สหสัมพันธ์ระหว่าง ฟีโนไทป์ของยีน *hup* กับศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของ *Bradyrhizobium japonicum*

นางสาว จิรพรรณ ทวีสุขสมบัติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2538

ISBN 974-632-276-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16750147

Correlation between *hup* Genes Phenotype and Nitrogen Fixing Potential of *Bradyrhizobium japonicum*

Miss Jiraparn Tweesuksombat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-632-276-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สหสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์ของยีน *hup* กับศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของ *Bradyrhizobium japonicum*
โดย	นางสาวจิรพรรณ ทวีสุขสมบัติ
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา ชาญสง่าเวช
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สิน สีหนนทน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา ชาญสง่าเวช)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เลอลักษณ์ จิตรดอน)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

จิรพรรณ ทวีสุขสมบัติ : สหสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์ของยีน hup กับศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของ Bradyrhizobium japonicum (CORRELATION BETWEEN hup GENES PHENOTYPE AND NITROGEN FIXING POTENTIAL OF Bradyrhizobium japonicum) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.กาญจนา ชาญสง่าเวช อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.นันทกร บุญเกิด, 136 หน้า. ISBN 974-632-276-1

คัดแยกเชื้อ Bradyrhizobium japonicum จากปมรากถั่วเหลืองที่ปลูกในอำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัย และจังหวัดนครนายก โดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและทดสอบการเกิดปมกับถั่วซีราโทร ได้ B. japonicum ทั้งหมด 96 ไอโซเลต จัดกลุ่มทางซีรัมวิทยาโดยวิธี ELISA โดยใช้แอนติซีรัมจากสายพันธุ์ THA5, THA6, TAL377, TAL944, TAL432, USDA76, USDA94 และ USDA142 ได้จำนวน 9, 0, 2, 17, 2, 3, 0 และ 2 ไอโซเลต ตามลำดับ ที่เหลือ 61 ไอโซเลต ไม่ทำปฏิกิริยากับสายพันธุ์ทั้งแปด เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของ B. japonicum ทั้ง 96 ไอโซเลต โดยทดสอบกับถั่วเหลืองสายพันธุ์ สจ.5 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 83.7 $\mu E.m^{-2}.sec^{-1}$. พบว่าไอโซเลตที่ให้น้ำหนักแห้งต่อต้นสูงสุดในช่วง 1.61-2.06 กรัม/ต้น ได้แก่ SSN18, SSN14, SSN17, SSN21 และ SSN12 ไอโซเลตที่ให้จำนวนปมสูง (59-74) ได้แก่ SSN14, SSN4, SSN11, SSN19, SSN18 และ SSN15 ไอโซเลตที่ให้น้ำหนักแห้งปมสูงสุดอยู่ในช่วงระหว่าง 0.24-0.30 กรัม ได้แก่ SSN8 และ SSN18 ไอโซเลตที่ให้อัตราการตรึงไนโตรเจนโดยปมถั่วโดยวิธี acetylene reduction test สูงสุดมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 4.44-5.54 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ได้แก่ SSN12, SSN17, SSN8, SSN15 และ SSN51 ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า B. japonicum สายพันธุ์ที่ให้น้ำหนักแห้งต้นสูง จำนวนปมสูง น้ำหนักแห้งปมสูง มิได้เป็นสายพันธุ์ที่มีอัตราการตรึงไนโตรเจนสูงเสมอไป อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์ (r) พบว่าน้ำหนักต้นแห้งมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักปมแห้งมากที่สุด (r=0.72) ผลการตรวจลักษณะฟีโนไทป์ของยีน hup ใน B. japonicum ที่แยกจากจังหวัดสุโขทัยทั้ง 41 ไอโซเลต ไม่พบไอโซเลตที่มีลักษณะฟีโนไทป์ของยีน hup ส่วน B. japonicum จำนวน 55 ไอโซเลตที่แยกจากจังหวัดนครนายกมี 3 ไอโซเลต แสดงลักษณะฟีโนไทป์ของยีน hup ได้แก่ SSN10, SSN46 และ SSN52 ผลการทดลองพบว่าไอโซเลตที่มีลักษณะฟีโนไทป์ของยีน hup มีประสิทธภาพในการตรึงไนโตรเจนในระดับปานกลาง ผลการทดลองมิได้แสดงความสัมพันธ์ทางบวกอย่างแน่ชัดระหว่างฟีโนไทป์ของยีน hup กับประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของไอโซเลตที่ใช้ในการทดลอง

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต จิรพรรณ ทวีสุขสมบัติ

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C526096 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: hup / Bradyrhizobium japonicum

JIRAPARN TWEESUKSOMBAT : CORRELATION BETWEEN hup GENES PHENOTYPE AND NITROGEN FIXING POTENTIAL OF Bradyrhizobium japonicum. THESIS ADVISOR ASSO. PROF. KANJANA CHANSA-NGAVEJ, Ph.D., INSTRUCTOR NANTAKORN BOONKERD, Ph.D. 136 pp.
ISBN 974-632-276-1

Bradyrhizobium japonicum was isolated from soybean nodules collected from Sawankalok District, Sukhothai Province, and Nakornnayok Province. Ninety-six isolates were tested by biochemical reactions. Authentication was performed with siratro plants. Serological grouping by ELISA employing 8 antisera of THA5, THA6, TAL377, TAL944, TAL432, USDA76, USDA94 and USDA142 showed that 9,0,2,17,2,3,0 and 2 isolates reacted positively with each antiserum, respectively. Nitrogen fixing potential was tested on soybean cv. SJ5 grown at 28° C with light intensity of 83.7 $\mu E.m^{-2}.sec^{-1}$. Highest plant dry weight in the range of 1.61-2.06 g/plant was obtained with the inoculation of the following isolates : SSN18, SSN14, SSN17, SSN21 and SSN12. The highest nodule numbers (59-74) were obtained from inoculation of the following isolates : SSN14, SSN4, SSN11, SSN19, SSN18 and SSN15. Isolates which resulted in the highest nodule dry weight in the range of 0.24-0.30 grams were SSN8 and SSN18. Acetylene reduction test revealed that the isolates which yielded the highest activities in the range of 4.44-5.54 μmoles per hour per plant were SSN12, SSN17, SSN8, SSN15 and SSN51. The experimental results revealed that isolates which yielded plant dry weight, nodule numbers and nodule dry weight in the highest ranges are not necessarily those with the highest range of acetylene reduction activities. However, the best correlation coefficient (r) was found for plant dry weight and nodule dry weight (r=0.72). All the 41 B. japonicum isolates obtained from Sukhothai Province were not found to exhibit hup phenotype while 3 isolates out of the 55 isolates from Nakornnayok Province showed hup phenotype. The 3 isolates were SSN10, SSN46 and SSN52. It was found out that nitrogen fixation potential of all the 3 isolates with hup phenotype was of medium level. Experimental results did not reveal clear-cut positive correlation between hup phenotype and nitrogen fixing potential of the isolates tested.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต จิราพรรณ ทวีสุขสมบัติ

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา ชาญสง่าเวช และอาจารย์ ดร.นันทกร บุญเกิด ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำ แนวความคิด ตลอดจนช่วยแก้ไขให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตต์สิน สีหนนทน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เลอลักษณ์ จิตรดอน ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร. อัจฉรา นันทกิจ คุณสมศักดิ์ โคตรพงศ์ คุณ ปรีชา วดีศิริศักดิ์ และพี่ๆ ที่ห้องปฏิบัติการไรโซเบียม ศูนย์ทรัพยากรการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษา ข้อมูลเกี่ยวกับเบรดิไรโซเบียม แอนติเซรุ่ม และให้กำลังใจ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือเกี่ยวกับการทำ ELISA เครื่องคอมพิวเตอร์สำหรับการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IRISTAT วิเคราะห์ analysis of variance และพิมพ์วิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณสุนี พรรคประพันธ์ ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัยที่ให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องกาซโครมาโตกราฟฟี

ขอขอบคุณ รศ.ดร.กิตติ อินทรานนท์ ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหกรรม ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้โปรแกรม สำเร็จรูปวิเคราะห์ analysis of variance

ขอขอบพระคุณท่านคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่ช่วยให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จ

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนวิจัยบางส่วน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของบัณฑิตวิทยาลัยที่ช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ เตี่ย แม่ พี่ๆและน้อง ที่ให้ความช่วยเหลือทั้งกำลังทรัพย์ กำลังใจ ให้คำแนะนำ ปรึกษา จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญรูป ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ 1

2 ตรวจเอกสาร 4

3 วิธีดำเนินการวิจัย 30

4 ผลการทดลอง 41

5 อภิปรายผลการทดลอง 95

6 สรุปผลการทดลอง 105

เอกสารอ้างอิง 109

ภาคผนวก ก 120

ภาคผนวก ข 125

ภาคผนวก ค 130

ภาคผนวก ง 132

ประวัติผู้เขียน 136

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ความแตกต่างระหว่างไรโซเบียมกับเบรดิไรโซเบียม..... 5

2 การจัดกลุ่มแบคทีเรียตามกลุ่มของพืชตระกูลถั่วที่เข้าอยู่อาศัย 6

3 ปฏิกิริยา ELISA ระหว่างสายพันธุ์*Bradyrhizobium japonicum* และแอนติซีรัมของแต่ละสายพันธุ์ 11

4 แหล่งที่มาของเบรดิไรโซเบียมที่ใช้ในการผลิตแอนติซีรุ่ม ซึ่งใช้ในการทำ ELISA 35

5 ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีของ *B. japonicum* สายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์โดยวิธี ELISA 43

6 น้ำหนักแห้งเรียงจากมากไปน้อยของส่วนลำต้นถั่วเหลือง (*Glycine max*) สายพันธุ์ สจ.5 ซึ่งเลี้ยงใน Leonard jars โดยมีการเติม *B.japonicum* ไอโซเลตต่าง ๆ ที่แยกได้ ภาวะการเจริญ ได้แก่ ความเข้มแสง 83.7 $\mu E.m^{-2}.sec^{-1}$ ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 38 วัน 49

7 จำนวนปมบริเวณรากต้นถั่วเหลืองสายพันธุ์ สจ.5 เรียงจากมากไปน้อย เลี้ยงใน Leonard jars โดยมีการเติม *B. japonicum* ไอโซเลตต่างๆ ที่แยกได้ ภาวะการเจริญ ได้แก่ ความเข้มแสง 83.7$\mu E.m^{-2}.sec^{-1}$ ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 38 วัน 52

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

8 น้ำหนักแห้งของปมถั่วเหลือง สายพันธุ์ สจ.5 เรียงจากมากไปน้อย เลี้ยงใน Leonard jars โดยมีการเติม *B. japonicum* ไอโซเลตต่าง ๆ ที่แยกได้ ภาวะการเจริญ ได้แก่ ความเข้มแสง 83.7 $\mu E.m^{-2}.sec^{-1}$. ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 38 วัน 55

9 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลือง สายพันธุ์ สจ.5 โดยวิธี ARA เรียงจากมากไปน้อย เลี้ยงใน Leonard jars โดยมีการเติม *B. japonicum* ไอโซเลตต่าง ๆ ที่ แยกได้ ภาวะการเจริญ ได้แก่ ความเข้มแสง 83.7 $\mu E.m^{-2}.sec^{-1}$ ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 38 วัน 58

10 Specific Nitrogenase activity ของถั่วเหลือง สายพันธุ์ สจ.5 (ไมโครโมล/ชั่วโมง/กรัมของน้ำหนักปมแห้ง) เรียงจากมากไปน้อย เลี้ยงใน Leonard jars โดยมีการเติม *B.japonicum* ไอโซเลตต่าง ๆ ที่แยกได้ ภาวะการเจริญ ได้แก่ ความเข้มแสง 83.7 $\mu E.m^{-2}.sec^{-1}$ ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 38 วัน 61

11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของส่วนลำต้นถั่วเหลือง โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ analysis of variance 73

12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยจำนวนปมบริเวณรากถั่วเหลือง โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ analysis of variance 74

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของปมบริเวณราก ถั่วเหลือง โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป สำหรับวิเคราะห์ analysis of variance 75

14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ ค่าเฉลี่ย ARA จากปมรากถั่วเหลือง โดยใช้ โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ analysis of variance 76

15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ ค่าเฉลี่ย Specific Nitrogenase Activity จากปมรากถั่วเหลือง โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ analysis of variance 77

16 การหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของน้ำหนักแห้งของต้น จำนวนปม น้ำหนักแห้งของปม และอัตราการตรึงไนโตรเจน ความสัมพันธ์ของจำนวนปม กับน้ำหนักแห้งปม และอัตราการตรึงไนโตรเจน และความสัมพันธ์ระหว่าง น้ำหนักแห้งปมกับอัตราการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *B.japonicum* ที่แยก จากต้นถั่วเหลืองที่ปลูกในเขตอำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัยและที่แยกจาก ดินใน จังหวัดนครนายก 78

17 การผลิตไฮโดรเจนโดย *B.japonicum* สายพันธุ์ที่แยกจากปมรากถั่วเหลือง ที่ปลูกในเขตอำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัย (มี.ค.-ก.ย. 2535) เลี้ยง เชื้อใน uptake medium ภายใต้กาซ N_2 82 เปอร์เซ็นต์ CO_2 10 เปอร์เซ็นต์ O_2 5 เปอร์เซ็นต์ และ H_2 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที และ 72 ชั่วโมง 86

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

18 การผลิตไฮโดรเจนโดย *B.japonicum* สายพันธุ์ที่แยกจากปมรากถั่วเหลือง ที่ปลูกในดินซึ่งนำมาจากจังหวัดนครนายก เลี้ยงเชื้อใน uptake medium ภายใต้กาซ N_2 82 เปอร์เซ็นต์ CO_2 10 เปอร์เซ็นต์ O_2 5 เปอร์เซ็นต์ และ H_2 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที และ 72 ชั่วโมง 89

19 ผลการผลิตไฮโดรเจนอัพเทคโดย *B.japonicum* ไอโซเลตที่พบในเบื้องต้น ว่ามีการแสดงออกของยีน *hup* เลี้ยงเชื้อใน uptake medium ภายใต้กาซ N_2 82 เปอร์เซ็นต์ CO_2 10 เปอร์เซ็นต์ O_2 5 เปอร์เซ็นต์ และ H_2 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที และ 72 ชั่วโมง 92

20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตของเชื้อ *B. japonicum* ที่มีฟีโนไทป์ *hup*$^+$ กับน้ำหนักแห้งของต้น จำนวนปม น้ำหนักแห้งปม และอัตราการตรึงไนโตรเจน ซึ่งได้จากการปลูกถั่วเหลือง สายพันธุ์ สจ. 5 เป็นเวลา 38 วัน ที่ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 83.7 $\mu E.m^{-2}.sec^{-1}$ 94

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ หน้า

1 แสดงบทบาทของเหล็กโปรตีน (Fe protein)(Fe) และ
โมลิบดีนัมเหล็กโปรตีน (MoFe protein)(MoFe) ในการตรึง
ไนโตรเจนและการเกิดไฮโดรเจน (H_2) โดยปฏิกิริยาการเร่ง
ของไนโตรจีเนส 20

2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการตรึงไนโตรเจนและไฮโดรเจนออกซิเดชั่น 24

3 แสดงบริเวณของ *hup* ของ *B. japonicum* พร้อมทั้งตำแหน่งที่ตั้งของยีนส์ 26

4 แสดงกราฟการเจริญของ *B.japonicum*ไอโซเลต SS6 ในอาหารเหลว
ยีสต์-แมนนิทอล ที่ค่าการดูดกลืนแสง 680 นาโนเมตร 43

5 แสดงกราฟสี่เหลี่ยมความถี่ของการให้น้ำหนักต้นแห้งของ
B. japonicum จำนวน 96 ไอโซเลต 64

6 แสดงกราฟสี่เหลี่ยมความถี่ของการให้จำนวนปมของ
B. japonicum จำนวน 96 ไอโซเลต 65

7 แสดงกราฟสี่เหลี่ยมความถี่ของการให้น้ำหนักปมแห้งของ
B. japonicum จำนวน 96 ไอโซเลต 66

8 แสดงกราฟสี่เหลี่ยมความถี่ของ ARA ของ *B. japonicum*
จำนวน 96 ไอโซเลต 67

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ หน้า

9 แสดงกราฟสี่เหลี่ยมการให้น้ำหนักต้นแห้งของ *B. japonicum* จำนวน 96 ไอโซเลต เรียงจากมากไปน้อย โดยวิธี DMRT 68

10 แสดงกราฟสี่เหลี่ยมการให้จำนวนปมของ *B. japonicum* จำนวน 96 ไอโซเลต เรียงจากมากไปน้อย โดยวิธี DMRT 69

11 แสดงกราฟสี่เหลี่ยมการให้น้ำหนักปมแห้งของ *B. japonicum* จำนวน 96 ไอโซเลต เรียงจากมากไปน้อย โดยวิธี DMRT 70

12 แสดงกราฟสี่เหลี่ยมการให้ ARA ของ *B. japonicum* จำนวน 96 ไอโซเลต เรียงจากมากไปน้อย โดยวิธี DMRT 71

13 แสดงกราฟสี่เหลี่ยม Specific Nitrogenase Activity ของ *B.japonicum* จำนวน 96 ไอโซเลต เรียงจากมากไปน้อย โดยวิธี DMRT 72

14 แสดงกราฟเส้นความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักต้นแห้งกับ ARA ของ *B. japonicum* จำนวน 96 ไอโซเลต 79

15 แสดงกราฟเส้นความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักต้นแห้งกับ จำนวนปม ของ *B. japonicum* จำนวน 96 ไอโซเลต 80

16 แสดงกราฟเส้นความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักต้นแห้งกับ น้ำหนักปมแห้ง ของ *B. japonicum* จำนวน 96 ไอโซเลต 81

17 แสดงกราฟเส้นความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักปมแห้งกับ จำนวนปม ของ *B. japonicum* จำนวน 96 ไอโซเลต 82

18 แสดงกราฟเส้นความสัมพันธ์ระหว่าง ARA กับ จำนวนปม ของ *B. japonicum* จำนวน 96 ไอโซเลต 83

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ หน้า

19 แสดงกราฟเส้นความสัมพันธ์ระหว่าง ARA กับน้ำหนักปมแห้ง ของ *B. japonicum* จำนวน 96 ไอโซเลต 84

20 ไดอะแกรมของ Leonard jar 130

21 แสดงการออกแบบการทดลองแบบ randomized complete block design ...132