1. คำนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีประโยชน์ เช่น ใช้บริโภคหรือแปรรูปเป็นน้ำมันถั่วเหลือง น้ำเต้าหู้ เต้าเจี้ยว ซีอิ๊วและใช้เป็นเมล็ดถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองอาหารสัตว์ นอกจากนี้ที่ปมรากถั่วเหลืองมีแบคทีเรียตรึงหรือเปลี่ยนไนโตรเจนในอากาศให้เป็นแอมโมเนีย ซึ่งเป็นรูปแบบสารประกอบไนโตรเจนที่ถั่วเหลืองนำไปใช้ในการเจริญ ในขณะเดียวกันถั่วเหลืองให้พลังงานแก่แบคทีเรียเหล่านี้ในรูปของเอทีพี (ATP) จึงเป็นการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาระหว่างถั่วเหลืองและแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้นซึ่งเรียกว่าไรโซเบียมถั่วเหลือง (soybean rhizobia) ในปัจจุบันผลผลิตเฉลี่ยของถั่วเหลืองในประเทศไทย ประมาณ 200-250 กิโลกรัมต่อไร่ (http://production.doae.go.th) ซึ่งมีค่าประมาณครึ่งหนึ่งของผลผลิตถั่วเหลืองในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่นผลผลิตถั่วเหลืองในสหรัฐอเมริกาเท่ากับ 458 กิโลกรัมต่อไร่ (http://www.feedusers.com) ในประเทศที่เป็นผู้นำด้านการผลิตและส่งออกถั่วเหลือง เช่น สหรัฐอเมริกา บราซิล และอาร์เจนตินา นอกจากจะใช้เมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ดีแล้ว ยังใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมถั่วเหลืองเพื่อเพิ่มผลผลิตถั่วเหลือง โดยปุ๋ยชีวภาพเหล่านี้มีสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลือง ซึ่งเข้าไปสร้างปมที่รากถั่วเหลืองและเปลี่ยนไนโตรเจนในอากาศให้เป็นแอมโมเนียให้ถั่วเหลือง เป็นการลดปริมาณการใช้ปุ๋ยเคมีประเภทไนโตรเจน การใช้ปุ๋ยเคมีอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลายาวนาน มีผลเสียต่อคุณภาพของดิน จะทำให้เกิดปัญหาความเสื่อมโทรมของโครงสร้างดินและดินขาดความอุดมสมบูรณ์ เนื่องจากการใช้ปุ๋ยเคมีไม่ใช่การบำรุงดิน แต่เป็นการอัดแร่ธาตุอาหารให้แก่พืช โดยไม่มีการเติมอินทรียวัตถุเพิ่มลงในดิน และการใช้ปุ๋ยเคมียังเร่งอัตราการสลายตัวของอินทรียวัตถุในดิน ทำให้โครงสร้างของดินเสื่อมลง ดินจึงกระด้างมีการอัดตัวแน่น ไม่อุ้มน้ำในฤดูแล้ง (อานัฐ ตันโช, 2550) นอกจากนี้ ปุ๋ยเคมีเหล่านี้มักถูกชะลงแหล่งน้ำ เป็นปุ๋ยให้พืชน้ำรวมถึงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายขนาดเล็กเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว จนแหล่งน้ำมีสีเขียว มลภาวะที่เพิ่มธาตุอาหารแก่พืชน้ำรวมถึงไซยาโนแบคทีเรียและสาหร่ายขนาดเล็ก เรียกว่า eutrophication ทำให้ใช้ประโยชน์จากแหล่งน้ำไม่ได้เต็มที่ ดังนั้นการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมถั่วเหลืองนอกจากจะเพิ่มผลผลิตถั่วเหลืองแล้ว ยังเป็นการอนุรักษ์แหล่งน้ำทางอ้อม

ในปัจจุบันประเทศไทยผลิตถั่วเหลืองไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ภายในประเทศ เป็นผลให้ประเทศไทยนำเข้าถั่วเหลืองประมาณ 85% ของปริมาณที่ต้องการใช้ ส่วนที่เหลือ 15% ของปริมาณถั่วเหลืองที่ต้องการใช้ในประเทศได้จากการผลิตภายในประเทศ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณการนำเข้าถั่วเหลืองและปริมาณการผลิตถั่วเหลืองในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2550-2553

ปี พ.ศ.	ปริมาณการนำเข้าถั่วเหลือง (ล้านตัน)	มูลค่าการนำเข้าถั่วเหลือง (ล้านบาท)	ปริมาณการผลิตถั่วเหลืองในประเทศไทย (ล้านตัน)
2550	1.54	19,456	0.21
2551	1.72	32,225	0.20
2552	1.53	23,812	0.19
2553	1.82	25,795,	0.19

แหล่งที่มา : http://www.agriinfo.doae.go.th/

นอกจากนี้ ในปัจจุบัน ชาวนาในประเทศไทยไม่นิยมปลูกถั่วเหลืองเป็นพืชหมุนเวียนสลับกับพืชชนิดอื่น เช่น ข้าวหรือข้าวโพด ทั้งนี้เหตุผลส่วนหนึ่งเป็นเพราะราคาขายเฉลี่ยต่อไร่ของเมล็ดถั่วเหลืองอยู่ในระดับต่ำ เมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่น ดังแสดงในตารางที่ 2 ประกอบกับความยากลำบากในการดูแล เช่น ดายหญ้าในแปลงถั่วเหลือง การปลูกถั่วเหลืองจึงไม่คุ้มค่าแก่การลงทุนและค่าเหนื่อย เกษตรกรจึงไม่นิยมปลูกถั่วเหลืองหมุนเวียนกับการปลูกข้าวหรือข้าวโพด ดังจะเห็นได้จากพื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองในประเทศไทยลดลงทุกปี ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ผลผลิตเฉลี่ยและราคาขายเฉลี่ยต่อไร่ของพืชเศรษฐกิจชนิดต่างๆในปี พ.ศ. 2553/2554

พืชเศรษฐกิจ	ผลผลิตเฉลี่ย (กิโลกรัมต่อไร่)	ราคาขายเฉลี่ยต่อกก. (บาท)	ราคาขายเฉลี่ยต่อไร่ (บาท)
ข้าว	530	30.00	15,900.00
ข้าวโพด	800	8.13	6,504.00
ถั่วเหลือง	250	16.18	4,045.00

แหล่งที่มา : http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=9704

ตารางที่ 3 พื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองในฤดูฝนและฤดูแล้งในประเทศไทย รวมทั้งผลผลิตเฉลี่ย

ปี พ.ศ.	พื้นที่เพาะปลูก (1000ไร่)	ผลผลิตเฉลี่ย (กก./ไร่)
2541	1,467	234
2542	1,451	227
2543	1,396	232
2544	1,154	236
2545	1,130	238

2546	961	246
2547	945	238
2548	929	250
2549	886	250
2550	831	253

แหล่งที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2552. http://www.oae.go.th/statistic/yearbook50/section2/sec2table26.pdf

ดังนั้น การที่ชาวนาไม่นิยมปลูกถั่วเหลืองเป็นพืชหมุนเวียนสลับกับการปลูกข้าวหรือข้าวโพด นอกจากจะทำให้ประเทศไทยขาดดุลการค้าแล้ว ยังทำให้ชาวนาขาดโอกาสที่จะทำนุบำรุงดินอย่างยั่งยืน เพราะที่ปมรากถั่วเหลืองมีแบคทีเรียไรโซเบียม ซึ่งเปลี่ยนไนโตรเจนจากบรรยากาศให้เป็นแอมโมเนียให้ถั่วเหลืองใช้แทนปุ๋ยยูเรีย และหลังจากเก็บเกี่ยวลำต้น ใบ และเมล็ดถั่วเหลือง รากและปมถั่วเหลืองจะถูกไถคราดลงดิน เป็นการเพิ่มธาตุอาหารประเภทไนโตรเจน ทำให้ชาวนาใช้ปุ๋ยยูเรียน้อยลงในการปลูกข้าว crop ต่อไป

ตารางที่ 1 ถึง ตารางที่ 3 แสดงให้เห็นถึงปัญหาประการหนึ่งของสถานการณ์การเพาะปลูกและการนำเข้าถั่วเหลืองในประเทศไทย กล่าวคือ ประเทศไทยนำเข้าถั่วเหลืองในปริมาณมากกว่า 5 เท่าของความสามารถของประเทศในการปลูกถั่วเหลือง เหตุผลประการหนึ่งได้แก่ ผลผลิตถั่วเหลืองในประเทศต่ำดังกล่าวแล้วข้างต้น ดังนั้นจึงควรมีการวิจัยและพัฒนาใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมถั่วเหลืองในการเพิ่มผลผลิตถั่วเหลือง จะเห็นได้จากตัวอย่างบทความวิจัยในต่างประเทศว่ามีการวิจัยและพัฒนามากด้านไรโซเบียมถั่วเหลือง และการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมถั่วเหลือง (Abaidoo et al., 2007;; Aguilar et al., 2001; Appunu et al., 2008; Bala et al., 2011; Brutti et al., 1998; Chen et al., 2000; Chen et al., 2004; de Jensen et al., 2004; Hungria et al., 2001; Minamisawa et al., 1999; Thomas-Oates et al., 2003) ในประเทศไทยยังมีการวิจัยน้อยมากด้านไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลือง (Ando et al., 1999; Chanaseni and Kongngoen, 1992; Emampaiwong, 2006; Maruekarajtinplaeng, 2010; Nuntagij et al., 1997; Teaumroong and Boonkerd, 1998; Thompson et al., 1991; Yokoyama et al., 1996, 1999) งานวิจัยต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 ของผู้วิจัย ได้แก่การวิจัยและการพัฒนาเพื่อผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลือง ซึ่งเป็นปุ๋ยชีวภาพฯ ที่เก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิห้องโดยเซลล์ไรโซเบียมไม่เพิ่มจำนวน และมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอประจำสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลือง เพื่อใช้ควบคุมคุณภาพระหว่างกระบวนการผลิต และใช้ตรวจความสามารถของไรโซเบียมในการแข่งขันกับไรโซเบียมท้องถิ่นเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลือง เป็นงานวิจัยที่ได้ขอจดสิทธิบัตรฉบับแรกเกี่ยวกับวิธีคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองเพื่อผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพฯ ที่เก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยดำเนินการขอจดสิทธิบัตรแล้วเมื่อวันที่ 25 มิถุนายน 2552 เลขที่ขอจดสิทธิบัตร 0901002866 (กาญจนา ชาญสง่าเวช, 2552) สิทธิบัตรฉบับนี้เป็นสิทธิบัตรที่อยู่ระหว่างการดำเนินการให้บริษัทแห่งหนึ่งที่ผลิตปุ๋ย

ชีวภาพขออนุญาตใช้สิทธิ์เทคโนโลยี (Technology Licensing) โดยผ่านทางสถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัจจุบันประเทศไทยปลูกถั่วเหลืองในภาคเหนือ ภาคกลางตอนบน และภาคตะวันออกเฉียงเหนือบางส่วน วิธีการหนึ่งที่จะเพิ่มผลผลิตถั่วเหลืองให้เพียงพอต่อการบริโภคภายในประเทศ เพื่อลดปริมาณการนำเข้า และการขาดดุลการค้า นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มรายได้ให้ชาวไร่ถั่วเหลือง บำรุงดินอย่างยั่งยืนและลดการเกิดมลภาวะทางน้ำประเภท eutrophication ได้แก่ การเพิ่มผลผลิตถั่วเหลืองต่อไร่ ด้วยการปรับปรุงดินให้เหมาะสมแก่การปลูกถั่วเหลือง การคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองที่เหมาะแก่การปลูกในดินและภูมิอากาศของท้องถิ่นต่างๆและการพัฒนาปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมถั่วเหลืองโดยคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนในปมรากถั่วเหลืองเพื่อนำมาวิจัยและพัฒนาวิธีการผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพฯ ซึ่งประกอบด้วยตัวพา (carrier) เช่นดินเพาะต้นกล้าหรือดินพีต (peat) กับไรโซเบียมถั่วเหลืองในปริมาณ 10^8 เซลล์ต่อกรัมพีต โดยคลุกเมล็ดถั่วเหลืองกับปุ๋ยไรโซเบียมก่อนปลูก (Somasegaran and Hoben, 1994) ไรโซเบียมถั่วเหลืองในปุ๋ยชีวภาพควรมีความสามารถตรึงไนโตรเจนสูงและมีความหนาแน่นของเซลล์ไรโซเบียมเหมาะสมต่อความสามารถในการแข่งขันกับไรโซเบียมที่มีอยู่เดิมในดินในการเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลือง ทั้งนี้เพราะความหนาแน่นที่มากเกินพอของเซลล์ไรโซเบียมจะทำให้เกิดการยับยั้งการเข้าสร้างปมโดยกลไกโควรัมเซ็นซิ่ง (quorum sensing) ซึ่งเป็นกลไกการสื่อสารระหว่างแบคทีเรีย ที่เชื่อมโยงความหนาแน่นของเซลล์กับการแสดงออกของยีน (Sharma et al., 2003) ในระหว่างปี ค.ศ. 2001-2003 Loh และ คณะ (Loh et al., 2001; 2002a; 2002b; 2003; Jitacksorn, 2006) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงไรโซเบียมถั่วเหลือง *Bradyrhizobium japonicum* ในอาหารสูตร minimum medium จนกระทั่งความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เซลล์จะขับออโตอินดิวเซอร์ (autoinducer) เบรดิออกซิติน (Bradyoxetin) หรือ [2-[4-[[4-(3-aminooxetan-2yl)phenyl](imino)methyl]phenyl] oxetan-3-ylamine] ซึ่งเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนเช่น $nodD_2$ โปรตีน $NodD_2$ ยับยั้งการแสดงออกของยีน *nodYABC* ซึ่งระบุรหัสการสังเคราะห์เอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์ Nod factor ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลืองของ *B. japonicum* ดังนั้นหากความหนาแน่นของ *B. japonicum* ในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม อยู่ในระดับที่ทำให้เกิดโควรัมเซ็นซิ่ง จะนำไปสู่การสังเคราะห์เบรดิออกซิติน ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ *nodD2* ซึ่งโปรตีน NodD2 ยับยั้งการแสดงออกของ *nodYABC* ทำให้ปริมาณการสังเคราะห์ Nod factor ลดลง ทำให้ลดความสามารถของ *B. japonicum* ในการเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลือง ดังนั้น บนซองบรรจุปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลืองที่มีจำหน่ายในท้องตลาดในปัจจุบัน จึงระบุให้เก็บรักษาในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำหรือในตู้เย็น ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้ไรโซเบียมถั่วเหลืองในปุ๋ยชีวภาพฯ แบ่งเซลล์จนกระทั่งมีจำนวนเกิน 10^8 เซลล์ต่อกรัมปุ๋ยฯ ซึ่งอาจลดความสามารถของเซลล์ในการเข้าสร้างปมโดยกลไกโควรัมเซ็นซิ่งดังกล่าวข้างต้น

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 25 ก.ย. 2555
เลขทะเบียน 246354
เลขเรียกหนังสือ

ในประเทศไทยยังมีการวิจัยน้อยมากด้านไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลืองดังได้รายงานแล้วข้างต้น ในปี พ.ศ. 2552 ธันปภา จันทเพ็ชรและกาญจนา ชาญสง่าเวช ใช้น้ำหนักแห้งลำต้นถั่วเหลืองซึ่งเลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดที่ใช้ทรายแทนดิน (Somasegaran and Hoben, 1994) และเติมไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์เป็นบรรทัดฐานในการคัดเลือกไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพคลุกกับเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 และทดลองปลูกภาคสนามในแปลงทดลองขนาด 15 เมตร x 24 เมตร ที่ต. น้ำมวบ อ. เวียงสา จ.น่าน ผลการทดลองได้ผลผลิตเฉลี่ยของถั่วเหลือง 223.2 กิโลกรัมต่อไร่ คิดเป็นการเพิ่มผลผลิตเพียง 4% ทั้งนี้ได้แยกแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลืองหลังการเพาะปลูก 1 เดือน และนำมาหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยวิธี RAPD-PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ RPO1 หรือ CRL-7 เพื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ NA7 หากตรวจพบลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังกล่าวจากแบคทีเรียที่แยกได้จากปมราก แสดงว่าไรโซเบียมสายพันธุ์ NA7 สามารถแข่งขันกับไรโซเบียมท้องถิ่นในการเข้าสร้างปมภาคสนาม ผลการทดลองได้แยกแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง 198 ไอโซเลต แบ่งเป็นแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว 147 ไอโซเลต และแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนช้า 51 ไอโซเลต เนื่องจากสายพันธุ์ NA7 เป็นไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า จึงหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนช้า 51 ไอโซเลต และพบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ NA7 ในสัดส่วน 25.5% นอกจากนี้ Chansa-ngavej et al. (2010) ใช้ไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพคลุกกับเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 และทดลองปลูกภาคสนามในแปลงทดลองขนาด 12 เมตร x 15 เมตร ที่ต. ส้าน อ. เวียงสา จ. น่าน ผลการทดลองได้ผลผลิตเฉลี่ยของถั่วเหลือง 245.8 กิโลกรัมต่อไร่ คิดเป็นการเพิ่มผลผลิต 15% ผลการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรวจความสามารถของไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 ในการเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลืองในแปลงทดลองที่ ต.ส้าน พบว่าแบคทีเรียบางไอโซเลตที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองที่ปลูกในแปลงทดลองที่ ต.ส้าน มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 แสดงว่าไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 สามารถเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลืองและเพิ่มผลผลิตถั่วเหลือง 15% ในแปลงทดลองที่ ต.ส้าน

จากผลการทดลองข้างต้น จะเห็นได้ว่า การใช้น้ำหนักแห้งลำต้นถั่วเหลืองซึ่งเลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดที่เติมไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์เป็นบรรทัดฐานในการคัดเลือกไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ NA7 เป็นบรรทัดฐานที่ไม่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีความสามารถในการเข้าสร้างปมสูง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนในการค้นหาวิธีรวดเร็วที่จะใช้ระบุความสามารถของไรโซเบียมถั่วเหลืองในการแข่งขันกับไรโซเบียมที่มีอยู่เดิมในดินในการเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลืองและความสามารถตรึงไนโตรเจนสูง การตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมถั่วเหลือง หมายถึง การที่ไรโซเบียมถั่วเหลืองเข้าไปในรากถั่วเหลืองและก่อให้เกิดปม ไรโซเบียมถั่วเหลืองในปมรากถั่วเหลืองเปลี่ยนไนโตรเจนที่ได้จากอากาศ เป็นแอมโมเนีย ซึ่งถั่วเหลืองนำไปใช้ในการเจริญ เป็นการตรึงไนโตรเจนแบบพึ่งพา (symbiotic nitrogen fixation) โดยถั่วเหลืองให้ที่พักในปมและให้พลังงานในรูปเอทีพี (ATP) แก่ไรโซเบียมถั่วเหลือง และไรโซเบียมถั่ว

เหลืองให้แอมโมเนียที่ได้จากการตรึงไนโตรเจนสำหรับถั่วเหลืองนำไปใช้ในการเจริญ ไนโตรจีเนสเป็นเอนไซม์ในกระบวนการตรึงไนโตรเจนดังแสดงในสมการที่ (1)

ไนโตรจีเนส

$$N_2 + 8H^+ + 8e + 16\ ATP \longrightarrow 2NH_3 + H_2 + 16\ (ADP + inorganic\ phosphate) \quad (1)$$

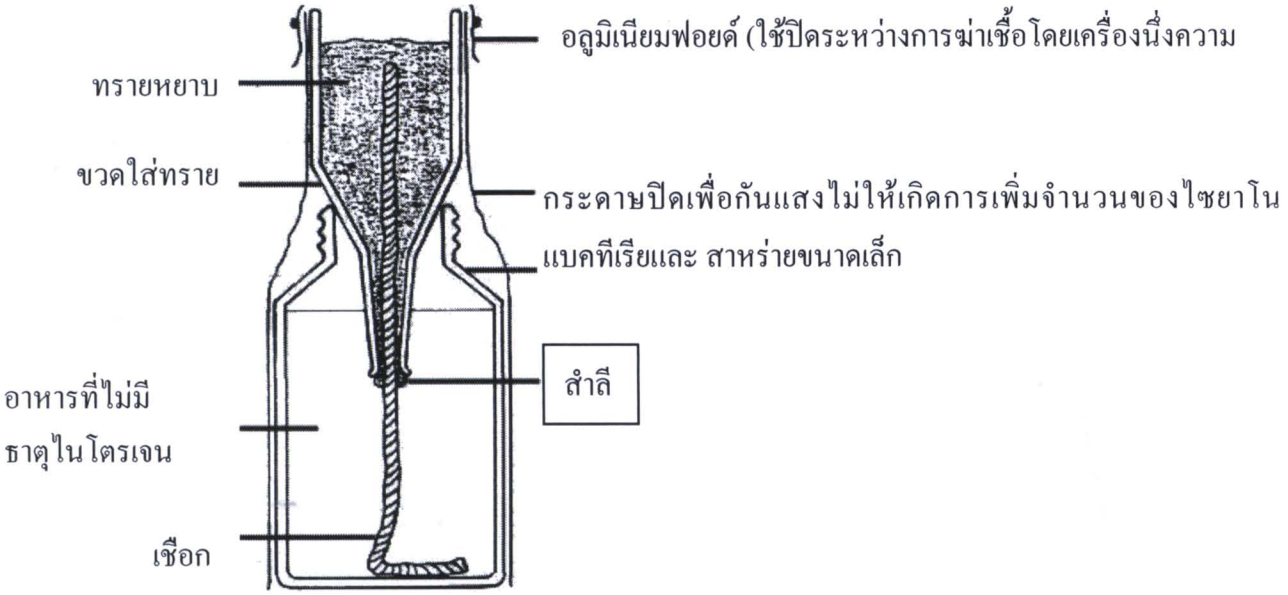
จากสมการข้างต้น จะเห็นได้ว่า ในการตรึงไนโตรเจนหนึ่งโมเลกุล มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้หนึ่งโมเลกุล ดังนั้นจึงอาจใช้การตรวจวัดแอคติวิตีของ hydrogen uptake hydrogenase ของไรโซเบียมถั่วเหลือง ในการวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังสามารถใช้หลายวิธีในการวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมถั่วเหลือง เช่น ใช้น้ำหนักลำต้นแห้ง น้ำหนักปมแห้ง จำนวนปม ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในลำต้นที่วัดโดยใช้วิธีเคดัล (Kjeldahl) การนำรากที่มีปม มาทำ acetylene reduction assay วิธีหาศักยภาพของไรโซเบียมถั่วเหลืองในการตรึงไนโตรเจนเหล่านี้แต่ละวิธีต้องใช้เวลานาน และเปลืองค่าใช้จ่าย ดังนั้นจึงควรมีวิธีลดจำนวนไรโซเบียมถั่วเหลืองที่จะนำไปหาศักยภาพการตรึงไนโตรเจน ตัวอย่างเช่น การวิจัยหาวิธีรวดเร็วเพื่อใช้ตรวจหาสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีประสิทธิภาพสูงในการเข้าสร้างปม โดยสามารถใช้วิธีตรวจหานี้ คัดกรองไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปม จากจำนวนไอโซเลตที่แยกได้นับพันไอโซเลต ก่อนนำไปหาศักยภาพการตรึงไนโตรเจน ดังนั้นหากค้นพบวิธีรวดเร็วที่คัดกรองไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปม จะทำให้จำนวนไรโซเบียมถั่วเหลืองที่นำไปหาศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนลดลง และในอนาคต หากมีการพิสูจน์ว่าไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีประสิทธิภาพในการเข้าสร้างปม มีศักยภาพตรึงไนโตรเจนสูงด้วย วิธีการคัดกรองนี้ก็จะใช้ระบุศักยภาพการตรึงไนโตรเจนได้ วิธีระบุศักยภาพการตรึงไนโตรเจนที่ใช้ในปัจจุบันมีหลายวิธี เช่น การใช้น้ำหนักลำต้นหรือปมแห้ง และ/หรือการใช้จำนวนปมที่ราก (Somasegaran and Hoben, 1994) การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปม ราก ลำต้นและใบโดยวิธีเคดัล (Kjeldahl method) (Pomeranz and Meloan, 1971; Chang, 2003) การทำ acetylene reduction assay (Somasegaran and Hoben, 1994) และ การหาแอคติวิตีของ hydrogen uptake hydrogenase (Albrecht et al., 1979 ; Carter et al., 1977 ; Fuhrmann, 1990 ; Lambert et al., 1987 ; van Berkum and Saloger, 1991) แต่ละวิธีต้องใช้เวลานาน (ณิชานันท์ กาบเกษร และกาญจนา ชาญสง่าเวช, 2552)

การชั่งน้ำหนักแห้งของลำต้น ปม รวมถึงการนับจำนวนปม

วิธีดั้งเดิมในการคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลือง ได้แก่การใส่เมล็ดถั่วเหลืองงอกราก (germinating soybean seeds) ลงในทรายที่บรรจุใน โหลเลียวนาร์ด (Leonard jars , Somasegaran & Hoben, 1994) และเติมไรโซเบียมถั่วเหลืองแต่ละสายพันธุ์ หลังจากนั้นเลี้ยงถั่วเหลืองด้วย Nitrogen- free medium และตัดส่วนลำต้นไปชั่งน้ำหนักแห้ง เนื่องจากสารอาหารที่ใช้เลี้ยงถั่วเหลืองไม่มีธาตุโนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ถั่วเหลืองจึงได้ธาตุไนโตรเจนจากการที่ไรโซเบียมถั่วเหลืองตรึงไนโตรเจนในอากาศ ให้เป็นแอมโมเนียซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ถั่วเหลืองนำไปใช้ในการเจริญ สายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่ทำให้น้ำหนักแห้งลำต้นถั่วเหลืองสูงกว่า

น้ำหนักแห้งของ positive control ซึ่งเป็นถั่วเหลืองที่ได้รับธาตุไนโตรเจนโดยเติม 0.05% KNO_3 ใน Nitrogen-free medium จัดว่าเป็นสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีศักยภาพสูงในการตรึงไนโตรเจน

วิธีเหล่านี้ง่าย ทำโดยปลูกถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ ในโหลเลียวนาร์ด (Leonard jars) ซึ่งประกอบด้วยโหลใส่สารอาหารที่ไม่มีธาตุไนโตรเจนสำหรับถั่วเหลือง (nitrogen-free medium) ปลูกถั่วเหลืองงอกราก (germinating seeds) ในทรายหยาบ (coarse sand) โดยเติมไรโซเบียมถั่วเหลืองแต่ละสายพันธุ์ เลี้ยงถั่วเหลืองในโรงปลูกพืชทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิ 28°C ± 2°C เป็นเวลา 28 วัน ตัดส่วนลำต้นเหนือแผลเป็นของใบเลี้ยงคู่ (cotyledon scar) นำส่วนลำต้นหรือปมไปอบแห้งที่ 80°C เป็นเวลา 3 วัน จนน้ำหนักแห้งคงที่และชั่งน้ำหนักแห้งของส่วนลำต้น หรือปม หลังจากนั้นนับจำนวนปม รูปที่ 1. แสดงส่วนประกอบของโหลเลียว นาร์ด รูปที่ 2. แสดงโหลเลียวนาร์ดที่ใช้เลี้ยงถั่วเหลืองในโรงปลูกพืชทดลองในการทดลองนี้

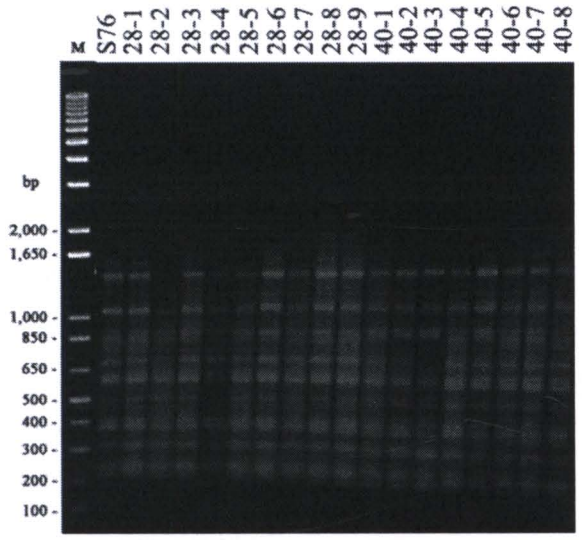


รูปที่ 1 ส่วนประกอบของโหลเลียวนาร์ด (Somasegaran and Hoben, 1994)

รูปที่ 2 โหลเลียวนาร์ดที่ใช้ปลูกเมล็ดถั่วเหลืองในโรงปลูกพืชทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิ 28° ± 4°C เติมไรโซเบียมถั่วเหลืองหนึ่งสายพันธุ์ในโหลเลียวนาร์ดแต่ละใบ

สารอาหารที่ใช้เลี้ยงถั่วเหลืองไม่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ถั่วเหลืองจึงได้ธาตุไนโตรเจนจากการที่ไรโซเบียมถั่วเหลืองตรึงไนโตรเจนในอากาศ ให้เป็นแอมโมเนียซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ถั่วเหลืองนำไปใช้ในการเจริญ สายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่ทำให้น้ำหนักแห้งลำต้นถั่วเหลืองสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกว่าน้ำหนักแห้งของ positive control ซึ่งเป็นถั่วเหลืองที่ได้รับธาตุไนโตรเจนโดยเติม 0.05% KNO_3 ใน nitrogen-free medium จัดเป็นสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีศักยภาพสูงในการตรึงไนโตรเจน

ข้อเสียของวิธีนี้คือ บางครั้งไม่สามารถใช้น้ำหนักลำต้นแห้ง น้ำหนักปมแห้งหรือจำนวนปมที่ได้จากการทดลองโดยใช้โหลเลียวนาร์ดในโรงปลูกพืชทดลองในการระบุศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลืองภาคสนาม ทั้งนี้เพราะในไร่ถั่วเหลือง มีการแข่งขันเข้าสร้างปมระหว่างไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ที่ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ และไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีอยู่เดิมในไร่ถั่วเหลือง (Rodriguez-Navarro et al., 2010) นอกจากนี้ยังต้องแยกแบคทีเรียจากปมทุกปมในรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดเพื่อนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ เช่น หาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อพิสูจน์ว่าในแต่ละปม ไม่มีไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่สายพันธุ์ที่เติมลงในโหลเลียวนาร์ด ทั้งนี้เพราะบางการทดลองมีการวางโหลเลียวนาร์ดหลายโหลในโรงปลูกพืชทดลอง หากขาดความระมัดระวังในการเติมสารอาหารลงในโหลเลียวนาร์ด อาจทำให้ไรโซเบียมถั่วเหลืองจากโหลเลียวนาร์ดโหลหนึ่งกระเด็นไปในโหลเลียวนาร์ดอีกโหลหนึ่ง ทำให้ปมรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดนั้นมีไรโซเบียมถั่วเหลืองหลายสายพันธุ์ รูปที่ 3 แสดงตัวอย่างการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์ว่ามีไรโซเบียมถั่วเหลืองเพียง 1 สายพันธุ์ในปมรากถั่วเหลืองในโหลเลียวนาร์ด



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
หอสมุดแห่งชาติ

รูปที่ 3 การหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไรโซเบียมถั่วเหลืองโดยวิธี RAPD-PCR โดยใช้ CRL-7 เป็นไพรเมอร์ เลนที่ 1 เป็นขนาดโมเลกุลมาตรฐาน เลนที่ 2 เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ S76 เลนที่ 3-11 เป็นไรโซเบียมถั่วเหลืองหลายไอโซเลตที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองในโหลเลียวนาร์ดที่บ่มที่ 28^0C เลนที่ 12-19 เป็นไรโซเบียมถั่วเหลืองหลายไอโซเลตที่แยกจาก

ปมรากทุกปมของถั่วเหลืองที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดที่บ่มที่ 28^{0}C สลับกับ 40^{0}C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ รูปนี้เป็นตัวอย่างผลการทดลองเพื่อแสดงให้เห็นว่าในปมรากแต่ละปมของถั่วเหลืองที่เลี้ยงในโหลเลียวนาร์ดเดียวกัน มีไรโซเบียมถั่วเหลืองเพียง 1 สายพันธุ์คือสายพันธุ์ S76 ในกรณีนี้ ไม่มีการปนเปื้อนของไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์อื่นในปมราก (กาญจนา ชาญสง่าเวช, ผลการทดลองที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์)

การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในลำต้น หรือปมโดยวิธีเคดัล

การหาศักยภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีนี้ ใช้สมมติฐานที่ระบุว่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในลำต้นหรือปมรากถั่วเหลือง ได้มาจากแอมโมเนียซึ่งเป็นสารประกอบผลลัพธ์ของกระบวนการตรึงไนโตรเจนดังระบุในสมการที่ (1) Chang (2003) ระบุว่าวิธีเคดัลประกอบด้วยการใช้กรดซัลฟูริกย่อยโปรตีนทั้งหมดให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเติมผงโปตัสเซียมเปอร์มังกาเนต เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต หลังจากนั้นใช้น้ำเจือจางสารละลายที่ได้จากการย่อย และทำให้เป็นกลางโดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ กลั่นแอมโมเนียที่เกิดขึ้นลงในกรดบอริกที่กำหนดปริมาตรและมี indicator คือ methylene blue และ methyl red ไตเตรต borate ion (ซึ่งมีปริมาณเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณไนโตรเจน) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{โปรตีน} \xrightarrow[\text{ความร้อนและ } KMnO_4]{\text{กรดซัลฟูริก}} \text{แอมโมเนียมซัลเฟต}$$

$$(NH_4)_2SO_4 + 2\,NaOH \longrightarrow 2NH_3 + Na_2SO_4 + 2H_2O$$

$$NH_4 + H_3BO_3 \longrightarrow NH_4 + H_2BO_3^-$$

(borate ion)

$$H_2BO_3^- + H^+ \longrightarrow H_3BO_3$$

วิธีคำนวณปริมาณร้อยละของไนโตรเจน

โมลของกรดไฮโดรคลอริก = โมลของแอมโมเนีย = โมลของไนโตรเจนในตัวอย่าง

$$\%\,N = N\text{HCl} \times \frac{\text{ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \times \frac{\text{น้ำหนักอะตอมของไนโตรเจน}}{\text{โมล}} \times 100$$

โดย NHCl = normality ของ HCl มีหน่วยเป็น โมล/1000 มล.

น้ำหนักอะตอมของไนโตรเจน = 14

ข้อดีของวิธีนี้คือวิธีทำค่อนข้างง่าย ข้อเสียคือใช้เวลาในการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างประมาณ 3 ชั่วโมง ซึ่งถ้ามีหลายตัวอย่าง จะใช้เวลาในการวิเคราะห์นานมาก จึงไม่ใช่วิธีรวดเร็วที่จะใช้ระบุความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลือง

การทำ acetylene reduction assay

วิธีดั้งเดิมที่ใช้คัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีประสิทธิภาพตรึงไนโตรเจน ได้แก่ การทำ acetylene reduction assay (Somasegaran and Hoben, 1994) โดยตัดรากที่ติดปมและนำไปใส่ในภาชนะเช่น ขวดปิดฝายางที่ไม่ให้อากาศเข้า-ออก หลังจากนั้นใช้เข็มฉีดก๊าซ acetylene ที่กำหนดปริมาตร และใช้ gas chromatography ตรวจปริมาณ ethylene ที่เกิดขึ้นจากการรีดิวซ์ acetylene โดยเร่งด้วยเอนไซม์ไนโตรจีเนสของแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในปมรากถั่วเหลือง ใช้ acetylene ซึ่งมี triple bonds แทนก๊าซไนโตรเจนซึ่งมี triple bonds สายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีแอคติวิตีไนโตรจีเนสสูง จัดว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูง

ข้อดีของวิธีนี้คือเป็นวิธีที่ใช้แพร่หลาย ข้อเสียคือต้องบรรจุรากที่ติดปมในภาชนะที่ไม่ให้อากาศเข้า-ออก และต้องมีก๊าซ acetylene ซึ่งในกรณีที่มีตัวอย่างน้อย อาจมีปัญหาในการซื้อและเก็บก๊าซ acetylene ปริมาตรน้อย นอกจากนี้ในปมที่ใช้ทำ acetylene reduction assay ยังอาจมีการปนเปื้อนของไรโซเบียมสายพันธุ์อื่นในปม

การหาแอคติวิตีของ hydrogen uptake hydrogenase

ในปี ค.ศ. 1979 Albrecht และคณะ เสนอว่า ไรโซเบียมถั่วเหลือง ที่มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเพิ่มการตรึงไนโตรเจนในปมรากถั่วเหลือง เพราะไฮโดรจีเนสหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ไฮโดรเจนอัพเทคไฮโดรจีเนส (hydrogen uptake hydrogenase) ซึ่งอยู่บนเซลล์เมมเบรน จะออกซิไดซ์ไฮโดรเจน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ จากปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน กลับเป็น $2H^+$ ที่เซลล์นำกลับเข้าไปใช้ใหม่ในปฏิกิริยารีดอกซ์ต่างๆภายในเซลล์ ดังแสดงในไดอะแกรมต่อไปนี้(van Berkum and Saloger,1991)

ต่อมามีผลงานวิจัยหลายชิ้นเกี่ยวกับไฮโดรเจนอัพเทคไฮโดรจีเนส และยีน *hup* ที่ระบุรหัสการสังเคราะห์เอนไซม์นี้ แต่ยังไม่มีการสรุปผลการทดลองอย่างแน่ชัดว่า ไรโซเบียมถั่วเหลืองที่มีการแสดงออกของยีน *hup* ตรึงไนโตรเจนได้ประสิทธิภาพสูงกว่าสายพันธุ์ที่ไม่มีการแสดงออกของยีน *hup* หรือไม่ (Albrecht et al.,1979; Carter et al., 1977, Fuhrmann, 1990; Lambert et al., 1987) ดังนั้นในรายงานการวิจัยฉบับนี้จึงเสนอแนวคิดที่จะใช้ RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) บริเวณ spacer region ระหว่างยีน *nodD1* และ *nodA* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองในการระบุศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลือง แนวเหตุผลในรายงานการวิจัยฉบับนี้คือ *nodD1* และ *nodA* เป็นยีนของไรโซเบียมถั่วเหลืองที่เกี่ยวข้องกับการเข้าไปสร้างปมที่รากถั่วเหลือง ดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีนทั้งสองนี้แตกต่างกันในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทต่างๆ เพียงพอที่จะใช้ความแตกต่างของดีเอ็นเอบริเวณนี้ ซึ่งสะท้อนให้เห็นได้จาก RFLPs คือรูปแบบการเรียง

ตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอกาโรสเจลหลังจากตัดด้วยเรสตริกชั่นเอนไซม์ (restriction enzyme) ในการทำนายศักยภาพการเข้าสร้างปมซึ่งอาจนำไปสู่ศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลือง

ประเภทของไรโซเบียมถั่วเหลือง

ในปัจจุบัน วงการไรโซเบียมถั่วเหลืองทั่วโลก ยอมรับการแบ่งประเภทไรโซเบียมถั่วเหลืองเป็นประเภทเพิ่มจำนวนเร็วและประเภทเพิ่มจำนวนช้า โดยไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วมี 2 ชนิด ได้แก่ *Sinorhizobium fredii* และ *S. xinjiangense* (Chen et al, 1988 ; Peng et al, 2002) ส่วนไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้ามี 3 ชนิด ได้แก่ *Bradyrhizobium elkanii, B. japonicum* และ *B. liaoningense* (Jordan, 1982; Kuykendall et al, 1992, Xu et al, 1995) ไรโซเบียมถั่วเหลืองทั้งสองประเภทแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความแตกต่างระหว่างไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วและประเภทเพิ่มจำนวนช้า (Elkan and Bunn, 1992)

สมบัติ	ไรโซเบียมถั่วเหลือง	
	ประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว	ประเภทเพิ่มจำนวนช้า
1. เวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า	น้อยกว่า 6 ชั่วโมง	มากกว่า 6 ชั่วโมง
2. จำนวนและชนิดของแฟลกเจลลา	2-6 เส้นอยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella)	1 เส้นอยู่ด้านข้างบริเวณใกล้ปลายเซลล์ (subpolar flagella)
3. ตำแหน่งของยีน *nifH* และ *nifDK* ซึ่งระบุรหัสการสังเคราะห์ Fe protein และ α , β subunits ของ Mo-Fe protein ตามลำดับ โปรตีนทั้งสามชนิดประกอบกันเป็นเอนไซม์ไนโตรจีเนส	อยู่บนโอเปอรอนเดียวกัน	อยู่ต่างโอเปอรอน
4. ตำแหน่งของยีนที่ระบุรหัสการสังเคราะห์โปรตีนเกี่ยวกับการเข้าสร้างปม	อยู่บน pSym ซึ่งเป็นพลาสมิดขนาดใหญ่ประมาณ 350 kb	อยู่บนโครโมโซม

ในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนและบนหมู่เกาะโอกินาวา ประเทศญี่ปุ่น มีรายงานการพบไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว ทั้งนี้เพราะดินในพื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองมีค่าพีเอชอยู่ในช่วงด่าง (Camacho et al., 2002 ; Dowdle and Bohlool, 1985; Suzuki et al., 2008) แต่ Han et al. (2008) รายงานการพบไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วและไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า *Bradyrhizobium liaoningense* ในมลฑลซิงเจียง (Xinjiang) ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ซึ่งพื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองมีค่าพีเอชอยู่ในช่วงด่าง ในประเทศไทย

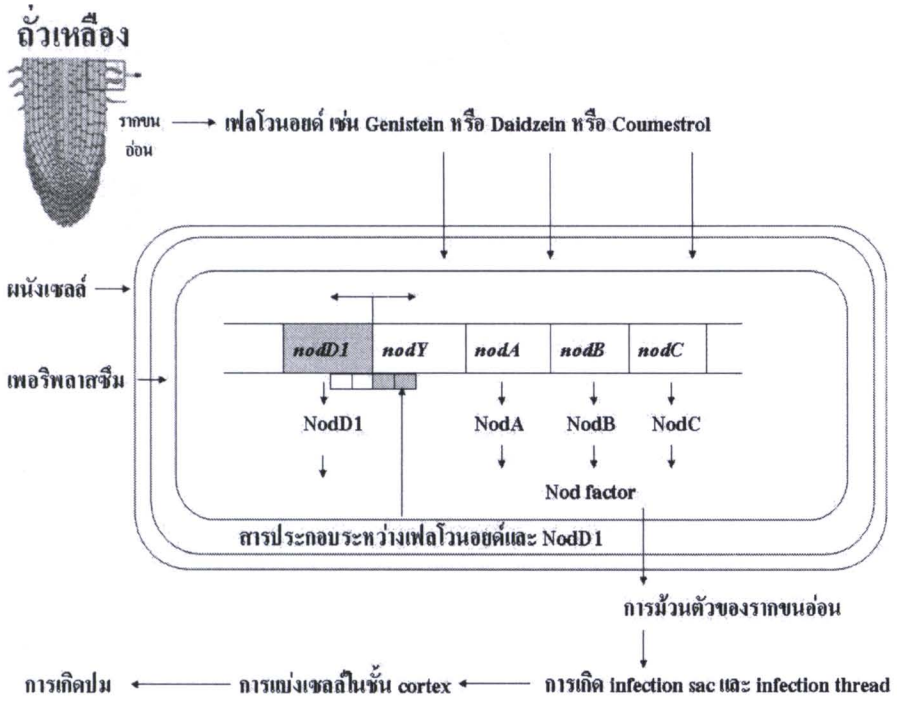
Chansa-ngavej et al., (2009) และ Maruekarajtinplaeng, (2010) รายงานการพบเฉพาะไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะดินในพื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองในประเทศไทยมีค่าพีเอชในช่วงกรด (pH 5.0-6.5 กาญจนา ชาญสง่าเวช, ผลงานวิจัยที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์)

Duteau และคณะ (1986) รายงานว่า ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว 4 สายพันธุ์ สามารถเข้าสร้างปมและตรึงไนโตรเจนในถั่วเหลือง (*Glycine max*) พันธุ์ Peking, Virginia, Hardee และถั่วเหลือง *Glycine soja* ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว 3 ใน 4 สายพันธุ์นี้เข้าสร้างปมที่ไม่มีการตรึงไนโตรเจน (ineffective nodules) ในถั่วเหลืองอีก 11 พันธุ์ ในขณะที่ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วอีก 1 สายพันธุ์ (*Rhizobium fredii* USDA 191) สามารถเข้าสร้างปมที่ตรึงไนโตรเจนที่รากถั่วเหลือง 14 พันธุ์ ไรโซเบียมถั่วเหลืองทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่สร้างปมในถั่วเหลืองพันธุ์ Harosoy rjl rjl นอกจากนี้ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว *R.fredii* USDA191 ตรึงไนโตรเจนได้ดีเทียบเท่าไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า *Bradyrhizobium japonicum* USDA 61A76 เมื่อใช้ถั่วเหลืองพันธุ์ Peking, Virginia, Harsoy63, Rampage, และ *Glycine soja* พันธุ์ PI 342622A และ PI 101404B แต่ตรึงไนโตรเจนน้อยกว่า *B. japonicum* USDA61A76 เมื่อใช้ถั่วเหลืองพันธุ์ Evans, Williams, Hardee, Itill และ *Glycine soja* PI 407217 และ P1 81762

ผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ประเภทของไรโซเบียมถั่วเหลือง (เพิ่มจำนวนเร็วหรือเพิ่มจำนวนช้า) และพันธุ์ถั่วเหลือง มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน ในการทดลองที่เสนอรายงานฉบับนี้จะใช้ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่กรมส่งเสริมการเกษตรแนะนำให้เกษตรกรไร่ถั่วเหลืองเพาะปลูกในจังหวัดทางภาคเหนือของประเทศไทย เช่น จังหวัดพิษณุโลกและจังหวัดน่าน เพราะพันธุ์นี้มีจุดเด่นคือทนทานต่อโรคราสนิมดีกว่าถั่วเหลืองพันธุ์อื่นๆ มีการแตกกิ่งน้อย จึงสามารถเพิ่มจำนวนต้นต่อไร่อันเป็นการเพิ่มผลผลิต สามารถปลูกได้ทั้งในฤดูแล้งและฤดูฝน ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 เป็นผลงานการวิจัยของศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ กรมวิชาการเกษตร ได้ผสมพันธุ์ถั่วเหลืองจำนวน 22 คู่ เมื่อปี 2518 ณ สถานที่ทดลองพืชไร่แม่โจ้ ซึ่งเป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ Williams มีลำต้นแข็งแรง จำนวนฝักต่อต้นมาก กับพันธุ์ สจ. (F10 7019) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ทนทานต่อโรคราสนิม คุณภาพเมล็ดดี และคณะกรรมการวิจัย กรมวิชาการเกษตร ได้มีมติรับรองสายพันธุ์นี้ เมื่อวันที่ 30 เดือนกันยายน พ.ศ.2530 โดยใช้ชื่อถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 มีอายุถึงวันออกดอก 35 วัน อายุถึงวันเก็บเกี่ยว 97 วัน (สุรัตน์ อัตตะ http://www.komchadluek.net/detail/20100817/70065/) สำหรับไรโซเบียมถั่วเหลืองที่ใช้ในรายงานการวิจัยนี้ ได้แก่แบคทีเรียประเภทเพิ่มจำนวนเร็วที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองจำนวน 7 สายพันธุ์ที่แยกโดย Emampaiwong (2006) และต้องพิสูจน์ว่าเป็นไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว และใช้ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า จำนวน 58 สายพันธุ์ รวมเป็น 65 สายพันธุ์ ที่รายงานโดย Emampaiwong (2006) โดยใช้จำนวนปมที่รากของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เลี้ยง

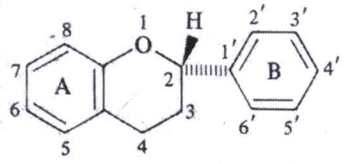
ในโหลเลียวนาร์ดตามวิธีที่ระบุโดย Somasegaran and Hoben (1994) ระบุศักยภาพในการเข้าสร้างปมและศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน

nodD1 และ *nodA* เป็นยีนของไรโซเบียมถั่วเหลืองที่เกี่ยวข้องกับการเข้าสร้างปมที่รากถั่วเหลืองดังแสดงในรูปที่ 4 (Chansa-ngavej, 2005)



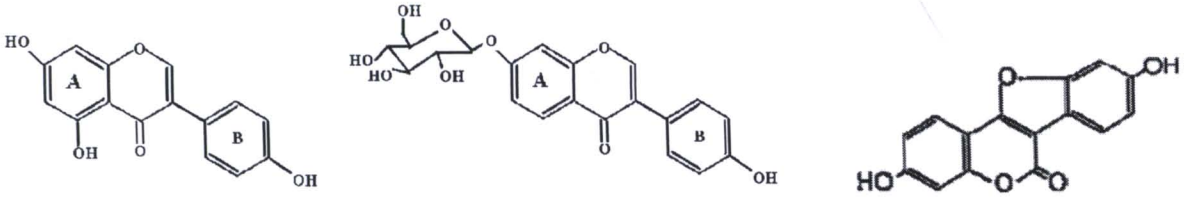
รูปที่ 4 กลไกการสร้างปมในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า (Chansa-ngavej, 2005)

รากขนอ่อนของถั่วเหลืองพันธุ์ต่างๆ จะขับเฟลโวนอยด์ (flavonoids) ชนิดต่างๆ เช่น Genistein, Daidzein และ Coumestrol เฟลโวนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นคาร์โบไฮเดรต (glycone structure) และโครงสร้างที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต (aglycone structure) ซึ่งประกอบด้วยวงเบนซินสองวงเชื่อมด้วย 3 คาร์บอน (C_6-C_3-C_6) ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 โครงสร้าง C_6-C_3-C_6 ซึ่งเป็นโครงสร้างส่วนที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรตของเฟลโวนอยด์ (Goodwin and Mercer, 2005)

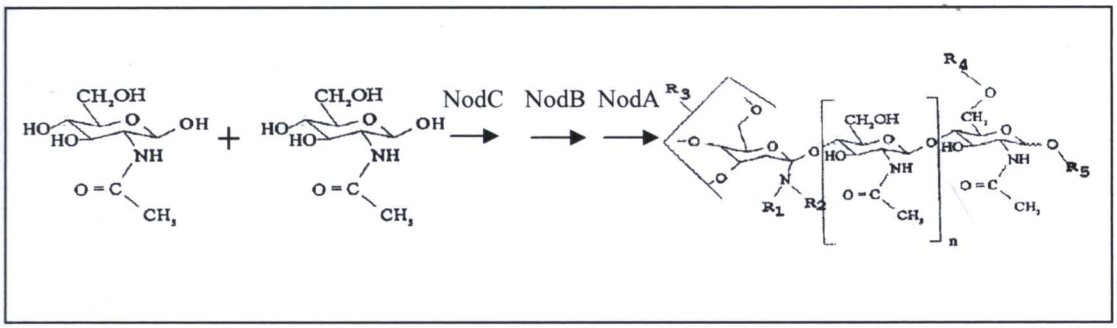
ดังนั้นเฟลโวนอยด์จึงเป็นอนุพันธ์ของ phenylpropane ซึ่งแบ่งเป็นชนิดต่างๆตาม oxidation state ของหน่วย C_3 (คาร์บอนตำแหน่งที่ 2, 3, 4 ในโมเลกุลที่แสดงในรูปที่ 5) รูปที่ 6 แสดงโครงสร้างของเฟลโวนอย์บางชนิดที่รากขนอ่อนถั่วเหลืองขับออกนอกราก



Genistein Daidzein Coumestrol

รูปที่ 6 สูตรโครงสร้างทางเคมีของเฟลโวนอยด์บางชนิดที่ขับออกจากรากถั่วเหลือง (Goodwin and Mercer, 2005)

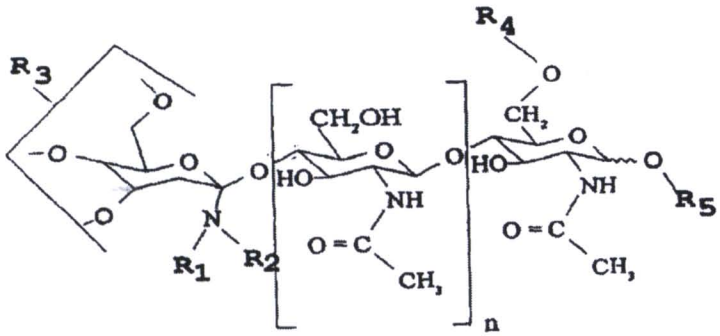
ไรโซเบียมถั่วเหลืองเข้าไปทำให้เกิดปมที่รากถั่วเหลือง (*Glycine max*) โดยเคลื่อนที่ไปยังรากขนอ่อนของถั่วเหลืองตามความเข้มข้นจากน้อยไปมาก (gradient) ของเฟลโวนอยด์ เช่น Genistein และ Daidzein ที่ขับออกมาจากรากถั่วเหลือง (Kosslak et al., 1987; Pueppke et al., 1998) ยีนของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้าที่เกี่ยวกับการเข้าไปทำให้เกิดปมที่รากถั่วเหลือง ได้แก่ *nodD1, nodYABC* ดังนี้ เฟลโวนอยด์ดังกล่าวข้างต้นจะเข้าไปในชั้นเพอริพลาสซึม (periplasm) ซึ่งอยู่ระหว่างผนังเซลล์และเซลล์เมมเบรนของ *B. japonicum* และทำปฏิกิริยากับบริเวณ C terminal ของโปรตีน NodD1 ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง NodD1 และเฟลโวนอยด์ ตามปกติการแสดงออกของ *nodD1* เกิดขึ้นโดยไม่มีการเหนี่ยวนำ แต่ถ้าภายในเซลล์ของ *B. japonicum* มีสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง NodD1 และเฟลโวนอยด์ สารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวจะเกาะกับโพรโมเตอร์ของ *nodD1* เรียกโพรโมเตอร์นี้ว่า *nodD1* box หลังจากสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวข้างต้นเกาะบน *nodD1* box จะเหนี่ยวนำให้เกิดการโค้งงอของดีเอ็นเอโมเลกุล ทำให้เกิดทรานสคริพชั่นและการแสดงออกของ *nodD1* มากขึ้น (Fisher and Long, 1993 ; Machado et al, 1998) นอกจากนี้สารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวข้างต้นระหว่าง NodD1 และเฟลโวนอยด์ยังเกาะบริเวณโพรโมเตอร์ของ *nodYABC* เรียกว่า *nodY* box ทำให้เกิดทรานสคริพชั่นของ *nodYABC* operon ซึ่งระบุรหัสการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ Nod factor ลำดับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นดังนี้ *nodC* ระบุรหัสการสังเคราะห์ N-acetylglucosaminyl transferase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเชื่อม N-acetylglucosaminyl units ด้วย β-1, 4 linkages ส่วน *nodB* ระบุรหัสการสังเคราะห์ N-deacetylase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการกำจัดกลุ่ม N-acetyl ของ N-acetyl glucosaminyl unit ที่ non-reducing end เอนไซม์ที่สามในกระบวนการสังเคราะห์ Nod factor ได้แก่ N-acyl transferase ซึ่งระบุรหัสการสังเคราะห์โดย *nodA* เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ acyl (เช่น C18:1 หรือ C16:1) ที่ N-acetyl glucosaminyl unit ที่ non-reducing end ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 การสังเคราะห์ Nod factor โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ที่ระบุรหัสการสังเคราะห์โดย *nodC*, *nodB* และ *nodA* (Stacey, 1995).

โครงสร้างของ nod factors ของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว และประเภทเพิ่มจำนวนช้า แตกต่างกันด้านจำนวน N-acetylglucosaminyl units และ กลุ่ม side chains (R_1-R_5) (Gil-Serrano et al., 1997) ตารางที่ 5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Nod factors ของ ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า

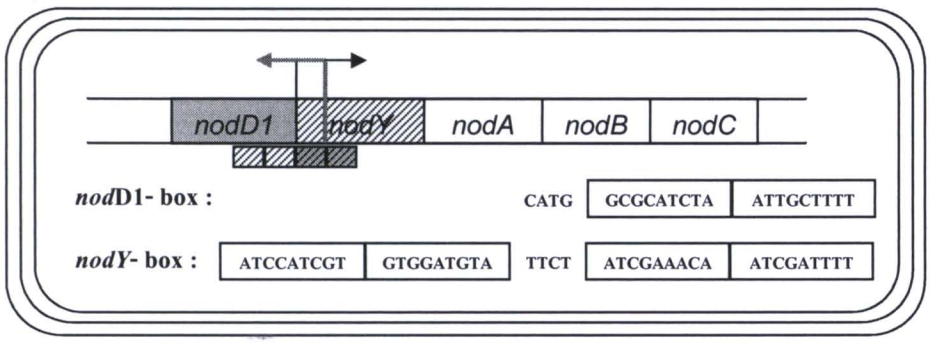
ตารางที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ Nod factors ที่ผลิตโดย *B. japonicum* สายพันธุ์ USDA110 , USDA135 และ *B. elkanii* สายพันธุ์ USDA61. อักษรย่อ: Ac, acetyl; Cb, carbamoyl; 2-0-MeFuc, 2-0-methylfucose; Fuc, fucose; Me, methyl; Gro, glycerol (Stacey , 1995).



STRAIN	R1	R2	R3	R4	R5	n
***B. japonicum* USDA110**						
NodBj-V(C18:1,MeFuc)	C18:1	H	H	2-O-MeFuc	H	3
***B. japonicum* USDA135**						
NodBj-V(C18:1, MeFuc)	C18:1	H	H	2-O-MeFuc	H	3
NodBj-V(Ac,C18:1,MeFuc)	C18:1	H	Ac	2-O-MeFuc	H	3
NodBj-V(C16:0,MeFuc)	C16:0	H	H	2-O-MeFuc	H	3
NodBj-V(Ac,C16:0,MeFuc)	C16:0	H	Ac	2-O-MeFuc	H	3
NodBj-V(C18:1, MeFuc)	C18:1	H	H	2-O-MeFuc	H	3
***B. elkanii* USDA61**						
NodBe-V(C18:1,MeFuc)	C18:1	H	H	2-O-MeFuc	H	3
NodBe-V(Ac,C18:1,MeFuc)	C18:1	H	Ac	2-O-MeFuc	H	3
NodBe-V(Cb,C18:1,NMe,MeFuc)	C18:1	Me	H	2-O-MeFuc	H	3
NodBe-V(Ac,Cb,C18:1,MeFuc)	C18:1	H	Ac,Cb	2-O-MeFuc	H	3
NodBe-IV(C18:1,MeFuc)	C18:1	H	H	2-O-MeFuc	H	2
NodBe-IV(Cb,C18:1,MeFuc)	C18:1	H	Cb	2-O-MeFuc	H	2
NodBe-IV(C18:1,Fuc,Gro)	C18:1	H	H	Fuc	Gro	2
NodBe-IV(C18:1,NMe,Fuc,Gro)	C18:1	Me	H	Fuc	Gro	2
NodBe-IV(Cb,C18:1,Fuc,Gro)	C18:1	H	Cb	Fuc	Gro	2
NodBe-IV(Cb,C18:1,NMe,Fuc,Gro)	C18:1	Me	Cb	Fuc	Gro	2

โครงสร้างของ Nod factor ของ *B. japonicum* ประกอบด้วย N-acetyl glucosaminyl 5 units เชื่อมกันด้วย β 1, 4 linkages (Stacey, 1995; Wang & Stacey, 1991) Nod factor อาจมีส่วนช่วยในการม้วนตัวของรากขนอ่อนและการทำให้เซลล์ในชั้น cortex ของรากขนอ่อนแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วจนเกิดเป็นปมดังนี้ เมื่อ *B. japonicum* เข้าใกล้รากขนอ่อนของถั่วเหลือง จะเกาะบนรากขนอ่อนบริเวณ lectin ซึ่งเป็นโปรตีนบนรากขนอ่อนที่เฉพาะเจาะจงให้พอลิแซ็กคาไรด์ของ *B. japonicum* เกาะ หลังจากนั้นปลายรากขนอ่อนม้วนตัวและ *B. japonicum* เข้าไปใน infection sac ซึ่งเป็นถุงที่เกิดจากเซลล์เมมเบรนของรากขนอ่อน ซึ่งจะยืดยาวเป็น infection thread ลำเลียงเซลล์ของ *B. japonicum* ไปยังเซลล์ในชั้น cortex ของรากถั่วเหลือง หลังจากนั้นส่วนปลายของ infection thread ที่บรรจุเซลล์ของ *B. japonicum* ถูกตัดออก กลายเป็น symbiosome ซึ่งประกอบด้วยเซลล์เมมเบรนของรากถั่วเหลืองหุ้ม *B. japonicum* ในรูปของ bacteroids ซึ่งมีรูปร่างไม่แน่นอนและไม่มีแฟลกเจลลา สามารถตรึงไนโตรเจน (Haeze and Holsters, 2002)

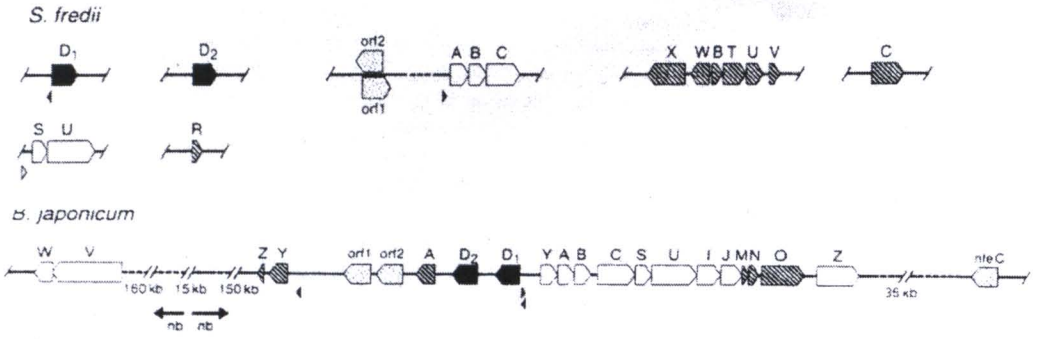
โพรโมเตอร์ของ *nodD*1 และโพรโมเตอร์ของ *nodYABC* ใน *B. japonicum* อยู่ทับกันบางส่วน (partially overlapping promoters) ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 ไดอะแกรมแสดงให้เห็นว่าบางส่วนของโพรโมเตอร์ของ *nodD*1 ซึ่งแทนด้วยกล่องสี่เหลี่ยมสองกล่อง อยู่ทับกับโพรโมเตอร์ของ *nodYABC* ซึ่งแทนด้วยกล่องสี่เหลี่ยมสี่กล่อง โพรโมเตอร์ของ *nodD1* หรือ *nodD1* box ของ *B. japonicum* ประกอบด้วย 9 นิวคลีโอไทด์ อยู่เรียงต่อกันสองครั้ง ซึ่งแทนด้วยกล่อง 2 กล่องในไดอะแกรม โพรโมเตอร์ของ *nodYABC* เรียกว่า *nodY* box ประกอบด้วย 9 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเรียงต่อกันสี่ครั้ง ลูกศรแสดงทิศทางทรานสคริพชั่นของยีน *nodD1* และของ *nodY*ABC operon ใน *B. japonicum* (Wang and Stacey, 1991)

Pueppke และคณะ (1998) รายงานว่ารากขนอ่อนของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วขับเฟลโวนอยด์ Coumestrol ในขณะที่ Kosslak และคณะ (1987) รายงานว่ารากขนอ่อนของไรโซเบียมถั่วเหลือง ประเภทเพิ่มจำนวนช้า ขับเฟลโวนอยด์ Genistein หรือ Daidzein ซึ่งมีโครงสร้างแตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 6 เฟลโวนอยด์เหล่านี้ทำปฏิกิริยากับบริเวณปลาย C ของโปรตีน NodD1 ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *nodD1* ซึ่งระบุรหัสลำดับกรดอะมิ

โนที่ปลาย C ของ NodD1 จะต่างกัน ภาคผนวก ก แสดง multiple alignments ของยีน *nodD1* ในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว (*Sinorhizobium fredii)* และไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า (*B. japonicum*, *B. elkanii*) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ดาวน์โหลด จาก GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ผลการทำ multiple alignments พบว่าลำดับนิว คลีโอไทด์ของ *nodD1* ของไรโซเบียมทั้งสองประเภทต่างกัน ดังแสดงในภาคผนวก ก นอกจากนี้ Schlaman และคณะ (1992) ไม่รายงานการมี *nodY* ในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว *Sinorhizobium fredii* ดังแสดงในรูปที่ 9



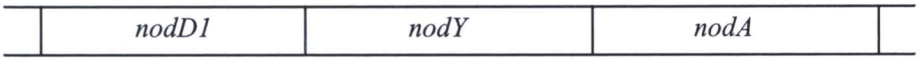
รูปที่ 9 แผนที่แสดงยีนที่เกี่ยวข้องกับการเข้าสร้างปมของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว (*S. fredii*) และไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า (*B. japonicum*) ลูกศรขนาดกว้าง (wide arrows) แสดงยีนและทิศทางของทรานสคริพชั่นของยีนเหล่านั้น (Schlaman et al., 1992)

แนวเหตุผลในการวิจัย

จากการตรวจเอกสารดังรายงานข้างต้น พบว่ายังไม่มีรายงานการพบ *nodY* ในไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว ในขณะที่ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้ามี *nodY* (Schlaman et al., 1992) ดังแสดงในไดอะแกรมต่อไปนี้

ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็ว

ไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนช้า



นอกจากนี้ *nodD1* และ *nodA* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการเข้าไปสร้างปม ดังรายละเอียดที่รายงานแล้วในคำนำ ประกอบกับในปัจจุบันยังไม่มีผู้รายงานหน้าที่ของผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ระบุรหัสโดย *nodY* ดังนั้นบริเวณระหว่าง *nodD1* และ *nodA* จึงเป็นบริเวณที่น่าสนใจ ในด้านของความสามารถเข้าไปสร้างปมและความแตกต่างเชิงวิวัฒนาการของไรโซเบียมถั่วเหลืองประเภทเพิ่มจำนวนเร็วและประเภทเพิ่มจำนวนช้า งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะหาความเป็นไปได้ของการใช้

ความแตกต่างของบริเวณระหว่าง *nodD1* และ *nodA* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองทั้งสองประเภทในการระบุศักยภาพการเข้าสร้างปมและศักยภาพการตรึงไนโตรเจน โดยใช้ RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) ระบุความแตกต่างของบริเวณดังกล่าว

RFLPs หมายถึงรูปแบบต่างๆการเรียงตัวบนแผ่นอกาโรสเจลหลังการทำ agarose gel electrophoresis ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วย restriction enzyme(s) ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอต่างกัน จะมี restriction sites ต่างกันทำให้รูปแบบการเรียงตัวบนแผ่นอกาโรสเจลหลังการทำ agarose gel electrophoresis ต่างกันเกิดเป็น RFLPs

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

หาความสัมพันธ์ระหว่าง RFLPs ของชิ้นส่วนบริเวณ *nodD1* และ *nodA* ของไรโซเบียมถั่วเหลืองกับศักยภาพการเข้าสร้างปมและศักยภาพการตรึงไนโตรเจนเพื่อใช้ประกอบการพิจารณาเสนอใช้ RFLPs ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าว ในการระบุศักยภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมถั่วเหลือง