บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การแยกและจำแนกชนิดเบื้องต้นของ *Bradyrhizobium* spp.

ในฤดูกาลที่มีการทำไร่ถั่วเหลือง (ส.ค.-ก.ย. 2535) หลังจากเกษตรกรหยอดเมล็ดแล้ว 30 วันเก็บรากถั่วเหลืองที่มีปม โดยขุดรากของต้นถั่วด้วยความระมัดระวังเพื่อให้ปมอยู่ติดกับรากมากที่สุดจากอำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัย ส่วนนอกฤดูกาลที่มีการทำไร่ถั่วเหลืองเก็บดินจากบริเวณที่เคยมีการเพาะปลูกถั่วเหลืองมาก่อน ในจังหวัดนครนายก นำดินที่ได้มาแยกใส่ลงในกระถางที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพาะเมล็ดถั่วเหลืองสายพันธุ์ สจ.5 ที่มีลักษณะสมบูรณ์ไม่ลีบไม่แตก และไม่มีร่องรอยของแมลงมาเจาะกิน หลังจากทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดยแช่ในเอทานอล 95เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในสารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นเวลา 2 นาที ล้างด้วยน้ำกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5-6 ครั้ง แช่เมล็ดถั่วในน้ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เปลือกเมล็ดอ่อนนุ่ม เลือกเฉพาะเมล็ดที่มีเปลือกย่นเพาะลงในดินให้ห่างจากผิวดินประมาณ 2 เซนติเมตร จำนวน 10 เมล็ดต่อ 1 กระถาง เลี้ยงในสภาพธรรมชาติ รดด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 30 วัน เก็บต้นถั่วเหลืองคัดเลือกต้นที่มีปมบริเวณราก ล้างดินออกจากรากด้วยความระมัดระวัง พยายามอย่าให้ปมหลุดออกจากราก นำปมที่ได้จากต้นถั่วเหลืองที่ปลูกในเขตอำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัย และปมที่ได้จากต้นถั่วเหลืองที่ปลูกในดินจังหวัดนครนายก มาแยกเบรดิไรโซเบียมตามลำดับวิธีการดังนี้ เลือกปมที่ไม่มีรอยแตกและมีขนาดใหญ่ 10 ปมต่อต้น ล้างปมด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5-10 วินาที แช่ปมใน 5 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นเวลา 1-5 นาทีขึ้นอยู่กับขนาดของปม ล้างด้วยน้ำกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5-6 ครั้ง เก็บปมในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ เพื่อนำไปคัดแยกเชื้อเบรดิไรโซเบียม โดยผ่าปมบนกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้วใช้ลูปแตะด้านในปมบริเวณที่มีสีแดงเขี่ยเชื้อบนอาหารวุ้นยีสต์-แมนนิทอล ซึ่งผสมสีคองโกเรดตามสูตรอาหารในภาคผนวก ก นำเพลตที่ได้ไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศา

เซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีสีขาวขุ่น เก็บรักษาเชื้อบนอาหารวุ้นเอียงซึ่งบรรจุอาหารวุ้นยีสต์-แมนนิทอลเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน แล้วเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นำเชื้อที่แยกได้ไปขีดลงบนอาหารวุ้นยีสต์-แมนนิทอล ผสมสีบรอมไทมอลบลูตามสูตรอาหารในผนวก ก เพื่อวัดความเป็นกรดด่างของสารที่เชื้อผลิต ถ้าเป็นเบรดิไรโซเบียมจะผลิตสารที่เป็นด่าง สีของอาหารจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน เลี้ยงเชื้อที่ 28องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน นำเชื้อที่มีโคโลนีสีน้ำเงินไปทดสอบสมบัติเบื้องต้นของเบรดิไรโซเบียมตามวิธีที่ระบุใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Jordan, 1984) และวิธีที่รายงานโดย Elkan & Burn (1992)เช่น การเคลื่อนที่ การย่อยสลายแป้ง การเจริญในอาหารเหลวยีสต์-แมนนิทอลที่พีเอช 8.0 การเจริญในอาหารเหลวยีสต์-แมนนิทอลที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0.5 ,2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการเจริญในอาหารเหลวยีสต์-แมนนิทอล ที่เติมโปแตสเซียมไนเตรต 8 เปอร์เซ็นต์เป็นต้น

การวัดการเจริญของ*Bradyrhizobium* spp.ในอาหารเหลวยีสต์-แมนนิทอล

ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อบริสุทธิ์ โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้ และคาดว่าเป็น *Bradyrhizobium* จากอาหารวุ้นเอียงยีสต์-แมนนิทอล เพาะลงในอาหารเหลวยีสต์-แมนนิทอลปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองขนาด 1.5x16.0 เซนติเมตร ปิดหลอดด้วยจุกสำลี นำไปวางไว้บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 90 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ใส่สารแขวนลอยเซลปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ที่มีแขนสำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง(Klett flask)ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวยีสต์-แมนนิทอลปริมาตร 45 มิลลิลิตร นำไปวางไว้บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 90 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยทำการวัดความขุ่นของเซลโดย spectrophotometer (Bauch and Lomb spectronic 21) ที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร ที่เวลา 0 24 48 72 96 120 194 168 192 216 240 264 292 312 336 384 และ 408 ชั่วโมงตามลำดับ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เขียนกราฟ

การทดสอบว่าเป็น *Bradyrhizobium* หรือไม่ (Authentication test)

ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อบริสุทธิ์ โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้ และคาดว่าเป็น *Bradyrhizobium* จากอาหารวุ้นเอียงยีสต์-แมนนิทอล เพาะลงในอาหารเหลวยีสต์-แมนนิทอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองขนาด 1.5x16.0 เซนติเมตร ปิดหลอดด้วยจุกสำลี นำไปวางไว้บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 90 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ใส่สารแขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนเมล็ดถั่วซีราโทร (*Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro) ซึ่งได้ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดยแช่ในกรดซัลฟูริคเข้มข้น เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5-6 ครั้งแช่เมล็ดถั่วในน้ำเป็นเวลา1 ชั่วโมง เพาะเมล็ดบนจานอาหารวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ควำ่เพลตลงนำเพลตไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเมล็ดถั่วซีราโทรที่มีความยาวของรากอยู่ในช่วง 0.5-1.0 เซนติเมตร เพาะลงบนอาหารวุ้นที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวด เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 1 เมล็ดต่อขวด นำขวดเลี้ยงต้นถั่วซีราโทรไปบ่มภายใต้ความเข้มแสง 42.6 $\mu E.m^{-2}.sec^{-1}$ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-45 วัน สังเกตุขนาด ตำแหน่งและ จำนวนปมที่เกิดขึ้นที่รากถั่วซีราโทร แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีอัตราการเพิ่มจำนวนช้า และทำให้เกิดปมบนรากถั่วซีราโทรจัดว่าเป็น *Bradyrhizobium* ซึ่งจะนำไปใช้ในการทดลองทำ ELISA test ต่อไปเพื่อพิสูจน์ว่าเป็น *B. japonicum* หรือไม่ สูตรอาหารวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ และ อาหารวุ้นที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน มีดังรายงานในภาคผนวก ก

การจำแนกสายพันธุ์ *B. japonicum* โดยวิธี ELISA

ทำตามวิธีที่รายงานโดย นันทกร บุญเกิด และคณะ(2536) ดังนี้

การเตรียมแอนติเจน

เพาะ *B. japonicum* ลงในอาหารเหลวยีสต์-แมนนิทอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสค์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 90 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำสารแขวนลอยเซลที่ได้ไปทำการเก็บเซลโดยใช้เครื่องปั่นแยกความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เทของเหลวส่วน

บนทิ้ง ล้างเซลด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลออกตามที่กล่าวข้างต้น ล้างเซลเช่นเดียวกับที่รายงานข้างต้นอีก 2 ครั้ง แขวนลอยเซลในโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้นประมาณ $1x10^9$ เซลต่อมิลลิลิตร ปรับความขุ่นของเซลให้มีค่าการดูดกลืนแสงซึ่งวัดโดย spectrophotometer (Bauch and Lomb spectronic 21) ที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร ให้เท่ากับ 0.48 จากการทดลองวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร ของสารละลายแบเรียมซัลเฟตมาตรฐานของ Mc Farland พบว่า ความขุ่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 680 นาโนเมตร เท่ากับ 0.48 จะมีเซลแบคทีเรียโดยประมาณเท่ากับ $1x10^9$ เซลต่อมิลลิลิตร ดังรายละเอียดในภาคผนวก ข นำสารแขวนลอยเซลไปต้มในอ่างน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที รอให้เย็นลงจนเท่ากับอุณหภูมิห้อง เก็บรักษาสภาพของแอนติเจนโดยเติมสารละลาย 1เปอร์เซ็นต์ merthiorate ในอัตราส่วน สารแขวนลอยเซล 10 มิลลิลิตร ต่อ 1 เปอร์เซ็นต์ merthiorate 0.1 มิลลิลิตร เก็บสารแขวนลอยแอนติเจนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

การเตรียมแอนติบอดี

แอนติบอดีที่ใช้ในการทดลองนี้มีไตเตอร์ 1:1,600 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร ได้แก่ แอนติบอดีที่เตรียมโดยใช้ *B. japonicum* สายพันธุ์ตามตารางที่ 4 เป็นแอนติเจน *B.japonicum* THA5 THA6 TAL377 TAL432 TAL944 USDA94 USDA76 USDA94 และ USDA142 เจือจางแอนติบอดี 1:500 เท่าในสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.4 และมีวิธีเตรียมดังรายงานในภาคผนวก ข

วิธีทำ ELISA

นำสารแขวนลอยเซลแอนติเจนที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีแล้วไปปั่นแยกเซลโดยใช้เครื่องปั่นแยก ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5นาที แขวนลอยเซลในคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าพีเอชเท่ากับ 9.6 ในอัตราส่วน 1:1

เติมสารแขวนลอยเซลปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในหลุมของไมโครไตเตอร์เพลต (microtiter plate)ขนาด 96 หลุม(Nunc Imuno PlateII, Denmark)โดยใช้ 4 หลุมต่อแอนติเจน 1 ชนิด นอกจากนี้ในแต่ละเพลตยังมีหลุมที่ไม่ใส่เชื้อเป็น blank และหลุมที่ใส่แอนติเจนซึ่งเป็นเบรดิไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ตรวจสอบแอนติเจนเป็นหลุมเปรียบเทียบ ปิดเพลตด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ เก็บเพลตในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เทสารละลายที่อยู่ในเพลตทิ้ง ล้างแต่ละหลุมด้วย phosphate buffered saline tween (PBST)200 ไมโครลิตร ค่าพีเอช 7.4 (วิธีเตรียมมีดังรายงานในภาคผนวก ข)ล้างแต่ละหลุม 2 ครั้ง เติมสารskim milk 3เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน phosphate buffered saline (PBS) 0.15 โมลาร์ ค่าพีเอช 7.4 ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดเพลตด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ก่อนนำไปเก็บในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยสารละลาย PBST 2 ครั้ง เติมแอนติซีรัมของแอนติเจนที่ใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดเพลตด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ นำเพลตไปเก็บในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยสารละลายPBST 2 ครั้ง ก่อนเติม goat anti-rabbit IgG alkaline phosphates conjagate (Sigma) ที่ทำให้เจือจางในสารละลายPBS อัตราส่วน anti IgG 1 ไมโครลิตรต่อสารละลาย PBS 4,000 ไมโครลิตร ปริมาตร 100ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดเพลตด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ เก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา3ชั่วโมง เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยสารละลาย PBST 2ครั้งหลังจากนั้นในแต่ละหลุมเติม สารละลายของ substrate ซึ่งประกอบด้วย diethanolamine, NaN_3 และ p-nitrophenylphosphate ตามส่วนประกอบดังระบุในภาคผนวก ข ปริมาตร100 ไมโครลิตร ปิดเพลตด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ เก็บในตู้อบที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที ขึ้นอยู่กับสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น หยุดปฏิกิริยาด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง multiscan spectophotometer (Dynatech MR 700 Microplate Reader)

ตารางที่ 4 แหล่งที่มาของเบรดิไรโซเบียมที่ใช้ในการผลิตแอนติซีรุ่มซึ่งใช้ในการทำ ELISA (Halliday and Somasegaran, 1984)แอนติบอดีเหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

สายพันธุ์เบรดิไรโซเบียม	แหล่งที่มา
TAL 377	Mississippi, USA.
TAL 432	Brazil
TAL 944	USA.
THA 5	Chiangmai, Thailand
THA 6	Chiangmai, Thailand
USDA 76	USDA, Beltsville,Maryland,USA.
USDA 94	USDA, Beltsville,Maryland,USA.
USDA 142	USDA, Beltsville,Maryland,USA.

I16750147

การตรวจหา *B. japonicum* สายพันธุ์ที่มีฟีโนไทป์ของยีน *hup*

การตรวจหาสายพันธุ์ *B.japonicum* ที่มีฟีโนไทป์ของยีน *hup* ทำโดยใช้วิธีที่รายงานโดย Cunningham และคณะ (1986) ดังนี้เพาะ *B. japonicum* บนอาหารวุ้นเอียงปริมาตร 8.0 มิลลิลิตรสูตรดัดแปลงของ Maier และคณะ(1978) ซึ่งมีการเติม $Ni(No_3)_2$ และ agar 2 เปอร์เซ็นต์ (ตามรายละเอียดสูตรอาหารในภาคผนวก ก) ในหลอดทดลองขนาด 1.6 x 15.0เซนติเมตร ซึ่งมีปริมาตร 27.5 มิลลิลิตร ปิดฝาด้วยจุกสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เปลี่ยนจุกสำลีเป็นฝาจุกยางครอบด้วยฝาอลูมิเนียมปิดฝาให้เรียบสนิทกับฝาหลอด นำไปไล่อากาศโดยใช้กาซไนโตรเจนบริสุทธิ์ (มีออกซิเจนเป็นสารประกอบน้อยกว่า 3 พีพีเอ็ม)ผ่านเข็มแทรกจุกยางเข้าไปในหลอด เป็นเวลา 5 นาที จึงใส่กาซผสมที่มีอัตราส่วนของกาซไนโตรเจน 82 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ออกซิเจน 5 เปอร์เซ็นต์ และ ไฮโดรเจน 3เปอร์เซ็นต์ ผสมโดยบริษัท TIG กรุงเทพฯโดยแทงเข็มผ่านจุกยางเข้าไปในหลอด เป็นเวลา 5 นาที ปิดรอยเข็มด้วยซิลิโคนเพื่อป้องกันการรั่วออกของกาซ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดปริมาณไฮโดรเจนโดยวิธีกาซโครมาโตรกราฟฟี Shimadzu GC-7AG บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยคอลัมน์ที่ใช้คือ Molecular Sieve 5A (Shimadzu) 60-80 mesh ขนาดคอลัม 3.0ID x 4 m.m. O.D x 2.0 m.m. อุณหภูมิคอลัม 25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ injectorและdetector เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส ใช้อีเลียมเป็นกาซพา (carrier gas) ที่ 30 มิลลิลิตรต่อนาที กระแสไฟฟ้าที่ TCD (Thermal Conductivity Detector)เท่ากับ 125 มิลลิแอมแปร์ นำหลอดที่วัดกาซแล้วไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดปริมาณกาซไฮโดรเจนในบรรยากาศในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธีกาซโครมาโตกราฟฟี คำนวณปริมาณไฮโดรเจน หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เทียบกับปริมาณไฮโดรเจนหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 30 นาที (ดังรายละเอียดในภาคผนวก ง) ถ้าปริมาณกาซไฮโดรเจนในหลอดทดลองลดลงอย่างน้อยที่สุด 30 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า *B.japonicum* สายพันธุ์ดังกล่าวมีฟีโนไทป์ของยีน *hup* รายงานปริมาณไฮโดรเจนเป็นไมโครโมลต่อปริมาตรทั้งหมดของบริเวณอากาศในหลอดทดลอง คือ 19.5 มิลลิลิตร ทำการ

ทดลองหาปริมาณการผลิตไฮโดรเจนโดยสายพันธุ์ที่พบว่ามีฟีโนไทป์ของยีนส์ *hup* ซ้ำอีกอย่างน้อยหนึ่งครั้ง

การหาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของ *B. japonicum*

หาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของ *B. japonicum* โดยชั่งน้ำหนักแห้งของลำต้นถั่วเหลืองและ ชั่งน้ำหนักแห้งของปมรากถั่วเหลือง พร้อมทั้งนับจำนวนปมตามวิธีที่รายงานโดย Somasegaran & Hoben (1985) เลี้ยงถั่วเหลืองใน Leonard jars วิธีเตรียม Leonard jars (มีดังรายงานในภาคผนวก ค) นอกจากนี้ยังหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของแบคทีรอยด์ในปมรากถั่วเหลืองโดย Acetylene Reduction Assay (ARA) ตามวิธีที่รายงานโดย นันทกร บุญเกิด และคณะ (2536)

การทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยใช้ Leonard jars

ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อบริสุทธิ์โดยเพาะ *B. japonicum* ลงในอาหารเหลวยีสต์-แมนนิทอลปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในฟลาสค์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 90รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ นำเมล็ดถั่วเหลืองสายพันธุ์ สจ.5 มาตรวจสอบการงอก (เปอร์เซ็นต์การงอกควรมีค่ามากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์) โดยทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วินาที จากนั้นจึงแช่เมล็ดถั่วเหลืองในสารละลาย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5-6 ครั้ง แช่เมล็ดถั่วในน้ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เมล็ดถั่วอ่อนพร้อมที่จะงอก เมื่อได้รับความชื้น ล้างด้วยน้ำกรองที่ฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้ง เพาะเมล็ดลงบนจานอาหารวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 25-30 เมล็ดต่อจาน นำจานอาหารวุ้นไปวางในที่มืด ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมานับจำนวนเมล็ดถั่วที่งอก เพื่อนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอก เตรียมเมล็ดถั่วด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น แล้วคัดเลือกเมล็ดที่มีรากยาว 0.5-1.0 เซนติเมตร ไปเพาะลงใน Leonard jarsซึ่งมีวิธีเตรียมดังรายงานในภาคผนวก ค. จำนวน 3 เมล็ดต่อ Leonard jar 1 ชุด โดยขุดเป็นหลุมห่างกันพอเหมาะ ลึกจากผิวหน้าทราย 2 เซนติเมตร วางเมล็ดถั่วที่งอกแล้วลงไปโดยให้ราก

ที่งอกอยู่ด้านล่าง กลบทรายด้านบนเบา ๆ อย่าให้ทรายอัดแน่นกันเกินไปแล้วกลบด้วยเม็ดกรวดให้มิดทราย เติมอาหารเหลวปลอดเชื้อที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน ในขวดใบล่างของ Leonard jars นำไปวางบนชั้นที่เตรียมไว้โดยใช้วิธี Randomized Complete Block Design (RCBD)(ภาคผนวกง.)ในห้องที่มีที่อุณหภูมิ28-30 องศาเซลเซียส ควบคุมการผ่าน เข้าออกของกระแสลม และมีความเข้มแสง 83.7 $\mu E.m^{-2}.sec^{-1}$ เป็นเวลา 5 วัน ใช้กรรไกรที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดต้นที่ไม่สมบูรณ์ออกให้เหลือต้นถั่ว 2 ต้นต่อ Leonard jars 1 ชุด ใส่สารละลายเซล *B. japonicum* ที่เพาะเตรียมไว้ที่บริเวณรากต้นถั่วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อต้นถั่ว 1 ต้น คอนโทรลมี 2 ชุด ชุดที่หนึ่งไม่เติม*B. japonicum*แต่เติมโปแตสเซียมไนเตรต 0.05เปอร์เซ็นต์ในอาหารเหลวที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน ชุดที่สองไม่เติม *B. japonicum* และใช้อาหารเหลวที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว (คอยเติมสารอาหารเหลวที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนและสารอาหารเหลวที่มีโปแตสเซียมไนเตรต 0.05เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน เป็นระยะเวลา 38 วัน) เมื่อต้นถั่วเหลืองสูงขึ้น ใช้ไม้ไผ่ที่ปลอดเชื้อมาปักลงในขวด Leonard jars ใกล้กับต้นถั่ว ใช้เชือกมัดต้นถั่วกับไม้ไผ่เข้าด้วยกัน ป้องกันต้นถั่วล้ม เก็บพืชตัวอย่างโดยตัดตรงบริเวณที่ใบเลี้ยงเคยติดอยู่ (cotyledon scar) นำส่วนลำต้นไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนแห้งสนิทจึงนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง นำส่วนที่อยู่ด้านล่างของ cotyledon scarไปใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ต่อ Leonard jars 1 ชุด (สลัดเม็ดทรายให้หลุดออกมากที่สุด) ปิดด้วยจุกยางให้แน่น และนำไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจิเนสโดยวิธี ARA หลังจากนั้นจึงนำส่วนรากมานับจำนวนปมและชั่งน้ำหนักแห้งของปม หลังจากอบให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ARA

ใช้หลอดฉีดยา (syringe) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ดูดอากาศออก 25 มิลลิลิตร ออกจากฟลาสค์ฉีดกาซอะเซทิลีนลงไปแทนที่ในปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าขวดเพื่อให้กาซกระจายทั่วทั้งขวด ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ระหว่างนั้นกาซอะเซทิลีน (C_2H_2) จะถูกรีดิวซ์ได้เอทธิลีน (C_2H_4) ดังสมการ

$$C_2H_2 + 2H^+ + 2e^- \text{----------} > C_2H_4$$

โดยใช้หลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตรดูดกาซออกจากฟลาสค์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดสูญญากาศ ปิดรอยรั่วด้วยกระดาษพาราฟิน นำไปหาแอคติวิตีการรีดิวซ์อะเซทิลีน โดยใช้หลอดฉีดยาฉีดตัวอย่างกาซ 1 มิลลิลิตร เข้าเครื่องกาซโครมาโตรกราฟฟี ที่มี detector ชนิด flame ionization ใช้คอลัมน์ Parapak N ขนาด 2.0 เมตร x 0.5 นิ้ว โดยมีไนโตรเจนชนิดปราศจากออกซิเจน เป็นกาซพาด้วยความเร็ว30มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 80 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ detector 110 องศาเซลเซียส ปริมาณกาซที่เกิดขึ้นคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับความสูงของยอดกราฟของเอทิลีนมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอนแล้ว (ตามวิธีการคำนวณในภาคผนวก ง) โดยกำหนดให้แอคติวิตีจำเพาะของการรีดิวซ์อะเซทิลีน คือจำนวนไมโครโมลของเอทิลีนที่เกิดขึ้นต่อต้นถั่วต่อเวลาที่ใช้บ่ม 1ชั่วโมง

นำข้อมูลทั้งหมดที่ได้ เช่น น้ำหนักแห้งต้นพืช จำนวนปม น้ำหนักปมแห้งและแอคติวิตีการรีดิวซ์อะเซทิลีน ไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปIRRISTAT ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย (analysis of variance) ตามวิธีที่รายงานโดย Somasegaran & Hoben(1985)

การหาความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์ของยีน *hup* และศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน

เปรียบเทียบระหว่างไอโซเลตของเชื้อ *B.japonicum* ที่มีฟีโนไทป์ของยีน *hup* กับค่าเฉลี่ยที่ได้จาก น้ำหนักแห้งของต้น (กรัม) จำนวนปม น้ำหนักแห้งของปม (กรัม) และ acetylene reduction assay (ไมโครโมลต่อชั่วโมง)ตามลำดับเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะฟีโนไทป์ของยีน *hup* กับศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของ *B.japonicum* สายพันธุ์ที่แยกได้