การชักนำการเจริญเติบโตของกรีนโอ๊ค (*Lactuca sativa* var. *crispa* L.) ด้วยไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้โดยใช้คลื่นความถี่สูง

ศรัญญา บัวกระสินธุ์[1] นวลกมล อำนวยสิน[2] สุธีรา ลิมปิพิชัย[3] และ สุเปญญา จิตตพันธ์[3*]
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการประยุกต์ใช้คลื่นความถี่สูงเพื่อชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตและการอยู่ร่วมกันระหว่างไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้กับผักสลัดกรีนโอ๊ค โดยนำรากกรีนโอ๊คอายุ 1 สัปดาห์ มาผ่านคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 20, 30, 60, 300 และ 600 วินาที แล้วนำไปเลี้ยงต่อในอาหาร BG-11N_0 ที่มีและไม่มีไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Nostoc* sp. TUBT05 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ สุ่มกรีนโอ๊คมาศึกษาการเจริญของ *Nostoc* sp. TUBT05 บริเวณผิวและภายในเนื้อเยื่อรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์เอของ *Nostoc* sp. TUBT05 พบว่ารากกรีนโอ๊คในทุกทรีตเมนต์ที่ผ่านคลื่นความถี่สูงและเลี้ยงใน BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05 ปรากฏเส้นสายของ *Nostoc* sp. TUBT05 เกาะบริเวณผิวชั้นนอกและภายในเนื้อเยื่อราก และมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอมากกว่าทรีตเมนต์ที่ไม่ได้ผ่านคลื่นความถี่สูง จากนั้นนำกรีนโอ๊คจากทุกทรีตเมนต์ปลูกลงดิน เมื่อครบ 15 และ 28 วัน ศึกษาการเจริญเติบโตของกรีนโอ๊คโดยชั่งน้ำหนักสดและแห้งของใบและราก และวัดความกว้างและความยาวใบ พบว่าการเจริญเติบโตของใบและรากกรีนโอ๊คที่ปลูกเป็นเวลา 15 และ 28 วัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยกรีนโอ๊คในทรีตเมนต์ที่รากได้ผ่านคลื่นความถี่สูงเป็นระยะเวลา 300 วินาที และเลี้ยงต่อใน BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05 มีน้ำหนักสดและแห้งใบสูงสุดที่ 15 วัน เท่ากับ 7.77 ± 0.07 และ 0.20 ± 0.01 กรัม มีน้ำหนักสดและแห้งรากสูงสุดเท่ากับ 1.30 ± 0.06 และ 0.07 ± 0.00 กรัม และความกว้างใบสูงสุดเท่ากับ 4.66 ± 0.07 เซนติเมตร และที่เวลา 28 วัน มีน้ำหนักสดและแห้งใบสูงสุดเท่ากับ 12.80 ± 0.14 และ 0.70 ± 0.00 กรัม มีน้ำหนักสดและแห้งรากสูงสุดเท่ากับ 1.90 ± 0.03 และ 0.11 ± 0.00 กรัม และความกว้างใบสูงสุดเท่ากับ 6.21 ± 0.07 เซนติเมตร ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้คลื่นความถี่สูงสามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตและการอยู่ร่วมกันระหว่างไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้กับกรีนโอ๊คได้ และส่งผลให้กรีนโอ๊คมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

คำสำคัญ : ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ / คลื่นความถี่สูง / การเจริญเติบโต

* *Corresponding Author : supenyac@tu.ac.th, chittapun@gmail.com*

[1] *นักศึกษาปริญญาตรี ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*

[2] *อาจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*

[3] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*

Induction of the Growth of Green Oak (*Lactuca sativa* var. *crispa* L.) Using N_2 Fixing Cyanobacteria via Ultrasonic Treatment

Sarunya Boukrasin[1], Nuankamol Amnuaysin[2], Sutheera Limbipichai[3] and Supenya Chittapun[3*]

Thammasat University, Rangsit Campus, Klong Luang, Pathum Thani 12120.

Abstract

This research studied the application of ultrasonication to induce growth and co-cultivate N_2-fixing cyanobacterium (*Nostoc* sp. TUBT05) and green oak (*Lactuca sativa var. crispa* L.). The roots of one-week seedlings were sonicated for 20, 30, 60, 300 and 600 seconds and transferred to BG-11N_0 medium with and without *Nostoc* sp. TUBT05. After one week, the roots of green oaks from each treatment were examined under a light microscope. The colonization of *Nostoc* sp. TUBT05 filaments on the root surface and tissues was observed and cyanobacterial chlorophyll a content was measured. The results showed that there were *Nostoc* sp. TUBT05 filaments colonized on the epidermal root surface and penetrated into cortex tissue with high quantity of cyanobacterial chlorophyll a content in treatment with sonicated root and soaked in BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05. All remaining seedlings were planted and cultured for 15 and 28 days. Green oak growth was measured from fresh and dry weight of leaves and roots and also the width and length of the leaves. There were significant differences between the green oak growth at 15 and 28 days among the treatments ($p < 0.05$). Roots sonicated for 300 s and soaked in BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05 (T11) at 15 days showed the highest growth of leaves in terms of both the fresh and dry weights (7.77 ± 0.07 and 0.20 ± 0.01 g), root fresh and dry weights (1.30 ± 0.06 and 0.07 ± 0.00 g), and leaf width (4.66 ± 0.07 cm). The leaves at 28 days from T11 showed the highest growth in terms of the fresh and dry weights (12.80 ± 0.14 and 0.70 ± 0.00 g), root fresh and dry weights (1.90 ± 0.03 and 0.11 ± 0.00 g), and leaf width (6.21 ± 0.07 cm). This study indicated that the application of ultrasonication on root significantly increased the growth of green oak and could induce an effective symbiosis between *Nostoc* sp. TUBT05 and green oak.

Keywords : N_2 Fixing Cyanobacteria / Ultrasonication / Growth

* *Corresponding Author : supenyac@tu.ac.th, chittapun@gmail.com*

1 *Undergraduate student, Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology.*

2 *Lecturer, Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology.*

3 *Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology.*

1. บทนำ

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช และมีอยู่มากในอากาศถึง 78 เปอร์เซ็นต์ โดยพืชบางชนิดที่มีการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกับแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ เช่น พืชตระกูลถั่วและไรโซเบียม หรือ แหนแดงและไซยาโนแบคทีเรีย ไรโซเบียมและไซยาโนแบคทีเรียจะทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศ และเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของแอมโนเนียมหรือไนเตรตซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ [1] ซึ่งเป็นวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติและใช้ระยะเวลานาน ปัจจุบันมีเทคนิคในการทำให้พืชสามารถตรึงไนโตรเจนได้เองเช่น การตัดต่อยีน *nif* เข้าสู่จีโนมพืช การกระตุ้นให้แบคทีเรียในพืชดำเนินกิจกรรมตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น การหาแบคทีเรียและพืชที่อยู่ร่วมกันชนิดใหม่ และการชักนำให้เกิดการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยระหว่างพืชและแบคทีเรียชนิดตรึงไนโตรเจนได้ เป็นต้น [1]

เทคนิคที่ใช้ในการชักนำให้เกิดการอยู่ร่วมกันระหว่างพืชและแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนนั้น ได้แก่ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น นำใบอ่อนของสตรอเบอร์รี่ไปเลี้ยงพร้อมกับแบคทีเรีย *Azomonas insignis* จากนั้นนำไปชักนำให้เกิดแคลลัส นำแคลลัสไปเพิ่มปริมาณ และชักนำให้สร้างเนื้อเยื่อต่อไป พบว่าแบคทีเรียสามารถเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อต้นสตรอเบอร์รี่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อนี้สามารถดำเนินกิจกรรมตรึงไนโตรเจนได้ [2] และการใช้คลื่นความถี่สูงโดยนำรากต้นอ่อนข้าวสาลีไปผ่านคลื่นความถี่สูงและนำไปเลี้ยงในอาหาร BG-11N_0 ที่มีไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc muscorum* พร้อมทั้งเติม 2,4 dichlorophenoxyacetic acid พบว่าไซยาโนแบคทีเรียสามารถแทรกเข้าไปในรากของต้นข้าวสาลีและเกิดเป็นปมเทียม และไซยาโนแบคทีเรียเหล่านี้สามารถดำเนินกิจกรรมตรึงไนโตรเจนได้ นอกจากนี้ยังพบว่ายอดและรากข้าวสาลีในทรีตเมนต์ที่ผ่านคลื่นความถี่สูงร่วมกับไซยาโนแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตมากกว่าในทรีตเมนต์ที่ผ่านคลื่นความถี่สูงเพียงอย่างเดียว [3] จะเห็นได้ว่าการชักนำให้เกิดการอยู่ร่วมกันระหว่างพืชและแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ ใช้ระยะเวลาสั้นเมื่อเทียบกับการเกิดวิวัฒนาการ และยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดการอยู่ร่วมกันระหว่างพืชและแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนยังมีอยู่น้อย ประกอบกับการทดลองศึกษาผลที่เกิดขึ้นต่อพืชจนถึงระยะเก็บเกี่ยวนั้นมีอยู่น้อยมาก ฉะนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงสนใจทดลองประยุกต์ใช้คลื่นความถี่สูงร่วมกับไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Nostoc* sp. TUBT05 ต่อการเจริญเติบโตของผักสลัดกรีนโอ๊ค ทั้งนี้เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ร่วมกับไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้กับพืชกลุ่มอื่น และเป็นแนวทางในการเพิ่มทางเลือกให้กับเกษตรกรให้หันมาเลือกใช้คลื่นความถี่สูงชักนำให้เกิดการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยของพืชและแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้ เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช แทนการใช้ปุ๋ยเคมี

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 สายพันธุ์ไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ สายพันธุ์ *Nostoc* sp. TUBT05 คัดแยกได้จากพื้นที่เกษตรอินทรีย์ อำเภอสนามชัยเขต จังหวัดฉะเชิงเทรา โดย Chittapun and Charoenrat [4] เพาะเลี้ยง *Nostoc* sp. TUBT05 ในอาหารเหลว BG-11N_0 บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 12 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์ *Nostoc* sp. TUBT05 โดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บเฉพาะตะกอนเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ปริมาตร 30 มิลลิลิตร มาทำให้เป็นท่อนสั้นๆ โดยใช้ tissue grinder และปรับปริมาตรโดย BG-11N_0 ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 3,600 มิลลิลิตร สำหรับการทดลองต่อไป

2.2 ผลของการใช้คลื่นความถี่สูงต่อการเจริญของผักสลัดกรีนโอ๊ค

ศึกษาผลของคลื่นความถี่สูงต่อการเจริญของผักสลัดกรีนโอ๊ค เพื่อหาระยะเวลาในการผ่านคลื่นความถี่สูงที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป โดยเพาะเมล็ดกรีนโอ๊คบนฟองน้ำในน้ำกลั่นเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำรากกรีนโอ๊คมาผ่านคลื่นความถี่สูงที่ความถี่เท่ากับ 50/60 เฮิรตซ์ (ultrasonic cleaner, Model-575HT)

เป็นระยะเวลา 30, 60 และ 300 นาที และหลังจากผ่านคลื่นความถี่สูงนำไปเลี้ยงต่อในสารละลายมาตรฐานไฮโดรพอนิกส์ (ธาตุอาหาร A, B) [5] หรือ BG-11N_0 ที่มี *Nostoc* sp. TUBT05 รวมทั้งสิ้น 8 ทรีตเมนต์ (ตารางที่ 1) จากนั้น 1 สัปดาห์ย้ายลงเลี้ยงในระบบไฮโดรพอนิกส์เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ แล้วจึงเก็บผลน้ำหนักสดและแห้งของใบและราก และความกว้างและยาวของใบ

ตารางที่ 1 ทรีตเมนต์ต่างๆ ที่ใช้ทดสอบผลของคลื่นความถี่สูงต่อการเจริญของผักสลัดกรีนโอ๊ค

ทรีตเมนต์	ระยะเวลาที่ผ่านคลื่นความถี่สูง (วินาที)	หลังผ่านคลื่นความถี่สูงนำรากไปเลี้ยงใน	
		สารละลายธาตุอาหาร A, B ปริมาตร 100 มิลลิลิตร	BG-11N_0 + *Nostoc* sp.TUBT05 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
1	0	✓	-
2	0	-	✓
3	30	✓	-
4	60	✓	-
5	300	✓	-
6	30	-	✓
7	60	-	✓
8	300	-	✓

หมายเหตุ ธาตุอาหาร A, B คือสารละลายธาตุอาหารที่ใช้ในการปลูกผักกาดหอมในระบบไฮโดรพอนิกส์

2.3 ผลของคลื่นความถี่สูงร่วมกับไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ต่อการเจริญของผักสลัดกรีนโอ๊ค

ศึกษาผลของคลื่นความถี่สูงร่วมกับไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ต่อการเจริญของผักสลัดกรีนโอ๊ค โดยเพาะเมล็ดกรีนโอ๊คบนฟองน้ำในน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำรากกรีนโอ๊คมาผ่านคลื่นความถี่สูงเป็นเวลานาน 20, 30, 60, 300 และ 600 นาที หลังจากผ่านคลื่นความถี่สูงนำไปแช่ในอาหาร BG-11N_0 ที่มีและไม่มี *Nostoc* sp. TUBT05 รวมทั้งสิ้น 13 ทรีตเมนต์ (ตารางที่ 2) เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิห้อง แสงส่องถึง และเขย่าทุกวัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ สุ่มตัวอย่างรากกรีนโอ๊คจำนวน 2 ราก จากทุกทรีตเมนต์ มาศึกษาการเจริญของเส้นสายไซยาโนแบคทีเรียที่บริเวณผิวและภายในเนื้อเยื่อรากกรีนโอ๊คภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus CX31) ที่กำลังขยาย 400 เท่า และสุ่มตัวอย่างรากกรีนโอ๊คจำนวน 3 รากจากทุกทรีตเมนต์มาวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์เอของไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญบริเวณผิวและภายในเนื้อเยื่อของราก กรีนโอ๊คตามวิธีของ Mac Kinney (1941) จากนั้นนำกรีนโอ๊คจากทุกทรีตเมนต์ไปปลูกลงดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง ปลูกกรีนโอ๊คในกระถางพลาสติกแบบยาวขนาด 19 × 65 × 12 เซนติเมตร ทรีตเมนต์ละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น รดน้ำเช้าเย็นทุกวัน เมื่อครบกำหนด 15 และ 28 วัน ตามลำดับ เก็บกรีนโอ๊คเพื่อศึกษาการเจริญเติบโต โดยวัดความกว้างและความยาวใบ ชั่งน้ำหนักสดของใบและราก หลังจากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักแห้งของใบและราก บันทึกข้อมูล

ตารางที่ 2 ทรีตเมนต์ต่างๆ ที่ใช้ทดสอบผลของคลื่นความถี่สูงร่วมกับไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ต่อการเจริญของผักสลัดกรีนโอ๊ค ก่อนปลูกลงดิน

ทรีตเมนต์	ระยะเวลาที่ผ่านคลื่นความถี่สูง (วินาที)	หลังผ่านคลื่นความถี่สูงนำรากมาเลี้ยงต่อใน		
		น้ำกลั่น (100 มิลลิลิตร)	$BG\text{-}11N_0$ (100 มิลลิลิตร)	$BG\text{-}11N_0$ + *Nostoc* sp. TUBT05 (100 มิลลิลิตร)
ควบคุม	0	✓	-	-
1	0	-	✓	-
2	0	-	-	✓
3	20	-	✓	-
4	30	-	✓	-
5	60	-	✓	-
6	300	-	✓	-
7	600	-	✓	-
8	20	-	-	✓
9	30	-	-	✓
10	60	-	-	✓
11	300	-	-	✓
12	600	-	-	✓

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบความแตกต่างของน้ำหนักสดและแห้ง และความกว้างและความยาวใบระหว่างทรีตเมนต์โดยใช้สถิติ One-way ANOVA และ Turkey's test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. ผลการทดลอง

3.1 ผลของคลื่นความถี่สูงต่อการเจริญของผักสลัดกรีนโอ๊ค

พบว่ากรีนโอ๊คที่รากผ่านคลื่นความถี่สูงมีน้ำหนักสดใบและราก น้ำหนักแห้งใบและราก และความกว้างและความยาวใบมากกว่าในทรีตเมนต์ที่ไม่ได้ผ่านคลื่นความถี่สูง (ตารางที่ 3 และ 4) โดยกรีนโอ๊คที่รากผ่านคลื่นความถี่สูงเป็นระยะเวลา 300 วินาทีและเลี้ยงต่อในธาตุอาหาร A และ B มีน้ำหนักสดของใบและราก (18.36 ± 2.46 และ 2.82 ± 0.26 กรัม) น้ำหนักแห้งของใบและราก (1.18 ± 0.14 และ 0.34 ± 0.02 กรัม) และความกว้างและความยาวใบ (4.19 ± 0.53 และ 7.40 ± 0.93 เซนติเมตร) มากที่สุด ส่วนกรีนโอ๊คที่รากผ่านคลื่นความถี่สูงเป็นระยะเวลา 30 วินาที และเลี้ยงต่อใน $BG\text{-}11N_0$ + *Nostoc* sp. TUBT05 มีการเจริญเติบโตมากที่สุด โดยมีน้ำหนักสดของใบและรากเท่ากับ 4.82 ± 1.00 และ 0.72 ± 0.22 กรัม น้ำหนักแห้งของใบและรากเท่ากับ 0.38 ± 0.21 และ 0.07 ± 0.02 กรัม และความกว้างและความยาวใบเท่ากับ 3.57 ± 0.81 และ 7.00 ± 1.31 เซนติเมตร ตามลำดับ จากการทดลองข้างต้นนี้จึงกำหนดระยะเวลาที่รากผ่านคลื่นความถี่สูงอยู่ในช่วงระหว่าง 20 - 600 วินาที เพื่อใช้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและแห้งของใบและรากของกรีนโอ๊คที่ผ่านคลื่นความถี่สูงที่ระยะเวลานานต่างกัน และเลี้ยงต่อในอาหารที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงนำไปปลูกในระบบไฮโดรพอนิกส์ จนอายุครบ 42 วัน

ทรีตเมนต์	น้ำหนักสด (กรัม)		น้ำหนักแห้ง (กรัม)	
	ใบ	ราก	ใบ	ราก
1 : ธาตุอาหาร A,B	10.67±0.88^{b}	1.87±0.06^{b}	0.74±0.21^{ab}	0.23±0.04^{a}
2 : BG-11N_0 + *Nostoc*	1.46±1.12^{c}	0.06±0.05^{c}	0.10±0.07^{c}	0.02±0.01^{b}
3 : 30 วินาที + ธาตุอาหาร A,B	14.88±0.68^{ab}	2.02±0.01^{ab}	0.99±0.07^{a}	0.26±0.02^{a}
4 : 60 วินาที + ธาตุอาหาร A,B	15.87±2.85^{ab}	2.29±0.47^{ab}	1.01±0.21^{a}	0.28±0.09^{a}
5 : 300 วินาที + ธาตุอาหาร A,B	18.36±2.46^{a}	2.82±0.26^{a}	1.18±0.14^{a}	0.34±0.02^{a}
6 : 30 วินาที + BG-11N_0 + *Nostoc*	4.82±1.00^{c}	0.72±0.22^{c}	0.38±0.21^{bc}	0.07±0.02^{b}
7 : 60 วินาที + BG-11N_0 + *Nostoc*	2.49±0.90^{c}	0.44±0.50^{c}	0.29±0.06^{bc}	0.03±0.01^{b}
8 : 300 วินาที + BG-11N_0 + *Nostoc*	2.20±0.65^{c}	0.13±0.06^{c}	0.16±0.04^{c}	0.01±0.00^{b}
p value	0.000	0.000	0.000	0.000

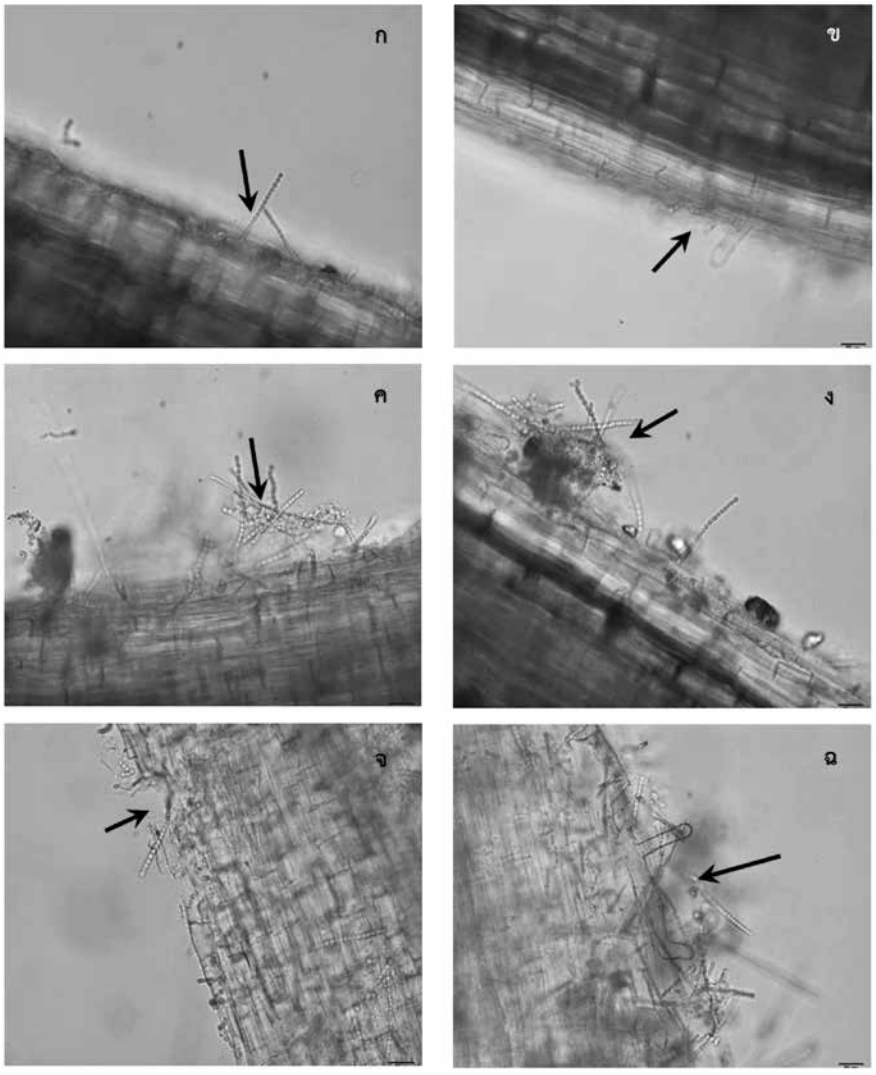
ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยความกว้างความยาวใบของกรีนโอ๊คที่ผ่านคลื่นความถี่สูงที่ระยะเวลานานต่างกันและเลี้ยงต่อในอาหารที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงนำไปปลูกในระบบไฮโดรพอนิกส์จนอายุครบ 42 วัน

ทรีตเมนต์	ความกว้างใบ (เซนติเมตร)	ความยาวใบ (เซนติเมตร)
1 : ธาตุอาหาร A,B	3.32±0.12^{ab}	6.05±0.45^{ab}
2 : BG-11N_0 + *Nostoc*	2.19±.06^{b}	4.71±1.77^{b}
3 : 30 วินาที + ธาตุอาหาร A,B	3.65±0.01^{a}	7.17±0.73^{a}
4 : 60 วินาที + ธาตุอาหาร A,B	3.87±0.48^{a}	22±0.21^{a}
5 : 300 วินาที + ธาตุอาหาร A,B	4.19±0.53^{a}	7.40±0.93^{a}
6 : 30 วินาที + BG-11N_0 + *Nostoc*	3.57±0.81^{a}	7.00±1.31^{a}
7 : 60 วินาที + BG-11N_0 + *Nostoc*	3.29±0.39^{ab}	6.47±1.06^{ab}
8 : 300 วินาที + BG-11N_0 + *Nostoc*	3.29±0.72^{ab}	6.32±0.26^{ab}
p value	0.001	0.001

3.2 ผลของคลื่นความถี่สูงร่วมกับไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ต่อการเจริญของผักสลัดกรีนโอ๊ค

3.2.1 การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียที่บริเวณผิวและภายในเนื้อเยื่อรากกรีนโอ๊คภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

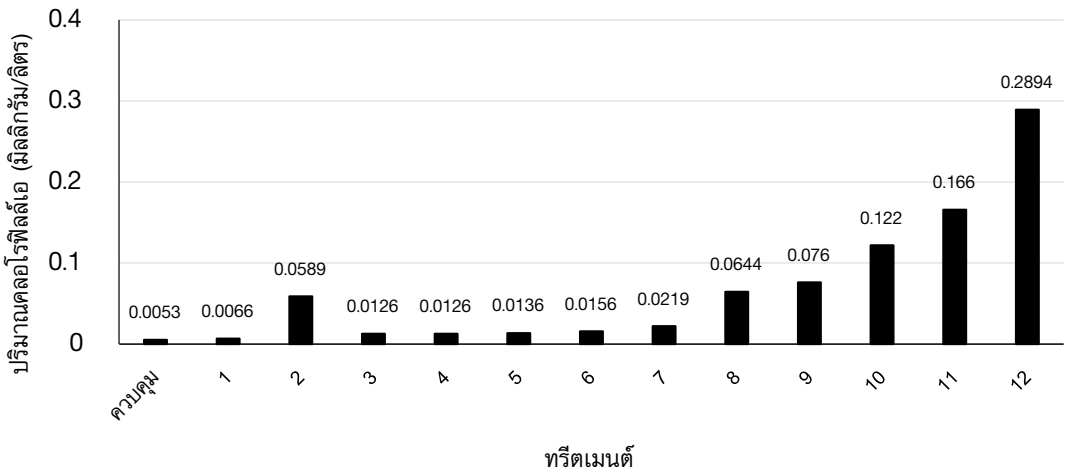
พบว่ารากกรีนโอ๊คในทรีตเมนต์ที่ผ่านคลื่นความถี่สูงเป็นระยะเวลาต่างกันและเลี้ยงต่อในอาหาร BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05 ปรากฏเส้นสายของ *Nostoc* sp. TUBT05 เกาะบริเวณผิวชั้นนอกของราก โดยปริมาณเส้นสายของ *Nostoc* sp. TUBT05 ที่เกาะแปรผันตามระยะเวลาที่ให้รากผ่านคลื่นความถี่สูง โดยทรีตเมนต์ที่รากผ่านคลื่นความถี่สูงที่เวลา 20 และ 30 วินาที พบการเกาะของเส้นสาย *Nostoc* sp. TUBT05 น้อยที่สุด (รูปที่ 1ก และ 1ข) ทรีตเมนต์ที่รากผ่านคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 60 และ 300 วินาที พบการเกาะของเส้นสาย *Nostoc* sp. TUBT05 เป็นกลุ่มก้อนที่ผิวชั้นนอกของราก (รูปที่ 1ค และ 1ง) และทรีตเมนต์ที่รากผ่านคลื่นความถี่สูงเป็นระยะเวลานานที่สุด คือ 600 วินาทีนั้น พบเนื้อเยื่อผิวรากถูกทำลายเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 1จ) และมีเส้นสายของ *Nostoc* sp. TUBT05 กระจายตัวเกาะอยู่รอบๆ ผิวชั้นนอกและแทรกในเนื้อเยื่อชั้นคอร์เท็กซ์ของรากจำนวนมาก (รูปที่ 1ฉ)



รูปที่ 1 *Nostoc* sp. TUBT05 ที่เจริญบนรากกรีนโอ๊คที่ผ่านคลื่นความถี่สูงเป็นระยะเวลา 20 (ก), 30 (ข), 60 (ค), 300 (ง) และ 600 (จ และ ฉ) วินาที (scale bar = 20 ไมโครเมตร)

3.2.2 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของไซยาโนแบคทีเรียที่เจริญบริเวณผิวและภายในเนื้อเยื่อรากกรีนโอ๊ค

พบว่ากรีนโอ๊คในทรีตเมนต์ที่รากผ่านคลื่นความถี่สูงมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอมากกว่าในทรีตเมนต์ที่ไม่ได้ผ่านคลื่นความถี่สูง และกรีนโอ๊คในทรีตเมนต์ที่ผ่านคลื่นความถี่สูงและเลี้ยงต่อใน BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05 มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอของไซยาโนแบคทีเรียมากกว่าเมื่อเทียบกับทรีตเมนต์ที่เลี้ยงใน BG-11N_0 โดยทรีตเมนต์ที่ที่มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอของไซยาโนแบคทีเรียสูงสุดได้แก่ กรีนโอ๊คที่รากผ่านคลื่นความถี่สูงเป็นระยะเวลานานที่สุด คือ 600 วินาที มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอของไซยาโนแบคทีเรียเท่ากับ 0.2894 มิลลิลิตรต่อกรัม (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของไซยาโนแบคทีเรียบนรากกรีนโอ๊คในแต่ละทรีตเมนต์ (n=3)

3.2.3 ผลของคลื่นความถี่สูงร่วมกับ

ไซยาโนแบคทีเรียที่มีต่อน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของใบและรากผักสลัดกรีนโอ๊ค เมื่อเพาะปลูกเป็นเวลา 15 วัน

พบว่ากรีนโอ๊คจากทรีตเมนต์ที่รากผ่านคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 300 วินาที และนำมาเลี้ยงต่อใน BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05 มีการเจริญเติบโตสูงสุด (ตารางที่ 6 ทรีตเมนต์ 11) โดยมีน้ำหนักสดใบและรากสูงสุด เท่ากับ 7.77 ± 0.07 และ 1.30 ± 0.06 กรัม มีน้ำหนักแห้งใบและรากสูงสุดเท่ากับ 0.20 ± 0.01 และ 0.07 ± 0.00 กรัม และมีความกว้างใบมากสุดเท่ากับ 4.66 ± 0.07 เซนติเมตร และทรีตเมนต์ที่กรีนโอ๊คมีความยาวใบสูงสุดคือทรีตเมนต์ที่รากกรีนโอ๊คผ่านคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 300 วินาทีและนำมาเลี้ยงต่อ BG-11N_0 (ตารางที่ 5 ทรีตเมนต์ 6) โดยมีความยาวใบสูงสุดเท่ากับ 4.98 ± 0.02 เซนติเมตร

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและแห้งของใบและราก และค่าเฉลี่ยความกว้างความยาวใบของกรีนโอ๊คที่ผ่านคลื่นความถี่สูงที่ระยะเวลานานต่างกัน และเลี้ยงต่อในอาหารที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงนำไปปลูกลงดินเป็นระยะเวลา 15 วัน

ทรีตเมนต์	น้ำหนักสด (กรัม) ใบ	น้ำหนักสด (กรัม) ราก	น้ำหนักแห้ง (กรัม) ใบ	น้ำหนักแห้ง (กรัม) ราก	ความกว้างใบ (เซนติเมตร)	ความยาวใบ (เซนติเมตร)
ควบคุม	3.19±0.29^{f}	0.51±0.03^{c}	0.05±0.03^{bc}	0.01±0.00^{cd}	2.88±0.26^{d}	4.04±0.15^{ab}
1	1.41±0.11^{g}	0.67±0.09^{bc}	0.18±0.00^{a}	0.01±0.00^{d}	3.17±0.03^{bcd}	4.54±0.21^{ab}
2	3.46±0.21^{ef}	0.73±0.01^{bc}	0.04±0.00^{bc}	0.02±0.01^{bcd}	2.92±0.29^{cd}	4.44±0.07^{ab}
3	3.64±0.59^{ef}	0.67±0.04^{bc}	0.04±0.01^{bc}	0.02±0.01^{bcd}	3.32±0.19^{bcd}	4.51±0.38^{ab}
4	3.73±0.05^{def}	0.76±0.01^{bc}	0.04±0.02^{bc}	0.01±0.00^{bcd}	3.79±0.17^{abc}	3.85±0.55^{b}
5	3.65±0.09^{ef}	0.78±0.03^{bc}	0.03±0.00^{bc}	0.02±0.00^{bcd}	4.56±0.15^{a}	4.71±0.20^{ab}
6	3.75±0.02^{def}	0.80±0.02^{bc}	0.02±0.00^{c}	0.03±0.00^{bcd}	4.64±0.17^{a}	4.98±0.02^{a}
7	4.36±0.24^{cdef}	0.81±0.03^{bc}	0.11±0.06^{abc}	0.03±0.00^{bcd}	3.80±0.18^{abc}	4.27±0.17^{ab}
8	5.17±0.09^{bcde}	0.86±0.01^{bc}	0.04±0.01^{bc}	0.03±0.00^{bc}	3.58±0.08^{bcd}	4.74±0.13^{ab}
9	5.38±0.04^{bcd}	0.97±0.02^{ab}	0.10±0.00^{abc}	0.03±0.00^{bc}	3.89±0.06^{ab}	4.70±0.14^{ab}
10	6.17±0.42^{ab}	0.99±0.07^{ab}	0.13±0.01^{abc}	0.04±0.01^{ab}	4.07±0.07^{ab}	4.68±0.06^{ab}
11	7.77±0.07^{a}	1.30±0.06^{a}	0.20±0.01^{a}	0.07±0.00^{a}	4.66±0.07^{a}	4.67±0.16^{ab}
12	6.04±0.06^{bc}	0.78±0.19^{bc}	0.14±0.01^{ab}	0.03±0.01^{bc}	3.95±0.43^{ab}	4.43±0.11^{ab}
p value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007

(ควบคุม (น้ำกลั่น), 1: BG-11N_0, 2: BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05, 3: อัลตร้าโซนิค 20 วินาที + BG-11N_0, 4: อัลตร้าโซนิค 30 วินาที + BG-11N_0, 5: อัลตร้าโซนิค 60 วินาที + BG-11N_0, 6: อัลตร้าโซนิค 300 วินาที + BG-11N_0, 7: อัลตร้าโซนิค 600 วินาที + BG-11N_0, 8: อัลตร้าโซนิค 20 วินาที + BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05, 9: อัลตร้าโซนิค 30 วินาที + BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05, 10: อัลตร้าโซนิค 60 วินาที + BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05, 11: อัลตร้าโซนิค 300 วินาที + BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05 และ 12: อัลตร้าโซนิค 600 วินาที + BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05)

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและแห้งของใบและราก และค่าเฉลี่ยความกว้างความยาวใบของกรีนโอ๊คที่ผ่านการโซนิเคทรากที่ระยะเวลานานต่างกัน และเลี้ยงต่อในอาหารที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงนำไปปลูกลงดินเป็นระยะเวลา 28 วัน

ทรีตเมนต์	น้ำหนักสด (กรัม) ใบ	น้ำหนักสด (กรัม) ราก	น้ำหนักแห้ง (กรัม) ใบ	น้ำหนักแห้ง (กรัม) ราก	ความกว้างใบ (เซนติเมตร)	ความยาวใบ (เซนติเมตร)
ควบคุม	7.57±0.06^{gh}	1.03±0.04^{d}	0.46±0.02^{e}	0.07±0.00^{ef}	4.16±0.04^{c}	6.13±0.37^{f}
1	6.03±0.04^{h}	1.01±0.10^{d}	0.32±0.00^{f}	0.05±0.00^{f}	4.41±0.07^{c}	6.65±0.09^{ef}
2	8.32±0.04^{fg}	1.23±0.01^{bcd}	0.47±0.02^{e}	0.07±0.00^{def}	4.47±0.21^{bc}	7.03±0.03^{def}
3	7.66±0.05^{fgh}	1.17±0.05^{cd}	0.46±0.02^{e}	0.07±0.00^{def}	4.47±0.10^{bc}	7.73±0.13^{cdef}
4	8.39±0.11^{efg}	1.26±0.02^{bcd}	0.49±0.00^{e}	0.07±0.00^{cdef}	4.50±0.09^{bc}	7.87±0.50^{cde}
5	8.50±0.08^{efg}	1.27±0.08^{bcd}	0.50±0.00^{e}	0.07±0.00^{cdef}	4.58±0.13^{bc}	4.71±0.20^{ab}
6	8.74±0.00^{defg}	1.31±0.02^{bcd}	0.50±0.00^{e}	0.08±0.00^{bcde}	4.79±0.02^{bc}	7.79±0.09^{bcde}
7	9.35±0.31^{cdef}	1.34±0.01^{bcd}	0.51±0.01^{de}	0.08±0.00^{bcde}	4.79±0.11^{bc}	8.08±0.21^{abcde}
8	10.04±0.14^{bcde}	1.37±0.02^{bc}	0.54±0.01^{cde}	0.08±0.00^{bcd}	5.01±0.10^{bc}	8.31±0.01^{abcde}
9	10.42±0.11^{bcd}	1.48±0.03^{bc}	0.60±0.00^{bcd}	0.08±0.00^{bcd}	5.02±0.01^{bc}	8.52±0.23^{abcd}
10	11.62±0.57^{ab}	1.49±0.10^{bc}	0.61±0.00^{abc}	0.09±0.00^{bc}	5.58±0.03^{ab}	8.73±0.14^{abc}
11	12.80±0.14^{a}	1.90±0.03^{a}	0.70±0.00^{a}	0.11±0.00^{a}	6.21±0.07^{a}	9.57±0.18^{ab}
12	11.04±0.05^{bc}	1.51±0.05^{b}	0.64±0.03^{ab}	0.09±0.00^{ab}	5.27±0.01^{abc}	9.71±0.51^{a}
p value	0.000 0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

(ควบคุม (น้ำกลั่น), 1: BG-11N_0, 2: BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05, 3: อัลตร้าโซนิค 20 วินาที + BG-11N_0, 4: อัลตร้าโซนิค 30 วินาที + BG-11N_0, 5: อัลตร้าโซนิค 60 วินาที + BG-11N_0, 6: อัลตร้าโซนิค 300 วินาที + BG-11N_0, 7: อัลตร้าโซนิค 600 วินาที + BG-11N_0, 8: อัลตร้าโซนิค 20 วินาที + BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05, 9: อัลตร้าโซนิค 30 วินาที + BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05, 10: อัลตร้าโซนิค 60 วินาที + BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05, 11: อัลตร้าโซนิค 300 วินาที + BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05 และ 12: อัลตร้าโซนิค 600 วินาที + BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05)

3.2.4 ผลของคลื่นความถี่สูงร่วมกับไซยาโนแบคทีเรียที่มีต่อน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของใบและรากผักสลัดกรีนโอ๊คเมื่อเพาะปลูกเป็นเวลา 28 วัน

พบว่ากรีนโอ๊คจากทรีตเมนต์ที่รากผ่านคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 300 วินาทีและนำมาเลี้ยงต่อใน BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05 มีการเจริญเติบโตสูงสุด (ตารางที่ 6 ทรีตเมนต์ 11) โดยมีน้ำหนักสดใบและรากสูงสุดเท่ากับ 12.80 ± 0.14 และ 1.90 ± 0.03 กรัม มีน้ำหนักแห้งใบและรากสูงสุดเท่ากับ 0.70 ± 0.00 และ 0.11 ± 0.00 กรัม และมีความกว้างใบมากสุดเท่ากับ 6.21 ± 0.07 เซนติเมตร และทรีตเมนต์ที่กรีนโอ๊คมีความยาวใบสูงสุดคือทรีตเมนต์ที่รากกรีนโอ๊คผ่านคลื่นความถี่สูงเป็นเวลา 600 วินาทีและนำมาเลี้ยงต่อ BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05 (ตารางที่ 6 ทรีตเมนต์ 12) โดยมีความยาวใบสูงสุดเท่ากับ 9.71 ± 0.51 เซนติเมตร

4. วิจารณ์ผล

คลื่นความถี่สูงสามารถประยุกต์ใช้ในการชักนำให้เกิดการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนกับพืชที่ไม่ใช่ตระกูลถั่ว โดยนอกจากการชักนำให้เกิดการอยู่อาศัยร่วมกันระหว่าง *Nostoc* sp. TUBT05 กับกรีนโอ๊คแล้ว ยังมีรายงานการใช้คลื่นความถี่สูงในการชักนำให้ *N. muscorum* อยู่ร่วมกับต้นอ่อนข้าวสาลี [3] และ *Nostoc* sp. 2S9B อยู่ร่วมกับข้าวสาลี [6] แสดงให้เห็นว่านอกจากแบคทีเรียในสกุล *Azospirillum, Rhizobia, Acetobacter, Herbaspirillum* และ *Azoarcus* แล้ว [7] ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ก็มีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ให้เกิดการอยู่อาศัยร่วมกันระหว่างแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนและพืชที่ไม่ใช่ตระกูลถั่วได้ การผ่านคลื่นความถี่สูงเป็นระยะเวลานานจะทำให้ผิวด้านนอกของรากถูกทำลายเพียงเล็กน้อยและเปิดออก จึงเป็นตำแหน่งที่ให้ไซยาโนแบคทีเรียยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ โดยการเพิ่มระยะเวลาการผ่านคลื่นความถี่สูงจะทำให้ไซยาโนแบคทีเรียยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดี [6] อย่างไรก็ตาม การทดลองครั้งนี้ไม่ปรากฏลักษณะปมเทียม (paranodule) เกิดขึ้นบนรากกรีนโอ๊ค ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากในระหว่างการทดลองไม่มีการเติมสารใดที่ชักนำให้เกิดปมเทียม ซึ่งต่างจากการทดลองของ Fadl-Allah และคณะ [3] ที่เติม 2,4-D ในระหว่างการทดลอง จึงปรากฏปมเทียมเกิดขึ้นบนรากต้นอ่อนข้าวสาลี ทั้งนี้เนื่องจาก 2,4-D จัดเป็นฮอร์โมนพืชที่ใช้ในการชักนำให้เกิดปมเทียมได้ [7] และการอยู่ร่วมกันของไซยาโนแบคทีเรียในรากกรีนโอ๊คช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกรีนโอ๊ค ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไซยาโนแบคทีเรียที่เกาะอยู่บริเวณผิวและชั้นคอร์เท็กซ์ของรากสามารถตรึงไนโตรเจนและเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่กรีนโอ๊คสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต รวมทั้งไซยาโนแบคทีเรียสามารถผลิตฮอร์โมนกลุ่มออกซินซึ่งช่วยส่งเสริมการการเจริญเติบโตของกรีนโอ๊คได้ โดยจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า *Nostoc* sp. TUBT05 สามารถผลิตกรดอินโดลแอซีติกได้เท่ากับ 2.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

5. สรุป

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การประยุกต์ใช้คลื่นความถี่สูงเพื่อชักนำให้เนื้อเยื่อผิวชั้นนอกของรากผักสลัดกรีนโอ๊คถูกทำลายเพียงเล็กน้อยและเปิดออก ทำให้ไซยาโนแบคทีเรีย *Nostoc* sp. TUBT05 สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนบริเวณผิวรากชั้นนอกและเนื้อเยื่อชั้นคอร์เท็กซ์ ส่งผลให้ผักสลัดกรีนโอ๊คมีการเจริญเติบโตดีอย่างมีนัยสำคัญ โดยการนำรากต้นอ่อนของกรีนโอ๊คมาผ่านคลื่นความถี่สูงเป็นระยะเวลา 300 วินาทีและเลี้ยงต่อใน BG-11N_0 + *Nostoc* sp. TUBT05 ก่อนนำลงดินเป็นสภาวะที่ดีที่สุดที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกรีนโอ๊ค งานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อช่วยลดต้นทุนการผลิตแทนการใช้ปุ๋ยเคมีในการเพาะปลูก และเป็นแนวทางในการนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้กับพืชผักเศรษฐกิจที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่วชนิดอื่นในการใช้ไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้เป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อเพิ่มผลผลิตสำหรับการเพาะปลูกในระบบเกษตรอินทรีย์ต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากหน่วยวิจัยสาหร่ายและแพลงก์ตอน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่สนับสนุนเครื่องมือในการทำวิจัยครั้งนี้

7. เอกสารอ้างอิง

1. Preininger, É. and Gyurján, I., 2001, "Trials to Create Artificial Nitrogen-fixing Symbioses and Associations using In vitro Methods : an Outlook," *Vitro Cell Developmental Biology Plant*, 37, pp. 139-148.

2. Preininger, É., Zatykó, J., Szũcs, P., Koráyni, P. and Gyurján, I., 1997, "*In Vitro* Establishment of Nitrogen-fixing Strawberry (*Fragaria x Ananassa*) via Artificial Symbiosis with *Azomonas insignis*," *Vitro Cell Developmental Biology Plant*, 33, pp. 190-194.

3. Fadl-Allah, E.M., El-komy, H.M., Al-Harbi, N.A. and Sholkamy, E.N., 2011, "In Vitro Creation of Artificial Nitrogen Fixing Cyanobacterium (Nostoc muscorum) Association with Wheat," *African Journal of Microbiology Research*, 5 (3), pp. 302-310.

4. Chittapun, S. and Charoenrat, T., 2015, "Isolation and Growth of N_2-Fixing Cyanobacteria from Organic Agricultural Areas in Sanamchaikate, Chachoeng-Sao Province, Thailand," *Thammasat International Journal of Science and Technology*, 20 (2), pp. 27-32.

5. Jirakiattikul, Y. and Saelim, N., 2009, "Growth of Leaf Lettuce cv. Red Oak Grown in Hydroponics with Different Nutrient Solution," *Thai Science and Technology Journal*," 17 (2), pp. 81-88. (In Thai)

6. Gantar, M., 2000, "Mechanical Damage of Roots Provides Enhanced Colonization of the Wheat Endorhizosphere by the Dinitrogen-fixing Cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 2S9B," *Biology and Fertility Soils*, 32, pp. 250-255.

7. Saikia, S.P. and Jain, V., 2007, "Biological Nitrogen Fixation with Non-legumes: an Achievable Target of a Dogma?," *Current Science*, 92 (3), pp. 317-322.