

ผลของการเปลี่ยนพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อโปรตีนในเซลล์ของ *Bradyrhizobium japonicum* S76,
S78 และ S162



นางสาวศลิษา จำปา

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5497-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF CHANGES IN MEDIUM pH ON INTRACELLULAR PROTEINS OF
Bradyrhizobium japonicum S76, S78 AND S162



Miss Salisa Jumpa

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-5497-3

ศลิษา จำปา : ผลของการเปลี่ยนพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อโปรตีนในเซลล์ของ *Bradyrhizobium japonicum* S76, S78 และ S162 (EFFECTS OF CHANGES IN MEDIUM pH ON INTRACELLULAR PROTEINS OF *Bradyrhizobium japonicum* S76, S78 AND S162) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา ชาญสง่าเวช

ดินที่ปลูกถั่วเหลืองในภาคเหนือของประเทศไทยมักจะเป็นดินกรด จึงมีการเติมปูนขาวก่อนที่จะหว่านเมล็ดถั่วเหลือง ผลของการเปลี่ยนแปลงพีเอชอย่างรวดเร็วในดินที่มีต่อโพรไฟล์ของโปรตีนภายในเซลล์ *Bradyrhizobium japonicum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนในปมรากถั่วเหลืองนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ เพื่อจำลองแบบการเกษตรที่มีการเติมปูนขาวในดิน เพื่อศึกษาถึงผลการเปลี่ยนพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อโพรไฟล์ของโปรตีนภายในเซลล์ *B. japonicum* เหตุผลสนับสนุนการออกแบบการทดลองนี้ คือ การเปลี่ยนแปลงโปรตีนโพรไฟล์เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหาร อาจนำไปสู่การอธิบายถึงการแสดงออกต่างๆกันของยีนส์ใน *B. japonicum* อันเป็นการตอบสนองต่อการเติมปูนขาวในดิน *B. japonicum* S76, S78 และ S162 แยกจากดินกรดจากจังหวัดเพชรบูรณ์ทางภาคเหนือของประเทศไทยซึ่งมีพีเอชเฉลี่ยของดินเท่ากับ 5.25 จากผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี RAPD-PCR ที่ใช้ RPO1 (บริเวณอนุรักษ์ของ *nifHDK* โพรโมเตอร์ 5'AATTTTCAAGCGTCGTGCCA3') หรือ CRL-7 (โพรโมเตอร์อย่างสูงที่มี GC สูง 5'GCCCGCCGCC3') พบว่า *B. japonicum* S76, S78 และ S162 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ซ้ำกัน ผลการหาค่าน้ำหนักแห้งของลำต้นและน้ำหนักแห้งของปมของถั่วเหลืองพันธุ์ เชียงใหม่ 2 (ชม 2), เชียงใหม่ 60 (ชม 60) และสุโขทัย 2 (สข 2) ที่เลี้ยงใน Leonard jars โดยเติม *B. japonicum* แต่ละสายพันธุ์ พบว่า เมื่อเลี้ยงถั่วเหลืองด้วยสารอาหารที่ไม่มีธาตุไนโตรเจนที่พีเอช 5.0 ทำให้น้ำหนักแห้งของถั่วเหลืองทั้ง 3 พันธุ์ ต่ำกว่า positive control ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า สารอาหารที่ไม่มีธาตุไนโตรเจน พีเอช 5.0 ไม่เหมาะสำหรับการเลี้ยงถั่วเหลืองโดยเติม *B. japonicum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะการทดลองที่ใช้ ผลการทำ Duncan's Multiple Range Test พบว่าถั่วเหลืองพันธุ์ ชม 60 เหมาะที่จะเลี้ยงด้วยสารอาหารที่ไม่มีธาตุไนโตรเจนที่พีเอช 6.8 นอกจากนี้การเติม *B. japonicum* S78 บนเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ ชม 60 และ สข 2 ให้น้ำหนักแห้งลำต้นถั่วเหลืองสูงกว่าการเติม *B. japonicum* S76 และ S162 และใช้สารอาหารที่ไม่มีธาตุไนโตรเจนที่พีเอช 5.0 ส่วนที่พีเอช 6.8 พบว่า *B. japonicum* S162 บนเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ ชม 60 ให้น้ำหนักแห้งลำต้นถั่วเหลืองสูงกว่าอีก 2 สายพันธุ์ และ positive control ผลการเลี้ยง *B. japonicum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหารสูตร yeast mannitol broth (YMB) ที่ไม่มีบัฟเฟอร์พีเอช 4.0-9.0 พบว่า ทุกสายพันธุ์เพิ่มจำนวนได้ที่ทุกพีเอชเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร YMB ที่มีบัฟเฟอร์ควบคุมพีเอชเริ่มต้น 4.0-9.0 พบว่า ไม่มีการเพิ่มจำนวนที่พีเอช 4.0 และ 5.0 แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์มีการเพิ่มจำนวนดีที่สุดที่พีเอชเริ่มต้น 7.0 ในอาหาร YMB ที่มีและไม่บัฟเฟอร์ ผลการแยกโปรตีนภายในเซลล์ระยะ mid-log โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงโปรตีนโพรไฟล์เมื่อเลี้ยงในอาหาร YMB ที่เติมและไม่เติมบัฟเฟอร์ แต่เมื่อเลี้ยงแต่ละสายพันธุ์ในอาหาร YMB ที่เติมบัฟเฟอร์พีเอช 6.0, 6.5 และ 7.0 โดยใช้แต่ละสายพันธุ์ที่เพิ่มจำนวนในอาหารที่มีพีเอช 5.5 จนถึงระยะ mid-log เป็นเชื้อเริ่มต้น พบว่าโปรตีนโพรไฟล์ภายในเซลล์ของ *B. japonicum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากเปลี่ยนพีเอชของอาหาร YMB บางครั้งพบว่า *B. japonicum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีโพลีเปปไทด์ขนาด 53 กิโลดาลตัน หายไปหรือลดลงภายใน 24 ชั่วโมงแรกหลังจากเปลี่ยนพีเอช ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโพลีเปปไทด์ขนาด 53 กิโลดาลตันไม่มีความเสถียร

ภาควิชา จุลชีววิทยา
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อผู้ผลิต.....ศลิษา จำปา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจนา ชาญสง่าเวช.....

4472316723 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORDS : CHANGES IN pH of MEDIUM, INTRACELLULAR PROTEIN PROFILES, *Bradyrhizobium*

SALISA JUMPA : EFFECTS OF CHANGES IN MEDIUM pH ON INTRACELLULAR PROTEINS OF *Bradyrhizobium japonicum* S76, S78 AND S162 THESIS ADVISOR : Associate Professor Kanjana Chansa-ngavej, Ph.D.

Soils in soybean cultivation areas in the northern part of Thailand are often acidic. The soils are usually limed with commercial calcium carbonate before planting soybean seeds. The effects of the abrupt changes in soil pHs on intracellular protein profiles of indigenous *Bradyrhizobium japonicum*, a symbiotic nitrogen-fixer in soybean root nodules, are not known. The aim of the experiments is to simulate the agricultural practice of soil liming to determine the effects of changes of culture medium pH on intracellular protein profiles of *B. japonicum*. The rationale behind the experiments is changes in protein profiles upon changes in culture medium pH may lead to the elucidation of differential gene expression in *B. japonicum* in response to soil liming. *B. japonicum* S76, S78, and S162 were isolated from an acidic soil sample from Petchaboon province in the northern part of Thailand. The average soil pH of the sampling site was determined to be 5.25. RAPD-PCR fingerprinting using either RPO1 (the conserved 20-mer of *nifHDK* promoter 5'AATTTTCAAGCGTCGTGCCA3') or CRL-7 (the arbitrary GC rich primer 5'GCCCGCCGCC3') as the primer revealed that *B. japonicum* S76, S78 and S162 were different strains. Plant and nodule dry weights of soybeans (*Glycine max*) cv. Chiangmai 2 (CM 2), Chiangmai 60 (CM 60) and Sukhothai 2 (ST 2) in Leonard jars inoculated with each of the three *B. japonicum* strains indicated that when nitrogen-free medium pH 5.0 was used to water the soybeans, dry weights of all the three soybean cultivars were found to be lower than that of the positive control indicating that the use of the pH 5.0 nitrogen-free medium was not suitable under the experimental conditions. Duncan's Multiple Range Test showed that soybean *Glycine max* cv. CM 60 was suitable for growing when nitrogen-free medium pH 6.8 was used. *B. japonicum* S78 was found to yield higher plant dry weights for soybeans cv CM 60 and ST 2 than *B. japonicum* S76 and S162 when pH 5.0 nitrogen-free medium was used while at pH 6.8 *B. japonicum* S162 was found to yield more plant dry weight for soybean cv CM 60 than the other two strains and the positive control under the experimental conditions. When the three *B. japonicum* strains were grown in yeast mannitol broth (YMB) pH 4.0-9.0 with no buffer, all strains could grow at all pHs. When the strains were grown in YMB with appropriate buffers at initial pHs 4.0-9.0, the strains could not grow at pHs 4.0 and 5.0. The optimal buffered and unbuffered pH for the growth of *B. japonicum* S76, S78 and S162 was found to be 7.0. SDS-PAGE of intracellular soluble protein profiles were found to be similar for all the mid-log phase cells of the three strains grown in both unbuffered and buffered media. When cells of each strain were grown at pH 5.5 until mid log phase, then used as inocula for yeast mannitol broth at buffered pHs 6.0, 6.5 and 7.0, SDS-PAGE soluble protein profiles indicated that there were no changes of intracellular protein profiles in the three *B. japonicum* strains 12h, 18h, 24h, 3 days and 5 days after the pH shifts. One remarkable finding was the disappearance or decrease in quantity of 53 kDa polypeptide within the first 24 hours after the pH shifts in all the three *B. japonicum* strains possibly due to the labile nature of the protein.

Department Microbiology
Field of study Industrial Microbiology
Academic year 2003

Student's signature.....Salisa Jumpa.....
Advisor's signature.....K. Chansa-ngavej.....

Acknowledgement

I wish to express sincere thanks and gratitude to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Kanjana Chansa-ngavej, for her tireless efforts as well as valuable advice and comments throughout the course of this study.

I would also like to thank Associate Professor Dr. Pairoh Pinphanichkarn for serving as the thesis committee chairperson and Professor Dr. Nantakorn Boonkerd, Associate Professor Dr. Lerluck Chitradon for serving as thesis committee members and their recommendations for the research.

Special thanks are given to student members in laboratory 404, all friends, and all staff members in the Department of Microbiology, especially, Mr.Veerarak Jungfungprinya for their help and friendship during my study.

This research was partially funded by a grant from the Graduate School, Chulalongkorn University which is gratefully acknowledged.

The last, but most important is my sincere and deepest gratitude to my parents and everyone in my family for their great love, constant support, understanding and heartfelt encouragement extended throughout my study.

ศูนย์วิทยุโทรพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Contents

	Page
Abstract (inThai).....	iv
Abstract (in English).....	v
Acknowledgement.....	vi
Content of Figures.....	ix
Content of Tables.....	xiii
Chapters	
1. Introduction	
1.1 <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1
1.2 Some factors affecting soybean productivity	
1.2.1 Soybean cultivars.....	2
1.2.2 Effect of liming on soil surface Al contents and nodulation....	3
1.3 Scope and aims of the experiments.....	4
2. Literature Survey	
2.1 Importance of <i>B. japonicum</i> to agriculture.....	5
2.2 Anticipated types of intracellular proteins that could change upon pH shifts.....	9
3. Materials and Methods	
3.1 Bacterial isolates and soybean cultivars.....	16
3.2 RAPD-PCR fingerprinting of 19 <i>B. japonicum</i> isolates.....	16
3.3 Growth of <i>B. japonicum</i> in unbuffered and buffered media.....	18
3.4 Extraction of intracellular proteins.....	18
3.5 Transblotting of intracellular proteins.....	19
3.6 Determination of plant and nodule dry weights.....	20
4. Results	
4.1 Selection of <i>B. japonicum</i> strains for study.....	22
4.2 Nitrogen-fixing potential of the three <i>B. japonicum</i> strains.....	23
4.3 Growth of <i>B. japonicum</i> S76, S78 and S162 in unbuffered and buffered YMB.....	29
4.4 Intracellular protein profiles of mid-log phase <i>B. japonicum</i> S76, S78 and S162.....	30

4.5 Effects of changes of medium pH on intracellular protein profiles...	36
5. Discussion.....	44
6. Conclusion.....	49
References.....	50
Appendices.....	54
Appendix A : Bacterial Growth Media and Plant Nutrient Solutions.....	55
Appendix B : Chemicals and Solutions.....	57
Appendix C : Duncan's Multiple Range Test.....	60
Appendix D : Preliminary results on N-terminal amino acid sequencing.....	67
Appendix E : SDS-PAGE of intracellular protein profiles of mid-log phase cells of <i>B. japonicum</i> S76 when cultured in buffered yeast extract mannitol medium pH 5.5 then transferred to pH 6.0 at 200 rpm, 30°C for 5-45 minutes.....	70
Biography.....	71



 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Content of Figures

	Page
Figure 1.1	The Entner-Doudoroff pathway for glucose breakdown.....1
Figure 1.2	Physical and genetic maps of <i>B. japonicum</i> USDA 110.....2
Figure 1.3	Soybean cultivation areas in Thailand.....3
Figure 2.1	Ribbon representation of the Fe protein of nitrogenase of <i>Azotobacter Vinelandii</i> at 2.9 °A.....5
Figure 2.2	Ribbon representation of nitrogenase.....6
Figure 2.3	Schematic representation of the FeMo cofactor model.....6
Figure 2.4	Metal clusters involved in the electron transfer in nitrogen fixation.....6
Figure 2.5	Physical and genetic maps of nodulation genes in <i>B. japonicum</i>11
Figure 2.6	Functions of NodC, NodB and NodA.....12
Figure 2.7	Chemical structure of <i>B. japonicum</i> Nod factor.....12
Figure 2.8	The core C ₆ -C ₃ -C ₆ structure of flavonoids.....13
Figure 2.9	Chemical structures of Genistein, Daidzein and their derivatives.....13
Figure 2.10	The transcriptional regulatory protein NodD ₁ control of nodulation gene expression in <i>B. japonicum</i>14
Figure 4.1	RAPD-PCR fingerprints of nineteen isolates of <i>B. japonicum</i> when (a) RPO1, and (b) CRL-7 was each used as the primer.....22
Figure 4.2	Average plant dry weight of soybean <i>Glycine max</i> cultivars CM 2, CM 60 and ST 2 after inoculation with either <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S76 or S78 or S162 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 5.0 for 28 days.....25
Figure 4.3	Average nodule dry weight of soybean <i>Glycine max</i> cultivars CM 2, CM 60 and ST 2 after inoculation with either <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S76 or S78 or S162 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 5.0 for 28 days.....25
Figure 4.4	Average dry weight of soybean <i>Glycine max</i> cultivars CM 2, CM 60 and ST 2 after inoculation with either <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S76 or S78 or S162 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 6.8 for 28 days.....26
Figure 4.5	Average nodule dry weight of soybean <i>Glycine max</i> cultivars CM 2, CM 60 and ST 2 after inoculation with either <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S76 or S78 or S162 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 6.8 for 28 days.....26

Figure 4.6.a. Growth curves of <i>B. japonicum</i> S76 cultured in unbuffered yeast extract mannitol broth with initial pHs ranging from 4.0 to 9.0 at 200 rpm, 30°C.....	31
Figure 4.6.b. Growth curves of <i>B. japonicum</i> S78 cultured in unbuffered yeast extract mannitol broth with initial pHs ranging from 4.0 to 9.0 at 200 rpm, 30°C.....	31
Figure 4.6.c. Growth curves of <i>B. japonicum</i> S162 cultured in unbuffered yeast extract mannitol broth with initial pHs ranging from 4.0 to 9.0 at 200 rpm, 30°C.....	32
Figure 4.6.d. Growth curves of <i>B. japonicum</i> S76 cultured in buffered yeast extract mannitol broth with initial pHs ranging from 4.0 to 9.0 at 200 rpm, 30°C.....	32
Figure 4.6.e. Growth curves of <i>B. japonicum</i> S78 cultured in buffered yeast extract mannitol broth with initial pHs ranging from 4.0 to 9.0 at 200 rpm, 30°C.....	33
Figure 4.6.f. Growth curves of <i>B. japonicum</i> S162 cultured in buffered yeast extract mannitol broth with initial pHs ranging from 4.0 to 9.0 at 200 rpm, 30°C.....	33
Figure 4.7 SDS-PAGE of intracellular protein profiles of mid-log phase cells <i>B. japonicum</i> S76, S78 and S162 when cultured in unbuffered yeast extract mannitol medium with initial pHs ranging from 4.0-8.0 at 200 rpm, 30 °C....	34
Figure 4.8 SDS-PAGE of intracellular protein profiles of mid-log phase cells <i>B. japonicum</i> S76, S78 and S162 when cultured in buffered yeast extract mannitol medium with initial pHs ranging from 5.5-8.0 at 200 rpm, 30 °C....	35
Figure 4.9.a. Growth curves of <i>B. japonicum</i> S76, S78 and S162 cultured in buffered yeast extract mannitol (YMB), pH 5.5, then shifted to YMB pH 5.5 and cultivated at 200 rpm, 30°C.....	37
Figure 4.9.b. Growth curves of <i>B. japonicum</i> S76, S78 and S162 cultured in buffered yeast extract mannitol (YMB), pH 5.5, then shifted to YMB pH 6.0 and cultivated at 200 rpm, 30°C.....	37
Figure 4.9.c. Growth curves of <i>B. japonicum</i> S76, S78 and S162 cultured in buffered yeast extract mannitol (YMB), pH 5.5, then shifted to YMB pH 6.5 and cultivated at 200 rpm, 30°C.....	38

Figure 4.9.d. Growth curves of <i>B. japonicum</i> S76, S78 and S162 cultured in buffered yeast extract mannitol (YMB), pH 5.5, then shifted to YMB pH 7.0 and cultivated at 200 rpm, 30 °C.....	38
Figure 4.10 SDS-PAGE of intracellular protein profiles of mid-log phase cells <i>B. japonicum</i> S76 when cultured in buffered yeast extract mannitol medium pH 5.5 then transferred to pH 6.0 at 200 rpm, 30 °C.....	39
Figure 4.11 SDS-PAGE of intracellular protein profiles of mid-log phase cells <i>B. japonicum</i> S78 when cultured in buffered yeast extract mannitol medium pH 5.5 then transferred to pH 6.0 at 200 rpm, 30 °C.....	39
Figure 4.12 SDS-PAGE of intracellular protein profiles of mid-log phase cells <i>B. japonicum</i> S162 when cultured in buffered yeast extract mannitol medium pH 5.5 then transferred to pH 6.0 at 200 rpm, 30 °C.....	40
Figure 4.13 SDS-PAGE of intracellular protein profiles of <i>B. japonicum</i> strains S76, S78, and S162 cultured in YMB medium, pH 5.5 until mid-log phase, then transferred to YMB medium with pH buffered at 6.0 and cultured for 6 h, 12 h, 18 h and 24 h at 200 rpm, 30 °C.....	40
Figure 4.14 SDS-PAGE of intracellular protein profiles of mid-log phase cells <i>B. japonicum</i> S76 when cultured in buffered yeast extract mannitol medium pH 5.5 then transferred to pH 6.5 at 200 rpm, 30 °C.....	41
Figure 4.15 SDS-PAGE of intracellular protein profiles of mid-log phase cells <i>B. japonicum</i> S76 when cultured in buffered yeast extract mannitol medium pH 5.5 then transferred to pH 7.0 at 200 rpm, 30 °C.....	41
Figure 4.16 SDS-PAGE of intracellular protein profiles of mid-log phase cells <i>B. japonicum</i> S78 when cultured in buffered yeast extract mannitol medium pH 5.5 then transferred to pH 6.5 at 200 rpm, 30 °C.....	42
Figure 4.17 SDS-PAGE of intracellular protein profiles of mid-log phase cells <i>B. japonicum</i> S78 when cultured in buffered yeast extract mannitol medium pH 5.5 then transferred to pH 7.0 at 200 rpm, 30 °C.....	42
Figure 4.18 SDS-PAGE of intracellular protein profiles of mid-log phase cells <i>B. japonicum</i> S162 when cultured in buffered yeast extract mannitol medium pH 5.5 then transferred to pH 6.5 at 200 rpm, 30 °C.....	43

Figure 4.19	SDS-PAGE of intracellular protein profiles of mid-log phase cells <i>B. japonicum</i> S162 when cultured in buffered yeast extract mannitol medium pH 5.5 then transferred to pH 7.0 at 200 rpm, 30 °C.....	43
Figure 5.1	The Nitrogen Cycle.....	47



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Content of Tables

		Page
Table 1.1	Cultivars of soybeans distributed to soybean growers in various parts of Thailand by the Department of Agricultural Extension in 2004.....	3
Table 2.1	Quantities and values of fertilizers imported into Thailand during 1999-2003.....	8
Table 2.2	Quantities and values of soybeans imported into Thailand during 1999-2003.....	8
Table 4.1	Sizes of PCR products of 19 isolates when CRL-7 was used as the primer.....	23
Table 4.2	Duncan's Multiple Range Test for average plant dry weight when each of <i>Bradyrhizobium japonicum</i> strains S76, S78 and S162 was inoculated onto germinating seeds of soybean <i>Glycine max</i> cv. CM 2, CM 60 and ST 2 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 5.0 for 28 days.....	27
Table 4.3	Duncan's Multiple Range Test for average nodule dry weight when each of <i>Bradyrhizobium japonicum</i> strains S76, S78 and S162 was inoculated onto germinating seeds of soybean <i>Glycine max</i> cv. CM 2, CM 60 and ST 2 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 5.0 for 28 days.....	27
Table 4.4	Duncan's Multiple Range Test for average plant dry weight when each of <i>Bradyrhizobium japonicum</i> strains S76, S78 and S162 was inoculated onto germinating seeds of soybean <i>Glycine max</i> cv. CM 2, CM 60 and ST 2 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 6.8 for 28 days.....	28
Table 4.5	Duncan's Multiple Range Test for average nodule dry weight when each of <i>Bradyrhizobium japonicum</i> strains S76, S78 and S162 was inoculated onto germinating seeds of soybean <i>Glycine max</i> cv. CM 2, CM 60 and ST 2 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 6.8 for 28 days.....	28
Table 4.6	Specific growth rate (h^{-1}) of <i>B. japonicum</i> S76, S78, and S162 grown in buffered and unbuffered YMB pH 4.0-9.0.....	29
Table 4.7	Final pHs of unbuffered yeast extract medium.....	30
Table A.1	Duncan's Multiple Range Test for average plant dry weight for <i>Bradyrhizobium japonicum</i> strains S76, S78, S162 and <i>Glycine max</i> cv CM 2, CM 60, ST 2 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 5.0 (Level of probability, $\alpha = 0.05$).....	60

Table A.2	Duncan's Multiple Range Test for average nodule dry weight for <i>Bradyrhizobium japonicum</i> strains S76, S78, S162 and <i>Glycine max</i> cv CM 2, CM 60, ST 2 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 5.0 (Level of probability, $\alpha = 0.05$).....	61
Table A.3	Duncan's Multiple Range Test for average plant dry weight for <i>Bradyrhizobium japonicum</i> strains S76, S78, S162 and <i>Glycine max</i> cv CM 2, CM 60, ST 2 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 6.8 (Level of probability, $\alpha = 0.05$).....	62
Table A.4	Duncan's Multiple Range Test for average nodule dry weight for <i>Bradyrhizobium japonicum</i> strains S76, S78, S162 and <i>Glycine max</i> cv CM 2, CM 60, ST 2 in Leonard jars with nitrogen-free medium pH 6.8 (Level of probability, $\alpha = 0.05$).....	63



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย