมของไอโซเลท 194 กับ USDA 110 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีจำนวนเซลล์สายพันธุ์ละ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยที่ USDA 110 มีการติดยีนเครื่องหมายเอาไว้ดังที่กล่าวในวิธีการศึกษา ผลการทดสอบพบว่า เชื้อไอโซเลท 194 มีจำนวนปมที่เชื้อสามารถเข้าสู่รากได้มากกว่าเชื้อทางการค้า USDA 110 ในสภาวะการปลูกถั่วเหลืองภายใต้สภาวะปกติ แล้ง และที่อุณหภูมิสูงอย่างมีนัยสำคัญ โดยแสดงข้อมูลเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเข้าครอบครองปม (% nodule occupancy) ในขณะที่สภาวะกรดของการปลูกถั่วเพื่อทดสอบ มีค่าการเข้าสู่รากปมของเชื้อไม่แตกต่างกัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า มีปมที่มีลักษณะติดสีฟ้าไม่ชัดเจนหลังการย้อม ซึ่งจะแสดงเป็น Dual nodule occupancy (Waraporn et al, 2003) ที่เกิดจากการเข้าสู่รากปมของเชื้อผสม 194 และ USDA 110 ซึ่งพบโดยเฉลี่ย 24.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบกับถั่วในสภาวะปกติ กรด และแล้ง และพบลักษณะของการเป็น Dual nodule occupancy อีก 14.6 เปอร์เซ็นต์ กับถั่วที่ทดสอบภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง ดังรูปที่ 3.2 ดังนั้นจึงสรุปว่า เชื้อไอโซเลท 194 มีประสิทธิภาพในการแข่งขันเพื่อเข้าสู่รากปมกับถั่วเหลืองได้ดีกว่าเชื้อมาตรฐาน USDA 110

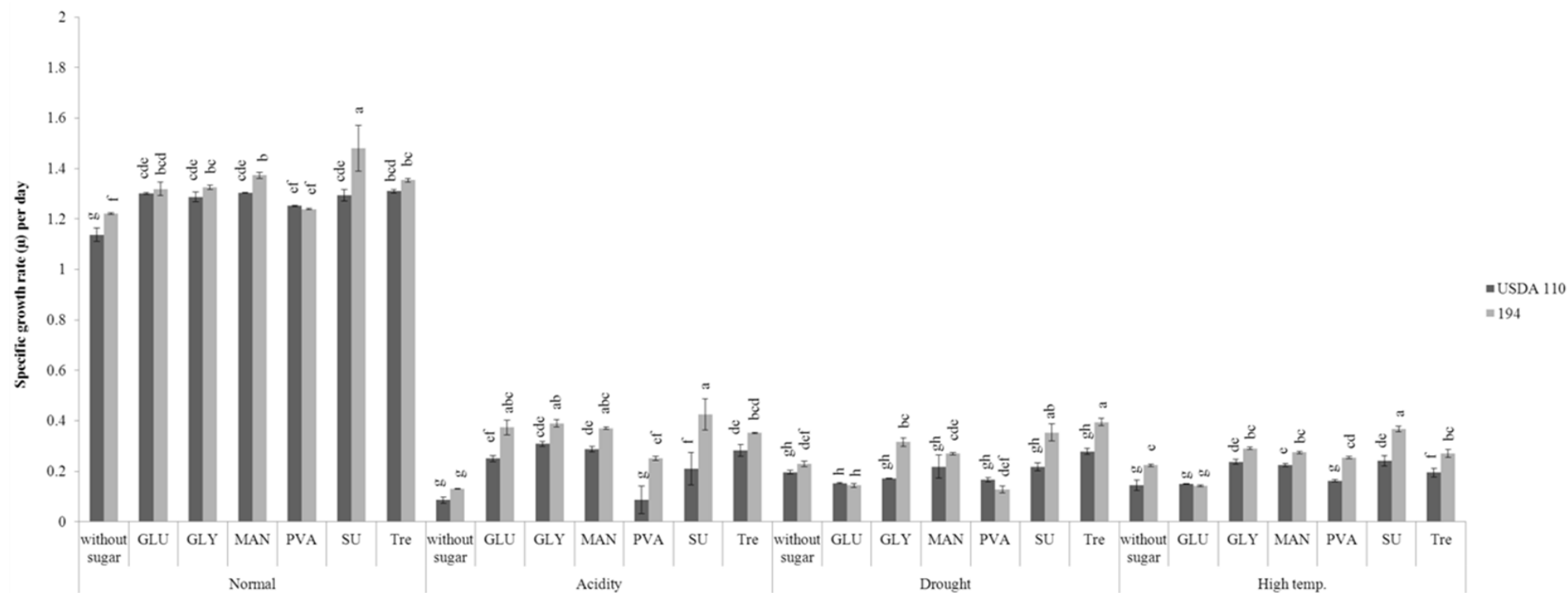


รูปที่ 3.2 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเข้าสร้างปมของเชื้อผสมระหว่าง เชื้อไอโซเลท 194 และ USDA 110 ภายใต้สภาวะที่ใช้ปลูกถั่วเหลืองแบบต่าง ๆ

3.5 ผลเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมที่คัดเลือก ในสภาวะเครียด โดยการเสริม Compatible solute

เพื่อตรวจสอบชนิดน้ำตาลที่เหมาะสมในการใช้เป็น compatible solute และส่งเสริมการเจริญของเชื้อไรโซเบียมในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ จึงได้ทำการทดลองโดยนำน้ำตาลชนิดต่าง ๆ คือ กลูโคส (GLU), กลีเซอรอล (GLY), แมนนิทอล (MAN), โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA), ซูโครส (SU), และทรีฮาโลส (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 อย่างไรก็ตามพบว่าการเสริมน้ำตาลบางชนิดส่งผลให้อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อดีกว่าการไม่เสริมน้ำตาล เชื้อไรโซเบียมไอโซเลท 194 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่า USDA110 ในทุกสภาวะ โดยในสภาวะปกติพบว่าน้ำตาลซูโครส สามารถส่งเสริมให้เชื้อไรโซเบียมไอโซเลท 194 เจริญได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ในการทดสอบในสภาวะกรดพบว่าการเสริมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลทุกชนิดส่งผลให้ไอโซเลท 194 เจริญได้ดีกว่าตัวรับที่ไม่ได้เสริมน้ำตาล โดยการเสริมด้วยน้ำตาลซูโครสให้ผลการเจริญสูงสุด สำหรับการทดสอบในสภาวะแห้งแล้งพบว่าการเสริมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลกลีเซอรอล ซูโครส และทรีฮาโลส สามารถเพิ่มอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อไอโซเลท 194 ได้ดีกว่าการไม่เสริมน้ำตาลอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่สามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อ USDA110 ในสภาวะแห้งแล้งได้ และเมื่อทดสอบการเจริญในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงพบว่าการเสริมด้วยน้ำตาลซูโครสสามารถทำให้เชื้อไรโซเบียมไอโซเลท 194 มีการเจริญได้ดีที่สุดและแตกต่าง

อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ การเสริมด้วยน้ำตาลชนิดอื่น หรือการไม่เสริมน้ำตาล ดังนั้นจะ เห็นได้ว่าน้ำตาลซูโครสมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อไรโซเบียมไฮโซเลท 194 ได้ดี ทั้งในสภาวะปกติ และสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ ดังนั้นจึงคัดเลือกน้ำตาลซูโครสเพื่อทำการทดสอบหา ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อภายใต้สภาวะเครียดต่อไป และเมื่อ ทำการทดสอบพบว่าระดับของน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ (mM) สามารถส่งเสริม ให้เชื้อไรโซเบียมไฮโซเลท 194 มีการเจริญในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ ได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ 300 มิลลิโมลาร์ ในการศึกษาเพื่อพัฒนาหัวเชื้อไรโซเบียมต่อไป



รูปที่ 3.3 แสดงผลของอัตราการเจริญจำเพาะ (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 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *ไรโซเปียมไฮโดรไลเซียม* 194 โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เมื่อพิจารณาลักษณะกราฟการเจริญของเชื้อ *ไรโซเปียมไฮโดรไลเซียม* 194 ในแต่ละช่วงเวลาร่วมกับผลการวิเคราะห์น้ำตาลที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 3.4 พบว่าการสะสมน้ำตาลของเชื้อที่มีการเติม และไม่เติมน้ำตาลอยู่ในระดับใกล้เคียงกันในการเลี้ยงภายใต้สภาวะปกติ และพบว่าการสะสมน้ำตาลหลายชนิด เช่น น้ำตาลซูโครส แมนนิทอล กลูโคส และทรีฮาโลสในเชื้อที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสในช่วง 2-10 วันของการเจริญ ในขณะที่น้ำตาลแมนนิทอล และกลูโคสพบว่าเป็นน้ำตาลส่วนใหญ่ที่พบในเชื้อ *ไรโซเปียมไฮโดรไลเซียม* ที่ไม่ได้มีการเสริมน้ำตาลซูโครส (รูปที่ 3.4a)

ในสภาวะกรดพบว่าเชื้อไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้นแต่สามารถดำรงชีวิตอยู่ในระดับ 10^7 CFU ต่อ มิลลิลิตร โดยเชื้อที่มีการเสริมน้ำตาลซูโครสมีปริมาณเซลล์มากกว่า และเมื่อวิเคราะห์น้ำตาลที่สะสมในเซลล์พบว่าเชื้อ *ไรโซเปียมไฮโดรไลเซียม* 194 ที่มีการเสริมน้ำตาลซูโครส มีการสะสมน้ำตาลซูโครส แมนนิทอล กลูโคส และทรีฮาโลส ในวันที่ 4-6 ของการเจริญ ในขณะที่พบเพียงการสะสมน้ำตาลแมนนิทอล และกลูโคสในเชื้อที่ไม่มีการเสริมน้ำตาลซูโครส แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ของเชื้อที่มีการเสริมด้วยน้ำตาลซูโครสสามารถช่วยให้เชื้อ *ไรโซเปียมไฮโดรไลเซียม* ดำรงชีวิตในสภาวะกรดได้ดีขึ้น (รูปที่ 3.4b)

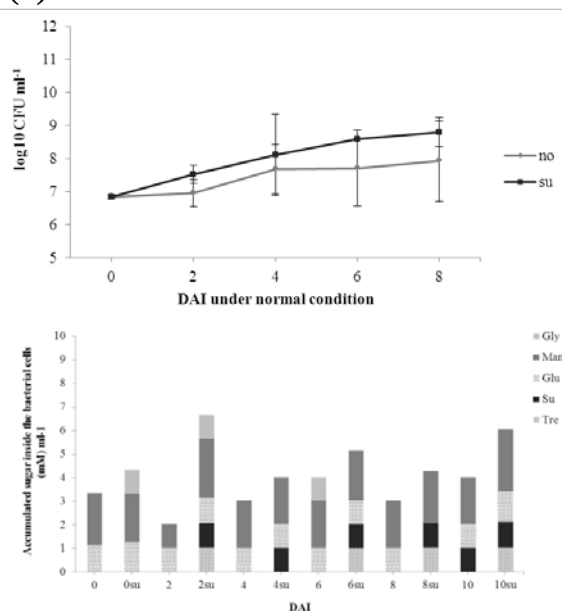
ในสภาวะแห้งแล้ง จากการวิเคราะห์น้ำตาลพบว่าการใช้ซูโครสเสริมทำให้จุลินทรีย์มีปริมาณน้ำตาลสะสมอยู่ในเซลล์สูงกว่าการไม่ให้น้ำตาลซูโครส และพบว่าถ้าไม่ใส่น้ำตาลซูโครส สามารถวิเคราะห์น้ำตาลได้เพียงสองชนิด ได้แก่ แมนนิทอล และกลูโคส การใช้น้ำตาลซูโครสทำให้การ uptake ของน้ำตาลซูโครสเข้าไปในเซลล์สูงขึ้นในวันที่ 2-10 และยังพบน้ำตาลทรีฮาโลส และกลีเซอรอล เพิ่มขึ้นในวันที่ 6-10 และการเจริญของเชื้อ *ไรโซเปียมไฮโดรไลเซียม* ก็สูงขึ้นเช่นกัน (รูปที่ 3.4c)

ในสภาวะอุณหภูมิสูง พบว่าเชื้อ *ไรโซเปียมไฮโดรไลเซียม* ที่มีการเสริมน้ำตาลซูโครสสามารถเจริญได้ดีกว่าตำรับที่ไม่มีการเติมน้ำตาล และเมื่อวิเคราะห์น้ำตาลภายในเซลล์ พบว่าในการเจริญช่วงวันที่ 2-8 มีการสะสมน้ำตาลกลีเซอรอล ทั้งในเชื้อที่มีการเสริมและไม่เติมน้ำตาลซูโครส แต่พบว่าการสะสมน้ำตาลกลีเซอรอลลดลงในวันที่ 10 ในเชื้อที่ไม่ได้เสริมซูโครสซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของเชื้อที่ลดลง ในขณะที่เซลล์ที่มีการเสริมน้ำตาลซูโครส มีปริมาณน้ำตาลทุกชนิดที่สะสมในเซลล์เพิ่มขึ้นในวันที่ 10 ของการเลี้ยง

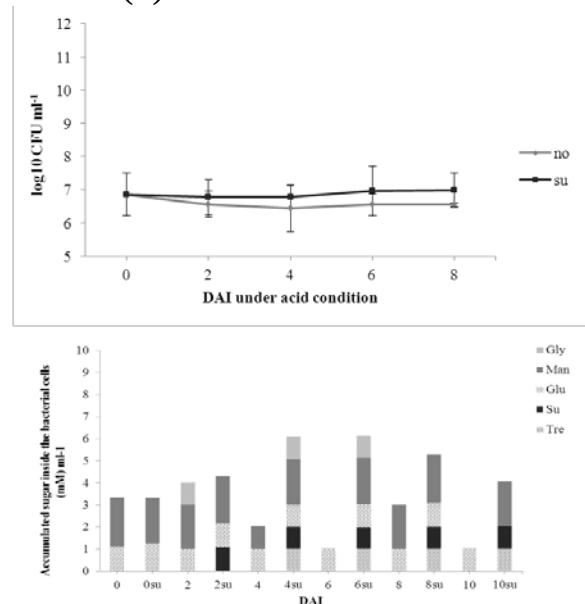
ทั้งนี้การสะสมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีการเจริญในสภาวะแตกต่างกันนั้น มีหลายงานวิจัยที่ศึกษาว่า การสะสมของสารภายในเซลล์แบคทีเรีย มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะที่เชื้อเจริญ และการปรับตัวเพื่อให้เซลล์สามารถอยู่รอด สามารถเจริญได้แม้ในสภาวะเครียด (Pedro et al., 1998) ส่วนการสะสมน้ำตาลที่พบในเซลล์ที่เจริญในสภาวะเครียดนั้น คาดว่าเซลล์แบคทีเรียมีการสะสมได้ด้วยการดูดซึมเอาสารที่อยู่รอบๆ เซลล์ เพื่อใช้ปรับระดับสมดุลของออสโมซิสภายใน และภายนอกเซลล์ให้กลับมาคงที่ (Gouffi et al., 1998) ยกตัวอย่างเช่นการสะสมน้ำตาล ซูโครส ทรีฮาโลส และสารในกลุ่มโพลีออล เช่น แมนนิทอล หรืออินอสิทอล เป็นต้น (Matthias, 2008) นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อแบคทีเรียเองก็มีกระบวนการในการสังเคราะห์สารกลุ่มดังกล่าวเพื่อช่วยในการปกป้องเซลล์ให้อยู่รอดได้ในสภาวะเครียด โดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า *de novo* ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อเชื้อมีการเจริญในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญอย่างสภาวะเครียด

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

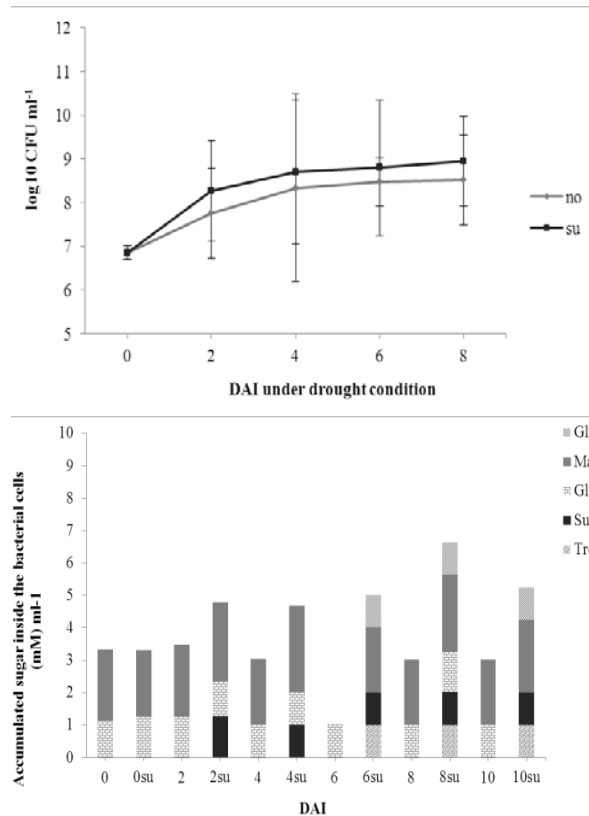
(a) Normal condition



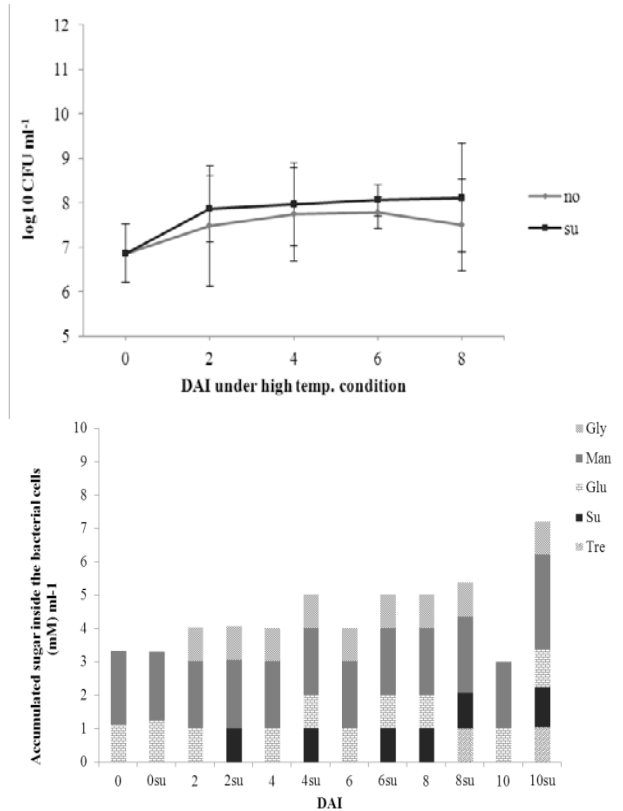
(b) Acid condition



(c) Drought condition



(d) High temperature



รูปที่ 3.4 ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลภายในเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมไฮโซเลท 194 ที่เจริญในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของหัวเชื้อไรโซเบียม เพื่อเป็นปุ๋ยชีวภาพให้กับการปลูกถั่วเหลืองภายใต้สภาวะเครียด สามารถสรุปผลการวิจัยได้ดังนี้

1. สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมสายพันธุ์ที่อยู่รอดได้ในสภาวะเครียดต่าง ๆ เช่น สภาวะกรด สภาวะแกล้ง และสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง เชื้อที่คัดเลือกได้คือ เชื้อแบคทีเรียไรโซเบียม ไฮโซเลท 194 มี
2. เชื้อที่คัดเลือกได้นี้มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเหลืองได้ดีในสภาวะแกล้งทั้งการทดสอบในทรายและในดิน

3. เชื้อที่คัดเลือกได้นี้สามารถเข้าสร้างปม (percent of nodule occupancy) ได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมมาตรฐาน USDA110 ทั้งในสภาวะการปลูกแบบปกติ และสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ
4. สารกลุ่ม compatible solute สามารถเพิ่มการอยู่รอดของเชื้อไฮโซเลท 194 ในสภาวะปกติ และสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ ได้ โดยผลการทดลองพบว่าน้ำตาลซูโครสที่เสริมในระหว่างการเลี้ยงเชื้อในสภาวะเครียด ช่วยให้อัตราการเจริญของเชื้อในสภาวะเครียดดีกว่าการเจริญของเชื้อที่ไม่ได้เสริมซูโครส
5. ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมในสภาวะเครียดแบบต่าง ๆ คือ 300 มิลลิโมลลาร์
6. เชื้อแบคทีเรียไรโซเบียมที่เลี้ยงในอาหารที่มีการเสริมด้วยน้ำตาลซูโครส พบว่ามีการสะสมน้ำตาลหลายชนิดภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่เป็น compatible solute ซึ่งการสะสมน้ำตาลภายในเซลล์นี้สัมพันธ์กับการเจริญและการอยู่รอดของเซลล์ภายใต้สภาวะเครียดแบบต่าง ๆ
7. สภาวะเครียดที่แตกต่างกันส่งผลต่อปริมาณซูโครส ทรีฮาโรส กลูโคส แมนนิทอล และกลีเซอรอลที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะที่สภาวะแล้ง เมื่อมีการเสริมน้ำตาลซูโครส น้ำตาลจะสะสมอยู่ในเซลล์ และพบว่าการสะสม ทรีฮาโรส กับ กลีเซอรอล ในระหว่างการเจริญ และในสภาวะอุณหภูมิสูงที่มีการเสริมด้วยน้ำตาล พบว่าการสะสมของ กลีเซอรอล ในทุกช่วงของการเจริญ เมื่อเทียบกับเชื้อที่ไม่มีการเสริมซูโครส
8. น้ำตาลกลีเซอรอล และทรีฮาโลส สามารถถูกสังเคราะห์ได้ภายในเซลล์โดยการใช้น้ำตาลซูโครสเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นแหล่งของ compatible solute ภายนอกเซลล์

ข้อเสนอแนะ

1. เพื่อเป็นการพัฒนาหัวเชื้อให้มีประสิทธิภาพ ควรมีการทดลองและศึกษาการส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโรโซเปียมกับถั่วเหลืองในสภาพดินแบบต่าง ๆ ต่อไป รวมทั้งควรนำไปทดสอบในสภาพไร่
2. ควรมีการพัฒนาหัวเชื้อแบคทีเรียโรโซเปียม ในรูปแบบปุ๋ยชีวภาพที่สามารถนำไปใช้ได้จริง โดยควรพัฒนาในส่วนของการเลี้ยงเชื้อ วัสดุพาหะ และตรวจสอบอายุการเก็บรักษาเพื่อเป็นแนวทางในการใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับการปลูกถั่วเหลืองต่อไป

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., Siripaibool C., 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 archaeobacteria." 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.