อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การวิจัยนี้มีการดำเนินงานแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การปลูกพืชทดสอบในพื้นที่เกษตรกร

เป็นการดำเนินการเพื่อให้พืชที่ทดสอบเกิดปมโดยไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมืองที่มีอยู่ในดินตามธรรมชาติ ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

ก. การเลือกพื้นที่

พื้นที่ทดสอบเลือกจากบริเวณที่มีการปลูกถั่วเหลือง ในเขตภาคเหนือตอนบนและภาคเหนือตอนล่าง ซึ่งเกษตรกรมีการปลูกถั่วเหลืองมานานโดยไม่ใช้เชื้อไรโซเบียมมาก่อน สำหรับเขตภาคเหนือตอนบนซึ่งมีการปลูกถั่วเหลืองในช่วงฤดูหนาวหลังการทำนาปีโดยอาศัยน้ำชลประทาน ผู้วิจัยกำหนดให้อยู่ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดแม่ฮ่องสอน พื้นที่ละ 1 จุด พื้นที่ที่ได้คัดเลือกไว้สำหรับการทดสอบ ได้แก่ พื้นที่ของนายหา ยาบัว บ้านไร่ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่ และพื้นที่ของนายสมพล ศรีวิชัย บ้านลุ่ม อำเภอแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอน ในเขตภาคเหนือตอนล่างซึ่งมีการปลูกถั่วเหลืองในช่วงฤดูฝนโดยอาศัยน้ำฝนแต่เพียงอย่างเดียว ผู้วิจัยกำหนดให้อยู่ในพื้นที่ของจังหวัดสุโขทัย และจังหวัดอุตรดิตถ์ พื้นที่ละ 1 จุด พื้นที่คัดเลือกไว้ ได้แก่ พื้นที่ของนายถวัลย์ คล้ำเพชร บ้านวังแดง อำเภอตรอน จังหวัดอุตรดิตถ์และพื้นที่ของนายสด ชาวไร่ อำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัย

ข. การปลูกพืชทดสอบ

พืชที่ใช้ปลูกเพื่อทดสอบ มีดังต่อไปนี้

1. ถั่วที่ไม่จำเพาะเจาะจงในการเกิดปมกับสายพันธุ์ไรโซเบียม ได้แก่ ถั่วหลืองพันธุ์ป่า (Glycine usseriensis) และถั่วพุ่ม (Vigna unguiculata)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ถั่วเหลืองพันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ ถั่วเหลืองผิวดำ และถั่วเหลืองพันธุ์สานเขียว ซึ่งปลูกในอำเภอปาย จังหวัดแม่ฮ่องสอน

3. ถั่วเหลืองพันธุ์มาตรฐาน ได้แก่ ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5

4. ถั่วเหลืองจากประเทศสหรัฐอเมริกา ได้แก่ ถั่วเหลืองพันธุ์ Improved Pelican พันธุ์ Forrest และสายพันธุ์ 7842

สำหรับการปลูกถั่วฝุ่ม ถั่วเหลืองพันธุ์ป่า ถั่วเหลืองผิวดำ ถั่วเหลืองพันธุ์สานเขียว ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 และพันธุ์ Improved Pelican จะปลูกในทุกพื้นที่ แต่ถั่วเหลืองพันธุ์ Forrest จะปลูกเฉพาะพื้นที่จังหวัดแม่ฮ่องสอน และพันธุ์ 7842 จะปลูกเฉพาะในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่

ในการเตรียมพื้นที่ และวิธีการปลูกถั่วในพื้นที่ทดสอบ จะใช้วิธีการเช่นเดียวกับที่เกษตรกรปฏิบัติ กล่าวคือ ในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน มีการเตรียมพื้นที่สำหรับการปลูกถั่วเหลือง ประมาณต้นเดือนมกราคม หลังจากการเก็บเกี่ยวข้าวนาปี โดยการเผาตอซังข้าวและฟางที่เกลี่ยไว้บนผิวดิน หลังจากนั้นจึงปล่อยน้ำเข้าสู่พื้นที่เพื่อให้ดินชื้น เมื่อดินหมาดจึงหยอดเมล็ดลงในหลุม ซึ่งเจาะให้มีความลึกประมาณ 2 เซนติเมตร โดยการใช้ท่อนไม้กระทุ้งดิน กลบหลุมด้วยขี้เถ้าจากฟางข้าว ใช้ระยะปลูกระหว่างหลุม 15 เซนติเมตร และระหว่างแถว 50 เซนติเมตร ในแต่ละพื้นที่จะปลูกพืชทดสอบพันธุ์ละ 1 แถว แถวละ 10 หลุม โดย 1 หลุม ให้มีต้นถั่ว 2-3 ต้น สำหรับในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง มีการเตรียมดินปลูกถั่วเหลืองโดยใช้รถไถ หลังจากไถพรวนดินแล้วจึงทำการหยอดเมล็ดประมาณต้นเดือนมิถุนายน ใช้ระยะระหว่างแถวและระยะระหว่างหลุมเช่นเดียวกับการปลูกในพื้นที่ภาคเหนือตอนบน การดูแลรักษาต้นถั่วหลังการหยอดเมล็ดจะปฏิบัติเช่นเดียวกับเกษตรกรเจ้าของพื้นที่ คือ ไม่มีการใช้ปุ๋ยวิทยาศาสตร์ แต่มีการใช้สารเคมีกำจัดโรคและแมลงเมื่อจำเป็น

การปลูกถั่วเหลืองในการทดลองส่วนนี้ ในเขตภาคเหนือตอนบนทำการปลูกเมื่อวันที่ 8 มกราคม 2528 และเขตภาคเหนือตอนล่างทำการปลูกเมื่อวันที่ 10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มิถุนายน 2528

ค. <u>การเก็บปมตัวอย่างเพื่อใช้ในการแยกเชื้อ</u>

ทั้งในเขตภาคเหนือตอนบน และภาคเหนือตอนล่าง ผู้วิจัยจะทำการเก็บปมถั่วหลังจากหยอดเมล็ดแล้ว 70 วัน การเก็บตัวอย่างทำโดยการขุดรากของต้นถั่วแต่ละพันธุ์ด้วยความระมัดระวัง เพื่อให้ปมอยู่ติดกับรากมากที่สุดแล้วใช้น้ำชะดินที่ติดอยู่กับรากออก หลังจากนั้นจึงแกะปมออกจากราก แล้วสุ่มตัวอย่างปมถั่วจากปมถั่วทั้งหมดที่ได้จากถั่วแต่ละพันธุ์ในแต่ละพื้นที่จำนวน 10 ปมต่อพันธุ์ เพื่อใช้ในการแยกเชื้อไรโซเบียม สำหรับปมถั่วที่เหลือ เก็บไว้ในหลอดแก้วที่มี silica gel บรรจุอยู่ เพื่อใช้สำหรับการแยกเชื้อต่อไปภายหลัง ถ้าหากไม่สามารถแยกเชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์จากตัวอย่างปมถั่วที่สุ่มไว้ในครั้งแรกได้

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> การทดลองในห้องปฏิบัติการ

เป็นช่วงการดำเนินการเพื่อแยกเชื้อไรโซเบียมจากปมถั่ว การทำให้เชื้อบริสุทธิ์ การจำแนกสายพันธุ์ไรโซเบียม และการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมือง ใช้ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางดิน ภาควิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในช่วงเดือนมีนาคม 2528 ถึงเดือนกันยายน 2531 โดยใช้อุปกรณ์และวิธีการ ดังต่อไปนี้

1. <u>การแยกเชื้อไรโซเบียมจากปมถั่วตัวอย่าง</u>

1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกเชื้อ

1.1.1 น้ำยาสำหรับใช้ฆ่าเชื้อที่ผิวปม

ethanol 95%

Calcium hypochlorite (Clorox) 3%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

1.1.2 เครื่องล้างปมถั่ว (nodule sterilizer) ดังแสดงในรูปที่ 1

1.1.3 อุปกรณ์สำหรับการแยกและเพาะเชื้อ

ไม้จิ้มฟันที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อใช้แทน loop ในการ streak เชื้อดังแสดงในรูปที่ 2

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar airflow carbinet)

ตู้เพาะเชื้อ (incubator)

จานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

หลอดทดลองฝาเกลียวขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง x ความยาว = 13 มิลลิเมตร x 100 มิลลิเมตร สำหรับใช้เก็บเชื้อ

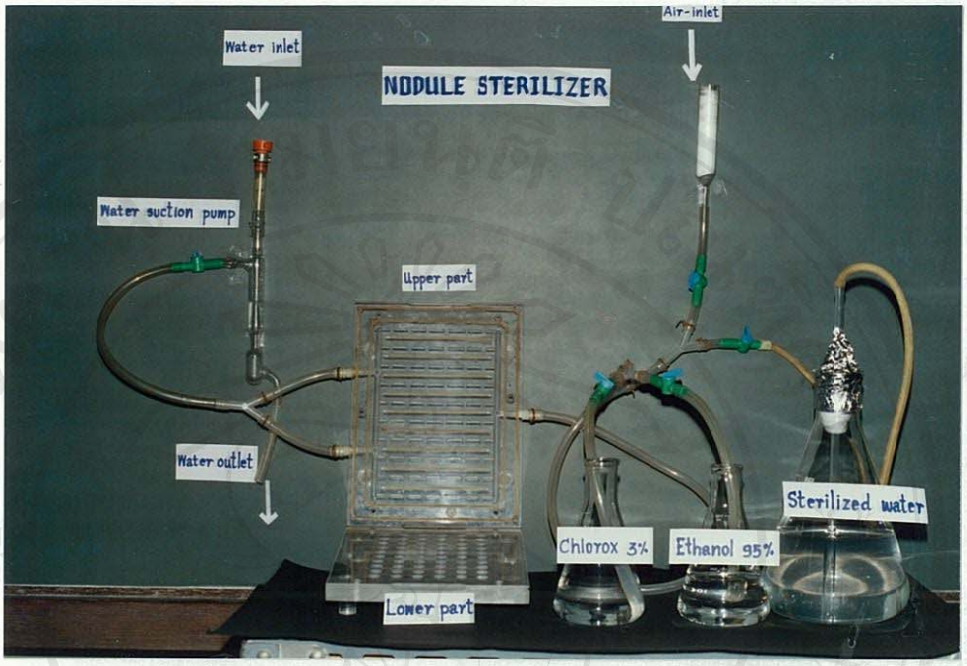
1.1.4 อาหารสำหรับแยกเชื้อไรโซเบียม Yeast mannitol congo red agar (ภาคผนวก หน้า 175)

1.1.5 อาหารสำหรับเก็บเชื้อไรโซเบียม Yeast mannitol agar (ภาคผนวก หน้า 175)

1.2 วิธีการแยกเชื้อมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.2.1 การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดอยู่บนผิวปม นำปมถั่วใส่ในเครื่องล้างปม ซึ่งสามารถล้างปมได้ครั้งละ 60 ปม โดยใส่ 1 ปมต่อหลุม ใช้ผ้าขาวบางวางทับลงบนฝาด้านล่างของเครื่องล้างปม ก่อนที่จะปิดด้วยฝาด้านบน ขันน็อตให้แน่นเพื่อให้ฝาด้านบนและล่างของเครื่องล้างประกบกันอย่างสนิท หลังจากนั้นจึงดูดอากาศออกจากเครื่องโดยใช้เครื่องดูดอากาศด้วยแรงน้ำ (water suction pump) ต่อจากนั้นจึงปล่อยน้ำยาล้างปมแต่ละอย่างเข้าไปในเครื่องล้างปม เพื่อล้างปมตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ ขั้นตอนแรกใช้ ethanol 95% แช่ปมเป็นเวลานาน 3 นาที ขั้นตอนที่ 2 ใช้ Calcium hypochlorite 3% แช่ปมเป็นเวลานาน 15 นาที ซึ่งเป็นวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Somasegaran et al. (1982) โดยใช้เวลาที่นานกว่า เนื่องจากวิธีการดังกล่าวมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 1 เครื่องล้างปม (nodule sterilizer)

รูปที่ 2 ไม้จิ้มฟันที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้แทน loop

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โอกาสเกิดการปนเปื้อนของเชื้อได้มากกว่า ขั้นตอนสุดท้ายใช้น้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ล้างปม เป็นจำนวน 7 ครั้ง ในการดูดน้ำยาล้างปมแต่ละชนิดเข้าและออกจากเครื่องล้างปมจะใช้เครื่องดูดอากาศด้วยแรงน้ำ หลังจากขั้นตอนสุดท้ายนี้แล้ว ปมเหล่านี้ก็พร้อมที่จะใช้ในการแยกเชื้อต่อไป

1.2.2 การแยกเชื้อไรโซเบียมจากปม ใช้ไม้จิ้มฟันที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วทำให้ปมแตกและใช้ไม้ดังกล่าวจิ้มน้ำจากปมแตะลงบนอาหาร Yeast mannitol congo red agar ซึ่งบรรจุอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วทำให้เจือจางลง โดยการเขี่ยเชื้อต่อไปอีกด้วยไม้จิ้มฟันที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วอันใหม่ สำหรับขั้นตอนทั้งหมดในการแยกเชื้อนี้ดำเนินการในตู้ปลอดเชื้อ เก็บจานเลี้ยงเชื้อไว้ในตู้เพาะเชื้อ ที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมี colony เดี่ยวเกิดขึ้น

1.2.3 การเก็บเชื้อไรโซเบียม เชื้อไรโซเบียมที่แยกได้จากปมถั่วจะนำมาทำให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะนำไปเก็บใน slant ซึ่งใช้ yeast mannitol agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ และใช้หลอดทดลองฝาเกลียว เป็นภาชนะบรรจุ เก็บรักษา slant นี้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการดำเนินงานขั้นต่อไป

2. <u>การทดสอบเชื้อไรโซเบียม (Authentication)</u>

เนื่องจากเชื้อไรโซเบียมมีคุณสมบัติเฉพาะตัว ซึ่งต่างจากแบคทีเรียอื่น ๆ คือมีความสามารถในการสร้างปมที่รากพืชตระกูลถั่ว ดังนั้นจึงสามารถใช้คุณสมบัตินี้ในการทดสอบว่าเชื้อที่แยกได้จากปมถั่วเป็นไรโซเบียมหรือไม่ ในการทดสอบได้ใช้ถั่วซิราโตร (<u>Macroptillium atropurpureum</u> cv. Siratro) เป็นพืชทดสอบ เนื่องจากพืชตระกูลถั่วชนิดนี้สามารถเกิดปมได้กับไรโซเบียมทุกสายพันธุ์ โดยใช้อุปกรณ์และวิธีการดังนี้

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบเชื้อไรโซเบียม

2.1.1 เมล็ดพันธุ์ถั่วซิราโตร (<u>Macroptillium atropurpureum</u> cv. Siratro)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2 เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมืองที่ได้จากหัวข้อ 1.2.3

2.1.3 อุปกรณ์สำหรับเพิ่มปริมาณเชื้อที่ใช้ทดสอบ

- loop
- erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมจุกสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อ (Yeast mannitol broth) ซึ่งมีส่วนผสมเช่นเดียวกับ Yeast manitol agar แต่ไม่ใส่วุ้นลงไปในอาหารเท่านั้น

2.1.4 อุปกรณ์สำหรับเพาะเมล็ดถั่ว

- กรดกำมะถันเข้มข้น
- น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- จานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว
- กระดาษชำระ

2.1.5 อุปกรณ์สำหรับปลูกถั่ว

- ถุงพลาสติกอย่างหนา ขนาด 5 x 7 1/2 นิ้ว
- กระดาษฟาง
- ชั้นวางถุง
- เครื่องเชื่อมพลาสติคชนิดใช้ไฟฟ้า
- สารละลายที่ใช้ในการปลูกถั่ว ที่มีธาตุอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของถั่วครบทุกชนิด ยกเว้นธาตุไนโตรเจน ซึ่งมีสูตรอาหารดังตารางที่ 1

2.1.6 ห้องสำหรับปลูกถั่ว ซึ่งติดหลอดนีออนที่ให้แสงสีแดง (GL 40 W t12-12A) สำหรับให้แสงสว่างแก่ต้นถั่วเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน และปรับอุณหภูมิด้วยเครื่องปรับอากาศ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 สารละลายใช้สำหรับปลูกถั่วที่ไม่มีธาตุไนโตรเจน (Somasegaran, 1982)

Stock Solutions	Element	uM	Form	MW	g/l	M
1	Ca	1000	$CaCl_2.2H_2O$	147.03	294.1	2.0
2	P	500	KH_2PO_4	136.09	136.1	1.0
3	Fe	10	Fe citrate	355.04	6.7	0.02
	Mg	250	$MgSO_4.7H_2O$	246.5	123.3	0.5
	K	250	K_2SO_4	174.06	87.0	0.5
	Mn	1	$MnSO_4.H_2O$	169.02	0.338	0.002
4	R	2	H_3BO_3	61.84	0.247	0.004
	Zn	0.5	$ZnSO_4.7H_2O$	287.56	0.288	0.001
	Cu	0.2	$CuSO_4.5H_2O$	249.69	0.100	0.0004
	Co	0.1	$CoSo_4.7H_2O$	281.12	0.056	0.0002
	Mo	0.1	$Na_2MoO_2.2H_2O$	241.98	0.048	0.0002

ถ้าต้องการเตรียมสารละลายปริมาณ 10 ลิตร : ใช้ Stock Solution ที่ 1-4 ชนิดละ 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 5 ลิตร แล้วทำให้เจือจางโดยเติมน้ำกลั่นเพิ่มจนสารละลายมีปริมาตร 10 ลิตร ปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 6.5-7.0 ด้วย 1 N NaOH

ในกรณีที่ต้องการสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชที่มีธาตุไนโตรเจน ให้เติม KNO_3 ในอัตราส่วน 0.5 กรัม KNO_3 ต่อสารละลาย 1 ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 วิธีการทดสอบเชื้อไรโซเบียม

2.2.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อบริสุทธิ์แต่ละเชื้อเพาะลงในอาหาร Yeast mannitol broth ซึ่งบรรจุใน erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน flask ละ 20 มิลลิลิตร แล้วปิดด้วยจุกสำลี นำไปวางไว้บนเครื่องเขย่าซึ่งมีความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งเชื้อมีจำนวนประมาณ 10^9 เซล/มิลลิลิตร การวัดปริมาณเชื้อที่เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว จะทำโดยการคาดคะเนจากความขุ่นของอาหาร โดยนำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เชื้อเจริญจนอาหารมีความขุ่นทาบลงบนกระดาษหนังสือพิมพ์ ถ้าความขุ่นของอาหารมีมากจนทำให้ไม่สามารถเห็นตัวอักษรที่อยู่บนกระดาษนั้นได้ แสดงว่ามีเชื้อในปริมาณตามที่ต้องการ (Somasegaran et al., 1982)

2.2.2 การเพาะถั่วซิราโตร เนื่องจากเมล็ดถั่วชนิดนี้ มีเปลือกหุ้มเมล็ดหนา จึงจำเป็นต้องช่วยให้เมล็ดงอกได้เร็วขึ้น โดยแช่เมล็ดในกรดกำมะถันเข้มข้นเป็นเวลานาน 5 นาที เทกรดออกแล้วล้างด้วยน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง หลังจากนั้นแช่เมล็ดถั่วไว้ในน้ำนั้นนาน 12 ชั่วโมง จึงนำไปเพาะในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ใช้กระดาษชำระที่ชื้นเป็นวัสดุเพาะตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งต้นถั่วงอก ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 วัน

2.2.3 การเตรียมภาชนะปลูก เมื่อถั่วซิราโตรงอกแล้ว นำไปปลูกในถุงพลาสติก ซึ่งภายในมีกระดาษฟางบรรจุอยู่เพื่อใช้ในการค้ำจุนรากและดูดซับสารละลายที่ใช้ปลูกถั่ว สารละลายที่ใช้ปลูกถั่วมีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของถั่วครบทุกชนิดยกเว้นไนโตรเจน โดยให้สารละลายดังกล่าวปริมาตร 30 มิลลิลิตรต่อต้น ในการปลูกถั่วซิราโตรนี้จะใช้ถั่ว 2 ต้นต่อถุงพลาสติก 1 ใบ โดยแยกถุงพลาสติกแต่ละใบออกเป็น 2 ส่วนด้วยเครื่องเชื่อมพลาสติกชนิดใช้ไฟฟ้า นำถุงพลาสติกดังกล่าวตั้งไว้ในที่วางถุง แล้วนำถั่วดังกล่าวไปปลูกในห้องทดลอง ลักษณะของชั้นวางถุง และสภาพการปลูกถั่วในห้องปฏิบัติการ แสดงไว้ในรูปที่ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 2 ชั้นวางถุงปลูกถั่ว และสภาพการปลูกถั่วใต้แสงไฟ ในห้องปฏิบัติการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.4 การปลูกเชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 2.2.1 แต่ละเชื้อใส่ให้แก่ต้นถั่ว จำนวน 2 ต้น ต้นละ 1 มิลลิลิตร เมื่อต้นถั่วอายุ 5 วัน และปล่อยให้ต้นถั่วเจริญเติบโตต่อไปเป็นเวลานาน 15 วัน โดยไม่จำเป็นต้องใส่สารละลายธาตุอาหารให้แก่ต้นถั่วอีก

2.2.5 การประเมินผล สังเกตการเกิดปมที่รากของต้นถั่วที่ได้รับการเพาะเชื้อ หลังจากการเพาะเชื้อให้แก่ต้นถั่วแล้ว 15 วัน ถ้าเชื้อที่ทดสอบเป็นเชื้อไรโซเบียมจะเห็นปมเกิดขึ้นที่รากของต้นถั่ว

3. <u>การจำแนกไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมืองโดยวิธีการทางซีรัม</u>

เนื่องจากไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมืองที่ได้จากดิน ซึ่งนำมาใช้ในการวิจัยนี้ อาจประกอบด้วยไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ หลายสายพันธุ์ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องแบ่งหมวดหมู่ของไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมืองเหล่านี้ เพื่อความสะดวกในการทดสอบขั้นตอนต่อไป เทคนิคที่ใช้ในการจำแนกคือ indirect fluorescent antibody ซึ่งมีอุปกรณ์และวิธีการ ดังนี้

3.1 อุปกรณ์ในการจำแนกไรโซเบียม

3.1.1 ไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมืองที่ผ่านการทดสอบในหัวข้อที่ 2.2 แล้ว

3.1.2 ไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐานที่นิยมใช้ในการผลิตผงคลุกเชื้อในทางการค้า ซึ่งได้แก่ สายพันธุ์ดังต่อไปนี้

- ไรโซเบียมจากประเทศไทย คือ TH-7
- ไรโซเบียมจากประเทศสหรัฐอเมริกา คือ USDA 24 USDA 31 USDA 15-7 USDA 110 และ USDA 122
- ไรโซเบียมจากประเทศออสเตรเลีย คือ CB 1809

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.3 Antiserum ที่เตรียมได้จากไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐานแต่ละสายพันธุ์ดังกล่าวในข้อ 3.1.2

3.1.4 Antirabbit IgG FITC conjugate

3.1.5 Phosphate Buffer Saline pH 7.1 ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

0.2 M $NaH_2PO_4.H_2O$	16.5	มิลลิลิตร
0.2 M $NaHPO_4.7H_2O$	33.5	มิลลิลิตร
น้ำเกลือ 0.85%	950.0	มิลลิลิตร

3.1.6 น้ำเกลือ 0.85% (NaCl 0.85 กรัม + น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)

3.1.7 แผ่นสไลด์ ขนาด 25 x 75 มิลลิเมตร

3.1.8 cover slips ขนาด 24 x 50 มิลลิเมตร

3.1.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.10 ไม้จิ้มฟัน

3.1.11 pasture pipette

3.1.12 water bath

3.1.13 fluorescent microscope

3.1.14 mounting fluid
(glycerol gelatin:น้ำเกลือ 0.85% = 1:50)

3.1.15 diamond pen ใช้ในการขีดแบ่งแผ่นสไลด์ออกเป็นช่อง ๆ

3.1.16 กล่องสำหรับย้อมสไลด์ ซึ่งเป็นกล่องพลาสติกขนาด 3 x 10 x 1 นิ้ว^3 พร้อมฝาปิด รองก้นกล่องด้วยกระดาษชำระที่ชุ่มน้ำ และใช้แท่งแก้ววางขนานกัน สำหรับรองรับสไลด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการจำแนกไรโซเบียม

3.2.1 การทดสอบ titer ของ antiserum และ Antirabbit IgG FITC conjugate

ขั้นตอนนี้เป็นวิธีดำเนินการเพื่อหาระดับความเข้มข้นของ Antiserum ของไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐานแต่ละสายพันธุ์ และ Antirabbit IgG FITC conjugate ที่สามารถทำให้เจือจางมากที่สุด และยังเกิดปฏิกิริยาได้อย่างเหมาะสม ซึ่งมีขั้นตอนโดยละเอียดดังนี้

3.2.1.1 smear ไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐาน แต่ละสายพันธุ์บนสไลด์แต่ละอัน โดยใช้สไลด์ละ 6 จุด และใช้จำนวน 6 สไลด์ต่อไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐานหนึ่งสายพันธุ์ แล้ว heat fix

3.2.1.2 ทำให้ antiserum ของไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐานแต่ละสายพันธุ์ เจือจางโดยผสมด้วย น้ำเกลือ 0.85% ในอัตราส่วนของ antiserum:น้ำเกลือ 0.85% เท่ากับ 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 และ 1:64

3.2.1.3 หยด antiserum ของแต่ละสายพันธุ์ที่เจือจางแล้วในแต่ละความเข้มข้นลงบนสไลด์ที่ได้จากข้อ 3.2.1.1 โดย antiserum ที่ใช้จะต้องตรงกับสายพันธุ์ที่ smear บนสไลด์

3.2.1.4 นำสไลด์ที่ได้จากข้อ 3.2.1.3 ไปวางไว้ในกล่องย้อมสไลด์แล้วปิดฝา หลังจากนั้นนำกล่องดังกล่าวไปเก็บไว้ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วนำสไลด์ออกมาแช่ใน phosphate buffer saline pH 7.1 เป็นเวลานาน 10 นาที ต่อจากนั้นนำสไลด์ไปแช่ใน น้ำเกลือ 0.85% ต่อไปอีกเป็นเวลานาน 5 นาที หลังจากนั้นชะสไลด์ด้วยน้ำกลั่นแล้วตั้งทิ้งไว้ให้สไลด์แห้งในอุณหภูมิห้อง

3.2.1.5 ทำให้ Antirabbit IgG FITC conjugate เจือจางโดยผสมด้วย น้ำเกลือ 0.85% ในอัตราส่วนของ Antirabbit IgG FITC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

conjugate:น้ำเกลือ 0.85% เท่ากับ 1:10 1:20 1:40 1:80 1:100 และ 1:200

3.2.1.6 หยด Antirabbit IgG FITC conjugate ที่ได้จากข้อ 3.2.1.5 ลงบนสไลด์ที่ผ่านวิธีการในข้อ 3.2.1.4 แล้ว หลังจากนั้นนำสไลด์ดังกล่าวไปดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.2.1.4

3.2.1.7 หยด mounting fluid ลงบนสไลด์ที่ได้จากข้อ 3.2.1.6 ปิดทับด้วย cover slip แล้วนำไปส่องดูด้วย Fluorescent microscope กำลังขยาย 40x

ประเมินระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antiserum และ Antirabbit IgG FITC conjugate โดยกำหนดความสว่างของการเรืองแสงจากมากไปน้อยเป็น 4 ระดับ ดังนี้ +4 +3 +2 และ +1 ตามลำดับ ในกรณีที่ไม่สามารถเห็นการเรืองแสงได้ กำหนดให้มีค่าเป็น - ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ antiserum และ Antirabbit IgG FITC conjugate ที่เลือกใช้คือ ความเข้มข้นที่เจือจางมากที่สุด ที่ยังทำให้ระดับความสว่างของการเรืองแสงมีค่าตั้งแต่ +3 ขึ้นไป

3.2.2 การจำแนกสายพันธุ์ไรโซเบียมพื้นเมือง

3.2.2.1 ใช้ diamond pen ขีดสไลด์แต่ละแผ่นให้เป็นช่องจำนวน 20 ช่อง โดยแต่ละช่องจะใช้สำหรับการ smear ไรโซเบียมแต่ละเชื้อ

3.2.2.2 smear และ heat fix ไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐานแต่ละสายพันธุ์ลงในช่องบนสุดด้านซ้ายมือของแต่ละสไลด์ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ ซึ่งจะใช้สไลด์ทั้งหมดเท่ากับไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ คือ 7 สไลด์

3.2.2.3 smear และ heat fix ไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมืองลงในช่องที่เหลือทั้งหมดช่องละ 1 เชื้อ ในทุกสไลด์ที่มีไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐานแต่ละสายพันธุ์ ทั้งนี้จะต้องให้ตำแหน่งของการ smear ไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมืองแต่ละเชื้อในทุกสไลด์อยู่ตรงกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2.4 ดำเนินการย้อมสไลด์ที่ได้ในข้อ 3.2.2.3 ด้วยวิธีการตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ 3.2.1.4 3.2.1.6 และ 3.2.1.7 โดยใช้ antiserum ของไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐานแต่ละสายพันธุ์ที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบในแต่ละสไลด์ และใช้ Antirabbit IgG FITC conjugate ในการย้อม ระดับความเข้มข้นของ antiserum และ Antirabbit IgG FITC conjugate ที่ใช้ในการทดสอบขั้นตอนนี้จะใช้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมตามที่ได้ผลการทดสอบจากหัวข้อที่ 3.2.1

3.2.2.5 การประเมินผล นำสไลด์ที่ย้อมได้จากข้อ 3.2.2.4 มาส่องดูด้วย Fluorescent microscope โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับวิธีการขั้นตอนที่ 3.2.1.7 หากไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมืองเชื้อใดเกิดปฏิกิริยาเรืองแสงกับ antiserum ของไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐานใด โดยให้ระดับความสว่างของการเรืองแสงตั้งแต่ +3 ขึ้นไป ไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมืองนั้นก็จะถูกจัดให้อยู่ใน serogroup เดียวกับไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐานชนิดนั้น

4. <u>การทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมืองกับถั่ว-เหลืองพันธุ์ต่าง ๆ และถั่วพุ่ม</u>

4.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบความเข้ากันได้

4.1.1 เมล็ดพันธุ์ถั่วที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ เมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ไทย คือ ถั่วเหลืองผิวดำและถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 และถั่วเหลืองพันธุ์อเมริกัน ได้แก่ พันธุ์ Bragg และพันธุ์ Improved Pelican และเมล็ดถั่วพุ่ม

4.1.2 ไรโซเบียมที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ ไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมืองจากปมถั่วพันธุ์ต่าง ๆ จากพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดแม่ฮ่องสอน ดังระบุในตารางที่ 2 และไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐาน CB 1809 สำหรับไรโซเบียมพื้นเมืองเชื้ออื่นที่ผู้วิจัยไม่ได้นำมาทดสอบในขั้นตอนนี้ เนื่องจากมีข้อจำกัดด้านเวลาและสถานที่ที่ใช้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 จำนวนไรโซเบียมพื้นเมืองที่ใช้ทดสอบในแต่ละการทดลองย่อย

การทดลองที่	สถานที่ [1/]	พืชทดสอบ [2/]	พืชที่ใช้ปลูกเพื่อเก็บปม [3/]								จำนวนรวม
			WS	BS	SJ	IP	CP	7842	GS	FR	
1	ชม.	BS	8	10	9	6	8	8	2	-	51
2	ชม.	BR	8	8	8	7	3	6	3	-	43
3	ชม.	CP	8	10	8	9	8	6	2	-	51
4	ชม.	SJ	7	8	5	7	7	8	1	-	43
5	ชม.	IP	8	10	6	9	7	8	2	-	50
6	มส.	BS	-	-	-	3	5	-	-	7	15
7	มส.	BR	-	-	-	2	6	-	-	8	16
8	มส.	CP	-	-	-	4	6	-	-	8	18
9	มส.	SJ	-	-	-	4	5	-	-	8	17
10	มส.	IP	-	-	-	2	7	-	-	6	15

1/ พื้นที่ซึ่งเก็บปมถั่ว : ชม. = เชียงใหม่ มส. = แม่ฮ่องสอน

2/ พืชที่ใช้ในการทดสอบ : BS = ถั่วเหลืองผิวดำ BR = ถั่วเหลืองพันธุ์ Bragg CP = ถั่วพุ่ม SJ.5 = ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 IP = ถั่วเหลืองพันธุ์ Improved Pelican

3/ พืชที่ใช้ปลูกเพื่อเก็บปม : WS = ถั่วเหลืองพันธุ์ป่า BS = ถั่วเหลืองผิวดำ BR = ถั่วเหลืองพันธุ์ Bragg CP = ถั่วพุ่ม SJ.5 = ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 IP = ถั่วเหลืองพันธุ์ Improved Pelican 7842 = ถั่วเหลืองพันธุ์ 7842 GS = ถั่วเหลืองพันธุ์สานเขียว FR = ถั่วเหลืองพันธุ์ Forrest

\- ไม่ได้ทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.3 อุปกรณ์สำหรับเพาะเมล็ดถั่วดังระบุไว้ในข้อ 2.1.4 แต่ใช้ calcium hypochlorite (chlorox) 3% หรือ H_2O_2 3% เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดแทนกรดกำมะถันเข้มข้น เพราะเมล็ดพันธุ์ถั่วที่ใช้ในการทดสอบขั้นตอนนี้ทุกพันธุ์เป็นเมล็ดพันธุ์ที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน งอกได้ง่ายเมื่อได้รับความชื้น

4.1.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกถั่ว ดังระบุไว้ในหัวข้อที่ 2.1.5

4.1.5 อุปกรณ์สำหรับเพิ่มปริมาณเชื้อที่ใช้ทดสอบ ดังระบุไว้ในข้อ 2.1.3 แต่ใช้ erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ในการทดสอบขั้นตอนนี้

4.1.6 ห้องสำหรับปลูกถั่ว ดังระบุไว้ในข้อ 2.1.6

4.2 วิธีการทดสอบความเข้ากันได้

4.2.1 การเพาะเมล็ดและการปลูกถั่ว ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด โดยการแช่เมล็ดพันธุ์ถั่วใน H_2O_2 3% หรือ Calcium hypochlorite 3% เป็นเวลานาน 3 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง (สำหรับกรณีที่ใช้ Calcium hypochlorite 3% เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อ) นำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อนี้แล้วไปเพาะในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว โดยมีกระดาษชำระที่ชื้นเป็นวัสดุเพาะ ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อแล้วปล่อยให้เมล็ดงอกที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 วัน เมื่อถั่วงอกแล้วนำลงปลูกในภาชนะปลูก โดยใส่ถั่ว 1 ต้นต่อถุง ให้สารละลายที่ใช้ปลูกถั่วแก่ต้นถั่วครั้งแรก 30 มิลลิลิตรต่อถุง ซึ่งเพียงพอต่อการเติบโตของต้นถั่วในสัปดาห์แรก สำหรับการเพิ่มเติมสารละลายให้แก่การปลูกถั่วในระยะต่อมา จะให้สารละลายแก่ต้นถั่วสัปดาห์ละครั้ง ครั้งละ 60 มิลลิลิตรต่อถุง และมีการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อไรโซเบียมระหว่างถุง โดยการให้สารละลายทางหลอดพลาสติกซึ่งใส่ไว้ในภาชนะปลูกแต่ละใบ เมื่อต้นถั่วเจริญได้ 5 วัน ตัดใบเลี้ยงคู่ออก เพื่อให้ต้นถั่วเจริญเติบโต โดยอาศัยธาตุอาหารจากสารละลายที่ใช้ปลูกและ จากการตรึงไนโตรเจนเท่านั้น ขั้นตอนนี้ดำเนินการภายใต้สภาพห้องสำหรับปลูกถั่ว

4.2.2 การเตรียมเชื้อไรโซเบียมที่ใช้ในการทดสอบ นำเชื้อไรโซเบียมแต่ละเชื้อที่จะใช้ในการทดสอบขั้นตอนนี้ มาเพิ่มปริมาณด้วยวิธีการต่าง ๆ ดัง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระบุไว้ในข้อ 2.2.1 แต่จะใช้ Yeast mannitol broth จำนวน 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

4.2.3 การปลูกเชื้อไรโซเบียมให้กับต้นถั่ว ขั้นตอนนี้จะทำเมื่อต้นถั่วเจริญได้ 6 วัน โดยใช้ไรโซเบียมที่เตรียมได้จากข้อ 4.2.2 ใส่ให้กับต้นถั่ว ที่ได้จาก 4.2.1 โดยใส่ไรโซเบียมแต่ละเชื้อให้แก่ต้นถั่ว ต้นละ 1 มิลลิลิตร และถือว่าต้นถั่ว 1 ต้น คือ 1 ซ้ำ

4.2.4 แผนการทดลอง เนื่องจากห้องทดลองที่ใช้ทำการทดลองมีขนาดเล็ก จึงไม่สามารถที่จะใช้ทดสอบไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมืองทั้งหมดกับพืชทดสอบทุกพันธุ์ได้ในเวลาเดียวกัน ผู้วิจัยจึงแยกการทดลองออกเป็น 10 การทดลองย่อย ตามแหล่งที่มาของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมือง และตามชนิดของพืชที่ใช้ทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 2 แต่ละการทดลองมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) มี 4 ซ้ำ ในแต่ละการทดลองนอกจากจะมีไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมืองแต่ละเชื้อเป็นตำรับการทดลองแล้ว จะมีตำรับการทดลองเพิ่มอีก 3 ตำรับ คือการปลูกถั่วโดยใส่เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐาน CB 1809 การปลูกถั่วโดยใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในอัตรา 70 ppm NO_3-N แต่ไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม และการปลูกถั่วโดยไม่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม ซึ่งตำรับสุดท้ายนี้ใช้เป็นตำรับเปรียบเทียบ

4.2.5 การประเมินผลการทดสอบ เมื่อต้นถั่วเจริญได้ 36 วัน ประเมินผลการทดสอบจากน้ำหนักปมแห้ง และน้ำหนักแห้งต่อต้น หลังจากนั้น นำปม ต้น และรากของต้นถั่วแต่ละต้นมาบดรวมกัน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี modified microkjedahl (เนาวรัตน์, 2527)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การศึกษาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมืองบางสายพันธุ์กับถั่วเหลืองพันธุ์ต่าง ๆ

5.1 อุปกรณ์การทดลองประกอบด้วย

5.1.1 เมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ต่าง ๆ ดังนี้

สจ.5	:	ถั่วเหลืองพันธุ์มาตรฐานของกรมวิชาการเกษตร
ชม. 60 (เชียงใหม่ 60)	:	ถั่วเหลืองพันธุ์มาตรฐานที่เริ่มส่งเสริมให้ปลูกในเขตภาคเหนือตอนบน
มช.1	:	ถั่วเหลืองสายพันธุ์ดีของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
นว. 1 (นครสวรรค์ 1)	:	ถั่วเหลืองพันธุ์มาตรฐานที่มีอายุสั้น ปลูกกันมากที่จังหวัดนครสวรรค์ เดิมเรียกว่าพันธุ์ OCB
สข. 1 (สุโขทัย 1)	:	ถั่วเหลืองพันธุ์มาตรฐานที่ปลูกกันมากที่จังหวัดสุโขทัย ซึ่งเกษตรกรเรียกว่า พันธุ์ผักบุ้ง
อินโดนีเซีย	:	ถั่วเหลืองที่ได้จากประเทศอินโดนีเซีย เป็นถั่วเหลืองเมล็ดเล็ก แต่ให้จำนวนฝักต่อต้นมาก
PI 85658	:	ถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างประเทศ ใช้รับประทานฝักสด
Santa Rosa	:	ถั่วเหลืองจากประเทศสหรัฐอเมริกา

5.1.2 ไรโซเบียมพื้นเมืองจำนวน 8 สายพันธุ์ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 3 ไรโซเบียมพื้นเมืองเหล่านี้ เป็นไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพดีในการสร้างน้ำหนักปมแห้ง และเพิ่มน้ำหนักแห้งให้แก่ถั่วที่ทดลองในหัวข้อที่ 4 และมีความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ (Intrinsic antibiotic resistance) ได้แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 แหล่งที่มาของไรโซเบียมพื้นเมืองที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน

สายพันธุ์ไรโซเบียม	รายละเอียดของสายพันธุ์ไรโซเบียม			
	สถานที่	พืชที่ปลูกเพื่อเก็บบม	เชื้อที่	ปฏิกิริยาซีโรโลยี*
1	เชียงใหม่	สจ.5	4	+ก+ง
2	เชียงใหม่	ถั่วพุ่ม	6	+ก+ง+จ
3	เชียงใหม่	ถั่วพุ่ม	8	+ง+จ
4	เชียงใหม่	7842	8	+ง
5	แม่ฮ่องสอน	สจ.5	5	+จ
6	แม่ฮ่องสอน	Improved Pelican	3	+ก
7	แม่ฮ่องสอน	Improved Pelican	3	+ก+จ
8	แม่ฮ่องสอน	ถั่วพุ่ม	3	+ค

* ลักษณะการเกิดปฏิกิริยากับซีรัมของไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมืองที่มีความต้านทานยาปฏิชีวนะแตกต่างกัน ดังรายละเอียดท้ายตารางที่ 4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 ความแตกต่างของไรโซเบียมพื้นเมืองในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ[1/]

ยาปฏิชีวนะ	สายพันธุ์ของไรโซเบียมพื้นเมือง[2/]				
	ก	ข	ค	ง	จ
	ระดับการต้านทาน (มก./ล.)				
Polymycin B	-	-	-	-	-
Streptomycin	-	13.0	-	6.0	-
Kanamycin	-	15.0	25.0	-	12.5
Erythromycin	22.5	36.0	30.0	32.0	-
Vancomycin	-	-	-	-	-
Rifampicin	-	3.0	3.5	0.5	-
Spectinomycin	-	-	-	7.0	-
Tetracyclin	-	-	-	-	-

1/ Thompson unpublished data

2/ สายพันธุ์ ก และ ข ได้จากปมถั่วเหลืองพันธุ์ Improved Pelican ที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ สายพันธุ์ที่ ค ได้จากปมถั่วเหลืองพันธุ์ Improved Pelican ที่ปลูกในจังหวัดแม่ฮ่องสอน สายพันธุ์ที่ ง ได้จากปมถั่วพุ่มที่ปลูกในจังหวัดแม่ฮ่องสอน และสายพันธุ์ที่ จ ได้จากปมถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 ที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.1.3 ไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐาน CB 1809 และ USDA 110

5.1.4 อุปกรณ์และวิธีการในการเพาะถั่ว การดูแลรักษาต้นถั่ว การเพิ่มปริมาณไรโซเบียม การปลูกถั่ว การปลูกเชื้อไรโซเบียมให้แก่ต้นถั่ว สภาพที่ใช้ในการทดลอง ตลอดจนวิธีในการประเมินผล ทำเช่นเดียวกับที่ระบุไว้ในการทดลองที่ 4

5.2 แผนการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการทดลองแบบ factorial ประกอบด้วยปัจจัยในการทดลอง 2 ปัจจัย คือ พันธุ์ถั่วเหลือง จำนวน 8 สายพันธุ์ ดังระบุไว้ในข้อ 5.1.1 และวิธีปลูกถั่ว 12 วิธี ได้แก่

- การปลูกโดยการใส่เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 10 สายพันธุ์ ดังระบุไว้ในข้อ 5.1.2 และ 5.1.3
- อีก 2 ตำรับเป็นการปลูกถั่วโดยใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในอัตรา 70 ppm NO_3-N ไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม และตำรับเปรียบเทียบ ซึ่งไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) มี 4 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved