รายงานผลการทดลองเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. **โครงการวิจัย** : โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและจุลินทรีย์ย่อยสลายทางการเกษตร

   กิจกรรมที่ 2 : การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพของประเทศไทย

   การทดลองที่ 2.1.1 : การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพและการจำแนกสกุลและชนิดปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

   การทดลองที่ 2.1.1 : Research and development of technical for efficiency analysis and classification of Rhizobium biofertilizer.

3. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	: นายมนต์ชัย มนัสสิลา	กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา	กปผ.
ผู้ร่วมงาน	: นางสาวศิริลักษณ์ จิตรอักษร	กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา	กปผ.
	: นางสาวศพิษา สังวิเศษ	ศวพ. ขอนแก่น	สวพ. 3

4. บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพ และการจำแนกสกุลและชนิดของปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม พบว่าการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและการใช้น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เป็น สารละลายเจือจางสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไรโซเบียมในปุ๋ยชีวภาพ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จากการนับปริมาณไรโซเบียม มีปริมาณเท่ากันในทั้งสองกรรมวิธี การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไรโซเบียม และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี phylogenetic tree analysis โดยใช้โปรแกรม MEGA 5.0 พบว่า การจำแนกโดยวิธีการหาลำดับเบสและวิเคราะห์ phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ขนาด 850 basepair (bp) พบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *Bradyrhizobium japonium* และ *Bradyrhizobium liaoniggense* และ *Mesorhizobium* spp. ซึ่งเป็นจีนัสอื่นที่ไม่ใช่จีนัส *Bradyrhizobium* การวิเคราะห์ phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ที่ 1400 bp พบว่าเมื่อจำนวน base เพิ่มขึ้นความสัมพันธุ์ระหว่างไรโซเบียมมีความชัดเจนขึ้น ความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Bradyrhizobium liaoningeses* อย่างชัดเจนมากขึ้น การใช้ลำดับเบสของ 16S rRNA gene + atpD gene + recA gene ที่ความยาว ~2,400 bp มาสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ทำให้การวิเคราะห์หรือการจำแนกชนิดของเชื้อไรโซเบียม ในผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม กรมวิชาการเกษตร สามารถจำแนกเชื้อไรโซเบียมได้จำเพาะมากขึ้นกว่าการใช้เฉพาะ 16S rRNA gene การจำแนกไรโซเบียมโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูล

ถั่วชนิดโดยใช้ primer BOXAIR และ primer TP-RAPD จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้ ด้วยโปรแกรม Quantity One® - Bio-Rad พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูลถั่วชนิดเดียวกัน ดังนั้นการวิเคราะห์หรือการจำแนกชนิดของเชื้อไรโซเบียม ในผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree analysis) ต้องมีการใช้ยีนอนุรักษ์ (House keeping gene) มากกว่า 1 ยีนเพื่อความแม่นยำในการจำแนกชนิดและสกุลของปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

Abstract

An efficiency analysis and identification of genus and species of Rhizobium fertilizer. Found that the use of sterile water and saline solution was 0.85 percent for the determination of Rhizobium in fertilizer. No difference was statistically significant. The count of Rhizobium. An equal amount in both processes. The nucleotide sequence of Rhizobium and the relationship with the phylogenetic tree analysis using MEGA 5.0 were identified by sequencing and analyzing the phylogenetic tree of the gene 16S rRNA size 850 basepair (bp) showed the genetic relationship of rhizobium from soybeans. mungbean and peanuts are genetically closer to *Bradyrhizobium japonium* and *Bradyrhizobium liaoniggense* and *Mesorhizobium* spp. The genus other than the genus. *Bradyrhizobium* spp. phylogenetic tree analysis of 16S rRNA gene of 1400 bp was found that increasing the number of base inextricably between rhizobium clear up. Close relationship with *B. liaoningeses* more clearly. The sequencing of the 16S rRNA gene + atpD gene + recA gene to create a length of 2,400 bp. Phylogenetic tree makes the analysis or identification of rhizobium. Rhizobium fertilizer products fromDepartment of Agriculture Identify have available more than using specific 16S rRNA gene for identification. Using DNA fingerprinting of the bacteria from of legume species using primer BOXAIR and primer TP-RAPD of. DNA fingerprinting to build a tree with the Quantity One® - Bio-Rad found that no relationship between rhizobium from legumes of the same type. Therefore, the analysis or identification of rhizobium biofertilizer products by creating a tree. (Phylogenetic tree analysis) requires the use of gene conservation (Housekeeping gene), more than one gene for precise identification of species and genus of rhizobium biofertilizer.

5. คำนำ

ปัจจุบันการเกษตรส่วนใหญ่เป็นระบบการเกษตรที่ใช้ปุ๋ยเคมีและสารเคมีมากขึ้นซึ่งส่งผลต่อต้นทุนการผลิตและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะปุ๋ยเคมีและสารเคมีมีราคาสูงขึ้นเรื่อยๆ จึงมีการใช้ปัจจัยการผลิตที่ทำมาจากจุลินทรีย์และสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้กันมากขึ้น การใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม สามารถทดแทนปุ๋ยไนโตรเจนในพืชตระกูลถั่วได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ปัจจุบันปุ๋ยชีวภาพเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการช่วยเพิ่มผลผลิต

ให้แก่เกษตรกร ในขณะเดียวกันนั้นได้มีการออกพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 ได้มีการแก้ไขเพิ่มเติมระบุชนิดแห่งปุ๋ย เป็น 3 ประเภทด้วยกัน ซึ่งหนึ่งในสามก็คือ ปุ๋ยชีวภาพ ทำให้หน่วยงานต่าง ๆ ของ กรมวิชาการเกษตรที่รับผิดชอบเกี่ยวกับเรื่องปุ๋ยชีวภาพโดยตรง ต้องมีการวิจัยและพัฒนารูปแบบวิธีการเก็บ ตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพให้มีมาตรฐานเทียบเท่ามาตรฐานสากล เนื่องจากปุ๋ยชีวภาพมีความแตกต่างจากปุ๋ยประเภทอื่น รวมไปถึงการวิจัยและพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพให้ทันสมัยมากขึ้น เพื่อรองรับการเข้าสู่มาตรฐานสากล และลดข้อขัดแย้งระหว่างบริษัท ผู้ผลิตปุ๋ยชีวภาพเกี่ยวกับกระบวนการเก็บตัวอย่างและการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ย เนื่องจากหน่วยงานของกรมวิชาการเกษตรต้องเป็นผู้รับรองการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพเพื่อการขึ้นทะเบียนตามพระราชบัญญัติปุ๋ยฉบับดังกล่าว ปุ๋ยชีวภาพตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 มี 5 ชนิด คือ ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่า ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ปุ๋ยชีวภาพสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต และปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม ซึ่งแต่ละชนิดมีจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ส่งผลให้วิธีการเก็บรักษาปุ๋ยชีวภาพแต่ละชนิดแตกต่างกันด้วย จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการวิจัยและพัฒนาเทคนิคการเก็บตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพ รวมไปถึงวิจัยและพัฒนาเทคนิควิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพแต่ละชนิดที่มีมาตรฐานเทียบเท่ามาตรฐานสากล

6. วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. เชื้อไรโซเบียมไอโซเลทต่าง ๆ

2. วัสดุ อุปกรณ์ วิทยาศาสตร์

แบบและวิธีการทดลอง

-

กรรมวิธี

1. ใช้ primer fD1 กับ rP2 จำแนกโดยวิธี Phylogenetic analysis

2. ใช้ primer atpD255F กับ atpD728R จำแนกโดยวิธี Phylogenetic analysis

3. ใช้ primer recA 41F กับ recA 640R จำแนกโดยวิธี Phylogenetic analysis

4. ใช้ primer nodA1 กับ nodA2 จำแนกโดยวิธี Phylogenetic analysis

5. ใช้ primer BOXAIR-PCR จำแนกโดยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)

6. ใช้ primer 8F-1509R จำแนกโดยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)

7. ใช้ primer 8F-1522R จำแนกโดยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)

8. ใช้ primer 849F-1509R จำแนกโดยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)

9. ใช้ primer 849F-1522R จำแนกโดยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. แยกเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารจำเพาะจากปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

2. ดำเนินการเตรียมตัวอย่างและวัสดุตามวิธีการวิเคราะห์ระดับชีววิทยาโมเลกุล เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอ ของเชื้อจุลินทรีย์จากปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ดำเนินการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *Bradyrhizobium* ตามวิธีของ Manassila et. al., (Afr. J. Biotechnol., 2007. 6:1393-1402)

3. เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเครื่อง PCR และใช้ primer ที่กำหนดขึ้นมาจนได้ปริมาณดีเอ็นเอ ตามที่ต้องการ

3.1. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ 16S rRNA geneด้วย primer fD1 กับ rP2 ตามวิธีของ Manassila et. al. (Afr. J. Biotechnol., 2007. 6:1393-1402)

3.2. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ atpD gene ด้วย primer atpD255F กับ atpD728R ตามวิธีของ Noisagiam et. al. (Syst. Appl. Microbiol., 2010. 33:374-382)

3.3. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ recA gene ด้วย primer recA 41F กับ recA 640R ตามวิธีของ Noisagiam et. al. (Syst. Appl. Microbiol., 2010. 33:374-382)

3.4. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ nodA gene ด้วย primer nodA1 กับ nodA2 ตามวิธีของ Manassila et. al. (Afr. J. Biotechnol., 2007. 6:1393-1402)

3.5. ดำเนินการอ่านลำดับเบสของ 16S rRNA gene, atpD gene, recA gene และ nodA gene

16S rRNA gene ร่วมกับ atpD gene , 16S rRNA gene ร่วมกับ recA gene , atpD gene ร่วมกับ recA gene , 16S rRNA gene ร่วมกับ atpD gene และ recA gene

3.6. ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูลถั่ว โดยใช้เทคนิค BOXAIR-PCR และ TP-RAPD ใช้ primer 4 คู่ ได้แก่ primer คู่ที่ 1 8F-1509R, คู่ที่ 2 8F-1522R, คู่ที่ 3 849F-1509R และ คู่ที่ 4 849F-1522R,

4. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank จากเวปไซต์ของ NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) เลือก ที่ BLAST แล้วเลือกที่ Nucleotide BLAST (blastn) จากนั้นใส่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ผลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จะแสดงตามลำดับความคล้ายคลึงกันจากมากไปหาน้อย วิเคราะห์หาความสัมพันธ์และสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้โปรแกรม MEGA 5.0 จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้ UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) ด้วยโปรแกรม Quantity One® - Bio-Rad

สถานที่ดำเนินการ

กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

การบันทึกข้อมูล

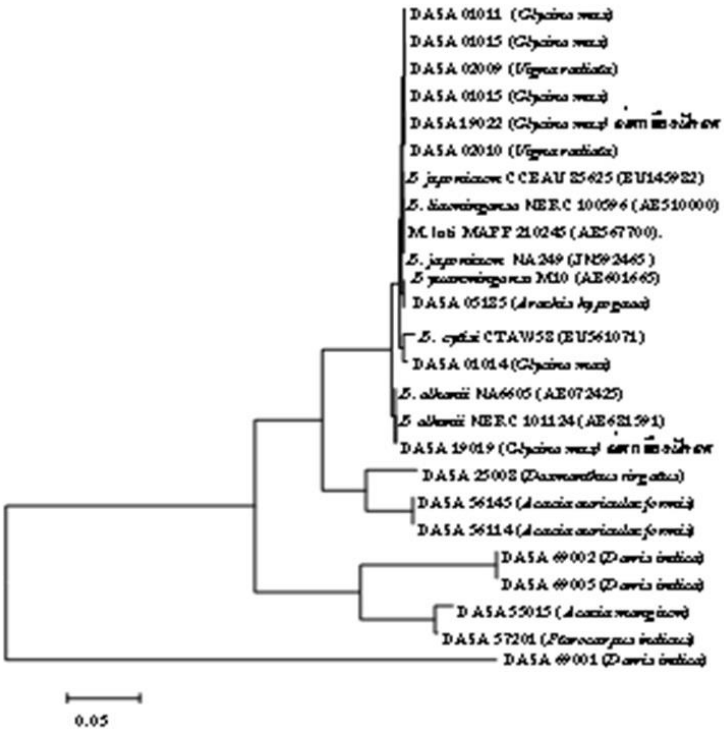
วิธีการมาตรฐานที่จะใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์

ผลการทดลอง

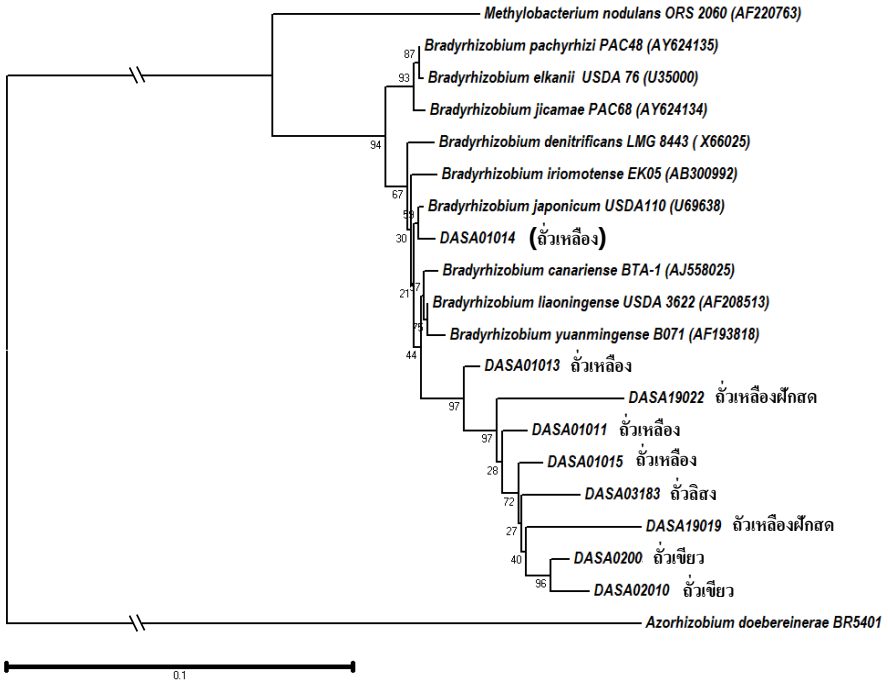
2554

ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมถั่วเขียวประกอบด้วยไรโซเบียมสกุล *Bradyrhizobium* spp. เป็นไรโซเบียมชนิดโตช้า ประกอบด้วยกรรมวิธีใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เปรียบเทียบกับการใช้น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำ 10 ซ้ำ ผลการทดลองพบว่า การใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อและการใช้น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารละลายเจือจางสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไรโซเบียมในปุ๋ยชีวภาพ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จากการนับปริมาณไรโซเบียม มีปริมาณเท่ากันในทั้งสองกรรมวิธี และให้ผลที่เที่ยงตรงและแม่นยำทั้งสองกรรมวิธี ดังนั้น การนับปริมาณไรโซเบียมชนิดที่โตช้าของห้องปฏิบัติการไรโซเบียม สามารถใช้สารละลายเจือจางสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไรโซเบียมทั้งสองชนิดนี้ได้

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไรโซเบียม และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี phylogenetic tree analysis โดยใช้โปรแกรม MEGA 5.0 แสดงดังภาพที่ 1 พบว่า การจำแนกโดยวิธีการหาลำดับเบสและวิเคราะห์ phylogenetic tree ของยีน 16S rRNA ขนาด 850 basepair (bp) พบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไรโซเบียมที่เป็นชุด Cowpea ของถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง โดยไรโซเบียมไอโซเลทที่ DASA 01011 DAS 01013 DASA 01015 ที่เป็นเชื้อไรโซเบียมที่จำเพาะเจาะจงกับถั่วเหลือง มีความสัมพันธ์กับ DASA 02009 DASA 02010 และ DASA 03183 ซึ่งเป็นเชื้อไรโซเบียมที่จำเพาะเจาะจงกับถั่วเขียว และถั่วลิสงตามลำดับ และยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับ DASA 19022 ซึ่งเป็นเชื้อไรโซเบียมถั่วเหลืองฝักสด และมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *Bradyrhizobium japonium* และ *Bradyrhizobium liaoniggense* และ *Mesorhizobium* ซึ่งเป็นจีนัสอื่นที่ไม่ใช่จีนัส *Bradyrhizobium* ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ phylogenetie ของยีน 16S rRNA ที่ 1400 bp ต่อไป ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 2 พบว่าเมื่อจำนวน base เพิ่มขึ้นความสัมพันธุ์ระหว่างไรโซเบียมถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วลิสง และถั่วเหลืองฝักสด มีความชัดเจนขึ้น โดยจะเห็นได้ว่า DASA 01011 DASA 01013 DASA 01015 DASA 02009 DASA 02010 DASA 03183 และ DASA 19019 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Bradyrhizobium liaoningeses* อย่างชัดเจนมากขึ้น



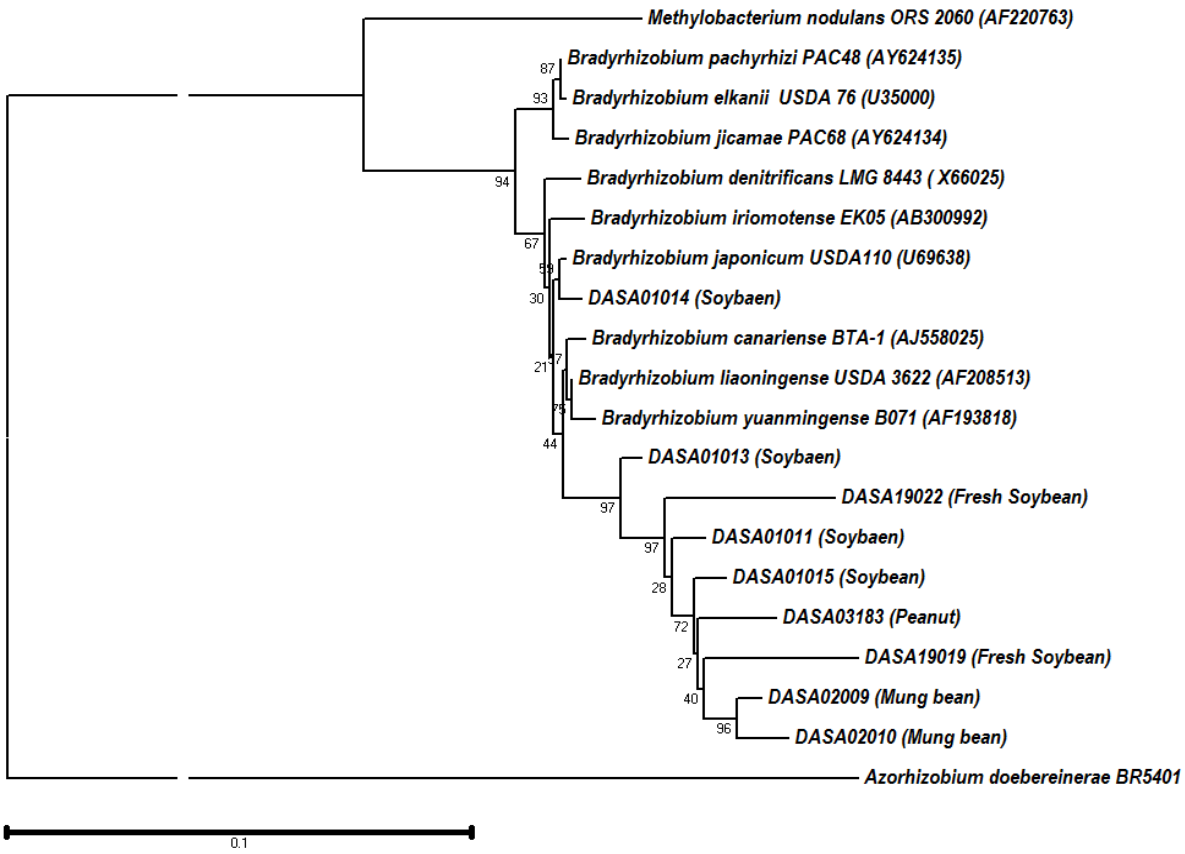
ภาพที่ 1 Neighbor-joining phylogenetic tree โดยใช้ ยีน 16S rRNA 850 bp แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อไรโซเบียม ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง



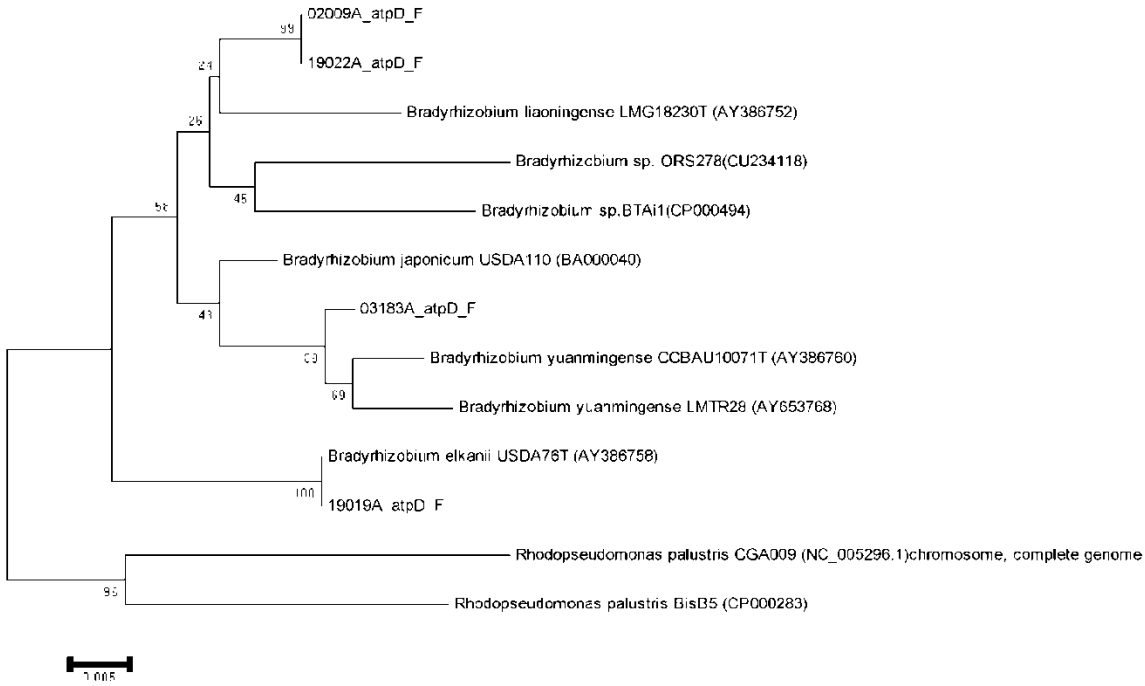
ภาพที่ 2 Neighbor-joining phylogenetic tree โดยใช้ ยีน 16S rRNA 1400 bp แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุ์กรรมระหว่างเชื้อไรโซเบียม ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง

2556

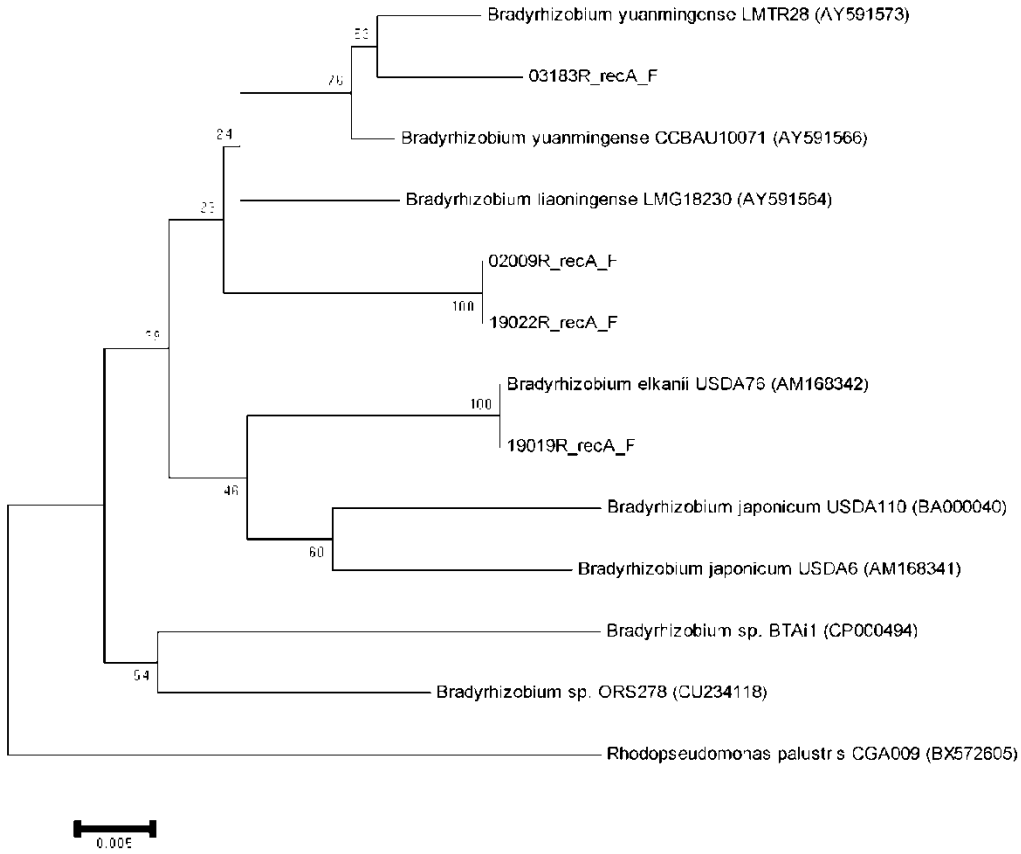
การใช้ลำดับเบสของ 16S rRNA gene + atpD gene + recA gene ที่ความยาว ~2,400 bp มาสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ทำให้การวิเคราะห์หรือการจำแนกชนิดของเชื้อไรโซเบียม ในผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม กรมวิชาการเกษตร สามารถจำแนกเชื้อไรโซเบียมได้จำเพาะมากขึ้นกว่าการใช้เฉพาะ 16S rRNA gene



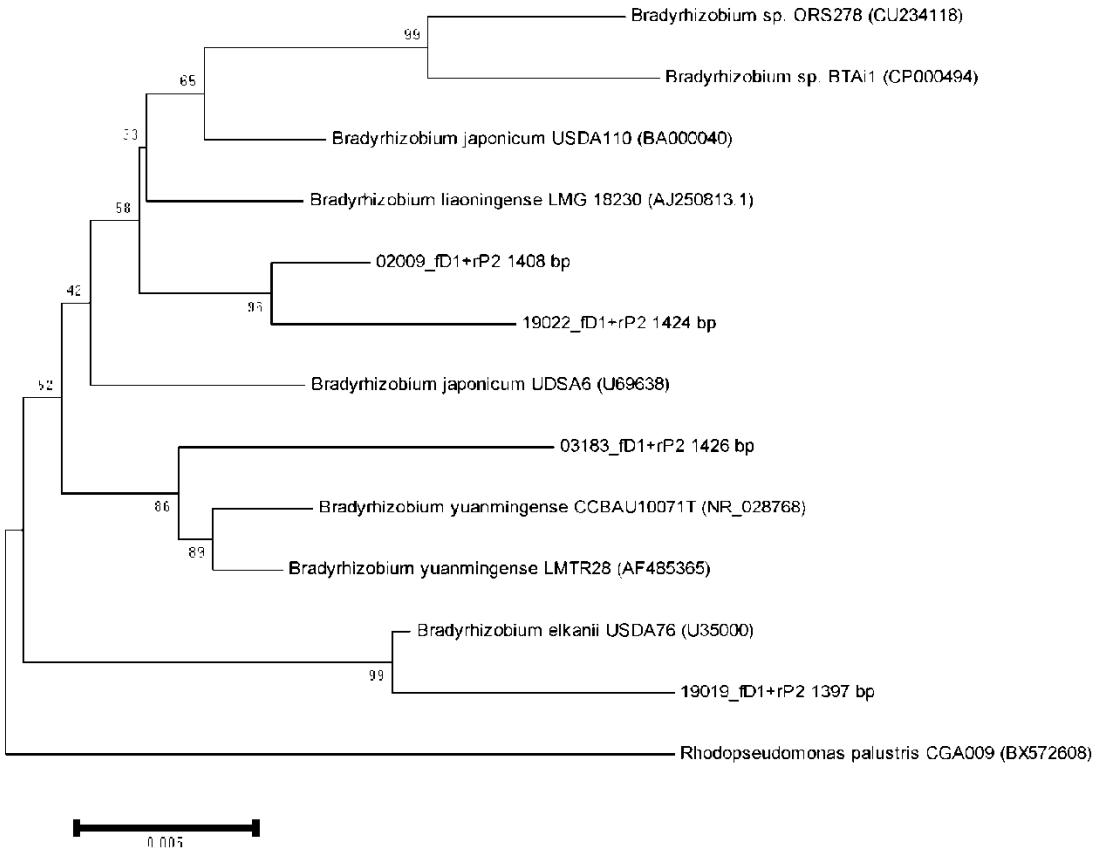
ภาพที่ 1 Neighbor-joining phylogenetic tree โดยใช้ ยีน 16S rRNA แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดเชื้อไรโซเบียม ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง



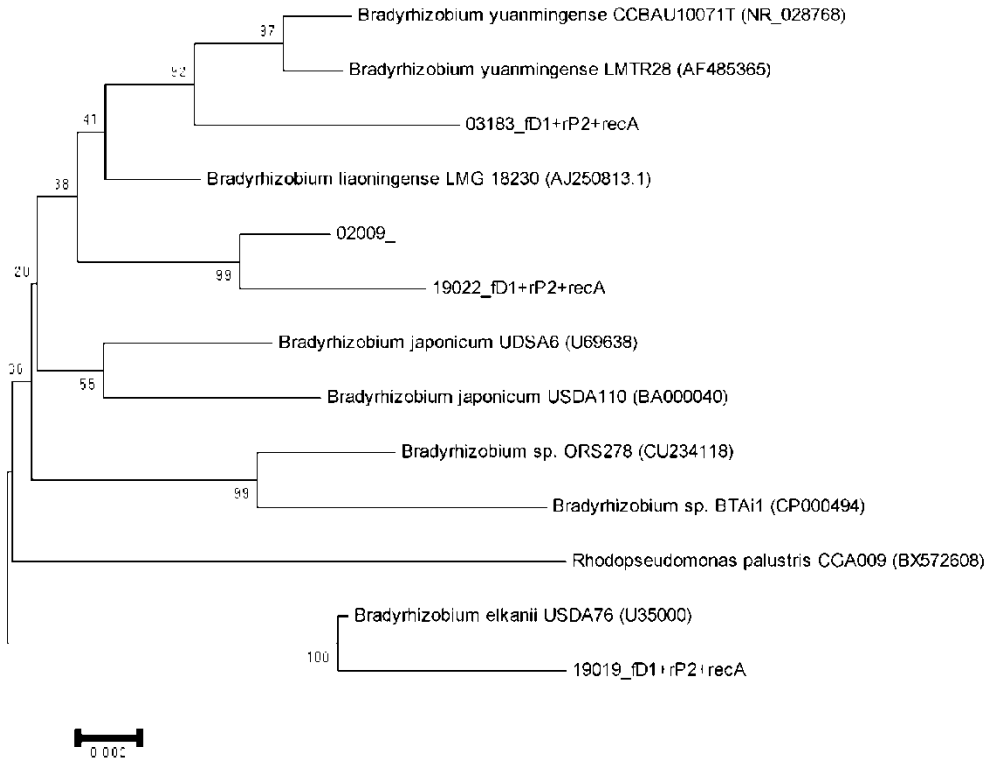
ภาพที่ 2 Neighbor-joining phylogenetic tree โดยใช้ ยีน atpD gene แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดเชื้อไรโซเบียม ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง



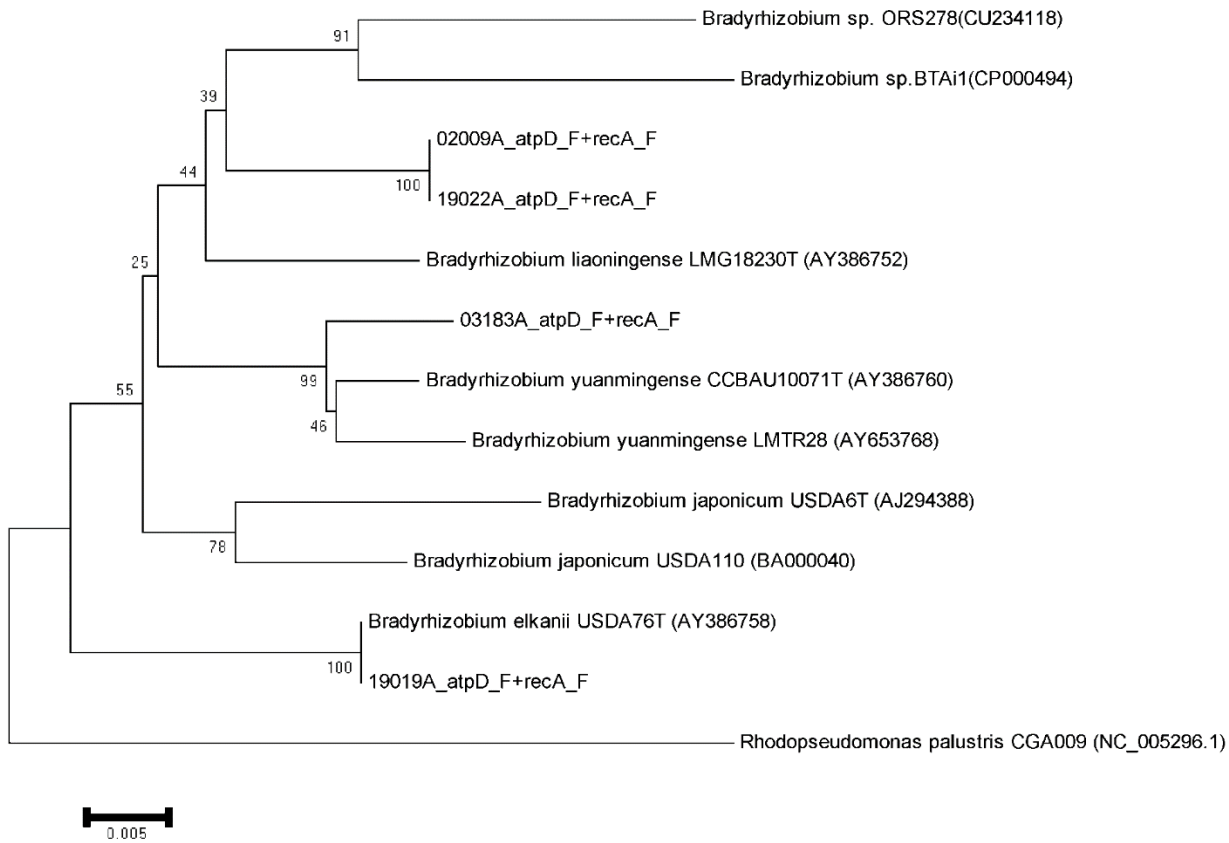
ภาพที่ 3 Neighbor-joining phylogenetic tree โดยใช้ ยีน recA gene แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดเชื้อไรโซเบียม ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง



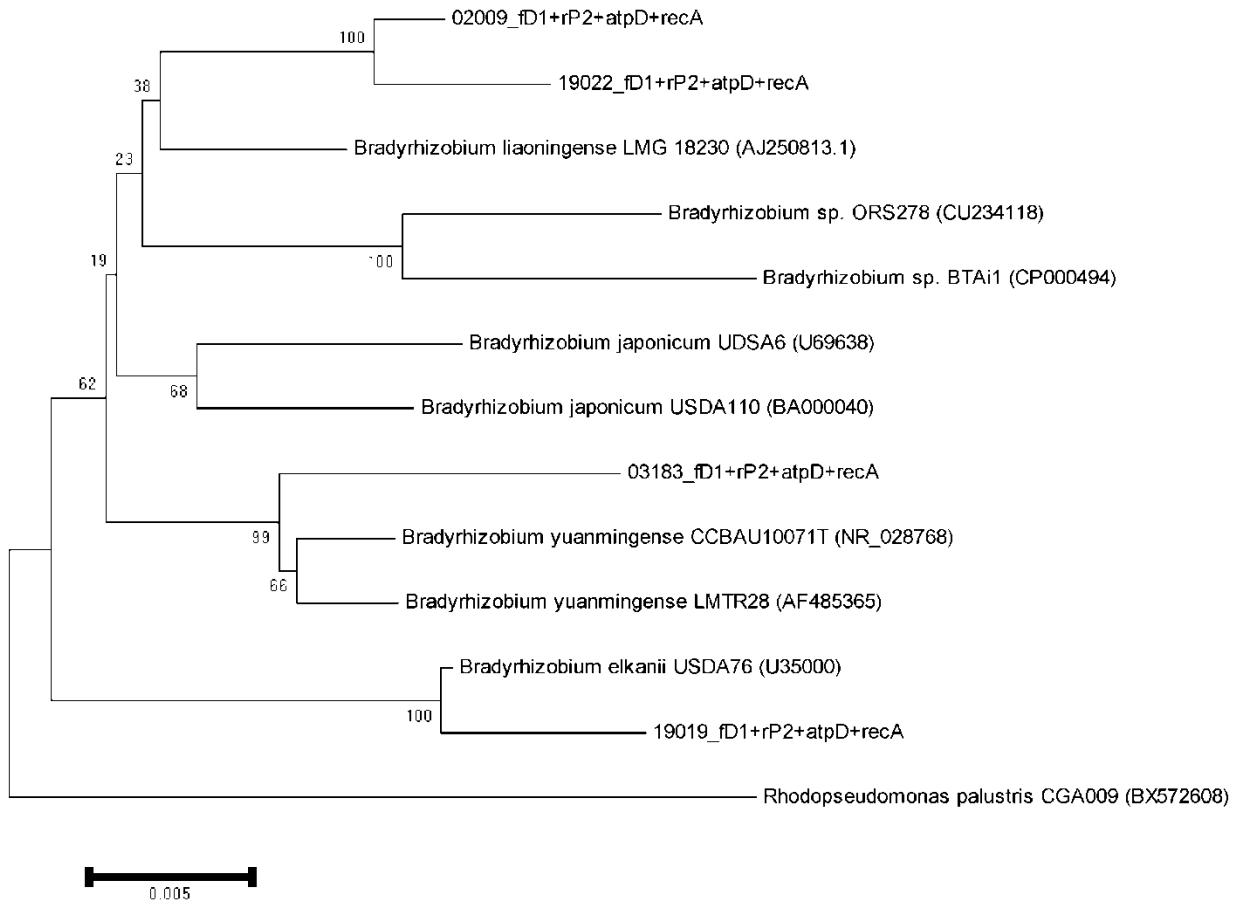
ภาพที่ 4 Neighbor-joining phylogenetic tree โดยใช้ ยีน 16S rRNA gene ร่วมกับ atpD gene แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดเชื้อไรโซเบียม ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง



ภาพที่ 5 Neighbor-joining phylogenetic tree โดยใช้ ยีน 16S rRNA gene ร่วมกับ recA gene แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดเชื้อไรโซเบียม ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง

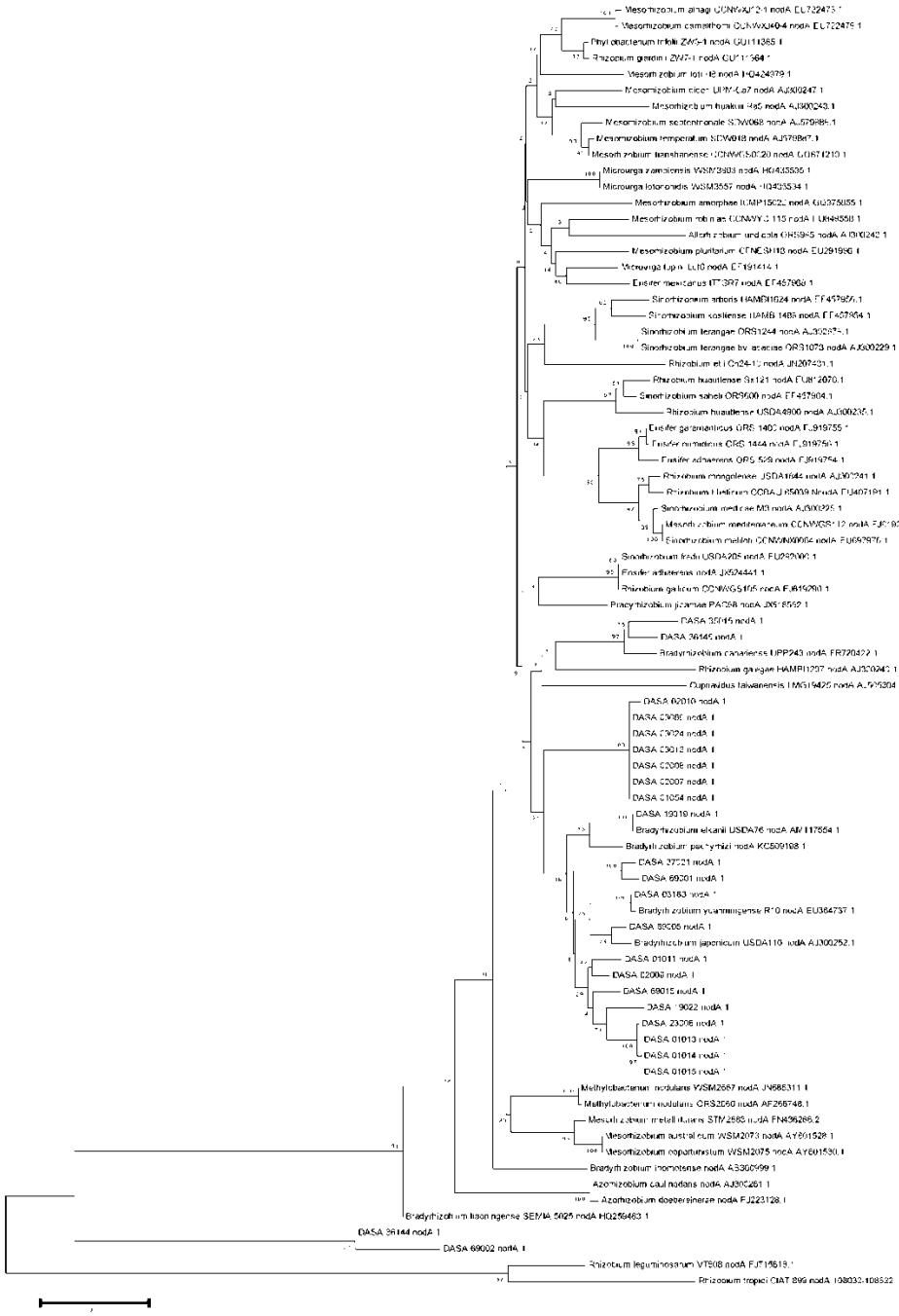


ภาพที่ 6 Neighbor-joining phylogenetic tree โดยใช้ ยีน atpD gene ร่วมกับ recA gene แสดงความสัมพันธ์ทาพันธุกรรมระหว่างชนิดเชื้อไรโซเบียม ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง



ภาพที่ 7 Neighbor-joining phylogenetic tree โดยใช้ ยีน 16S rRNA gene ร่วมกับ atpD gene และ recA gene แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดเชื้อไรโซเบียม ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง

จากผลการทดลองพบว่าการใช้ลำดับเบสของ nodA ยีน ที่ความยาวตั้งแต่ 628-633 bp มาสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อไรโซเบียมด้วยวิธี Neighbor-joining phylogenetic tree พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วที่เป็นพืชอาศัย

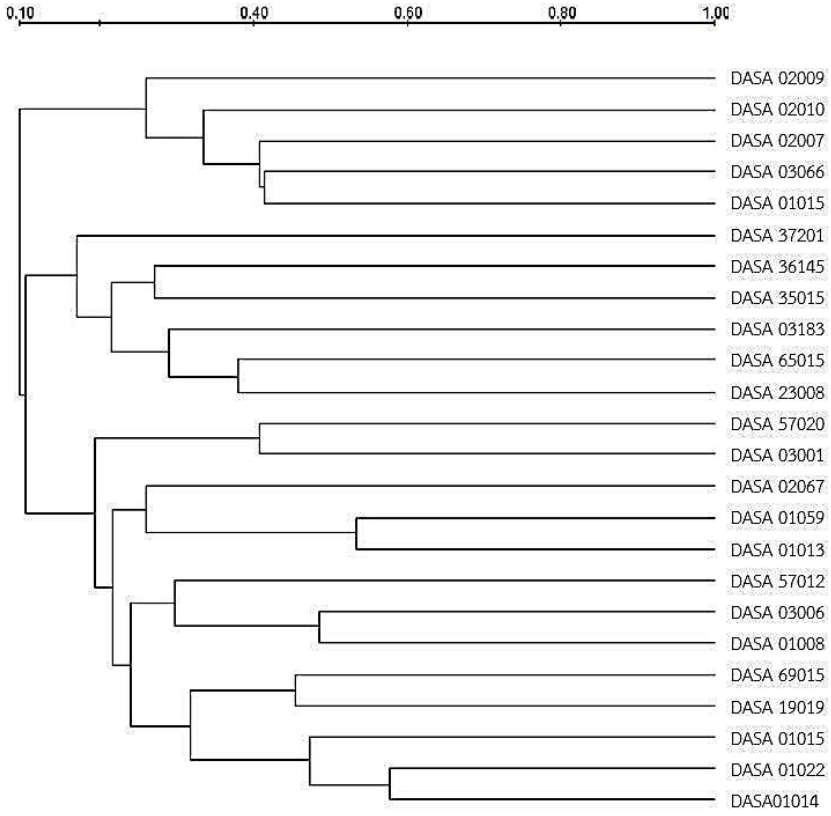


ภาพที่ 1 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ของเชื้อไรโซเบียมจากความสัมพันธ์ของ nodA ยีนด้วยวิธี Neighbor-joining phylogenetic tree

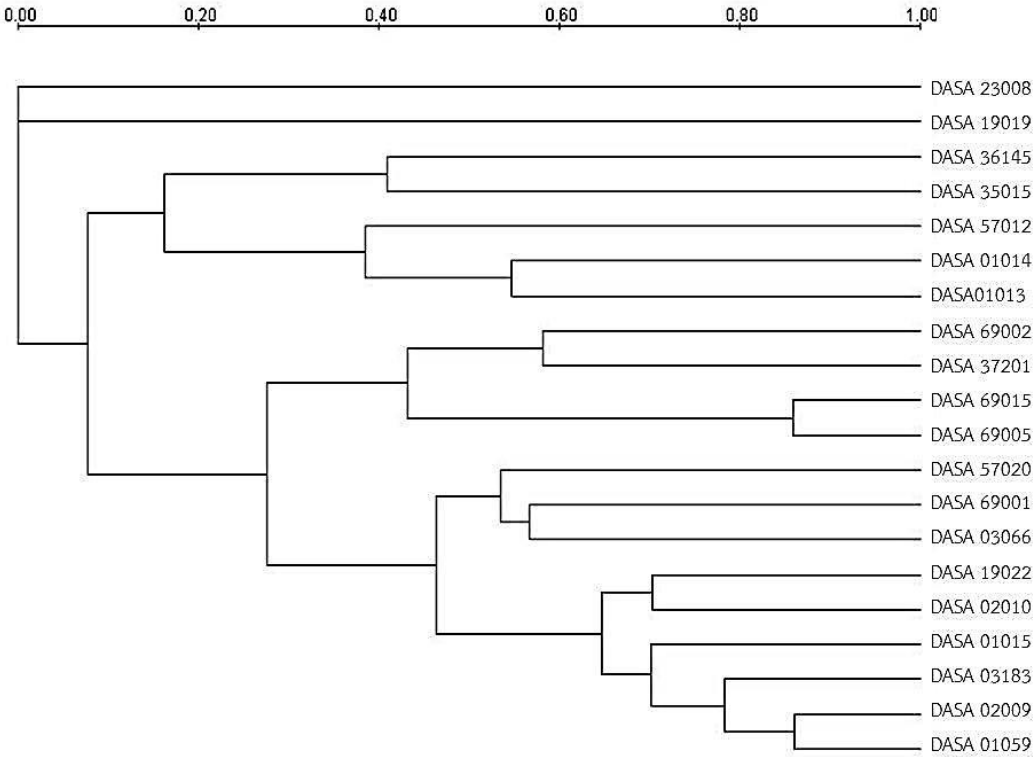
การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูลถั่วชนิดต่างๆ โดยใช้ primer BOXAIR พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิดมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน แต่เชื้อไรโซเบียมบางไอโซเลท (DASA 03001 DASA 03006) ที่แยกได้จากพืชตระกูลถั่วชนิดเดียวกันมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกัน และการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย primer TP-RAPD ประกอบด้วย primer คู่ที่ 1 8F-1509R, คู่ที่ 2 8F-1522R, คู่ที่ 3 849F-1522R และ คู่ที่ 4 849F-1522R พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูลถั่วชนิดต่างๆ จากการใช้ primer คู่ที่ 1 และ 2 ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูลถั่วชนิดต่างๆ มีความแตกต่างกันเมื่อใช้ primer คู่ที่ 3 และ 4

จากผลการทดลองนี้ทำให้ได้เทคนิคการจำแนกไรโซเบียมโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูลถั่วชนิดต่างๆ 3 วิธี คือ การจำแนกเชื้อโซเบียมโดยใช้ primer BOXAIR และ primer TP-RAPD โดยใช้ primer 849F-1522R และ 849F-1509R

จากศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อไรโซเบียมโดยใช้ primer BOXAIR และ primer TP-RAPD โดยใช้ primer 849F-1522R จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้ ด้วยโปรแกรม Quantity One® - Bio-Rad พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูลถั่วชนิดเดียวกัน



ภาพที่ 1 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูลถั่ว โดยใช้เทคนิค BOXAIR-PCR



ภาพที่ 2 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อไรโซเบียมจากพืชตระกูลถั่ว โดยใช้เทคนิค TP-RAPD โดยใช้ primer 849F-1522R

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ประสิทธิภาพและการจำแนกสกุลและชนิดปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมด้วยการใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ สามารถจำแนกสกุลและชนิดของเชื้อไรโซเบียมได้อย่างแม่นยำ แต่เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์มีวิธีการดำเนินงานที่ประกอบด้วยขั้นตอนและกรรมวิธีที่ซับซ้อน ต้องการบุคลากรที่มีความรู้และเข้าใจ จึงจะสามารถทำการจำแนกได้อย่างแม่นยำ

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

มาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

11. คำขอบคุณ

ผศ.ดร. พรรณลดา ติตะบุตร สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ศ.ดร. หนึ่ง เตียอำรุง สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คุณกมลลักษณ์ เทียมไธสง ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์เครื่องมือและวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

12. เอกสารอ้างอิง

Monchai Manassila, Achara Nuntagij, Somsak Kotepong, Nantakorn Boonkerd, and Neung Teaumroong. (2007). Characterization and monitoring of selected rhizobial strains isolated from tree legumes in Thailand. African Journal of Biotechnology, 6: 1393-1402.

Rugireg Noisangiam , Achara Nuntagij ,Neelavan Pongsilp,Nantakorn Boonkerd,Jesda Denduangboripant Clive Ronson, Neung Teaumroong. (2010). Heavy metal tolerant Metalliresistens boonkerdii gen. nov., sp. nov., a new genus in the family Bradyrhizobiaceae isolated from soil in Thailand. Syst. Appl. Microbiol. Nov; 33 (7) :374-82

13. ภาคผนวก