อิทธิพลของ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 และ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 ต่อการเกิดปม การตรึงไนโตรเจน และผลผลิตของถั่วเหลือง [*Glycine max* (L.) Merrill]

Effects of endophytic *Streptomyces* sp.; P4 isolate and *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 on nodulation, nitrogen fixation and yield of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]

วัลลีย์ อาศัย[1*], วิภา หอมหวล[1], สิริรัตน์ แสนยงค์[1] และ อำพรรณ พรมศิริ[2]

Wanlee Asai[1*], Wipa Homhaul[1], Sirirat Sanyong[1] and Ampan Bhromsiri[2]

บทคัดย่อ: เกษตรกรยังคงใช้สารเคมีทางการเกษตรที่เป็นผลเสียต่อสุขภาพของผู้ผลิตและผู้บริโภค รวมทั้งต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาผลของการใช้ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 กับ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 ต่อการเกิดปม การตรึงไนโตรเจน และผลผลิตของถั่วเหลืองโดยทดลอง ในกระถางกับถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 2 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 3 ชุดๆ ละ 4 ซ้ำมี 8 กรรมวิธี ได้แก่ กรรมวิธีควบคุมซึ่งไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์และปุ๋ยไนโตรเจน และอีก 7 กรรมวิธีที่ใส่ *B. japonicum* USDA 110 endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ปุ๋ยไนโตรเจนทั้งใส่เดี่ยว และใส่ร่วมกัน จากการศึกษาพบว่า การใส่ *B. japonicum* USDA 110 ร่วมกับ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ส่งผลให้น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน น้ำหนักแห้งปม และน้ำหนักแห้งรวมของถั่วเหลืองในระยะเจริญเติบโต (V_6) และระยะเจริญพันธุ์ (ระหว่าง R_3 กับ R_4) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเฉพาะน้ำหนักแห้งปมในระยะ V_6 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) แต่ไม่มีผลต่อน้ำหนักแห้งรากทั้ง 2 ระยะ สำหรับการตรึงไนโตรเจน พบว่าการใส่ *B. japonicum* USDA 110 ร่วมกับ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 เพิ่มค่าดัชนียูรีไอด์สัมพัทธ์ เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงตลอดฤดูปลูก ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสม และปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) ส่วนผลผลิตในระยะเก็บเกี่ยวพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝักและผลผลิตเมล็ดของ ถั่วเหลืองทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ ผลการวิจัยชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะนำ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 มาใช้ร่วมกับ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 เพื่อส่งเสริมการเกิดปม การตรึงไนโตรเจน และผลผลิตของถั่วเหลือง

คำสำคัญ: endophytic actinomycetes, Rhizobium, ดัชนียูรีไอด์สัมพัทธ์, การผลิตถั่วเหลือง

ABSTRACT: The agrochemicals which harm farmers, consumers' health and the environment are still being used with rhizobia in soybean production. The objective of this study was, therefore, to study the effects of endophytic *Streptomyces* sp.; P4 isolate and *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 on nodulation, nitrogen fixation and yield of soybeans [*Glycine max* (L.) Merrill]. The Chiang Mai 2 soybean variety was used in a pot experiment. The experimental

[1] คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก
Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok

[2] คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่
Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai

* Corresponding author: wanlee_asai@yahoo.com

design was a completely randomized design (CRD) with 3 sets, 4 replications and 8 treatments. These treatments consisted of control, single and combined applications of *B. japonicum* USDA 110, endophytic *Streptomyces* sp.; P4 isolate and nitrogen fertilizer. For nodulation, it was found that the use of *B. japonicum* USDA 110 with endophytic *Streptomyces* sp.; P4 isolate could significantly improve the shoot, nodule and total dry weights of soybeans ($P<0.05$) at growth (V_6) and flowering stages (between R_3 and R_4), especially the nodule dry weight at V_6 ($P<0.01$). It had no effect on root dry weight at both growth stages. It could also significantly improve the relative ureide index, percentage of seasonal fixed nitrogen, total nitrogen accumulation and amount of fixed nitrogen ($P < 0.01$) for nitrogen fixation. At harvesting stage, the number of pods per plant, seeds per pod and seed yield of soybeans in all treatments did not differ statistically. The results of this study indicated the possibility of using endophytic *Streptomyces* sp.; P4 isolate with *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 to promote nodulation, nitrogen fixation and yield of soybeans.
Keywords: endophytic actinomycetes, rhizobium, relative ureide index, soybean production

บทนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชอาหารแหล่งโปรตีนและน้ำมันของมนุษย์และสัตว์ที่สำคัญของโลก ประเทศไทยมีความต้องการถั่วเหลืองปริมาณมากเพื่อบริโภคภายในประเทศ และเป็นผลจากการเปิดตลาดการค้าโดยเสรีตามข้อตกลงองค์การค้าโลก แต่ผลผลิตถั่วเหลืองของไทยในปัจจุบันมีไม่เพียงพอต่อความต้องการ มีการนำเข้าจากต่างประเทศ ทั้งในรูปเมล็ด และกากถั่วเหลือง ได้จากการสกัดน้ำมันมูลค่าถึง 19,456 32,226 23,813 25,799 34,354 ล้านบาท ระหว่างปี พ.ศ. 2550-2554 ตามลำดับ (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) ประกอบกับแหล่งปลูกถั่วเหลืองสำคัญในประเทศลดลง โดยเฉพาะในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในปี 2550 / 2551 มีพื้นที่เพาะปลูกและผลผลิตลดลงเกือบ 20 % (สำนักงานวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) จำเป็นต้องมีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตควบคู่กับการอนุรักษ์และฟื้นฟูคุณภาพสิ่งแวดล้อม และทรัพยากรธรรมชาติ ข้อแนะนำในการผลิตถั่วเหลืองสำหรับเกษตรกรโดยทั่วไปนิยมใช้วิธีการคลุกเมล็ดพันธุ์ด้วยแบคทีเรียปมรากที่มีประสิทธิภาพสูง คือ ไรโซเบียม (Rhizobium) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาใช้ประโยชน์ต่อถั่วเหลืองได้จึงช่วยลดการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนบำรุงดินในพื้นที่เพาะปลูก (สมศักดิ์, 2541) วิธีการนี้จึงเป็นวิธีทางชีวภาพวิธีหนึ่งที่มีผลกระทบทางบวกต่อสิ่งแวดล้อม และทรัพยากรธรรมชาติ อย่างไรก็ตาม ยังมีเกษตรกรใช้สารเคมีทางการเกษตรในการผลิตถั่วเหลืองอยู่เพื่อควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราและทำให้ถั่วเหลืองเน่าตาย หรือผลผลิตลดลง เช่น โรครากและโคนเน่า และโรคราสนิม เป็นต้น ตามข้อแนะนำของกรมวิชาการเกษตร (2552) สมควรหาแนวทางลดปัญหาการใช้สารเคมีที่อาจมีผลตกค้างที่ไม่ปลอดภัยต่อผู้ผลิต ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมในกระบวนการผลิตอาหารเช่นนี้ ทั้งนี้อาจพิจารณาใช้การควบคุมทางชีวภาพ เช่น ใช้จุลินทรีย์ที่สามารถต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคเนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถเพิ่มความต้านทานต่อโรค หรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่อาจเป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะ (antibiotic) และสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) (Hasegawa et al., 2006)

จุลินทรีย์ดังกล่าวที่น่าสนใจคือ endophytic actinomycetes ใน *Streptomycetes* spp. เนื่องจากได้รับการพิสูจน์ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตสารควบคุมทางชีวภาพ (biocontrol agent) ที่ดีมากสำหรับโรคพืช สามารถยับยั้งเชื้อที่ก่อโรคได้ (พรพรรณ, 2550; ปราณี และคณะ, 2552; รัชนี, 2552; พรนภา และคณะ, 2554; Tian et al., 2003; Inderiati and Franco, 2008; Mohd-Fuat et al., 2010; Taechowisan et al., 2012) จากการศึกษาความสามารถในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ของ endophytic actinomycetes จำนวน 17 ไอโซเลท (isolate) ที่แยกมาจากใบ ลำต้น และรากของมะเขือเทศ แตงกวา ถั่วลันเตา และ *Vicia sativa* L. ของ Thapanapongworakul (2003) พบว่า actinomycetes ไอโซเลท P4 ที่แยกได้จากรากถั่วลันเตา (*Pisum*

sativum L.) จัดอยู่ในสกุล (genus) *Streptomyces* มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชโดยแสดงการเป็นปฏิปักษ์กับ *Bacillus subtilis Staphylococcus aureus* และ *Micrococcus lutues* ทั้งยังเข้ากันได้กับพืชอาศัยตระกูลถั่ว และแบคทีเรียปมรากหลายชนิดอีกด้วย เมื่อ Tang-um and Niamsup (2012a) ตรวจสอบด้วย 16s r RNA sequence analysis พบว่าจากการมีความเป็นไปได้ถึง 99.7 % ที่ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 จะเป็น *Streptomyces griseoflavus* จุลินทรีย์นี้สามารถผลิต chitinase ที่แสดงปฏิปักษ์ต่อ *Fusarium oxysporum f.* sp. *lycopersici* โดยส่งผลให้ผนังเซลล์ของเชื้อดังกล่าวแตก ทั้งยังสามารถผลิตเอนไซม์ amylase อีกด้วย (Tang-um and Niamsup, 2012b) เมื่อนำ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ไปใช้ พบว่า มีแนวโน้มที่จะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมโรคพืชในการปลูกพืชตระกูลถั่ว ดังเช่น เมื่อใช้กับเมล็ดถั่วลันเตาที่ปลูกในกระถางกลางแจ้งบนพื้นที่สูงในภาคเหนือของไทย แสดงแนวโน้มที่จะลดอาการของโรคราแป้ง (อังสนา และคณะ, 2550) เมื่อใช้กับเมล็ดถั่วลันเตาที่ปลูกในแปลงพบว่าส่งผลให้ลดพื้นที่ใบที่มีการเกิดโรคราแป้งเมื่อคิดเป็นค่าร้อยละของพื้นที่ใบทั้งหมด (Sangmanee et al., 2009) เมื่อใช้กับเมล็ดถั่วเหลืองก่อนปลูกในกระถางพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มการดูดไนโตรเจน (nitrogen uptake) ในต้น (Thapanapongworakul, 2003) และแนวโน้มให้ผลเชิงบวกเกี่ยวกับการเกิดปม การตรึงไนโตรเจน และการเจริญเติบโต ทั้งนี้เมื่อนำไปใช้ร่วมกับแบคทีเรียปมรากหลายไอโซเลทในถั่วเหลืองพบว่าให้ผลแตกต่างกันผันแปรตาม ไอโซเลทของแบคทีเรียปมรากที่ใช้ (Cheach, 2010) และความเข้ากันได้ระหว่าง endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 กับแบคทีเรียปมรากแต่ละไอโซเลท หรือแต่ละสายพันธุ์มีแนวโน้มที่จะผันแปรตามพันธุ์พืชทั้งในถั่วลันเตา (อังสนา และคณะ, 2551) และในถั่วเหลืองโดยการใช้จุลินทรีย์ดังกล่าวร่วมกัน ช่วยเพิ่มการเกิดปมและการตรึงไนโตรเจนในถั่วเหลืองบางพันธุ์ แต่ไม่ได้ผลในถั่วเหลืองบางพันธุ์ (Soe et al., 2012) นอกจากนั้น Asai et al. (2012) ได้ศึกษาความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยของ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 กับถั่วเหลืองพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ พันธุ์เชียงใหม่ 2 เชียงใหม่ 60 สุโขทัย 2 และศรีสำโรง 1 ด้วยการทดสอบ re-isolation พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถเข้าอยู่อาศัยในต้นกล้าถั่วเหลืองทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ กล่าวคือถั่วเหลืองที่ใช้ทดสอบสามารถเป็นพืชอาศัยของ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ได้โดยเปอร์เซ็นต์ในการเข้าอยู่อาศัยในถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 2 สูงกว่าอีก 3 พันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ

ผลการวิจัยเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า การใช้ endophytic *Streptomyces* ที่มีประสิทธิภาพร่วมกับไรโซเบียมสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในพันธุ์ถั่วเหลืองที่เหมาะสมอาจเป็นวิธีการเพิ่มผลผลิตถั่วเหลืองอย่างปลอดภัยวิธีหนึ่ง นับเป็นประเด็นที่น่าสนใจเพราะการจัดการทรัพยากรดินในปัจจุบันควรคำนึงถึงผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม แต่ปัจจุบันข้อมูลและการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้ในประเทศไทยยังมีน้อย ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจมากในการศึกษาเกี่ยวกับผลของ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 และ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 ต่อการเกิดปม การตรึงไนโตรเจน และผลผลิตของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 2 ที่คัดเลือกโดยอาศัยข้อมูลของความสามารถในการเข้าอยู่อาศัยของ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ด้วยการทดสอบ re-isolation ของ Asai et al. (2012) ข้อมูลที่ได้รับจากการวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาแนวทางและเทคนิคปฏิบัติเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตถั่วเหลืองต่อไป

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการใช้ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 กับ *B. japonicum* USDA 110 ต่อการเกิดปม การตรึงไนโตรเจน และผลผลิตของถั่วเหลือง

วิธีการศึกษา

ใช้ดินจากแปลงปลูกถั่วเหลืองของเกษตรกร อำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก ดำเนินการ

ณ เรือนทดลองและห้องปฏิบัติการคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2554 ถึงเดือนพฤษภาคม 2555 ทำการปลูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 2 ในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว สูง 12 นิ้ว วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) มี 8 กรรมวิธี และ 4 ซ้ำ กรรมวิธีต่างๆ ประกอบด้วย 1) ไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์และไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน (Control) 2) ใส่ *B. japonicum* USDA 110 (USDA110) 3) ใส่ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 (P4) 4) ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน (N) 5) ใส่ *B. japonicum* USDA 110 ร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจน (USDA110+N) 6) ใส่ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจน (P4+N) 7) ใส่ *B. japonicum* USDA 110 ร่วมกับ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 (USDA110+P4) และ 8) ใส่ *B. japonicum* USDA 110 ร่วมกับ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 และปุ๋ยไนโตรเจน (USDA110+ P4+N) โดยใช้หัวเชื้อทั้งสองชนิดในอัตรา 10^6 cfu ต่อเมล็ด และใส่ปุ๋ยยูเรียอัตรา 3 กก.ไนโตรเจนต่อไร่ ทำ 3 ชุด โดยชุดที่ 1 ใช้เก็บข้อมูลในระยะเจริญเติบโตทางลำต้น (vegetative stage) เมื่อใบจริงที่ 5 ในข้อที่ 6 บนลำต้นคลี่กาง (V_6) ชุดที่ 2 ใช้เก็บข้อมูลในระยะเจริญพันธุ์ (reproductive stage) เมื่อฝักเริ่มเต็ม (early pod filling stage) (ระหว่าง R_3 กับ R_4) และชุดที่ 3 ใช้เก็บข้อมูลในระยะเก็บเกี่ยว (Cheach, 2010)

เตรียมหัวเชื้อ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ในอาหารเหลว Inhibitory mold agar (IMA-2) (ซึ่งเตรียมโดยละลาย glucose 5.0 กรัม soluble starch 5.0 กรัม beef extract 1.0 กรัม yeast extract 1.0 กรัม enzyme hydrolyzed casein 2.0 กรัม NaCl 2.0 กรัม และ $CaCO_3$ 1.0 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1.0 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ นาน 30 นาที) ให้มีโคโลนีอย่างน้อย 10^6 cfu ต่อ มล. ตรวจสอบจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นโดยวิธี drop plate (Somasegaran and Hoben, 1985) ในอาหาร IMA-2 (เตรียมเช่นเดียวกันกับอาหารเหลว IMA-2 และเติมผงวุ้น 15.0 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ นาน 30 นาที แล้วเติมสารปฏิชีวนะ 3 ชนิด คือ Trimethoprim 20 มล.ละลายใน Dimethyl sulfoxide 2 มล. Naldixic acid 10 มก.ละลายใน 0.1 N NaOH 10 มล. และ Axoxystrobin 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 29 มล. ต่ออาหาร IMA-2 ปริมาตร 1 ลิตร) (Shimizu et al., 2000 และ ปิยะธิดา, 2549) กรณีหัวเชื้อ *B. japonicum* USDA 110 ใช้อาหารเหลว yeast mannitol broth (YEMB) (เตรียมโดยละลาย mannitol 10.0 กรัม K_2HPO_4 0.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม NaCl 0.1 กรัม และ yeast extract 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1.0 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ นาน 30 นาที) ให้มีโคโลนีอย่างน้อย 10^6 cfu ต่อ มล. ตรวจสอบจำนวนโคโลนีด้วยวิธี dilution plate count ในอาหาร yeast mannitol agar (YEMA) (เตรียมเช่นเดียวกันกับอาหารเหลว YEMB และเติมผงวุ้น 15.0 กรัม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ นาน 30 นาที) (Somasegaran and Hoben, 1985)

เก็บรวบรวมตัวอย่างดินจากแปลงเกษตรกร อำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก นำตัวอย่างดินมาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ นาน 60 นาที จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชม. ดินที่ใช้ศึกษาเป็นดินร่วนปนตะกอน (silt loam) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 6.4 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 56 ppm ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 40 ppm โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 183 ppm แคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 1,711 ppm และแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 9,755 ppm ทำการเพาะเมล็ดถั่วเหลืองโดยฝังในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ บรรจุดิน 3, 6 และ 9 กิโลกรัม/กระถาง ในชุดที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ วางไว้ในเรือนทดลอง จำนวน 4 เมล็ดต่อกระถาง หยดหัวเชื้อ *B. japonicum* USDA 110 ในกรรมวิธีที่ 2, 5, 7, 8 และ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ในกรรมวิธีที่ 3, 6, 7, 8

หลังจากต้นกล้าเกิดใบแท้คู่แรกถอนให้เหลือต้นที่สมบูรณ์จำนวน 2 ต้นต่อกระถาง ใส่ปุ๋ยยูเรีย ที่ 14 วันหลังปลูกในกรรมวิธีที่ 4, 5, 6, 8

บันทึกผลการทดลองโดยเก็บเกี่ยวถั่วเหลืองทั้งต้นที่ระยะ V_6 และที่ระยะระหว่าง R_3 กับ R_4 (Cheach, 2010)นำมาแบ่งออกเป็นส่วนเหนือดิน ราก และปมแล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 72 ชม. เพื่อคำนวณหาน้ำหนักแห้ง นำส่วนเหนือดินที่ระยะระหว่าง R_3 กับ R_4 ซึ่งอบแห้งแล้วไปบด วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Novozamsky et al, 1974; Walinga et al, 1989) เก็บรวบรวมน้ำเลี้ยงจากตอราก (root breed sap) นำมาเติม ethanol (C_2H_5OH) 95 % ปริมาณเท่ากันในหลอดเก็บรวบรวมแล้วนำไปเก็บในระยะยาวที่อุณหภูมิ -15 °ซ นำน้ำเลี้ยงจากตอรากมาวิเคราะห์หา amino-N (Herridge, 1984), NO_3-N (Cataldo et al., 1975) และ ureide-N (Young and Conway, 1942) จากนั้น นำข้อมูลของ amino-N, NO_3-N, ureide-N และน้ำหนักแห้งไปคำนวณหาดัชนียูรีไอด์สัมพัทธ์ (relative ureide index; RUI) (Peoples et.al., 1988) ร้อยละของไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงตลอดฤดูปลูก (percentage of seasonal fixed nitrogen) (Herridge and Peoples, 2002) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสม หรือไนโตรเจนที่ดูดขึ้นมาในส่วนเหนือดินของพืช (total nitrogen accumulation or nitrogen uptake of shoot) และปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากการตรึง (amount of fixed nitrogen) ตามลำดับดังนี้

$$\text{ดัชนียูรีไอด์สัมพัทธ์ (\%)} = \frac{4 \times \text{ureide-N}}{4 \times \text{ureide-N} + \text{amino-N} + NO_3\text{-N}} \times 100 \quad \ldots(1)$$

$$Y = 4.8 + 0.83x \quad \ldots(2)$$

โดย y = ดัชนียูรีไอด์สัมพัทธ์ (%)

X = ไนโตรเจนที่ได้รับจากการตรึงในอากาศตลอดฤดูปลูก (%)

$$\text{N-uptake} = \frac{\%\ N \times DW}{100} \quad \ldots(3)$$

โดย N-uptake = ไนโตรเจนที่ดูดขึ้นมาในส่วนเหนือดินของพืช (กรัมไนโตรเจนต่อต้น)

% N = ความเข้มข้นของไนโตรเจนทั้งหมดในตัวอย่างพืช (%)

DW = น้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดิน (กรัม)

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากการตรึง} = \frac{X \times \text{N-uptake}}{100} \quad \ldots(4)$$

โดย X = ไนโตรเจนที่ได้รับจากการตรึงในอากาศตลอดฤดูปลูก (%)

N-uptake = ไนโตรเจนที่ดูดขึ้นมาในส่วนเหนือดินของพืช (กรัมไนโตรเจนต่อต้น)

เมื่อถั่วเหลืองสุกแก่เก็บเกี่ยวผลผลิตและรวบรวมข้อมูลจำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และผลผลิตเมล็ด นำข้อมูลน้ำหนักแห้งปม ราก และส่วนเหนือดิน จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก ผลผลิตเมล็ด ค่าดัชนียูรีไอด์สัมพัทธ์ ร้อยละและปริมาณของไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงตลอดฤดูปลูก และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสมต่อต้นมาวิเคราะห์สถิติโดยใช้ F-test และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least significant different (LSD) ที่ระดับ 0.05 (Gomez and Gomez, 1984)

ผลการศึกษา

จากการศึกษาผลของ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 กับ *B. japonicum* USDA 110 ต่อการเกิดปม การตรึงไนโตรเจน และผลผลิตของถั่วเหลือง ปรากฏผลดังนี้

การเกิดปม

ที่ระยะ V_6 พบว่าการใส่ *B. japonicum* USDA 110 ร่วมกับ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ทั้งที่ใส่ และไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมด้วยส่งผลให้น้ำหนักแห้งปมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) ใกล้เคียงกับ การใส่ปุ๋ยไนโตรเจน รองลงมาคือ การใส่ *B. japonicum* USDA 110 หรือ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจน ทั้งยังเพิ่มน้ำหนักแห้งส่วนเหนือดินและน้ำหนักแห้งทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ใกล้เคียงกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และใส่ *B. japonicum* USDA 110 ร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจน อย่างไรก็ตาม พบว่าทุกกรรมวิธีไม่มีผลทำให้ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งรากแตกต่างกันทางสถิติ (**Table 1**) เมื่อพิจารณาข้อมูลจะเห็นว่า การใส่ *B. japonicum* USDA 110 ร่วมกับ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 มีแนวโน้มให้ค่าสูงกว่ากรรมวิธีอื่นๆ

Table 1 Effects of endophytic *Streptomyces* sp.; P4 isolate and *B. japonicum* USDA 110 on shoot, root and total dry weights (g/plant) and nodule dry weights (mg/plant) of soybean at V_6 stage.

Treatment	Shoot dry weight[1/] (g/plant)	Root dry weight (g/plant)	Nodule dry weight[1/] (mg/plant)	Total dry weight[1/] (g/plant)
Control	0.6783 d	0.2802	32.1 d	0.9906 d
USDA110	0.7515 cd	0.3318	34.3 d	1.1175 cd
P4	0.8148 bcd	0.2677	27.3 d	1.1097 cd
N	1.2516 a	0.3349	75.6 a	1.6621 a
USDA110+N	1.1011 ab	0.3304	44.2 c	1.4757 abc
P4+N	0.8837 bcd	0.2984	53.2 b	1.2353 bcd
USDA110+P4	1.1020 ab	0.3503	72.1 a	1.5244 ab
USDA110+ P4+N	1.0497 abc	0.3020	80.7 a	1.4323 abc
F-test	*	NS	**	*
CV (%)	28.6	27.5	39.9	24.6

[1/] Means within a column followed by the same letter are not significantly different according to LSD 0.05. NS, *, ** non-significant, significant at $P< 0.05$ and $P < 0.01$ level respectively.

ที่ระยะระหว่าง R_3 กับ R_4 พบว่าการใส่ *B. japonicum* USDA 110 ร่วมกับ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ทั้งที่ใส่ และไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนร่วมด้วยส่งผลให้น้ำหนักแห้งปมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ใกล้เคียงกับการใส่ *B. japonicum* USDA 110 หรือ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจน ทั้งยังเพิ่มน้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน และน้ำหนักแห้งทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ใกล้เคียงกับการใส่ *B. japonicum* USDA 110 ร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจน อย่างไรก็ตาม ทุกกรรมวิธีไม่มีผลทำให้ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งรากของถั่วเหลืองแตกต่างกันทางสถิติ (**Table 2**) ทั้งนี้ การใส่ *B. japonicum* USDA 110 ร่วมกับ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 มีแนวโน้มให้ค่าสูงรองลงมาจากการใส่ *B. japonicum* USDA 110 ร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจน

Table 2 Effects of endophytic *Streptomyces* sp.; P4 isolate and *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 on shoot, root and total dry weights (g/plant) and nodule dry weights (mg/plant) of soybean between R_3 and R_4 stage.

Treatment	Shoot dry weight[1/] (g/plant)	Root dry weight (g/plant)	Nodule dry weight[1/] (mg/plant)	Total dry weight[1/] (g/plant)
Control	4.1 c	1.1	89.3 c	5.3 d
USDA110	4.4 bc	1.2	151.5 abc	5.8 cd
P4	5.0 abc	1.3	109.6 bc	6.4 bcd
N	4.9 bc	1.6	151.7 abc	6.6 bcd
USDA110+N	6.0 a	2.0	193.0 a	8.2 a
P4+N	4.7 bc	1.4	180.0 a	6.3 bcd
USDA110+P4	5.4 ab	2.0	171.5 ab	7.6 ab
USDA110+ P4+N	5.1 abc	1.6	192.3 a	7.0 abc
F-test	*	NS	*	*
CV (%)	17.5	36.5	35.8	19.7

[1/] Means within a column followed by the same letter are not significantly different according to LSD 0.05.
NS, * non-significant, significant at P < 0.05 level.

การตรึงไนโตรเจน

ที่ระยะระหว่าง R_3 กับ R_4 พบว่าการใส่ *B. japonicum* USDA 110 ร่วมกับ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ส่งผลให้เพิ่มค่าเฉลี่ยของค่าดัชนียูรีไอด์สัมพัทธ์ เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงตลอดฤดูปลูก ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสม และปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) โดยให้ค่าสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ ในขณะที่การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเดี่ยว และใส่ร่วมกับ *B. japonicum* USDA 110 ส่งผลให้ลดค่าดัชนียูรีไอด์สัมพัทธ์ และเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงตลอดฤดูปลูก (**Table 3**)

Table 3 Effects of endophytic *Streptomyces* sp.; P4 isolate and *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 on relative ureide index, seasonal fixed N (%), total nitrogen accumulation and amount of fixed nitrogen in soybean (mg N/plant) between R_3 and R_4 stage.

Treatment	Relative ureide index[1/] (%)	Seasonal fixed N[1/] (%)	Total nitrogen accumulation[1/] (mg N/plant)	Amount of fixed N[1/] (mg N/plant)
Control	33.4 bc	34.5 b	44.9 c	15.6 bc
USDA110	38.3 abc	40.3 b	49.3 c	20.2 b
P4	23.3 d	22.3 d	60.1 bc	13.2 bc
N	22.5 d	21.3 d	53.1 c	11.4 c
USDA110+N	20.4 d	18.8 d	72.9 ab	13.1 bc
P4+N	31.6 c	32.3 bc	56.8 c	18.3 bc
USDA110+P4	45.2 a	48.6 a	84.1 a	40.9 a
USDA110+ P4+N	31.8 bc	32.6 bc	51.5 c	16.7 bc
F-test	**	**	**	**
CV (%)	30.0	35.5	26.3	54.9

[1/] Means within a column followed by the same letter are not significantly different according to LSD 0.05.
** significant at P <0.01 level.

ผลผลิต

พบว่าทุกกรรมวิธีไม่มีผลทำให้ค่าเฉลี่ยของจำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และผลผลิตเมล็ดของถั่วเหลืองในระยะเก็บเกี่ยวแตกต่างกันทางสถิติ (**Table 4**) อย่างไรก็ตาม การใส่ *B. japonicum* USDA 110 ร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจน หรือร่วมกับ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 มีแนวโน้มที่จะให้จำนวนฝักต่อต้น และผลผลิตเมล็ดสูงกว่ากรรมวิธีอื่นๆ ในขณะที่การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมีแนวโน้มที่จะให้จำนวนฝักต่อต้น และผลผลิตเมล็ดต่ำกว่าทุกกรรมวิธีรวมทั้งกรรมวิธีควบคุมด้วย

Table 4 Effects of endophytic *Streptomyces* sp.; P4 isolate and *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 on the amount of pods per plant, seeds per pod and seed yield (g/plant) of soybean.

Treatment	Number of Pod/plant	Number of Seed/pod	Seed yield (g/plant)
Control	17.6	1.9	4.5
USDA110	18.6	1.8	5.0
P4	18.3	1.9	4.6
N	16.0	2.0	4.0
USDA110+N	21.5	1.8	5.6
P4+N	19.9	1.9	5.1
USDA110+P4	21.5	1.9	5.2
USDA110+ P4+N	19.9	1.8	4.7
F-test	NS	NS	NS
CV (%)	18.0	8.2	20.3

วิจารณ์

จากผลการศึกษาข้างต้นชี้ให้เห็นว่าการใช้ *B. japonicum* USDA 110 ร่วมกับ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 สามารถส่งเสริมการเกิดปม รวมทั้งการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองในระยะเจริญเติบโต และระยะเจริญพันธุ์ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gregor et.al. (2003) ที่ศึกษาผลของการใช้ *Streptomyces kanamycetious* ร่วมกับ *B. japonicum* ต่อ nodule occupancy ในถั่วเหลืองพันธุ์ LS 90-1920 และ Soe et. al. (2012) ที่ศึกษาการใช้ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ร่วมกับ *B. japonicum* USDA 110 ในถั่วเหลืองพันธุ์ Hinthada จากประเทศพม่า และพันธุ์ สจ.4 จากประเทศไทย นอกจากนั้นกรรมวิธีดังกล่าวยังสามารถเพิ่มการตรึงไนโตรเจน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Cheach (2010) ที่ศึกษาการใช้แบคทีเรียปมราก ไอโซเลท CD_2P ร่วมกับ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ในถั่วเหลืองพันธุ์ DT 84 จากประเทศกัมพูชา รวมทั้งมีแนวโน้มที่จะเพิ่มผลผลิตเมล็ดของถั่วเหลืองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Soe et al. (2012)

มีข้อสังเกตว่า กรรมวิธีอื่นๆ ให้ผลแตกต่างออกไป กล่าวคือการใช้เชื้อเดี่ยวไม่ว่าจะเป็น *B. japonicum* USDA 110 หรือ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ไม่ส่งเสริมการเกิดปม หรือเพิ่มการตรึงไนโตรเจน การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนเดี่ยวช่วยส่งเสริมการเกิดปมในระยะเจริญเติบโตแต่ไม่มีผลในการเกิดปม และการตรึงไนโตรเจนในระยะเจริญพันธุ์ การใช้ *B. japonicum* USDA 110 และ/หรือ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจน ช่วยส่งเสริมการเกิดปมทั้ง 2 ระยะ ไม่เพิ่มการตรึงไนโตรเจน แต่ยังคงมีแนวโน้มที่จะเพิ่มผลผลิตเมล็ดถั่วเหลือง ชี้ให้เห็นว่าสามารถใช้เชื้อดังกล่าวร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจนได้ ทั้งนี้ต้องพิจารณาชนิดและอัตราปุ๋ยที่เหมาะสมด้วย

สรุป

การใส่ *B. japonicum* USDA 110 และ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ส่งผลให้เพิ่มน้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน น้ำหนักแห้งปม และน้ำหนักแห้งรวมของถั่วเหลืองทั้งในระยะเจริญเติบโตและระยะเจริญพันธุ์ และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มผลผลิตเมล็ดถั่วเหลือง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ *B. japonicum* USDA 110 ร่วมกับ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 ส่งผลให้เพิ่มการตรึงไนโตรเจนอย่างมาก การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำ endophytic *Streptomyces* ไอโซเลท P4 มาใช้ร่วมกับ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 เพื่อส่งเสริมการเกิดปม การตรึงไนโตรเจน และผลผลิตของถั่วเหลือง อย่างไรก็ตาม ควรทำการศึกษาเกี่ยวกับการใช้เชื้อดังกล่าวร่วมกันในดินอื่นๆ หรือกับถั่วเหลืองพันธุ์อื่นๆ รวมทั้งการทดสอบในสภาพไร่เพื่อยืนยันผลต่อไป

คำขอบคุณ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคุณสุรีย์รัตน์ บัวชื่น เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คุณอัษฎาวุธ สนั่นนาม นิสิตระดับปริญญาเอก และคุณอรวี คำแดง นิสิตระดับปริญญาตรี ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตรที่ให้การช่วยเหลือในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2552. ถั่วเหลือง. http://www.doa.go.th/vichakan/news.php?newsid=34. ค้นเมื่อ 7 ธันวาคม 2555.

ปิยะธิดา พุกคล้าย. 2549. การคัดเลือกแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟท์จากพืชสมุนไพรเพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของคะน้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, เอมอร คำเพราะ, และรัชฎาพร นวะพิฆ. 2552. การคัดเลือกเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ. วิชาการ ม.อบ. 3:9-17.

พรนภา โทตรี, ชาติชาย โขนงนุช, และสรัญยา ณ ลำปาง. 2554. ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุของโรคแอนแทรกโนสของพริก. ว. วิทย. กษ. 1 (พิเศษ): 163-166.

พรพรรณ อู่สุวรรณ. 2550. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.

รัชนี มิ่งมา. 2552. แอคติโนมัยสีทจากรากและดินรอบรากพืชตระกูลถั่วและการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. สถิติการค้าสินค้าเกษตรไทยกับต่างประเทศ ปี 2554. http://www.oae.go.th/download/journal/trade-eco54.pdf. ค้นเมื่อ 7 ธันวาคม 2555.

สมศักดิ์ วังใน. 2541. การตรึงไนโตรเจน: ไรโซเบียม-พืชตระกูลถั่ว. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. สถานการณ์ถั่วเหลือง. http://www.oae.go.th/ewtadmin/ ewt/oae_bear/ewt_news.php?nid.=410&filename=index. ค้นเมื่อ 13 กันยายน 2553.

อังสนา อัครพิศาล, อำพรรณ พรมศิริ, และนันทิภัคค์ ฐาปนพงษ์วรกุล. 2550. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ endophytic actinomycete *Streptomyces* sp. Isolate P4 ในการควบคุมโรคของถั่วลันเตาและการส่งเสริมการตรึงไนโตรเจน. สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง, เชียงใหม่.

อังสนา อัครพิศาล, อำพรรณ พรมศิริ, อัญชัน ชมพูพวง, และพจนีย์ แสงมณี. 2551. การคัดเลือกเชื้อ endophytic actinomycete และไรโซเบียมที่เหมาะสมสำหรับการส่งเสริมการตรึงไนโตรเจนและป้องกันโรคสำหรับถั่วลันเตาบนพื้นที่สูง. สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง, เชียงใหม่.

Asai, W., W. Homhaul, S. Sanyong, and A. Bhromsiri. 2012. Infectiveness of selected endophytic actinomycetes (P4 isolate) on different varieties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. P.667-672. In: Harmonization in graduate school studies in Asean plus three proceedings 1-2 March 2012. The Graduate School, Chiang Mai University, Chiang Mai.

Cataldo, D. A., M. Maroon, L. E. Schrader, and V. L. Youngs, 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Soil Science and Plant Analysis. 6:71–80.

Cheach, M. 2010. Compatibility of endophytic actimomycetes with different soybean root nodule bacteria collected from Thailand and Cambodia. M. Sc.Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai.

Gomez, K. A., and A. A. Gomez. 1984. Statistical Procedures for Agricultural Research. 2nd ed. John Wiley and Sons Inc, New York.

Gregor, A. K., B. Klubek, and E. C. Varsa. 2003. Identification and use of actinomycetes for enchanced nodution of soybean co-inoculanted with *Bradyrhizobium japonicum*. Canadian Journal of Microbiology. 8:481-491.

Hasegawa, S., A. Meguro, M. Shimizu, T. Nishimura, and H. Kunoh. 2006. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. Actinomycetologica. 20:72-81.

Herridge, D. F. 1984. Effects of nitrate and plant development on the abundance of nitrogenous solutes in root-bleeding and vacuum extracted exudates of soybean. Crop Sci. 24:173-170.

Herridge, D. F, and M. B. Peoples. 2002. Timing of xylem sampling for ureide analysis of nitrogen fixation. Plant and Soil. 238:57-67.

Inderiati S., and C. M. M. Franco. 2008. Isolation and identification of endophytic actinomycetes and their antifungal activity. Journal of Biotecnology Research in Tropical Region. 1 (Special edition):1-6.

Mohd-Fuat, A. R., A. R. B. Amini, and O. M. Hasyima. 2010. Isolation of *Streptomyces* with broad spectrum antifungal activity from polyherbal products. Int. J. Bot. 3:259-265.

Novozamsky, I. R. Van Eck, J. Ch. Van Schouwenburg, and I. Walinga. 1974. Total nitrogen determination in plant material by means of the indophenols blue method. Neth. J. agric. Sci. 22:3-5.

Peoples, M. B., F. J. Bergersenal, D. F. Herridge, M. N. Sudin, A. W. Faizah, K. Chong, and M. Norhayati. 1988. Estimation of nitrogen fixation in legumes in the tropics by xylem sap analysis. P.117-126. In: Z. H. Shanmsuddin, W. M. W. Othman; M. Marziah, and J. Sundram. Biotechnology of nitrogen fixation in the tropics. University Pertanian Malaysia, Serdang.

Sangmanee, P., A. Bhromsiri, and A. Akarapisan. 2009. The potential of endophytic actinomycetes, (*Streptomyces* sp.) for the biocontrol of powdery mildew disease in sweet pea (*Pisum sativaum*). As. J. Food Ag-Ind. Special Issue:93-98.

Shimizu, M., Y. Nakagawa, Y. Sato, T. Furumai, Y. Igarashi, H. Onaka, R.Yoshida, and H. Kunoh. 2000. Studies on endophytic actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. isolate from rhododendron and its antifungal activity. J. Gen. Plant Patho. 66:360-366.

Soe, K. M., A. Bhromsiri, D. Karladee, and T. Yamakawad. 2012. Effects of endophytic actinomycetes and *Bradyrhizobium japonicum* strains on growth, nodulation, nitrogen fixation and seed weight of different soybean varieties. Soil Science and Plant Nutrition. 58:319-325.

Somasegaran, P., and H. J. Hoben. 1985. Methods in Legumes- Rhizobium Technology. NifTAL Project and MIRCEN, Department of Agronomy and Soil Science, College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii, Hawaii,

Taeechowisan, T., S. Chanaphat, W. Ruensamran, and W. S. Phutdhawong. 2012. Antifungal activity of 3-methylcarbazoles from *Streptomyces* sp. LJK109; an endophyte in *Alpinia galangal*. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 3:124-128.

Tang-um J., and H. Niamsup. 2012a. Chitinase production and antifungal potential of endophytic *Streptomyces* strain P4. Maejo Int. J. Sci. Technil. 1:95-104.

Tang-um J., and H. Niamsup. 2012b. Extracellular amylase activity from endophytic *Streptomyces Griseoflavus* P4. Chiang Mai J. Sci. 2:346-350.

Thapanapongworakul, P. 2003. Characterization of endophytic actinomycetes capable of controlling sweet pea root rot diseases and effects on root nodule bacteria. M. Sc. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai.

Tian, X. L., L. X. Cao, H. M. Tan, Q. G. Zeng, Y. Y. Jia, W. Q. Han, and S. N. Zhou. 2004. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 20:303-309.

Walinga, I., W. Van Vark, V. J. G. Houba, and J. J. Vander Lee. 1989. Soil and Plant Analysis A. Series of Syllabi Part 7 Plant Analysis Procedures. Dept. of Soil Science and Plant Nutrition, Wageningen Agricultural University, Wageningen.

Young, E. G., and C. F. Conway. 1942. On the estimation of Allantoin by the Rimini-Schryver Reaction. J. Biol. Chem. 142:839–853.