รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย: วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล

2. โครงการวิจัย: วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ ปุ๋ย พืช ดิน และน้ำ

กิจกรรม: พัฒนาเทคนิคระบบการวิเคราะห์และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย): การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการจัดจำแนกไรโซเบียมในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): The validation of rhizobium classification method in rhizobium biofertilizer.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง: นายอำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน:
1. นางสาวจิตรา เกาะแก้ว
2. นายมนต์ชัย มนัสสิลา
3. นายภัสชญภณ หมื่นแจ้ง
4. นางสาวอมรรัตน์ ใจยะเสน

สังกัด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ: การจำแนกชนิดของเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเขียว ถั่วลิสง และถั่วเหลืองสายพันธุ์อ้างอิงทั้งหมด 9 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกจากประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนดีที่สุด 3 อันดับแรกจากจำนวนทั้งหมด 10 สายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียมแต่ละชนิดถั่ว โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ fD1 (forward primer) และ rP2 (reverse primer) แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอมาหาลำดับเบส จากนั้นทำแผนภูมิวิวัฒนาการ เปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อไรโซเบียมอื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล NCBI ด้วยวิธี Neighbor-joining phylogenetic analysis โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.0 พบว่า เชื้อไรโซเบียมถั่วเขียวสายพันธุ์ DASA 02002 02008 และ 02009 จัดอยู่ในกลุ่มของ *Bradyrhizobium japonicum* โดยมีค่า Bootstrap 85% จึงสรุปได้ว่าชนิดของเชื้อไรโซเบียมอ้างอิงสำหรับถั่วเขียวสายพันธุ์ DASA 02002 02008 และ 02009 คือ *B. japonicum* ส่วนเชื้อไรโซเบียมถั่วลิสงสายพันธุ์ DASA 03069 และ 03071 จัดอยู่ในกลุ่มของ *B. yuanmingense* โดยมีค่า Bootstrap 87% ในขณะที่สายพันธุ์ DASA 03018 จัดอยู่ในกลุ่มของ *B. liaoningense* โดยมีค่า Bootstrap 87% จึงทำการยืนยันการจำแนกชนิดด้วย phylogenetic analysis พบว่า *B. yuanmingense* และ *B. liaoningense* มีวิวัฒนาการที่มีความใกล้เคียงกัน

มาก จึงจัดอยู่ในกลุ่ม (clade) เดียวกัน โดยมีค่า Bootstrap 100% จึงสรุปได้ว่า ชนิดของเชื้อไรโซเบียมถั่วลิสงสายพันธุ์ DASA 03069 และ 03071 คือ *B. yuanmingense* และสายพันธุ์ DASA 03018 คือ *B. liaoningense* ในขณะที่เชื้อไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ DASA 01001, DASA 01014 และ DASA 01023 จัดอยู่ในกลุ่มของ *B. japonicum* ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าไพรเมอร์ fD1 และ rP2 สามารถใช้ในการจัดจำแนกเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเขียว ถั่วลิสง และถั่วเหลืองในระดับชนิด (species) ได้

Abstract: The identification of nine reference rhizobium strains for mung bean, groundnut and soy bean that selected from the top three highest nitrogen fixing rate for each leguminous plant. fD1 (forward primer) and rP2 (reverse primer) primers were used to increase DNA fragments of those rhizobium strains. Then rhizobium DNAs were sequenced and used to construct the phylogenetic tree by comparing with other rhizobium strains in NCBI database. Neighbor-joining phylogenetic analysis was performed using MEGA 6.0 program. The result showed that rhizobium for mung bean strains DASA 02002 02008 and 02009 were grouped in *Bradyrhizobium japonicum* with 85% bootstrap support. Therefore, the species of rhizobium for mung bean strains DASA 02002 02008 and 02009 was *B. japonicum*. Rhizobium for groundnut strains DASA 03069 and 03071 were grouped in *B. yuanmingense* with 87% bootstrap support while DASA 03018 was grouped in *B. liaoningense* with 87% bootstrap support. The result of phylogenetic analysis revealed that *B. yuanmingense* and *B. liaoningense* had similar evolution which resulted in their grouping in the same clade with 100% bootstrap support. Therefore, the species of rhizobium for groundnut strains DASA 03069 and 03071 was *B. yuanmingense* while, DASA 03018 was *B. liaoningense*. The rhizobiums for soy bean strains DASA 01001 01014 and 01023 were *B. japonicum*. Therefore, it was concluded that the primer fD1 and rP2 can be used to classify rhizobium into species level.

6. คำนำ:

ไรโซเบียมเป็นจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ โดยใช้กลไกการตรึงไนโตรเจนที่มีอยู่ในอากาศ มาเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนียหรือสารประกอบไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ ความพิเศษของเชื้อกลุ่มไรโซเบียมคือ ความสามารถในการสร้างปมที่รากหรือที่ลำต้นของพืชตระกูลถั่ว ทำให้พืชได้ประโยชน์จากการตรึงไนโตรเจนโดยตรงซึ่งจำเป็นจะต้องอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างพืชตระกูลถั่วกับไรโซเบียมที่สัมพันธ์กัน

เนื่องจากไรโซเบียมสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ ดังนั้นการใช้ไรโซเบียมเป็นปุ๋ยชีวภาพจึงมีความสำคัญ การใช้ไรโซเบียมนอกจากจะทำให้ลดการใช้ปุ๋ยเคมี ยังผลทำให้มีต้นทุนการผลิตลดลงอีกด้วย จึงลดปัญหาการใช้ปุ๋ยเคมีได้แก่ การสะสมตกค้างของสารเคมีเนื่องจากพืชไม่สามารถนำไปใช้ได้ทั้งหมดซึ่งการใช้ทำให้เกิดการปนเปื้อนไปยังแหล่งน้ำได้

การวิเคราะห์จุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์เพื่อให้ได้มาตรฐาน ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 เนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในปุ๋ยชีวภาพมีบทบาทสำคัญในการให้สารประกอบธาตุอาหารพืช อัตราการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ในวัสดุพา ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการสร้างธาตุอาหารให้แก่พืช การสร้างมาตรฐานวิธีการตรวจวิเคราะห์ให้เป็นที่ยอมรับในระดับอาเซียนและนานาชาติ

เนื่องจากในปัจจุบันบริษัทเอกชนผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมจำหน่ายกันอย่างแพร่หลาย และขอขึ้นทะเบียนปุ๋ยชีวภาพตามพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 โดยปริมาณจุลินทรีย์ไรโซเบียม 1.0 x 10^6 เซลล์ต่อน้ำหนักปุ๋ยชีวภาพ 1 กรัม ดังนั้นการตรวจสอบความความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อรับรองคุณภาพของปุ๋ยชีวภาพและเป็นประโยชน์ต่อการนำวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ น่าเชื่อถือ และรองรับประชาคมเศรษฐกิจอาเซียนในปี พ.ศ. 2558

7. วิธีดำเนินการวิธีดำเนินการ:

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์

- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycler)
- เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation)
- ไพร์เมอร์ (primer)
- ชุดสกัดดีเอ็นเอ
- เครื่องแก้วและวัสดุอื่น ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์

2. สารเคมี / จุลินทรีย์

- สารเคมีในกระบวนการสกัดสารพันธุกรรม
- อาหารเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม
- เชื้อไรโซเบียมถั่วเขียว ถั่วลิสง และถั่วเหลือง สายพันธุ์บริสุทธิ์

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. นำเชื้อไรโซเบียมถั่วเขียว ถั่วลิสง และถั่วเหลือง สายพันธุ์บริสุทธิ์เลี้ยงในอาหาร yeast mannitol broth medium ปั่นตกตะกอนเพื่อเก็บเซลล์ไรโซเบียม

2. สกัดดีเอ็นเอของไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ ตามวิธีการของชุดสกัด Genomic DNA Mini Kit (Tissue) (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan)

3. เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 16S rDNA ที่ต้องการโดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ fD1 (5’ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3’) และ rP2 (5’-ACGGCTACCTTGTTAC GAC TT-3’) (Weisburg et al., 1991) จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดเข้าเครื่อง PCR โดยมีลำดับของปฏิกิริยา (PCR reaction condition) ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1	94 องศาเซลเซียส 3 นาที	จำนวน 1 รอบ
ขั้นตอนที่ 2	94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	35 รอบ
	50 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
	72 องศาเซลเซียส 1 นาที	
ขั้นตอนที่ 3	72 องศาเซลเซียส 10 นาที	จำนวน 1 รอบ

ตรวจสอบ PCR product ด้วยเครื่อง agarose gel electrophoresis

4. หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rDNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเครื่อง DNA Sequencer

5. นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ที่ได้มาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันกับสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) ด้วย Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

6. นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไรโซเบียมในฐานข้อมูลที่มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันมากที่สุด (% similarity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์อ้างอิง มาสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.0 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของเชื้อ ไรโซเบียมทดสอบแต่ละสายพันธุ์ว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อ ไรโซเบียมชนิดใดในฐานข้อมูล และบ่งบอกชนิด (species) ของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์อ้างอิง

การบันทึกข้อมูล

1. รูปถ่ายเจลปริมาณสารพันธุกรรมที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

2. ตารางผลการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกัน (% similarity) ของลำดับเบสของไรโซเบียมทดสอบแต่ละสายพันธุ์กับสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI)

3. แผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

เวลาและสถานที่ ระยะเวลาเริ่มต้น ต.ค. 2558 สิ้นสุด ก.ย. 2561

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ถั่วเขียว

เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียมถั่วเขียวได้ 10 สายพันธุ์ ได้แก่ DASA 02001 02002 02006 02007 02008 02009 02010 02020 02062 และ 02080 และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ fD1 และ rP2 จนได้ปริมาณดีเอ็นเอตามภาพถ่ายเจล (Figure 1)

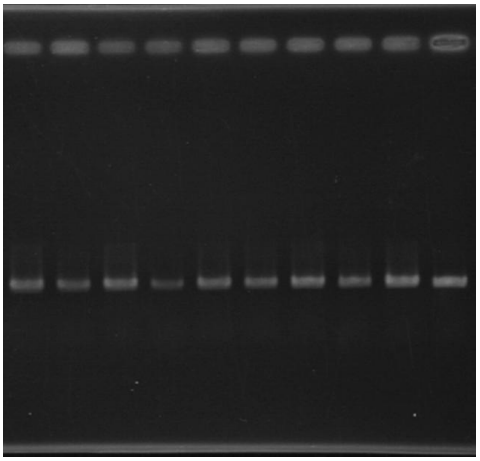

Figure 1 The amount of DNA of 10 selected mung bean rhizobium

เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อไรโซเบียมทั้ง 10 สายพันธุ์ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยไพร์เมอร์ fD1 และ rP2 ไปหาลำดับเบส แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับเบสของเชื้อไรโซเบียมอื่น ๆ ในฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) พบว่า ลำดับเบสของดีเอ็นเอเชื้อไรโซเบียมทั้ง 10 สายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ *Bradyrhizobium japonicum* 99% (Table 1) สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขึ้นอยู่กับระยะทางวิวัฒนาการ (evolutionary distance) การวิเคราะห์จากค่าเปอร์เซ็นต์อัตลักษณ์ (identity percentage) จะให้ค่าประมาณที่เป็นประโยชน์ ซึ่งโดยปกติจะพิจารณาว่าสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มีวิวัฒนาการใกล้ชิดกัน หรือเป็นชนิดเดียวกัน เมื่อเปอร์เซ็นต์อัตลักษณ์มีค่าแตกต่างกันไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ (Pearson, 2013)

Table 1 Classification of selected mung bean rhizobium

Strains	Species	Similarity (%)	NCBI accession number
DASA 02001	*Bradyrhizobium japonicum*	99	KY000645
DASA 02002	*B. japonicum*	99	AB931151
DASA 02006	*B. japonicum*	99	CP017637
DASA 02007	*B. japonicum*	99	KY284085
DASA 02008	*B. japonicum*	99	AB931151

DASA 02009	*B. japonicum*	99	KF995119
DASA 02010	*B. japonicum*	100	KY000644
DASA 02020	*B. japonicum*	99	KF995119
DASA 02062	*B. japonicum*	99	AY904774
DASA 02080	*B. japonicum*	99	KY000645

ยืนยันผลการจำแนกชนิดโดยนำลำดับเบสของเชื้อไรโซเบียมถั่วเขียวสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนดีที่สุด 3 อันดับแรกได้แก่ DASA 02002 02008 และ 02009 มาทำแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) เปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อไรโซเบียมอื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล NCBI ด้วยวิธี Neighbor-joining phylogenetic analysis โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.0 พบว่า เชื้อไรโซเบียมถั่วเขียวสายพันธุ์ DASA 02002 02008 และ 02009 ยังคงจัดอยู่ในกลุ่มของ *B. japonicum* (Figure 2) โดยมีค่า Bootstrap 85% ซึ่งค่า Bootstrap นี้มีความสัมพันธ์กับความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Richardson *et al*., 2000) ดังนี้

ค่า Bootstrap 85-100% แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับสูง

ค่า Bootstrap 71-84% แสดงถึง ความเชื่อมั่นระดับปานกลาง

ค่า Bootstrap 50-70% แสดงถึง ความเชื่อมั่นระดับต่ำ

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ชนิดของเชื้อไรโซเบียมถั่วเขียวสายพันธุ์ DASA 02002, DASA 02008 และ DASA 02009 คือ *Bradyrhizobium japonicum*

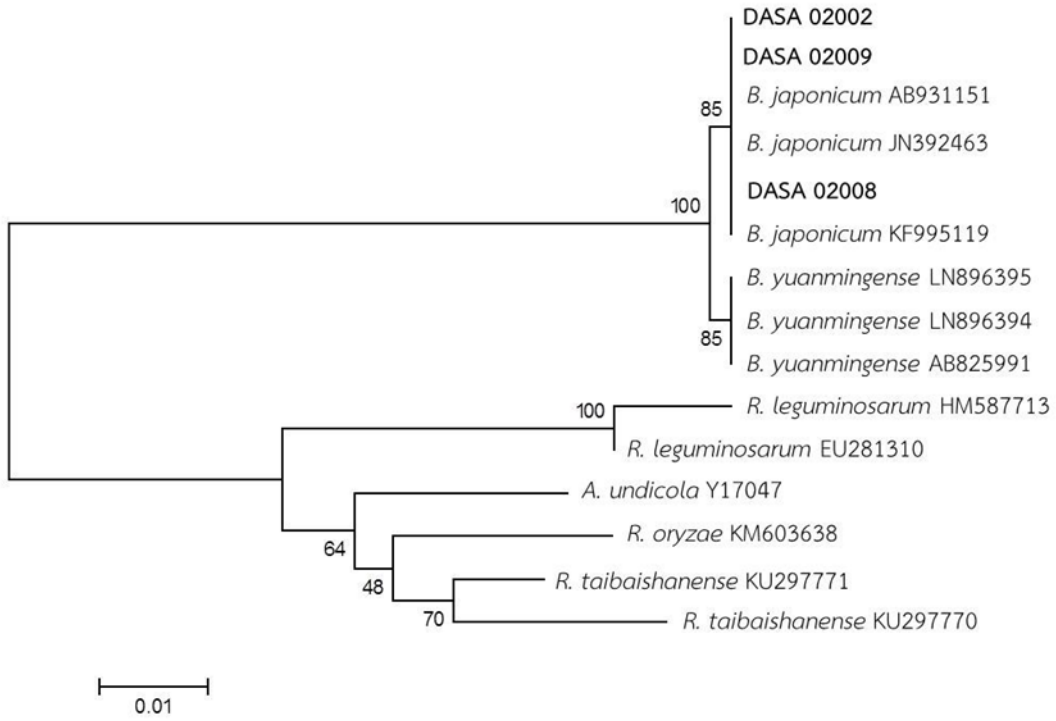

Figure 2 Neighbor-joining phylogenetic tree of partial 16S rDNA gene of three reference mung bean rhizobium strains: DASA 02002 02008 and 02009 versus reference strains from NCBI database. The percentage support values are based on 1000 bootstraps.

ถั่วลิสง

คัดเลือกเชื้อไรโซเบียมถั่วลิสงจากประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนดีที่สุด 10 สายพันธุ์บริสุทธิ์ ได้แก่ DASA 03001 03007 03017 D 03018 03043 03069 03071 03084 03183 และ 03184 นำเซลล์เชื้อไรโซเบียมดังกล่าวมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ fD1 และ rP2 แล้วนำไปหาลำดับเบส เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับเบสของเชื้อไรโซเบียมอื่น ๆ ในฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) พบว่า สายพันธุ์ไรโซเบียมส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ *Bradyrhizobium liaoningense* และ *B. yuanmingense* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกัน (% similarity) อยู่ในช่วง 97 – 100% เนื่องจากเชื้อไรโซเบียมทั้งสองชนิดมีความคล้ายคลึงกันทางวิวัฒนาการสูง (Table 2)

Table 2 Classification of selected groundnut rhizobium

Strains	Species	Similarity (%)	NCBI accession number
DASA 03001	*B. yuanmingense*	100	KY908463
	B. liaoningense	100	KX230054
DASA 03006	*B. yuanmingense*	98	FJ418699
	B. liaoningense	98	KX230054
DASA 03007	*B. liaoningense*	99	AB931151
	B. japonicum	99	EU481826
DASA 03017	*B. yuanmingense*	99	KY908463
	B. liaoningense	99	KX230054
DASA 03018	*B. liaoningense*	99	KX682021
DASA 03069	*B. yuanmingense*	99	KY908463
	B. liaoningense	99	KX230054
DASA 03071	*B. yuanmingense*	100	KY908463
	B. liaoningense	100	KX230054
DASA 03084	*B. japonicum*	99	KR092321
	B. daqingense	99	HQ664955
DASA 03183	*B. yuanmingense*	98	KY908463
	B. liaoningense	98	KX230054
DASA 03184	*B. yuanmingense*	97	KY908463
	B. liaoningense	97	KX230054

การยืนยันผลการจำแนกชนิดโดยนำลำดับเบสของเชื้อไรโซเบียมถั่วลิสงสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนดีที่สุด 3 อันดับแรกได้แก่ DASA 03018 03069 และ 03071 ด้วยการทำแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) เปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อไรโซเบียมอื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล NCBI ด้วยวิธี Neighbor-joining phylogenetic analysis โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.0 พบว่า เชื้อไรโซเบียมถั่วลิสงสายพันธุ์ DASA 03069 และ 03071 จัดอยู่ในกลุ่มของ *Bradyrhizobium yuanmingense* (Figure 3) โดยมีค่า Bootstrap 87% ในขณะที่สายพันธุ์ DASA 03018 จัดอยู่ในกลุ่มของ *B. liaoningense* โดยมีค่า Bootstrap 87% เช่นกัน จากภาพแสดงให้เห็นว่า *B. yuanmingense* และ *B. liaoningense* มีวิวัฒนาการที่มีความใกล้เคียงกันมาก จึงจัดอยู่ในกลุ่ม (clade) A เช่นเดียวกัน โดยมีค่า Bootstrap 100% ซึ่งค่า Bootstrap นี้แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับสูง (Richardson *et al*., 2000) จึงสรุปได้ว่า ชนิดของเชื้อไรโซเบียมถั่วลิสงสายพันธุ์ DASA 03069 และ 03071 คือ *B. yuanmingense* และสายพันธุ์ DASA 03018 คือ *B. liaoningense* (Figure 3) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhang et al. (2011) ที่พบว่า เชื้อไรโซเบียมส่วนใหญ่ที่ก่อให้เกิดปมรากในถั่วลิสงจัดอยู่ใน 2 กลุ่มใหญ่คือ *B. yuanmingense* และ *B. liaoningense* ดังนั้นจึงสามารถใช้เชื้อไรโซเบียมทั้งสองชนิดเป็นสายพันธุ์อ้างอิงของเชื้อไรโซเบียมที่สามารถก่อให้เกิดปมรากในถั่วลิสงได้ เพื่อให้คลอบคลุมกับชนิดของไรโซเบียมที่พบในปมรากถั่วลิสงมากที่สุด

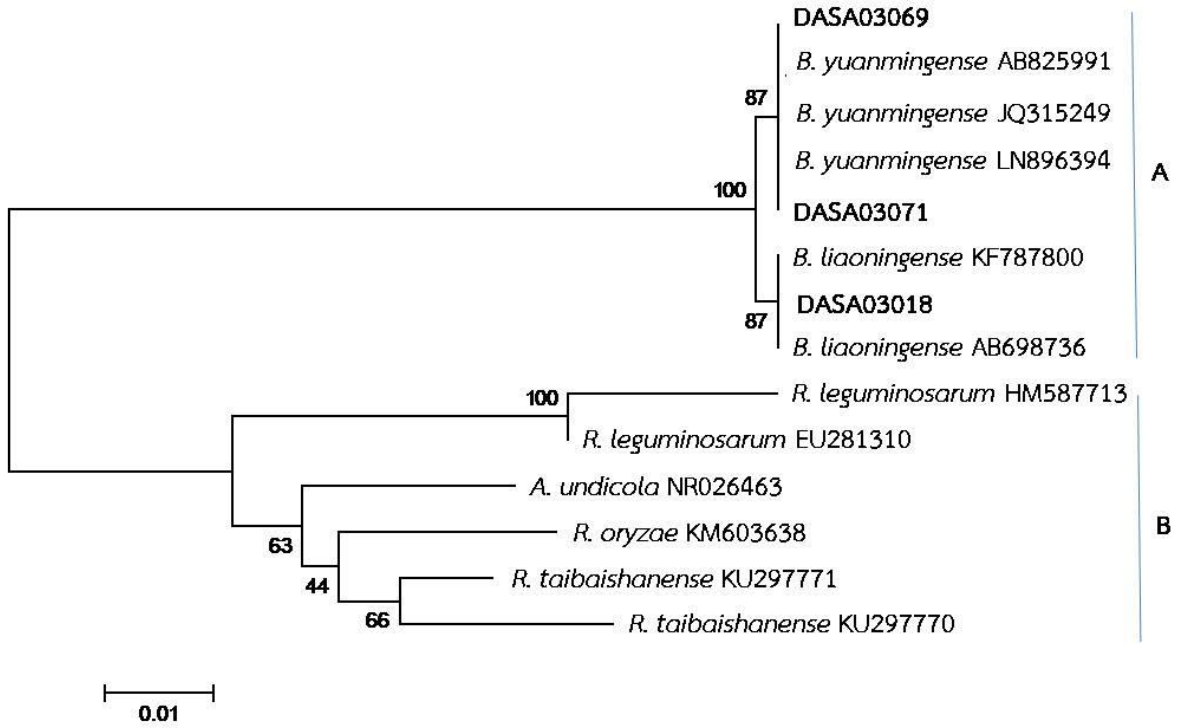

Figure 3 Neighbor-joining phylogenetic tree of partial 16S rDNA gene of three reference groundnut rhizobium strains: DASA 03018 03069 and 03071 versus reference strains from NCBI database. The percentage support values are based on 1000 bootstraps.

ถั่วเหลือง

คัดเลือกเชื้อไรโซเบียมถั่วเหลือง10 สายพันธุ์บริสุทธิ์และเลี้ยงในอาหาร yeast mannitol broth medium ปั่นตกตะกอนเพื่อเก็บเซลล์ไรโซเบียม และสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ fD1 และ rP2 เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ไปหาลำดับเบส แล้วนำลำดับเบสของเชื้อไรโซเบียม 3 สายพันธุ์ ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับเบสของเชื้อไรโซเบียมอื่นๆ ในฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) พบว่า สายพันธุ์ไรโซเบียมถั่วเหลืองทั้งหมดมีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ *Bradyrhizobium japonicum* 99% (Table 3) และต้องทำแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-joining เพื่อศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของเชื้อไรโซเบียมทดสอบแต่ละสายพันธุ์ว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อไรโซเบียมชนิดใดในฐานข้อมูลมากที่สุด และเป็นการยืนยันผลการบ่งบอกชนิดอีกครั้ง

Table 3 Classification of selected soybean rhizobium

Strains	Species	Similarity (%)	NCBI accession number
DASA 01001	*Bradyrhizobium japonicum*	99	KY000639
DASA 01007	*B. japonicum*	99	KY000643
DASA 01013	*B. japonicum*	99	KY000644
DASA 01014	*B. japonicum*	99	KY000638
DASA 01015	*B. japonicum*	99	KY000644
DASA 01022	*B. japonicum*	99	AY904786
DASA 01023	*B. japonicum*	99	MF664373
DASA 01034	*B. japonicum*	99	KY000638
DASA 01054	*B. japonicum*	99	KY000638
DASA 01059	*B. japonicum*	99	KY000636

การยืนยันผลการจำแนกชนิดโดยนำลำดับเบสของเชื้อไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์อ้างอิงทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด 3 อันดับแรกได้แก่ DASA 01001 01014 และ 01023 มาทำแผนภูมิวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) เปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อไรโซเบียมอื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยวิธี Neighbor-joining

phylogenetic analysis โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.0 พบว่า เชื้อไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์ DASA 01001 01014 และ 01023 จัดอยู่ในกลุ่มของ *Bradyrhizobium japonicum* (Figure 4)

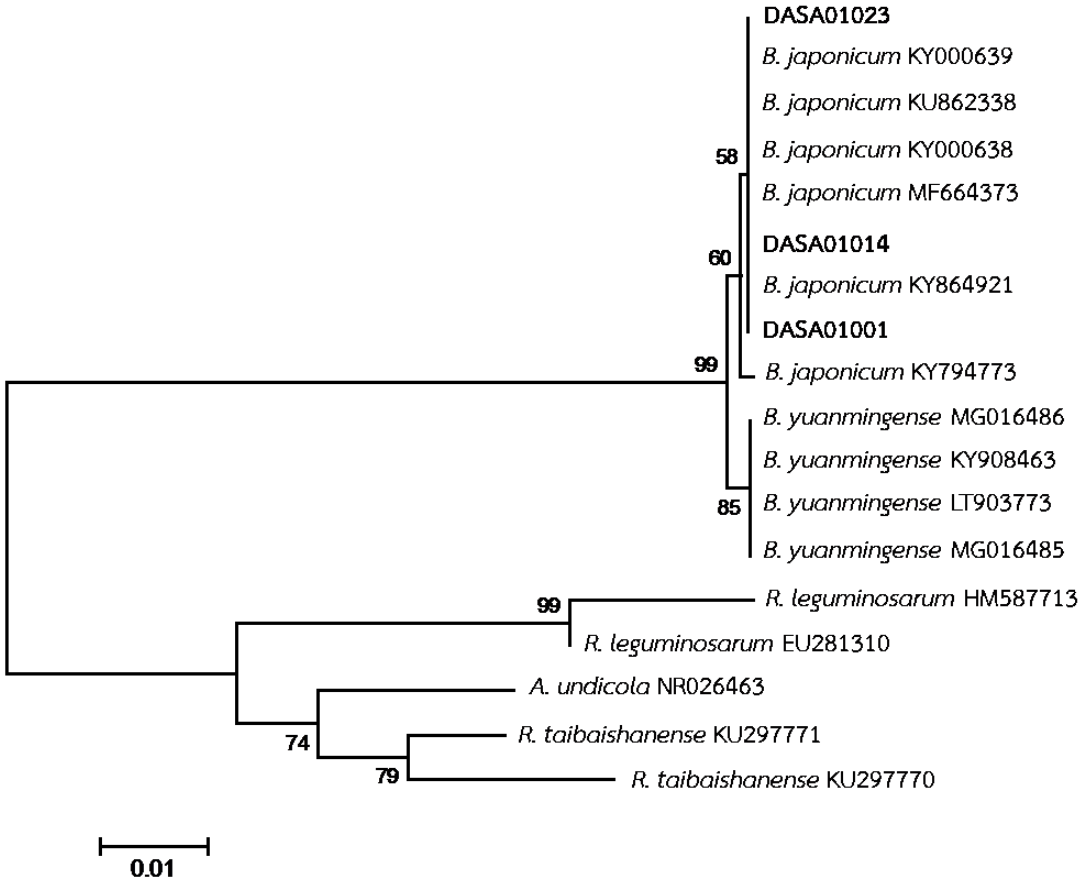

Figure 4 Neighbor-joining phylogenetic tree of partial 16S rDNA gene of three reference soybean rhizobium strains: DASA 01001 01014 and 01023 versus reference strains from NCBI database. The percentage support values are based on 1000 bootstraps.

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการจำแนกชนิดของเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเขียว ถั่วลิสง และถั่วเหลืองสายพันธุ์อ้างอิงทั้งหมด 9 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกจากประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนดีที่สุด 3 อันดับแรกจากจำนวนทั้งหมด 10 สายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียมแต่ละถั่ว โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ fD1 (forward primer) และ rP2 (reverse primer) แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอมาหาลำดับเบส จากนั้นทำแผนภูมิวิวัฒนาการ เปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อไรโซเบียมอื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล NCBI ด้วยวิธี Neighbor-joining phylogenetic analysis โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.0 พบว่า ชนิดของเชื้อไรโซเบียมอ้างอิงสำหรับถั่วเขียวสายพันธุ์ DASA 02002 02008 และ 02009 คือ *B. japonicum* ส่วนชนิดของเชื้อไรโซเบียมถั่วลิสงสายพันธุ์ DASA 03069 และ 03071 คือ *B. yuanmingense* และสายพันธุ์ DASA 03018 คือ *B. liaoningense* ในขณะที่เชื้อไรโซเบียมถั่วเหลืองสายพันธุ์

DASA 01001 01014 และ 01023 จัดอยู่ในกลุ่มของ *B. japonicum* ดังนั้นการใช้ไพรเมอร์ fD1 และ rP2 สามารถใช้ในการจัดจำแนกเชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเขียว ถั่วลิสง และถั่วเหลืองในระดับชนิด (species) ได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้วิธีการจัดจำแนกของไรโซเบียมในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำหรับถั่วเขียว ถั่วลิสง และถั่วเหลือง เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์รับรองในปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ช่วยเหลือให้งานวิจัยลุล่วงไปด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมปฏิบัติงานด้วย

12. เอกสารอ้างอิง :

Pearson WR. 2013. An Introduction to Sequence Similarity ("Homology") Searching. *Current Protocols in Bioinformatics* 3: doi: 10.1002/047125 0953.bi0301s42.

Richardson JE, Fay MF, Cronk QCB, Bow-man D and Chase M. 2000. A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using rbcl and trnL-F plastid DNA sequences. American Journal of Botany 87: 1309-1324.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA and Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.

Zhang S, Xie F, Yang J, Li Y. 2011. Phylogeny of bradyrhizobia from Chinese cowpea miscellany inferred from 16S rRNA, *atpD*, *glnII*, and 16S–23S intergenic spacer sequences. Canadian Journal of Microbiology, 57(4): 316-327

13. ภาคผนวก : -