รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : -

2. **โครงการวิจัย** : ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อจุลินทรีย์ดินที่มีประโยชน์เพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตพืชในพื้นที่ลุ่มน้ำปาย

   กิจกรรม : การศึกษาศักยภาพของจุลินทรีย์ดินที่มีประโยชน์ทางการเกษตรในพื้นที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศบริเวณลุ่มน้ำปาย

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การศึกษาศักยภาพของไรโซเบียมที่แยกได้จากพื้นที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศบริเวณลุ่มน้ำปาย

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Study on Potential of Rhizobium Isolated from Areas Effected by Climate Chang in Pai River Basin

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวจิตรา เกาะแก้ว กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน : นายมนต์ชัย มนัสสิลา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

นางสาวอมรรัตน์ ใจยะเสน กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

นายอำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

ผลการศึกษาศักยภาพของไรโซเบียมที่แยกได้จากพื้นที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศบริเวณลุ่มน้ำปาย โดยคัดเลือกไรโซเบียม 30 สายพันธุ์ พบ *Bradyrhizobium* spp. ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนให้กับต้นถั่วสูงที่สุด 3 สายพันธุ์ได้แก่ DASA32019 DASA32025 และ DASA32116 นำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำหรับใช้ในการทดลองครั้งนี้ การทดลองในกระถางวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 3 ซ้ำ 7 กรรมวิธี คือ 1) ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA32019 2) ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA32025 3) ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA32116 4) ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำหรับถั่วเป้าหมาย 5) ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมผสม สายพันธุ์ DASA32019+ DASA32025+ DASA32116 6) ไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม และ 7) ใส่ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน ทำการทดลองที่กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรม

วิชาการเกษตร ผลการทดลองในกระถางพบว่ากรรมวิธีที่ 3 มีจำนวนปม น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งปม มากที่สุด กรรมวิธีที่ 2 มีน้ำหนักสดราก น้ำหนักแห้งราก มากที่สุดและมีความแตกต่างจากกรรมวิธีที่ 5 และกรรมวิธีที่ 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น้ำหนักสดต้น น้ำหนักแห้งต้นในกรรมวิธีที่ 3 มีค่ามากที่สุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 7 ค่าการตรึงไนโตรเจนพบว่ากรรมวิธีที่ 7 มีค่าการตรึงไนโตรเจนมากที่สุด รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ 4 และกรรมวิธีที่ 3 นอกจากนี้ยังพบว่ากรรมวิธีที่ 1, 2 และ 6 มีค่าการตรึงไนโตรเจนค่อนข้างต่ำและมีความแตกต่างจากกรรมวิธีที่ 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลผลิตถั่วเหลืองตาแดงที่ปลูกในกระถางทดลอง พบว่าจำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดทั้งหมด น้ำหนักเมล็ด และ น้ำหนัก 100 เมล็ดในทุก ๆ กรรมวิธีการไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อนำเชื้อผสม 3 สายพันธุ์มาใช้ร่วมกัน พบว่าให้ผลผลิตที่ดีกว่าปุ๋ยชีวภาพสำหรับถั่วเหลืองที่ผลิตโดยกรมวิชาการเกษตร

Abstract

The result of study on potential of rhizobium isolated from areas effected by climate chang in Pai river basin. Thirty isolates of Rhizobium were selected to test for nitrogen fixation with vegetable soybean. Three isolates such as DASA19001, DASA19014 and DASA19016 are highest effective on nitrogen fixation. A Completely Randomized Design (CRD) with three replications of 7 treatments was applied in experiment in pots at Soil Microbiology Research group, Department of Agriculture. The treatments included: 1) Rhizobium isolate DASA32019, 2) Rhizobium isolate DASA32025, 3) Rhizobium isolate DASA32116, 4) Rhizobium biofertilizer for Soybean from Department of Agriculture (DOA), 5) Rhizobium isolate DASA32019+ DASA32025+ DASA3 2 1 16, 6) No rhizobium inoculation and 7) chemical fertilizer (N-P-K) according to soil analysis without rhizobium biofertilizer. The results showed that the treatment 3 had highest in number of node fresh weight and dry weigh of node. Treatment 2 has highest root fresh and dry weight and has high significant compare to treatment 5 and 7. Treatment 3 has highest in fresh and dry matter and high significant different compare to treatment 7. Nitrogen fixation value in treatment 7 has high fixation value followed by treatment 4 and 3, respectively. While treatment 1, 2 and 6 has low nitrogen fixation value and significantly different compare to treatment 7. Yield components value in pot trial showed that number of pod, total number of seed, seed weight and 100 seed weight were not significant different in all treatments. When mix 3 varieties and use showed better yield than bio-fertilizer for soybean form DOA.

6. คำนำ

ดินเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด แบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่พบมากที่สุดเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น มีหน้าที่ย่อยซากพืช ซากสัตว์ ผลิตฮิวมัส เปลี่ยนแปลงแร่ธาตุในดินให้เป็นประโยชน์

แบคทีเรียในดินบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่มีประโยชน์ต่อพืชได้ เช่น แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis N2-fixing bacteria) ได้แก่ เชื้อไรโซเบียม (*Rhizobium* sp.) กับพืชตระกูลถั่ว (หนึ่ง, 2554) ไรโซเบียมเป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในพวก prokaryote ที่สามารถสร้างเอ็นไซม์ไนโตรจิเนส (nitrogenase enzyme) ทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ (Biological Nitrogen Fixation) โดยกระบวนการทางเอ็นไซม์นี้สามารถรวมแก๊สไนโตรเจนและแก๊สไฮโดรเจนให้เป็นแอมโมเนีย ทำให้เกิดการดึงแก๊สไนโตรเจนจากอากาศมาเป็นประโยชน์ต่อพืชและสัตว์ต่างๆ กระบวนการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรีย มีบทบาทสำคัญที่ควรให้ความสนใจอย่างยิ่ง แต่เมื่อสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป โลกมีการพัฒนาขึ้น ความต้องการบริโภคอาหารมากขึ้น ส่งผลให้พื้นที่ป่าถูกบุกรุกทำลายเพื่อมาทำการผลิตพืชและอาหารอย่างต่อเนื่อง พื้นที่อาศัยของแบคทีเรียเหล่านี้จึงถูกกระทบด้วยความเปลี่ยนแปลงทางระบบนิเวศ มีผลกระทบต่อประชากรแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะกระทบถึงประชากรไรโซเบียมในดินที่มีความสำคัญต่อปริมาณการเกิดปมของต้นถั่วหลายชนิด รวมทั้งถั่วที่เป็นพืชเศรษฐกิจต่างๆ และไม้ยืนต้น แต่เนื่องจากไรโซเบียมเป็นจุลินทรีย์ที่ค่อนข้างเฉพาะเจาะจงกับพืชตระกูลถั่วเหล่านั้น กล่าวคือไรโซเบียมจะถูกจำแนกตามลักษณะความสามารถในการเข้าสร้างปมได้กับชนิดของพืชตระกูลถั่วที่อาศัยอยู่ เช่น *Bradyrhizobium japonicum* จะสร้างปมรากและตรึงไนโตรเจนเฉพาะกับถั่วเหลืองเท่านั้น ซึ่งในสภาพแวดล้อมต่างกันก็มีอิทธิพลต่อการเป็นอยู่ของไรโซเบียมต่างกัน (Boonkerd and Weaver, 1982: Weaver et al., 1987) นอกจากนี้ Boonkerd and Promsiri (1993) ยังพบอีกว่าอิทธิพลของระบบการปลูกพืชมีส่วนเกี่ยวข้องกับประชากร และความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมอีกด้วย

ในการผลิตพืชตระกูลถั่ว การปลูกเชื้อไรโซเบียมร่วมกับถั่วสามารถเพิ่มผลผลิตได้การทดลองของ Duzan et al. (2004) พบว่าเมื่อมีการปลูกเชื้อ *B. japonicum* ให้กับถั่วเหลืองที่ปริมาณเซลล์ตั้งแต่ 10^3 ถึง 10^6 เซลล์ต่อเมล็ด ทำให้มีจำนวนปม น้ำหนักปม และน้ำหนักเมล็ดเพิ่มขึ้น ตามปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการปลูกเชื้อ *B. japonicum* สามารถเพิ่มจำนวนฝัก จำนวนเมล็ด น้ำหนักต่อ 100 เมล็ด ปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง (Zhang et al., 2002) ในการปลูกพืชตระกูลถั่ว ไรโซเบียมจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ซึ่งไรโซเบียมสามารถผลิตปุ๋ยไนโตรเจนให้กับพืชตระกูลถั่วได้อย่างเพียงพอ ความต้องการไนโตรเจนของพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน เช่น การผลิตถั่วเหลือง 3 ตันต้องใช้ไนโตรเจน 300 กิโลกรัมในพื้นที่ 6.25 ไร่ ในขณะที่ผลผลิตข้าว 5 ตันต่อไร่ต้องใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 100 กิโลกรัม/ไร่

นอกจากเชื้อไรโซเบียมแล้วในดินยังพบว่ามีจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณรอบๆ ราก โดยมีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่ม *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Gordonia*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* เป็นต้น โดยแบคทีเรียเหล่านี้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตฮอร์โมนพืช ดูดซับธาตุอาหารที่จำเป็นจากดิน ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (Glick, 1995) มีรายงานการใช้แบคทีเรียที่เป็นประโยชน์

ร่วมกัน 2-3 กลุ่ม พบว่าให้ผลดีกว่าการใช้แบคทีเรียเพียงกลุ่มเดียว Dashti et al. (1998) พบว่าการปลูกเชื้อร่วมระหว่าง *B. japonicum* และ *Azospirillum* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนและจำนวนปมให้แก่ถั่วเหลือง การปลูกเชื้อร่วมระหว่าง *Pseudomonas* sp. และ *Rhizobium* sp. สามารถเพิ่มการเข้าเกาะติดรากของเชื้อไรโซเบียม กระตุ้นให้เกิดการสร้างปมของถั่ว (Cook and Baker, 1983) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชตระกูลถั่วร่วมกับเชื้อไรโซเบียม เช่น Azospirillum (Aung et al., 2013), Azotobacter (Wu et al., 2012), Bacillus (Atieno et al., 2012), Pseudomonas (Zahir et al., 2011), Serratia (Pan et al., 2002) มีผลต่อการเจริญของรากขนอ่อน ปริมาณการหลั่งสาร flavonoid และจำนวนปมรากถั่วเพิ่มมากขึ้น จากผลการทดลองที่มีอย่างต่อเนื่องชี้ให้เห็นว่าการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนจะช่วยลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกรในการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนได้มากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำมาก การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียไรโซเบียมที่แยกได้จากพื้นที่ลุ่มน้ำปาย ในการนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร และนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม เพื่อใช้ในการเพิ่มศักยภาพการผลิตพืชตระกูลถั่วในระบบนิเวศที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ

7. วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์

1. เชื้อไรโซเบียมที่แยกจากดินในพื้นที่ลุ่มน้ำปาย จำนวน 30 สายพันธุ์
2. เมล็ดถั่วเหลืองตาแดงพันธุ์พื้นเมืองแม่ฮ่องสอน
3. Leonard jar
4. N-free medium
5. อุปกรณ์วัดการเจริญเติบโต (ตลับเมตร)
6. เครื่อง Gas chromatography
7. ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมผสม 3 สายพันธุ์ จากผลการคัดเลือกในระดับห้องปฏิบัติการ
8. ปุ๋ยเคมีได้แก่ ปุ๋ยยูเรีย ทริปเปิ้ลซุปเปอร์ฟอสเฟต และโพแทสเซียมคลอไรด์
9. สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณอินทรียวัตถุ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในดิน

7.2 วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. วางแผนการทดลอง

. แผนการทดลอง

- การทดลองในห้องปฏิบัติการวางแผนการทดลองโดยใช้สถิติขั้นต้นในการวิเคราะห์ข้อมูล

- การทดลองในโรงเรือนวางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ

2. เก็บตัวอย่างดินในฤดูหนาว (ช่วงเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม) ฤดูร้อน (ช่วงเดือนมีนาคม-เมษายน) และฤดูฝน (ช่วงเดือนกรกฎาคม-สิงหาคม) จากพื้นที่ 4 แหล่ง คือ 1) พื้นที่ป่าต้นน้ำ 2) ดินพื้นที่ทำการเกษตรต้นน้ำ 3) พื้นที่ป่าปลายน้ำ และ 4) ดินพื้นที่ทำการเกษตรปลายน้ำ โดยขุดดินลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร ขุดอย่างน้อย 5 หลุม ในพื้นที่ 25 ตารางเมตร ตักดินมาหลุมละ 1 กิโลกรัม นำดินที่ได้มาผสมให้เข้ากัน ตักใส่ถุงพลาสติกประมาณ 2 กิโลกรัม ปิดปากถุงให้แน่น เพื่อนำไปวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

3. ศึกษาทดลองในห้องปฏิบัติการ และโรงเรือนทดลอง ของกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร โดยใช้สถิติพื้นฐานในการทดลองคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมโดยคัดเลือกครั้งละ 30 สายพันธุ์ แบ่งเป็น 31 กรรมวิธี ได้แก่

- กรรมวิธีที่ใส่เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆที่แยกได้จากดินในพื้นที่ลุ่มน้ำปาย 30 สายพันธุ์
- กรรมวิธีควบคุม (ไม่ใช้เชื้อไรโซเบียม) โดยดำเนินการดังนี้

3.1 เตรียมดินทรายเพื่อปลูกทดสอบกับพืชตระกูลถั่ว โดยนำดินทรายมาทำความสะอาด แล้วบรรจุ ลงในขวด (Leonard’s jar assembly) ที่เตรียมไว้ประมาณ ¾ ของขวด จากนั้นนำดินทรายที่ทำความสะอาดแล้วมาทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3.2 เตรียมเมล็ดถั่วเหลืองตาแดงพันธุ์พื้นเมืองแม่ฮ่องสอน โดยนำเมล็ดพันธุ์มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ และ Clorox แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำไปเพาะลงในกระดาษเพาะจนเมล็ดมีรากงอก จึงย้ายลงปลูกในกระป๋องที่บรรจุดินทรายที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

3.3 เตรียมสารละลายธาตุอาหารพืช (Plant nutrient solution) เตรียมในลักษณะ stock solution โดยเตรียมสารละลายที่ไม่มีส่วนประกอบของไนโตรเจน (N-free medium) ตามสูตรของ Broughton and Dilworth (1971

3.4 เตรียมเชื้อโดยนำเชื้อไรโซเบียม ที่แยกได้จากพื้นที่ลุ่มน้ำปายจำนวน 30 สายพันธุ์ มา streak บนอาหาร yeast mannitol agar (YMA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-7 วัน ขึ้นกับชนิดของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ จากนั้นเก็บโคโลนีของไรโซเบียมมาตรวจดูลักษณะและความบริสุทธิ์ของเชื้อใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วนำเชื้อไรโซเบียมมาเจือจางในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ คำนวณหาค่า Colony Forming Unit (CFU) ให้ได้จำนวน 108 CFU

การปลูกและดูแลรักษาต้นถั่ววางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ โดยนำเมล็ดถั่วที่เริ่มงอกมาปลูกในทรายที่อบฆ่าเชื้อไว้ ก่อนกลบดินทำการปลูกเชื้อ ไรโซเบียมที่เตรียมมาหยดลงบนเมล็ดถั่วที่เพาะงอกแล้ว จำนวน 4 เมล็ดต่อขวด โดยใช้สารละลายเชื้อ ไรโซเบียม 1 มิลลิลิตรต่อเมล็ดแล้วกลบด้วยดินทรายหนาประมาณ 1–2 ซม. จากนั้นเติมน้ำในกระป๋องด้านล่าง ปลูกถั่วไว้ในโรงเรือน เมื่อต้นถั่วเจริญเติบโตได้ 2 สัปดาห์ทำการถอนออกให้เหลือต้นถั่วจำนวน 2 ต้น ต่อขวด ทำการรดน้ำและเติมสารละลายที่ปราศจากไนโตรเจนตามระยะเวลาที่กำหนด เมื่อถั่วเจริญเติบโตอายุ 35 วัน ทำการตรวจวัดการเจริญเติบโต ได้แก่ นับจำนวนปมต่อต้น หาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของปม และดูประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน ตามวิธีการของ Boonkerd et al., 1978 จากนั้นทำ

การคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพดีเหมาะสมสำหรับถั่วสายพันธุ์ที่นำมาใช้ทดสอบ ไปใช้ในการทดลองในกระถางต่อไป

การวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของถั่วที่ปลูกเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยทำการเก็บตัวอย่างรากถั่ว ตัดส่วนของลำต้นออกตั้งแต่ข้อแรก แยกเอาทรายออกอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้ปมหลุดจากราก จากนั้น นำตัวอย่างรากถั่วและปมที่ติดอยู่กับรากทั้งหมดวางลงในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ที่ทราบปริมาตรแน่นอนปิด ด้วยจุกยางให้แน่นสนิท จากนั้นเติมแก๊สอะเซธิลีนลงในขวดเพื่อใช้เป็น substrate ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยใช้เข็มฉีดยาดูดอากาศออกจากขวดแก้ว 10 % ของปริมาตรขวด แล้วฉีดแก๊สอะเซธิลีนลงไปแทนที่อากาศ และบ่มไว้เป็นเวลา 30 นาทีจากนั้นใช้เข็มฉีดยาดูดแก๊สออกจากขวดที่บ่มไว้เพื่อนำไปฉีดและวิเคราะห์หาปริมาณเอธิลีนด้วยเครื่อง gas chromatograph (GC)

การหาจำนวนปมราก และน้ำหนักแห้งของปมราก เมื่อถั่วมีอายุ 30-35 วัน หลังปลูก ทำการวัดปริมาณการตรึงไนโตรเจนแล้ว นำมานับจำนวนปมรากต่อต้นของถั่ว จากนั้นแยกปมรากไปอบที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักแห้งปมรากเป็นรายต้น

การหาน้ำหนักแห้งของต้น และน้ำหนักแห้งของราก โดยหลังจากแยกปมรากออกจากต้นแล้ว นำส่วนของต้น และรากถั่วเหลืองไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อชั่งน้ำหนักแห้งของต้น และ ราก

4. ทดสอบการทำงานของเชื้อไรโซเบียมกับถั่วที่ปลูกในกระถางทดลองในสภาพโรงเรือน การทดสอบในกระถางทดลองจะทำการวิเคราะห์สมบัติของดินก่อนและหลังปลูกถั่ว เปรียบเทียบ กรรมวิธีการใส่เชื้อ ไรโซเบียม และการใส่ปุ๋ยเคมีสูตรแนะนำ บันทึกข้อมูลเมื่อถั่วออกดอก 50 เปอร์เซ็นต์โดยบันทึกค่าการตรึงไนโตรเจน จำนวนปม น้ำหนักปมแห้ง และน้ำหนักต้นแห้ง และที่ระยะเก็บเกี่ยวบันทึก ผลผลิตฝักสดและฝักแห้งพร้อมเปลือกวิเคราะห์ผลทางสถิติ เลือกกรรมวิธีที่ให้ผลผลิตสูงเพื่อทำการทดสอบในแปลงทดลอง

การทดสอบในสภาพกระถางทดลอง ทำการศึกษาทดลองในโรงเรือนทดลอง ของกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร เตรียมกระถางดินเผาเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 นิ้ว และนำดินตัวอย่างที่ใช้ปลูกมาจากแปลงปลูกข้าวและถั่วเหลือง ในพื้นที่ลุ่มน้ำปาย ต.ผาบ่อง อ.เมือง จ.แม่ฮ่องสอน มาวิเคราะห์ระดับความอุดมสมบูรณ์ของดินก่อนปลูก และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากนั้นทำการย่อยดินและผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันดี และแบ่งใส่กระถางทดลองจำนวน 30 กิโลกรัมต่อกระถาง วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 3 ซ้ำ 7 กรรมวิธี ดังนี้

1 ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA32019 (A)

2 ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA32025 (B)

3 ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA32019 (C)

4 ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลืองของกรมวิชาการเกษตร

5. ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมผสม สายพันธุ์ A+B+C

6. ไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม

7. ใส่ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน(ปุ๋ยทริปเปิ้ลซุปเปอร์ฟอสเฟต(0-46-0) ในอัตรา 3 กิโลกรัมต่อไร่)

ทำการปลูกถั่วโดยคลุกเมล็ดด้วยปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม และใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราที่กำหนดในกรรมวิธีการทดลอง โดยปลูกถั่วจำนวน 4 ต้นต่อกระถางเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของต้นถั่ว และเมื่อต้นถั่วเริ่มออกดอกที่อายุ 30-35 วัน เก็บตัวอย่างรากมาวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene Reduction Assay โดยทำการเก็บตัวอย่างรากถั่วจำนวน 2 ต้น โดยตัดส่วนของลำต้นออกตั้งแต่ข้อแรก ล้างทำความสะอาดดินที่ติดมากับรากถั่ว ระวังไม่ให้ปมหลุดจากราก จากนั้นนำตัวอย่างรากถั่วทั้งหมดวางลงในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ที่ทราบปริมาตรแน่นอนปิด ด้วยจุกยางให้แน่นสนิท จากนั้นเติมแก๊สอะเซธิลีนลงในขวดเพื่อใช้เป็น substrate ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยใช้เข็มฉีดยาดูดอากาศออกจากขวดแก้ว 10 % ของปริมาตรขวด แล้วฉีดแก๊สอะเซธิลีนลงไปแทนที่อากาศ และบ่มไว้เป็นเวลา 30 นาทีจากนั้นใช้เข็มฉีดยาดูดแก๊สออกจากขวดที่บ่มไว้เพื่อนำไปฉีดและวิเคราะห์หาปริมาณเอธิลีนด้วยเครื่อง gas chromatograph (GC)

การหาจำนวนปมราก และน้ำหนักแห้งของปมราก เมื่อถั่วมีอายุ 30- 35 วันหลังปลูก ทำการวัดปริมาณการตรึงไนโตรเจนแล้ว นำมานับจำนวนปมรากต่อต้นของถั่ว จากนั้นแยกปมรากไปอบที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักแห้งปมรากเป็นรายต้น

การหาน้ำหนักแห้งของต้น และน้ำหนักแห้งของราก โดยหลังจากแยกปมรากออกจากต้นแล้ว นำส่วนของต้น และรากถั่วไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อชั่งน้ำหนักแห้งของต้น และ ราก

บันทึกข้อมูล จำนวนปม น้ำหนักสดของปม น้ำหนักแห้งของปม และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม IRRISTAT

เวลาและสถานที่: 1 ตุลาคม 2560 – 30 กันยายน 2562

กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร และพื้นที่ป่าและพื้นที่เกษตรลุ่มน้ำปาย จ. แม่ฮ่องสอน

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1.-สภาพแวดล้อมขณะที่ทำการเก็บตัวอย่างดินในช่วงฤดูหนาว (เดือนธันวาคม) ฤดูร้อน (เดือนเมษายน) และฤดูฝน (เดือนกรกฎาคม) จากพื้นที่ 4 แหล่ง คือ 1) พื้นที่ป่าต้นน้ำ (19° 23' N 97° 57' E) ดินพื้นที่ทำการเกษตรต้นน้ำ (19° 23' N 97° 57' E) 3) พื้นที่ป่าปลายน้ำ (19° 11' N 97° 59' E) และ 4) ดินพื้นที่ทำการเกษตรปลายน้ำ (19° 11' N 97° 59' E) ตัวอย่างดินต้นน้ำเก็บที่ บ้านแม่นะ อ.แม่นาเติง จแม่ฮ่องสอน ตัวอย่างดินปลายน้ำเก็บที่ บ้านผาบ่อง ต.ผาบ่อง อ.เมือง จ.แม่ฮ่องสอน พบว่า เมื่อทำการเก็บข้อมูลอุณหภูมิของดินและอากาศในขณะที่เก็บตัวอย่างดินในปี 2560 พื้นที่ป่าปลายน้ำและพื้นที่เกษตรปลายน้ำมีอุณหภูมิดินและอุณภูมิอากาศต่ำกว่าพื้นที่ป่าต้นน้ำและพื้นที่เกษตรต้นน้ำ (ตารางที่1) เมื่อนำตัวอย่างดินมาทำการแยกเชื้อไรโซเบียมจนได้เชื้อบริสุทธิ์ พบว่าในปี 2560 ช่วงฤดูหนาวมีจำนวน 10 สายพันธุ์ ช่วงฤดูร้อนมีจำนวน 10 สายพันธุ์ และช่วงฤดูฝนมีจำนวน 10 สายพันธุ์ โดยทั้งหมดเป็น *Bradyrhizobium* spp.และได้นำเชื้อไรโซเบียมที่แยกได้ทั้งหมดไป

ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลืองตาแดงพันธุ์พื้นเมืองแม่ฮ่องสอน และเลือกพันธุ์ที่ดีที่สุดจำนวน 3 สายพันธุ์ไปทดสอบในระดับกระถางทดลองต่อไป

ตารางที่ 1 ข้อมูลอุณหภูมิดิน อุณหภูมิอากาศในช่วงที่เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ลุ่มน้ำปาย จ.แม่ฮ่องสอน ในปี 2017

แหล่งที่เก็บ	หนาว		ร้อน		ฝน	
	อุณหภูมิดิน (°C)	อุณหภูมิอากาศ (°C)	อุณหภูมิดิน (°C)	อุณหภูมิอากาศ (°C)	อุณหภูมิดิน (°C)	อุณหภูมิอากาศ (°C)
1. พื้นที่ป่าปลายน้ำ	19	24	23	29	26	31
2. พื้นที่เกษตรปลายน้ำ	19	24	26	31	26	33
3. พื้นที่เกษตรต้นน้ำ	22	29	27	33	28	34
4. พื้นที่ป่าต้นน้ำ	22	27	25	31	27	32

8.2. การคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลืองตาแดงพันธุ์พื้นเมืองแม่ฮ่องสอน ในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาผลการใช้เชื้อ *Bradyrhizobium* spp.จำนวน 30 สายพันธุ์กับถั่วเหลืองตาแดงพันธุ์พื้นเมืองแม่ฮ่องสอน ในสภาพไม่มีธาตุอาหารไนโตรเจน ในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน พบว่าการใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* spp.ทั้ง 30 สายพันธุ์ ทำให้รากถั่วมีการติดปม และสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้และเมื่อเปรียบเทียบอัตรา การตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ ในรากถั่วกับกรรมวิธีไม่ใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* spp. สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนได้สูงที่สุดจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *Bradyrhizobium* spp. สายพันธุ์ DASA 32019, DASA 32025 และ DASA 32116 ซึ่งมีอัตราการตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 38.269, 41.343 และ 39.288 ไมโครโมลเอธิลีนต่อกระถางต่อชั่วโมงตามลำดับ โดยที่ DASA 32019 มีจำนวนปมเฉลี่ยเท่ากับ 74 ปม/ต้น น้ำหนักสดปม 2.10 กรัม/ต้น น้ำหนักแห้งปม 0.48 กรัม/ต้น และน้ำหนักแห้งต้นเท่ากับ 4.50 กรัม/ต้น DASA 32025 มีจำนวนปมเฉลี่ยเท่ากับ 108 ปม/ต้น น้ำหนักสดปม 2.93 กรัม/ต้น น้ำหนักแห้งปม 0.63 กรัม/ต้น และน้ำหนักแห้งต้นเท่ากับ 5.92 กรัม/ต้น DASA 32116 มีจำนวนปมเฉลี่ยเท่ากับ 77 ปม/ต้น น้ำหนักสดปม 2.00 กรัม/ต้น น้ำหนักแห้งปม 0.46กรัม/ต้น และน้ำหนักแห้งต้นเท่ากับ

6.10 กรัม/ต้น (ตารางที่ 2) ที่ซึ่งสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นสายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลืองตาแดงพันธุ์พื้นเมืองแม่ฮ่องสอน นอกจากนี้ยังพบว่าไรโซเบียมที่แยกได้ทั้ง 30 สายพันธุ์เป็นเชื้อไรโซเบียมสกุลเดียวกับไรโซเบียมที่ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพสำหรับถั่วเหลืองของกรมวิชาการเกษตร การเลือกใช้สายพันธุ์ผสมของเชื้อไรโซเบียมเพื่อช่วยลดความเสี่ยงในการติดปมให้กับถั่วเมื่อปลูกในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน เนื่องจากในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน เชื้อไรโซเบียมที่คัดเลือกได้อาจมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันด้วย (จิระศักดิ์, 2545)

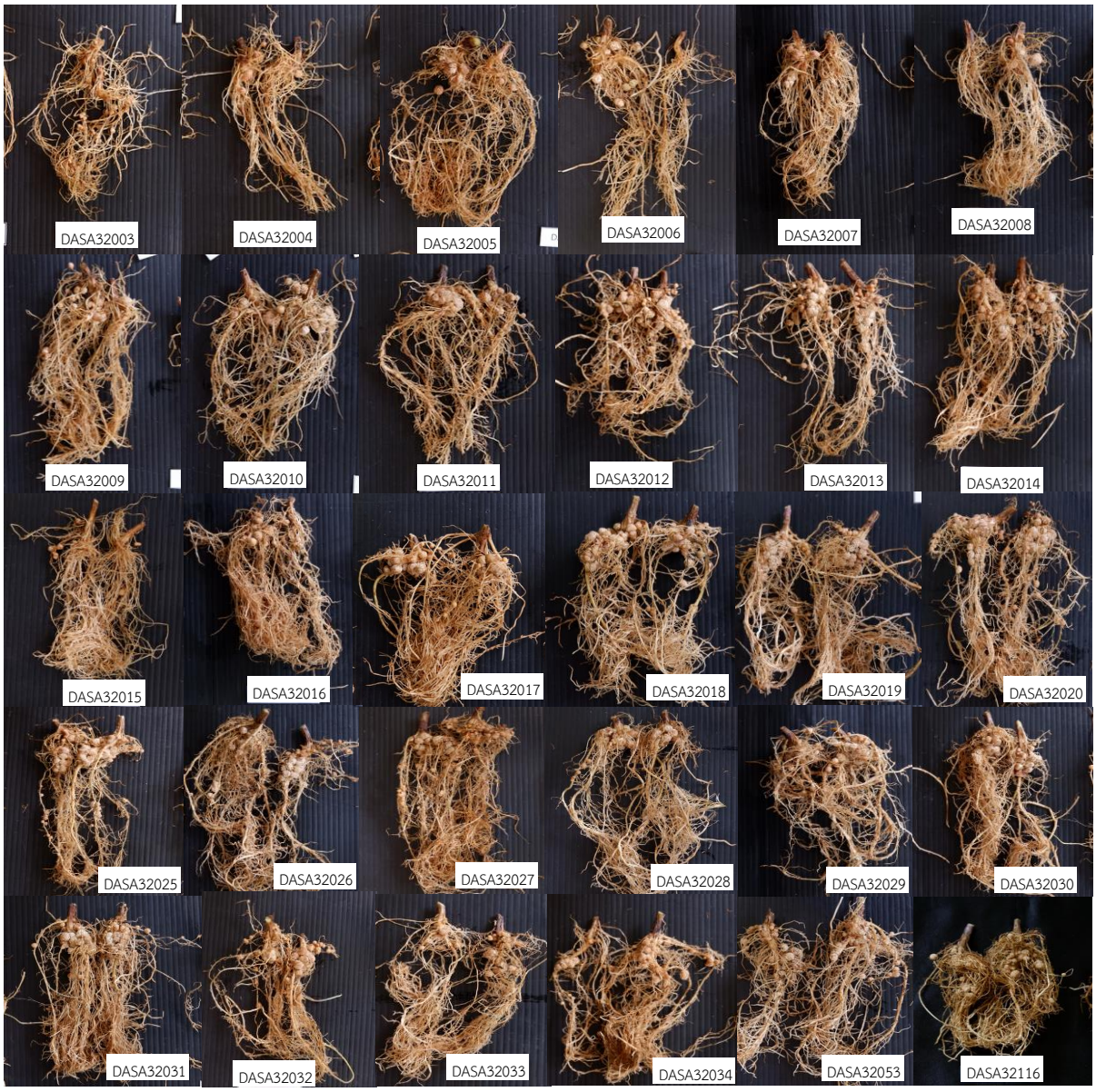
ตารางที่ 2 ผลของ *Bradyrhizobium* spp. 30 สายพันธุ์ที่แยกจากพื้นที่ลุ่มน้ำปาย ต่อจำนวนปม น้ำหนักสดปม น้ำหนักแห้งปม น้ำหนักแห้งต้น และประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน กับถั่วเหลืองตาแดงพันธุ์พื้นเมืองแม่ฮ่องสอน

รหัสชื่อ	จำนวนปม (ปม/ต้น)	น้ำหนักสดปม (กรัม/ต้น)	น้ำหนักแห้งปม (กรัม/ต้น)	น้ำหนักแห้งต้น (กรัม/ต้น)	การตรึงไนโตรเจน (μmol C_2H_4/ กระถาง/ชั่วโมง)
Control(ไม่ใส่เชื้อ)	0	0.00	0.00	1.39	0.199
DASA32003	33	1.13	0.03	0.95	0.791
DASA32004	7	0.26	0.06	1.58	1.745
DASA32005	12	0.51	0.13	1.98	3.959
DASA32006	8	0.56	0.11	1.92	3.101
DASA32007	5	0.25	0.05	1.27	3.110
DASA32008	7	0.36	0.09	1.67	2.962
DASA32009	16	0.73	0.19	2.59	3.046
DASA32010	25	1.07	0.18	2.49	6.521
DASA32011	49	1.65	0.32	2.14	5.579
DASA32012	109	1.64	0.35	3.24	9.520
DASA32013	92	1.50	0.32	3.42	14.685
DASA32014	86	1.72	0.34	4.73	11.436
DASA32015	6	0.11	0.01	0.75	1.055
DASA32016	38	1.06	0.16	1.94	3.953
DASA32017	67	1.45	0.29	2.93	12.388
DASA32018	97	1.98	0.45	3.77	21.342
DASA32019	74	2.10	0.48	4.50	38.269
DASA32020	111	2.65	0.70	5.05	27.856
DASA32025	108	2.93	0.63	5.92	41.343
DASA32026	184	30.22	0.68	7.15	18.562
DASA32027	99	1.95	0.43	5.92	8.180
DASA32028	53	1.43	0.32	5.37	4.316
DASA32029	84	2.71	0.59	6.44	12.477
DASA32030	85	2.07	0.49	5.89	15.457

DASA32031	97	2.89	0.65	7.53	18.873
DASA32032	97	2.29	0.49	7.21	13.097
DASA32033	118	2.99	0.61	7.64	21.817
DASA32034	104	2.91	0.59	6.96	17.700
DASA32053	110	1.76	0.36	2.60	25.592
DASA32116	77	2.00	0.46	6.10	39.288

ภาพที่ 1 การคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลืองตาแดงพันธุ์พื้นเมืองแม่ฮ่องสอน โดยวิธี Leonard’s jar

control


DASA32003
DASA32004
DASA32005
DASA32006
DASA32007
DASA32008
DASA32009
DASA32010
DASA32011
DASA32012
DASA32013
DASA32014
DASA32015
DASA32016
DASA32017
DASA32018
DASA32019
DASA32020
DASA32025
DASA32026
DASA32027
DASA32028
DASA32029
DASA32030
DASA32031
DASA32032
DASA32033
DASA32034
DASA32053
DASA32116

ภาพที่ 2 ลักษณะปมและรากของถั่วเหลืองตาแดงพันธุ์พื้นเมืองแม่ฮ่องสอน ที่ไม่ใส่เชื้อไรโซเบียมและที่ใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* spp. ทั้ง 30 สายพันธุ์

3. การทดสอบผลของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองตาแดงพันธุ์พื้นเมืองแม่ฮ่องสอน ในสภาพกระถางทดลอง

ความอุดมสมบูรณ์ของดินก่อนปลูก ผลวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดินก่อนปลูกที่ระดับ 0-20 เซนติเมตร พบว่ามีอินทรียวัตถุ 2.029 เปอร์เซ็นต์ มีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 84.225 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 205.60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (ตารางที่ 3 ถ้าจะนำมาปลูกถั่วเหลืองให้ได้ผลผลิตดีจะต้องใช้ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม อัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดินสำหรับการปลูกพืชตระกูลถั่ว ซึ่งจากผลวิเคราะห์ดินที่ได้สามารถคำนวนอัตราการใช้ปุ๋ยในการทดลองครั้งนี้ได้ดังนี้ ใส่ในอัตราดังนี้ ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) ในอัตรา 0 กิโลกรัมต่อไร่ ปุ๋ยทริปเปิ้ลซุปเปอร์ฟอสเฟต (0-46-0) ในอัตรา 3 กิโลกรัมต่อไร่ และปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์ (0-0-60) ในอัตรา 0 กิโลกรัมต่อไร่ (กรมวิชาการเกษตร, 2551)

ตารางที่ 3 ผลวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดินก่อนปลูกถั่วเหลืองตาแดงพันธุ์พื้นเมืองแม่ฮ่องสอนในกระถางทดลอง

ความลึก (ซม.)	pH ดิน	อินทรียวัตถุ (เปอร์เซ็นต์)	ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)
0-20	6.59	2.029	84.225	205.60

จากผลการคัดเลือกเชื้อ *Bradyrhizobium* spp. ที่แยกได้จากดินบริเวณลุ่มน้ำปายโดยวิธี Leonard's jar กับถั่วเหลืองตาแดงพันธุ์พื้นเมืองแม่ฮ่องสอน ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการตรึงไนโตรเจนจำนวน 3 สายพันธุ์ นำเชื้อไรโซเบียมทั้ง 3 สายพันธุ์มาทดสอบในระดับกระถางโดยปลูกถั่วเหลืองตาแดง ตามกรรมวิธีที่กำหนด และได้ดำเนินการนับจำนวนปมราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของรากและปมราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งลำต้น และวัดค่าการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมในปมรากของต้นถั่วเหลืองตาแดงในระยะออกดอก อายุ 35 วันหลังปลูก ผลการทดลอง พบว่า ในกรรมวิธีที่ 3 (ใส่ปุ๋ยชีวภาพ *Bradyrhizobium* spp. สายพันธุ์ DASA32116) มีจำนวนปม น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งปม มากที่สุดโดยมีจำนวนปมเท่ากับ 86 ปมต่อต้น น้ำหนักสดปม เท่ากับ 2.61 กรัม และ น้ำหนักแห้งปม เท่ากับ 0.51 กรัม ในทุก ๆ กรรมวิธีของจำนวนปม น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งปม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ น้ำหนักสดราก น้ำหนักแห้งราก ในกรรมวิธีที่ 2 (ปุ๋ยชีวภาพ

Bradyrhizobium spp. สายพันธุ์ DASA32025 มีน้ำหนักมากที่สุดเท่ากับ 8.69 และ 2.08 ตามลำดับ โดยในกรรมวิธีที่ 2 มีความแตกต่างจากกรรมวิธีที่ 5 (ปุ๋ยชีวภาพ *Bradyrhizobium* spp. ผสมระหว่างสายพันธุ์ DASA32019+ DASA32025+ DASA32116 และกรรมวิธีที่ 7 (ใส่ปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดินคือใส่ปุ๋ยทริปเปิ้ลซุปเปอร์ฟอสเฟต(0-46-0) ในอัตรา 3 กิโลกรัมต่อไร่) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น้ำหนักสดต้น น้ำหนักแห้งต้นในกรรมวิธีที่ 3 (ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA32116 มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 76.83 กรัม และ 17.41 กรัม ตามลำดับ โดยกรรมวิธีที่ 3 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 7 และค่าการตรึงไนโตรเจนพบว่ากรรมวิธีที่ 7 (ใส่ปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน) มีค่าการตรึงไนโตรเจนมากที่สุดเท่ากับ 24.13 µmol C_2H_4/ ต้น/ชั่วโมง รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ 4 (ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลืองของกรมวิชาการเกษตร) กรรมวิธีที่ 3 (ใส่ปุ๋ยชีวภาพชีวภาพ *Bradyrhizobium* spp. สายพันธุ์ DASA32116 เท่ากับ 23.16 µmol C_2H_4/ ต้น/ชั่วโมง และพบว่ากรรมวิธีที่ 1, 2 และ 6 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 7 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 จำนวนปมราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของราก ปมราก และลำต้น และค่าการตรึงไนโตรเจนของ *Bradyrhizobium* spp. ในปมรากของต้นถั่วเหลืองในระยะออกดอก อายุ 35 วันหลังปลูก

กรรมวิธี	จำนวนปม/ต้น	น้ำหนักสดปม (กรัม)/ต้น	น้ำหนักแห้งปม (กรัม)/ต้น	น้ำหนักสดราก(กรัม)/ต้น	น้ำหนักแห้งราก (กรัม)/ต้น	น้ำหนักสดต้น (กรัม)/ต้น	น้ำหนักแห้งต้น (กรัม)/ต้น	ค่าการตรึงไนโตรเจน (µmol C_2H_4 / ต้น/ชั่วโมง
Bradyrhizobium DASA32019 (A)	64	1.26	0.28	**6.93 abc**	**1.73 abc**	**73.80 ab**	**17.16 ab**	**12.91 b**
Bradyrhizobium DASA32025 (B)	60	1.41	0.31	**8.69 a**	**2.08 a**	**64.89 ab**	**16.30 ab**	**14.89 b**
Bradyrhizobium DASA32116 (C)	86	2.61	0.51	**8.34 ab**	**2.03 a**	**76.83 a**	**17.41 a**	**23.16 ab**
Bradyrhizobium sp. กรมวิชาการฯ	77	1.67	0.43	**7.54 ab**	**1.83 abc**	**58.34 ab**	**13.95 ab**	**24.13 ab**
Bradyrhizobium A + B + C	68	1.53	0.36	**6.26 bc**	**1.30 bc**	**65.66 ab**	**15.53 ab**	**17.65 ab**
ไม่ใส่ปุ๋ย	48	1.03	0.24	**7.75 ab**	**1.88 ab**	**62.09 ab**	**14.37 ab**	**12.68 b**
ปุ๋ยทริปเปิ้ลซุปเปอร์ฟอสเฟตในอัตรา 3 กิโลกรัมต่อไร่	78	1.72	0.41	**4.98 c**	**1.14 c**	**52.50 b**	**12.61 b**	**28.14 a**
CV	36.44	38.61	40.93	**15.47**	**21.63**	**17.63**	**15.71**	**35.62**

ผลผลิตถั่วเหลืองตาแดงที่ปลูกในกระถางทดลอง เก็บเกี่ยวผลผลิตเมื่อต้นถั่วมีอายุได้ 105 วัน หลังปลูก พบว่าจำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดทั้งหมด น้ำหนักเมล็ด และ น้ำหนัก 100 เมล็ดในทุก ๆ กรรมวิธีการใส่ปุ๋ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยพบว่ากรรมวิธีการใส่ปุ๋ยชีวภาพ *Bradyrhizobium* spp. สายพันธุ์ DASA32025 ให้จำนวนฝัก/ต้น จำนวนเมล็ดทั้งหมด น้ำหนักเมล็ดทั้งหมด มากที่สุด เท่ากับ 67 ฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดทั้งหมด 225 เมล็ด และ นน.เมล็ด เท่ากับ 33.15 กรัม และเมื่อนำเชื้อผสม 3 สายพันธุ์มาใช้ พบว่ามีจำนวนฝักต่อต้นเท่ากับ 55 ฝัก จำนวนเมล็ดทั้งหมด เท่ากับ 172 เมล็ด และน้ำหนักเมล็ด เท่ากับ 28.69 กรัม (ตารางที่ 5)

เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่จำเป็นในการสร้าง ATP ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่ใช้ในการตรึงไนโตรเจน การเปลี่ยนแก๊สไนโตรเจน 1 โมเลกุลให้เป็น NH_4 2 โมเลกุลต้องใช้ ATP จำนวน 16 โมเลกุล (หนึ่ง, 2554) ในกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยทริปเปิ้ลซุปเปอร์ฟอสเฟต จึงมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนได้มากกว่ากรรมวิธีที่ไม่ใส่ปุ๋ย เนื่องจากมีธาตุฟอสฟอรัสเพียงพอต่อความต้องการ และดินที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีเชื้อไรโซเบียมท้องถิ่น (indigenous species) อยู่จำนวน 1.12×10^3 เซลล์ต่อดิน 1 กรัม

ตารางที่ 5 จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดทั้งหมด น้ำหนักเมล็ดแห้ง น้ำหนัก 100 เมล็ด ของถั่วเหลืองตาแดงเก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 105 วันหลังปลูก

กรรมวิธี	จำนวนฝัก/ต้น	จำนวนเมล็ดทั้งหมด	นน.เมล็ดทั้งหมด	นน. 100 เมล็ด
Bradyrhizobium DASA32019 (A)	52	161	30.57	15
Bradyrhizobium DASA32025 (B)	67	225	33.15	14.26
Bradyrhizobium DASA32116 (C)	57	207	29.7	15.01
B. japonicum กรมวิชาการฯ	53	172	26.44	14.91
Bradyrhizobium A+B+C	55	207	28.69	14.33
ไม่ใส่ปุ๋ย	55	195	27.2	14.33
ปุ๋ยทริปเปิ้ลซุปเปอร์ฟอสเฟตในอัตรา 3 กิโลกรัมต่อไร่	51	186	25.63	14.42
CV	20.63	17.23	17.23	7.26

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่แยกจากดินที่เก็บตัวอย่างในช่วงฤดูหนาว (เดือนธันวาคม) ฤดูร้อน (เดือนเมษายน) และฤดูฝน (เดือนกรกฎาคม) จากพื้นที่ 4 แหล่ง คือ 1) พื้นที่ป่าต้นน้ำ (19° 23' N 97° 57' E) ดินพื้นที่ทำการเกษตรต้นน้ำ (19° 23' N 97° 57' E) 3) พื้นที่ป่าปลายน้ำ (19° 11' N 97° 59' E) และ 4) ดินพื้นที่ทำการเกษตรปลายน้ำ (19° 11' N 97° 59' E) จากบริเวณลุ่มน้ำปาย จ.แม่ฮ่องสอน โดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนให้แก่ถั่วเหลืองตาแดงพันธุ์พื้นเมืองแม่ฮ่องสอน พบว่ามีสายพันธุ์ไรโซเบียมที่เหมาะสมจำนวน 3 สายพันธุ์ จาก30 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bradyrhizobium* spp. สายพันธุ์ DASA 32019, DASA 32025 และ DASA 32116 ซึ่งทั้งสามสายพันธุ์เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการทำการทดลองในขั้นต่อ ๆ ไป

ผลของเชื้อ *Bradyrhizobium* spp. สายพันธุ์ DASA 32019, DASA 32025 และ DASA 32116 ที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองตาแดงพันธุ์พื้นเมืองแม่ฮ่องสอน ในสภาพกระถางทดลอง ผลปรากฏว่ากรรมวิธีที่ 3 (ใส่ปุ๋ยชีวภาพ *Bradyrhizobium* spp. สายพันธุ์ DASA32116) มีจำนวนปม น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งปม มากที่สุด น้ำหนักสดราก น้ำหนักแห้งราก ในกรรมวิธีที่ 2 (ปุ๋ยชีวภาพ *Bradyrhizobium* spp. สายพันธุ์ DASA32025) มีน้ำหนักมากที่สุดและ มีความแตกต่างจากกรรมวิธีที่ 5 (ปุ๋ยชีวภาพ *Bradyrhizobium* spp. สายพันธุ์ผสม DASA32019+ DASA32025+ DASA32116) และกรรมวิธีที่ 7 (ใส่ปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น้ำหนักสดต้น น้ำหนักแห้งต้นในกรรมวิธีที่ 3 (ใส่ปุ๋ยชีวภาพ *Bradyrhizobium* spp. สายพันธุ์ DASA32116) มีค่ามากที่สุด โดยกรรมวิธีที่ 3 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 7 และค่าการตรึงไนโตรเจนพบว่ากรรมวิธีที่ 7 (ใส่ปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน) มีค่าการตรึงไนโตรเจนมากที่สุด รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ 4 (ปุ๋ยชีวภาพ *Bradyrhizobium japonicum* สำหรับถั่วเป้าหมาย) กรรมวิธีที่ 3 (ใส่ปุ๋ยชีวภาพ *Bradyrhizobium* spp. สายพันธุ์ DASA32116) และพบว่ากรรมวิธีที่ 1, 2 และ 6 ค่าการตรึงไนโตรเจนน้อยและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 7

ข้อมูลผลผลิตของถั่วเหลืองตาแดงพันธุ์พื้นเมืองแม่ฮ่องสอน เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 105 วันหลังปลูกจำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดทั้งหมด น้ำหนักเมล็ด และ น้ำหนัก 100 เมล็ดในทุก ๆ กรรมวิธีการใส่ปุ๋ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ การใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* spp. สายพันธุ์ DASA 32025 เพียงอย่างเดียวให้จำนวนฝัก/ต้น จำนวนเมล็ดทั้งหมด นน.เมล็ดทั้งหมด มากที่สุด และพบว่าการนำเชื้อไรโซเบียมที่แยกได้จากพื้นที่ลุ่มน้ำปายมาผสม 3 สายพันธุ์ พบว่าให้ผลผลิตที่ดีกว่าปุ๋ยชีวภาพสำหรับถั่วเหลืองที่ผลิตโดยกรมวิชาการเกษตรซึ่งเป็น *Bradyrhizobium japonicum*

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : จากผลการคัดเลือกและผลการทดลองในระดับกระถางทดลองของสายพันธุ์ไรโซเบียมที่แยกได้จากพื้นที่ลุ่มน้ำปาย ได้ข้อมูลที่เป็นแนวทางในการนำไปทดสอบกับการปลูกถั่วเหลืองตาแดงพันธุ์พื้นเมืองแม่ฮ่องสอนในระดับแปลงทดลองของพื้นที่ลุ่มน้ำปาย โดยข้อมูลที่ได้สามารถนำไปเผยแพร่และนำสายพันธุ์ไรโซเบียมที่ผ่านการคัดเลือกกับถั่วสายพันธุ์ดังกล่าวมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมเพื่อให้เกษตรกรในพื้นที่ลุ่มน้ำปายได้นำไปใช้ในการปลูกถั่วเพื่อลดต้นทุนการผลิตต่อไป

11. เอกสารอ้างอิง

จิระศักดิ์ อรุณศรี. 2545. ชีววิทยาและการใช้ประโยชน์ของเชื้อ ไรโซเบียม. น. 23-62. *ใน*: เอกสาร

วิชาการ ปุ๋ยชีวภาพ. กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการ เกษตร ปี พ.ศ. 2545.

หนึ่ง เตียอำรุง. 2554. แบคทีเรียตรึงไนโตรเจน. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 251 หน้า.

Atieno, M., L. Herrmann, R. Okalebo, and D. Lesueur. 2012. Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicumand* effect of co-inoculation of Bacillus subtilis with two different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 28(7) : 2541-2550.

Aung, T.T., P. Tittabutr, N. Boonkerd, D. Herridge, and N.Teaumroong. 2013. Co-inoculation effects of *Bradyrhizobium japonicum* and Azospirillum sp. on competitive nodulation and rhizosphereeubacterial community structures of soybean under rhizobia-established soil conditions. Afr. J. Biotech. 12(20) : 2850-2862.

Boonkerd, N., Weber, D.F., Bezdicek, D.F., 1978. Influ-ence of *Rhizobium japonicum* strains and inoculation methods on soybeans grown in rhizobia-populated soil. Agron. J. 70, 547–549.

Boonkerd, N. and R.W. Weaver. 1982. Survival of cowpea rhizobia in soil as effect by soil temperature and moisture. Appl. Environ. Microbial. 43 : 585-589.

Boonkerd, N. and S. Promsiri. 1993. Effectiveness in N2 fixation of Sesbania speciosa and Sesbania rostrata rhizobia isolated from different locations. Kasetsart J. 27 : 292-302.

Broughton, W.J. and M.J. Dilworth, 1971. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. Biochem. J., 125: 1075-1080.

Cook, R. J., and K.F. Baker. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens.Amer. Phytopathol.Soc. St. Paul, Minnesota. 539 pp.

Dashti, N., F. Zhang, R. Hynes, and D.L. Smith. 1998. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by

field grown soybean (Glycine max (L.) Merr.)under short season conditions. Plant Soil 200 : 205-213.

Duzan, H.M., X. Zhou, A. Souleimanov, and D.L. Smith. 2004. Perception of *Bradyrhizobium japonicum* Nod factor by soybean [Glycine max (L.) Merr.]root hairs under abiotic stress conditions. Journal of Experimental Botany 55(408) : 2641-2646.

Glick, B. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol. 41(2): 109-117.

Pan, B., J.K. Vessey, and D.L. Smith. 2002. Response of field-grown soybean to co-inoculation with the plant growth promoting rhizobacteria *Serratia proteamaculans* or *Serratia liquefaciens*, and *Bradyrhizobium japonicum* pre-incubated with genistein. European Journal of Agronomy. 17(2) : 143-153.

Weaver, R.W.,D.R. Morris, N.Boonkerd and J. Sij. 1987. Populations of *Bradyrhizobium japonicum* in field cropped with soybean-rice rotation. Soil. Sci. Soc. Am. J. 51: 90-91.

Wu, F., Wan, Judy Hon C., S. Wu, and M. Wong. 2012. Effects of earthworms and plant growth–promoting rhizobacteria (PGPR) on availability of nitrogen, phosphorus and potassium in soil. J. Pl. Nutr. Soil Sci. 175(3) : 423-433.

Zahir, Z.A., M. Zafar-ul-Hye, S. Sajjad, and M. Naveed. 2011. Comparative effectiveness of Pseudomonas and Serratiasp. containing ACC-deaminase for coinoculation with *Rhizobium leguminosarum* to improve growth, nodulation, and yield of lentil. Biology and Fertilizer of Soil. 47(4) : 457-465.

Zhang, H., T.C. Charles, B. Driscoll, T. Prithiviraj, and D.L. Smith. 2002. Low temperature-tolerant *Bradyrhizobium japonicum* strains allowing improved soybean yield in short-season. Agron. J. 94: 870-875.