บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการเก็บปมจากต้นถั่วเหลืองที่ปลูกในฤดูกาลเพาะปลูกในเขต อำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัย และจากต้นถั่วเหลืองที่ปลูกในดินจังหวัดนครนายก มาคัดแยกเชื้อเบรดิไรโซเบียม เริ่มจากการสังเกตลักษณะรูปร่างโคโลนี ระยะเวลาในการเจริญ การดูดกลืนสีคองโกเรดจากอาหารแข็งยีสต์แมนนิทอลผสมคองโกเรด การผลิตกรด-ด่างบนอาหารแข็งยีสต์แมนนิทอลผสมบรอมไทมอลบลู การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และทำการพิสูจน์ว่าเชื้อที่แยกได้เป็นเบรดิ-ไรโซเบียมจริง โดยสังเกตการสร้างปมบริเวณรากถั่วชีราโทรก็สามารถแยกเชื้อเบรดิไรโซเบียมจากปมรากถั่วเหลืองที่ปลูกในเขตอำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัยได้ทั้งสิ้นจำนวน 41 ไอโซเลต และแยกเชื้อเบรดิไรโซเบียมจากปมรากถั่วเหลืองที่ปลูกในดินจังหวัดนครนายกได้ทั้งสิ้นจำนวน 55 ไอโซเลต เชื้อที่แยกได้ทั้งหมดมีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่น และมีเมือก ใช้ระยะเวลา 5-7 วัน ไม่ดูดกลืนสีคองโกเรด และเปลี่ยนสีอาหารแข็งยีสต์แมนนิทอลผสมบรอมไทมอลบลู บริเวณรอบๆโคโลนีจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าเป็นเชื้อที่เจริญช้า และผลิตด่าง เมื่อนำไปทดสอบทางชีวเคมี เซลติดสีกรัมลบ รูปร่างเป็นแท่ง สามารถเคลื่อนที่ได้ในอาหารกึ่งแข็งส่วนใหญ่ ไม่ย่อยสลายแป้ง เจริญได้ในอาหารเหลวยีสต์แมนนิทอลที่มีพีเอช 8.0 แต่ไม่สามารถเจริญในอาหารเหลวยีสต์แมนนิทอลที่มีโซเดียมคลอไรด์มากกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นส่วนผสมได้ เมื่อนำไปทดสอบการเกิดปมกับถั่วชีราโทร เชื้อทุกไอโซเลตสามารถสร้างปมได้ จึงสรุปได้ว่าเชื้อที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองที่ปลูกในดินเขตอำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัยทั้ง 41 ไอโซเลตและเชื้อที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองที่ปลูกในดินจังหวัดนครนายกทั้ง 55 ไอโซเลต เป็นเบรดิไรโซเบียมจริงสำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การจำแนกเชื้อเบรดิไรโซเบียมที่แยกได้ด้วยวิธี ELISA โดยใช้แอนติบอดีของเบรดิไรโซเบียม8 สายพันธุ์ ได้แก่ THA5 TAL944 TAL377 THA6 USDA142 TAL432 USDA94และ USDA76 ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของเบรดิไรโซเบียมที่แยกได้สามารถจำแนกเชื้อเบรดิไรโซเบียมทั้งหมด 96 ไอโซเลต ออกเป็น 7 กลุ่มตามการเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีของเบรดิไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐาน มีทั้งหมดจำนวน 35 ไอโซเลตได้แก่ กลุ่มของแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีของเบรดิไรโซเบียมสายพันธุ์มาตราฐาน THA 5 มีจำนวน 9 ไอโซเลต กลุ่มของแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีของเบรดิไรโซเบียมสายพันธุ์มาตราฐาน TAL 377 มีจำนวน 2 ไอโซเลต ทำปฏิกิริยากับ TAL 944 มีจำนวน17 ไอโซเลต ทำปฏิกิริยากับ TAL 432 มีจำนวน 2 ไอโซเลต ทำปฏิกิริยากับ USDA 76 มีจำนวน 3ไอโซเลต และ ทำปฏิกิริยากับ USDA 142มีจำนวน 2 ไอโซเลต ส่วนกลุ่มของแอนติเจนที่ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีสายพันธุ์มาตราฐานกลุ่มใดเลยมีจำนวนทั้งหมด 61 ไอโซเลตจะเห็นได้ว่าการจำแนกเชื้อเบรดิไรโซเบียมที่แยกได้จากปมรากถั่วเหลือง โดยวิธี ELISA นั้นสามารถแยกเบรดิไรโซเบียมระหว่างสายพันธุ์ได้ และสามารถแบ่งได้เป็นกลุ่มตามการเกิดปฏิกิริยากับแอนติเซรุ่มของเบรดิไรโซเบียมสายพันธุ์ที่นำมาใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบได้ ถ้ามีแอนติเซรุ่มของเบรดิไรโซเบียมของสายพันธุ์ที่จะใช้เปรียบเทียบครบทุกสายพันธุ์

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *B. japonicum* ที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองที่ปลูกในเขตอำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัยและที่แยกจากดินในจังหวัดนครนายก ทั้งสิ้นจำนวน 96 ไอโซเลต ปรากฏว่าเชื้อเบรดิไรโซเบียมแต่ละเชื้อทำให้น้ำหนักแห้งของต้น จำนวนปม น้ำหนักแห้งของปม ตลอดจนอัตราการตรึงไนโตรเจนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.01 โดยมีเชื้อเบรดิไรโซเบียมที่ทำให้น้ำหนักแห้งของต้นสูงมีจำนวน 5 ไอโซเลต ส่วนเชื้อเบรดิไรโซเบียมที่ทำให้น้ำหนักรองลงมามีจำนวน 12 ไอโซเลต แต่ละไอโซเลตให้น้ำหนักแห้งของต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเชื้อเบรดิไรโซเบียม ที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ต้นถั่วเกิดปมสูง มีจำนวน 6 ไอโซเลต และเบรดิไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ต้นถั่วเกิดปมได้รองลงมามีจำนวน 5 ไอโซเลต แต่ละไอโซเลตให้จำนวนปมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 เชื้อเบรดิไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพ

ในการสร้างเนื้อเยื่อปมให้มีน้ำหนักแห้งปมสูง มีจำนวน 2 ไอโซเลต และเชื้อเบรดิไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเนื้อเยื่อปมให้มีน้ำหนักปมรองลงมา มีจำนวน 6 ไอโซเลต แต่ละไอโซเลตให้น้ำหนักแห้งของปมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.01 และเชื้อเบรดิไรโซเบียมที่มีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนสูง มีจำนวน 5 ไอโซเลต ส่วนเชื้อเบรดิไรโซเบียมที่มีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนรองลงมามีจำนวน 5 ไอโซเลต แต่ละไอโซเลตให้อัตราการตรึงไนโตรเจนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.01เชื้อเบรดิไรโซเบียมที่มีค่า Specific Nirogenase Activity สูง มีจำนวน 3 ไอโซเลต ส่วนเชื้อเบรดิไรโซเบียมที่มีค่า Specific Nirogenase Activity รองลงมามีจำนวน 2 ไอโซเลต แต่ละไอโซเลตให้อัตราการตรึงไนโตรเจนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.01 เชื้อ *B. japonicum* ที่สมควรนำไปใช้ในการทดลองต่อคือ ไอโซเลตหมายเลข SSN12 SSN17 และ SSN8 เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ถั่วเหลืองมีน้ำหนักแห้งของส่วนลำต้น จำนวนปม น้ำหนักแห้งปม และอัตราการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด

ผลจากการหาความสัมพันธ์ระหว่าง น้ำหนักแห้งของต้นกับจำนวนปม น้ำหนักแห้งปมและอัตราการตรึงไนโตรเจนมีค่า r = 0.60 0.72 0.49 ตามลำดับ ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปมกับน้ำหนักแห้งปม และอัตราการตรึงไนโตรเจน มีค่า r = 0.63 0.50 ตามลำดับ และความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักปมแห้งกับอัตราการตรึงไนโตรเจนมีค่า r = 0.63 จากความสัมพันธ์ดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักปมแห้งกับอัตราการตรึงไนโตรเจนมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงกว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปมและน้ำหนักต้นแห้งกับอัตราการตรึงไนโตรเจน สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้น่าจะสามารถใช้ค่าที่ได้จากน้ำหนักปมแห้งแทนอัตราการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ARA ได้

ผลจากการแสดงความถี่ของ *B . japonicum* เกี่ยวกับ น้ำหนักต้นแห้ง จำนวนปม น้ำหนักแห้งปม และ ARA น้ำหนักต้นแห้งจะมีความถี่สูงสุด อยู่ในช่วง 0.80-1.19 กรัมต่อต้น มีจำนวน 47 ไอโซเลต และช่วงที่มีความถี่รองลงมาคือ 0.40-0.79 กรัมต่อต้น มีจำนวน 25 ไอโซเลต ดังแสดงในรูปที่ 5 จำนวนปม จะมีความถี่สูงสุด อยู่ในช่วง 25-37 ปม มีจำนวน 37 ไอโซเลต และช่วงที่มีความถี่รองลงมา คือ 12-25 ปม มีจำนวน 30 ไอโซเลต ดังแสดง

ในรูปที่ 6 น้ำหนักปมแห้ง จะมีความถี่สูงสุด อยู่ในช่วง 0.06-0.119 กรัมต่อต้น มีจำนวน 45 ไอโซเลต และช่วงที่มีความถี่รองลงมาคือ 0.12-0.179 กรัมต่อต้น มีจำนวน 23 ไอโซเลต ดังแสดงในรูปที่ 7 และ ARA จะมีความถี่สูงสุดอยู่ในช่วง 0.00-0.99ไมโครโมลต่อชั่วโมงต่อต้น มีจำนวน 30 ไอโซเลตและช่วงที่มีความถี่รองลงมาคือ 1.00-1.99 ไมโครโมลต่อชั่วโมงต่อต้น มีจำนวน 27 ไอโซเลต ดังแสดงในรูปที่ 8

จากการศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ของยีน *hup* ใน *B.japonicum* ที่แยกจากปมรากรากถั่วเหลืองที่ปลูกในเขตอำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัย จำนวน 41 ไอโซเลต ไม่พบไอโซเลตที่มีการแสดงออกของยีน *hup* ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระยะเวลาในการคัดแยกเชื้อจากปมล่าช้าเกินไปเชื้อที่ได้จึงมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนต่ำ จะเห็นได้จากค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งต้น จำนวนปม น้ำหนักแห้งปม และอัตราการตรึงไนโตรเจนมีค่าต่ำกว่าเชื้อ *B. japonicum* ที่แยกจากดินในจังหวัดนครนายก

ลักษณะฟีโนไทป์ของยีน *hup* ไอโซเลตที่แยกจากปมรากถั่วเหลืองที่ปลูกในดินจังหวัดนครนายก จำนวน 55 ไอโซเลต พบไอโซเลตที่แสดงลักษณะของ*hup* ทั้งสิ้นจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ SSN10, SSN46 และ SSN52 คิดเป็น 5.45 เปอร์เซ็นต์ของไอโซเลตทั้งหมด ไอโซเลตอื่นๆนอกจากที่กล่าวมาพบว่าไม่มีระบบของเอนไซม์ไฮโดรจีเนส สามารถสรุปความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตที่มีฟีโนไทป์ของยีน *hup* กับ น้ำหนักแห้งของต้น จำนวนปม น้ำหนักแห้งปม และอัตราการตรึงไนโตรเจน ดังแสดงในตารางที่ 20 แสดงว่าลักษณะฟีโนไทป์ของยีน *hup* มีผลต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนอยู่เล็กน้อย ทั้งนี้จะต้องมีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องร่วมอยู่ด้วย จึงจะสามารถช่วยให้มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งที่มีการใช้คาร์โบไฮเดรต(supply carbohydrate)คือขบวนการสังเคราะห์แสง และธาตุอาหารที่จำเป็น ถ้าจะให้ได้กิจกรรมสูงจะต้องปลูกพืชในที่ที่มีความเข้มแสงสูง ในห้องทดลองควรมีความเข้มแสงอยู่ในช่วง 400-700 $\mu E.m^{-2}.sec^{-1}$ หรือปลูกในเรือนทดลอง หรือปลูกในสภาพไร่