

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** การประเมินการแข่งขันของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้  
คลุกเมล็ดสำหรับการปลูกถั่วพุ่มเป็นปุ๋ยพืชสดบนพื้นที่  
สูงโดยเทคนิคทางอนุชีววิทยา

**ผู้เขียน** นางสาวสุปราณี จีมูล

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) ปฐพีศาสตร์

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** ดร. ชูชาติ สันทรทรัพย์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
ผศ.ดร. อำพรธม พรหมศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

### บทคัดย่อ

การประเมินการแข่งขันของสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว (*Bradyrhizobium* sp.) ที่  
ใช้คลุกเมล็ดในการเกิดปมกับถั่วพุ่มซึ่งปลูกเป็นปุ๋ยพืชสดบนพื้นที่สูงโดยเทคนิคทางอนุชีววิทยามี  
การดำเนินงาน 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการทดลองในแปลงทดลองเพื่อศึกษาการตอบสนองของ  
ถั่วพุ่มต่อการใส่เชื้อ bradyrhizobial 3 สายพันธุ์และความจำเป็นในการใส่เชื้อในการปลูกถั่วพุ่มใน  
ฤดูกาลถัดไป ขั้นตอนที่สองเป็นการทดลองในกระถางเพื่อศึกษาความสามารถในการแข่งขันของ  
สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกเมล็ดกับเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในธรรมชาติในการ  
เกิดปมกับถั่วพุ่ม ทั้งสองขั้นตอนมีการปลูกถั่วพุ่ม 2 ครั้ง เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้ทดสอบเป็น  
เชื้อที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพดีจำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ CP-PHT4 CP-  
TLA5 และ CP-NK3 การทดลองในแปลงทดลองใช้พื้นที่สูง 2 แห่งซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์ของดิน  
ต่างกัน ได้แก่ พื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะป๊อกซึ่งเป็นดินกรดมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และ  
พื้นที่ศูนย์หนองหอยซึ่งเป็นดินที่มี pH 7.0-7.6 และมีความอุดมสมบูรณ์สูง ส่วนการทดลองใน  
กระถางก็ใช้ดินจากพื้นที่ดังกล่าวในการปลูกถั่วพุ่ม กรรมวิธีที่ใช้สำหรับการปลูกถั่วครั้งแรกทั้งใน  
แปลงทดลองและในกระถางมี 4 กรรมวิธี กรรมวิธีแรกเป็นกรรมวิธีควบคุมซึ่งไม่ใส่เชื้อแบคทีเรีย  
ปมรากถั่วและอีก 3 กรรมวิธีเป็นการใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วสายพันธุ์ CP-PHT4 CP-TLA5 และ

CP-NK3 ตามลำดับ การปลูกถั่วพุ่มครั้งที่ 2 มี 7 กรรมวิธี กรรมวิธีแรกไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว กรรมวิธีที่ 2 4 และ 6 ใส่เชื้อสายพันธุ์ CP-PHT4 CP-TLA5 และ CP-NK3 เฉพาะในฤดูกาลปลูกถั่ว ครั้งแรกและไม่ใส่ซ้ำในการปลูกถั่วฤดูกาลที่สองตามลำดับ กรรมวิธีที่ 3 5 และ 7 ใส่เชื้อสายพันธุ์ CP-PHT4 CP-TLA5 และ CP-NK3 ซ้ำในการปลูกถั่วฤดูกาลที่สอง การทดลองในแปลงทดลองใน ฤดูกาลปลูกที่ 2 ใช้พื้นที่เดียวกันกับการปลูกถั่วครั้งแรกโดยแบ่งพื้นที่ในแปลงทดลองในกรรมวิธีที่ มีการใส่เชื้อในฤดูกาลแรกเป็นสองส่วน ส่วนแรกใช้สำหรับกรรมวิธีที่ไม่ใส่เชื้อซ้ำและส่วนที่สอง ใช้สำหรับกรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อซ้ำในการปลูกถั่วพุ่มครั้งที่สอง การทดลองในแปลงทดลองทั้ง 2 ครั้งในแต่ละพื้นที่ใช้แผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) มี 4 ซ้ำ ข้อมูลที่บันทึกสำหรับการทดลองในแปลงทดลองได้แก่ น้ำหนักแห้งปม น้ำหนักสดและแห้งของ ส่วนเหนือดิน การสะสม N ในส่วนเหนือดินที่ระยะ R 3.5 เปอร์เซ็นต์และปริมาณการตรึง N ตลอด ฤดูปลูกโดยใช้วิธีการวิเคราะห์น้ำเลี้ยงจากตอรากที่ระยะ R 3.5 การทดลองในกระถางใช้ดินจาก พื้นที่สูงแต่ละพื้นที่จำนวน 10 กก./กระถาง และใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มี 4 ซ้ำ แต่ละกรรมวิธี ปลูกถั่วพุ่ม 3 ต้น/กระถาง/ซ้ำ สำหรับการปลูกครั้งที่ 1 กรรมวิธีที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วปลูกถั่วพุ่มมีจำนวน 8 กระถางและกรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อ แบคทีเรียปมรากถั่วปลูกถั่วพุ่มมีจำนวน 12 กระถาง/กรรมวิธี โดย 4 กระถางแรกของทุกกรรมวิธีจะ ใช้เก็บข้อมูลสำหรับการปลูกถั่วครั้งที่ 1 ส่วนที่เหลือใช้ปลูกถั่วครั้งที่สอง การเก็บปมที่เกิดขึ้น ทั้งหมดที่ระบบรากของต้นถั่วแต่ละกระถางที่ระยะ R 3.5 และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ก่อน นำไปศึกษาชนิดของเชื้อในปมด้วยวิธี REP- และ ERIC-PCR ในการศึกษาชนิดของเชื้อในปมถั่วพุ่ม ใช้วิธีสุ่มเลือกปมจากระยะราก 0-5 5-10 และมากกว่า 10 ซม.จำนวน 5% ของจำนวนปมทั้งหมดที่ เกิดขึ้นในแต่ละระยะราก ในการทดลองในแปลงทดลองและในกระถางใช้วิธีการใส่เชื้อโดยคลุก หัวเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วซึ่งอยู่ในรูปผงดินพีทกับเมล็ดถั่วก่อนปลูกในอัตรา 10<sup>6</sup> เซลล์/เมล็ดและ ใช้ gum Arabic ความเข้มข้น 30% เป็นสารเชื่อม ตลอดการทดลองทั้งในสภาพแปลงทดลองและ กระถางมีการให้น้ำตามความจำเป็น จากการทดลองพบว่าในการปลูกถั่วพุ่มในฤดูกาลแรกในพื้นที่ สูงซึ่งดินมีสภาพเป็นกรด (pH 5.2-5.4) มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำและมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว ในธรรมชาติอยู่ 1.26x10<sup>2</sup> เซลล์/กรัมดิน ถั่วพุ่มที่ปลูกเป็นปุ๋ยพืชสดซึ่งปลูกในช่วงฤดูร้อนโดยไม่ได้ รับการใส่เชื้อให้น้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดิน 183 กก./ไร่ มีการสะสม N ในส่วนเหนือดิน 6.53 กก./ไร่ มีน้ำหนักแห้งปม 1.67 กรัม/ต้น มีการตรึง N 84 % ของปริมาณ N ทั้งหมดที่สะสมในส่วน เหนือดินคิดเป็นปริมาณ N ที่ได้จากการตรึง 5.72 กก./ไร่ การปลูกถั่วพุ่มโดยการใส่เชื้อแบคทีเรีย ปมรากถั่วทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ใช้ทดลอง ไม่ทำให้ถั่วพุ่มมีการตอบสนองต่อการใส่เชื้อแบคทีเรียปมราก ถั่วอย่างมีนัยสำคัญในแง่ของการเกิดปม มวลชีวภาพและปริมาณ N ที่สะสมในส่วนเหนือดิน

เปอร์เซ็นต์ N ตลอดจนปริมาณ N ที่ตรึงได้ เชื้อที่ใช้คลุกเมล็ดทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน ในด้านการแข่งขันกับเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่มีอยู่ในดินตามธรรมชาติในการเกิดปม โดยสามารถสร้างปมได้ในระบบรากทั้งหมดในช่วง 46.5-51.8% ในการปลูกถั่วในฤดูกาลที่ 2 ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝน ถั่วพุ่มที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อให้น้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดิน 321 กก./ไร่ มีการสะสม N ในส่วนเหนือดิน 8 กก./ไร่ มีน้ำหนักแห้งปม 0.6 กรัม/ต้น มีการตรึง N 72 % ของปริมาณ N ทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดินคิดเป็นปริมาณ N ที่ได้จากการตรึง 5.9 กก./ไร่ การใช้เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วสำหรับการปลูกถั่วพุ่มในฤดูกาลที่สองไม่ทำให้ถั่วพุ่มมีการเกิดปม มวลชีวภาพและปริมาณ N ที่สะสมในส่วนเหนือดิน เปอร์เซ็นต์และปริมาณ N ที่ได้จากการตรึงแตกต่างจากต้นถั่วที่ปลูกโดยการใช้เชื้อเพียงครั้งเดียว และต้นถั่วที่ไม่ได้รับการคลุกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในจำนวนปมทั้งหมดที่เกิดขึ้นที่ระบบรากของต้นถั่วที่ปลูกโดยการใช้เชื้อเพียงครั้งเดียวมีปมที่เกิดจากการใช้เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วอยู่ในช่วง 0-23.5% การใช้เชื้อซ้ำในฤดูกาลปลูกที่ 2 ทำให้เปอร์เซ็นต์ของปมถั่วที่เกิดจากเชื้อที่ใช้คลุกเพิ่มขึ้น โดยมีอยู่ในช่วงตั้งแต่ 12.7-59.3 และเชื้อสายพันธุ์ CP-PHT4 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถเข้าไปสร้างปมได้ดีที่สุด ข้อมูลด้านการเกิดปม น้ำหนักแห้งและการสะสม N การตรึง N ของถั่วพุ่มที่ไม่ได้ใส่เชื้อ เปอร์เซ็นต์การเกิดปมของเชื้อที่ใช้คลุกเมล็ดและลักษณะการตอบสนองของถั่วพุ่มต่อการใส่เชื้อทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่า ไม่มีความจำเป็นที่ต้องใช้เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วสำหรับการปลูกถั่วพุ่มที่ใช้เป็นปุ๋ยพืชสดในดินสภาพดังกล่าว

สำหรับพื้นที่สูงซึ่งดินมี pH 7.0-7.6 มีความอุดมสมบูรณ์สูงและมีเชื้อปริมาณเชื้อแบคทีเรียในธรรมชาติ  $2.22 \times 10^7$  เซลล์/กรัม ถั่วพุ่มที่ปลูกเป็นปุ๋ยพืชสดในครั้งแรกซึ่งอยู่ในช่วงฤดูฝนก็ไม่ตอบสนองต่อการใส่เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์เช่นกันในแง่ของการเกิดปม มวลชีวภาพและปริมาณ N ที่สะสมในส่วนเหนือดิน เปอร์เซ็นต์และปริมาณ N ที่ได้จากการตรึงอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งถั่วพุ่มที่ปลูกโดยการไม่ใส่เชื้อยังให้น้ำหนักแห้งในส่วนเหนือดินสูงถึง 694 กก./ไร่ และมี N ที่สะสมในส่วนเหนือดินถึง 20.5 กก./ไร่ แต่เปอร์เซ็นต์ N ที่ได้จากการตรึงมีเพียง 33.8% ของปริมาณ N ทั้งหมดที่สะสมอยู่ในส่วนเหนือดินซึ่ง แสดงว่าดินมีความเป็นประโยชน์ต่อ N ในระดับสูง สภาพเช่นนี้ต้นถั่วย่อมไม่ตอบสนองต่อการใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว สำหรับเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกทั้ง 3 สายพันธุ์ความสามารถในการเข้าไปสร้างปมที่รากไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความสามารถในการสร้างปมได้ 28.3-60.5% ของจำนวนปมที่เกิดขึ้นของรากทั้งระบบ การปลูกถั่วในฤดูกาลถัดไปซึ่งเป็นช่วงฤดูหนาว กรรมวิธีการทดลองที่ใช้เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วเพียงครั้งเดียวหรือการใช้เชื้อซ้ำในฤดูกาลปลูกที่ 2 ให้ผลไม่แตกต่างกัน และให้ผลไม่แตกต่างจากต้นถั่วที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อด้วยในแง่ของการเกิดปม มวลชีวภาพและปริมาณ N ที่สะสมในส่วนเหนือดิน เปอร์เซ็นต์และปริมาณ N ที่ได้จากการตรึง สำหรับต้นถั่วที่ไม่คลุกเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในฤดูนี้

สามารถให้น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน 202 กก./ไร่ มีปริมาณ N สะสมในส่วนเหนือดิน 6.32 กก./ไร่ มีเปอร์เซ็นต์ N ที่ได้จากการตรึง 58.62 ของปริมาณ N ทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดินคิดเป็นปริมาณ N ที่ได้จากการตรึง 3.76 กก./ไร่ ส่วนต้นถั่วที่ปลูกโดยใช้เชื้อเพียงครั้งเดียวมีปมที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้อยู่ในช่วง 14.8-38.9% ของจำนวนปมทั้งหมดที่เกิดขึ้นทั้งระบบราก ซึ่งต่ำกว่าที่พบในการปลูกถั่วฤดูแรก สำหรับต้นถั่วพุ่มที่ปลูกโดยใช้เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วซ้ำในฤดูกาลปลูกที่สอง มีจำนวนปมที่เกิดจากเชื้อที่ใช้ปลูกอยู่ในช่วง 27.2-41.0% จากลักษณะในการตอบสนองของถั่วพุ่มที่ปลูกเป็นปุ๋ยพืชสดต่อการใส่เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์และข้อมูลที่ได้จากการศึกษาความสามารถของเชื้อที่ใช้คลุมเมล็ดในการเกิดปมในดินจากพื้นที่สูงซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์สูง จึงให้เห็นว่าในพื้นที่นี้ก็ไม่มีความจำเป็นในการใช้เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วสำหรับการปลูกถั่วพุ่มเป็นปุ๋ยพืชสดเช่นกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

**Thesis Title** Competitiveness Evaluation of Seed Inoculated Root Nodule Bacteria for Green Manure Cowpea Cultivation on Highland by Molecular Technique

**Author** Miss Supranee Jeemoon

**Degree** Master of Science (Agriculture) Soil Science

**Thesis Advisory Committee** Dr. Choochad Santasup Advisor  
Asst. Prof. Dr. Ampan Bhromsiri Co-advisor

### ABSTRACT

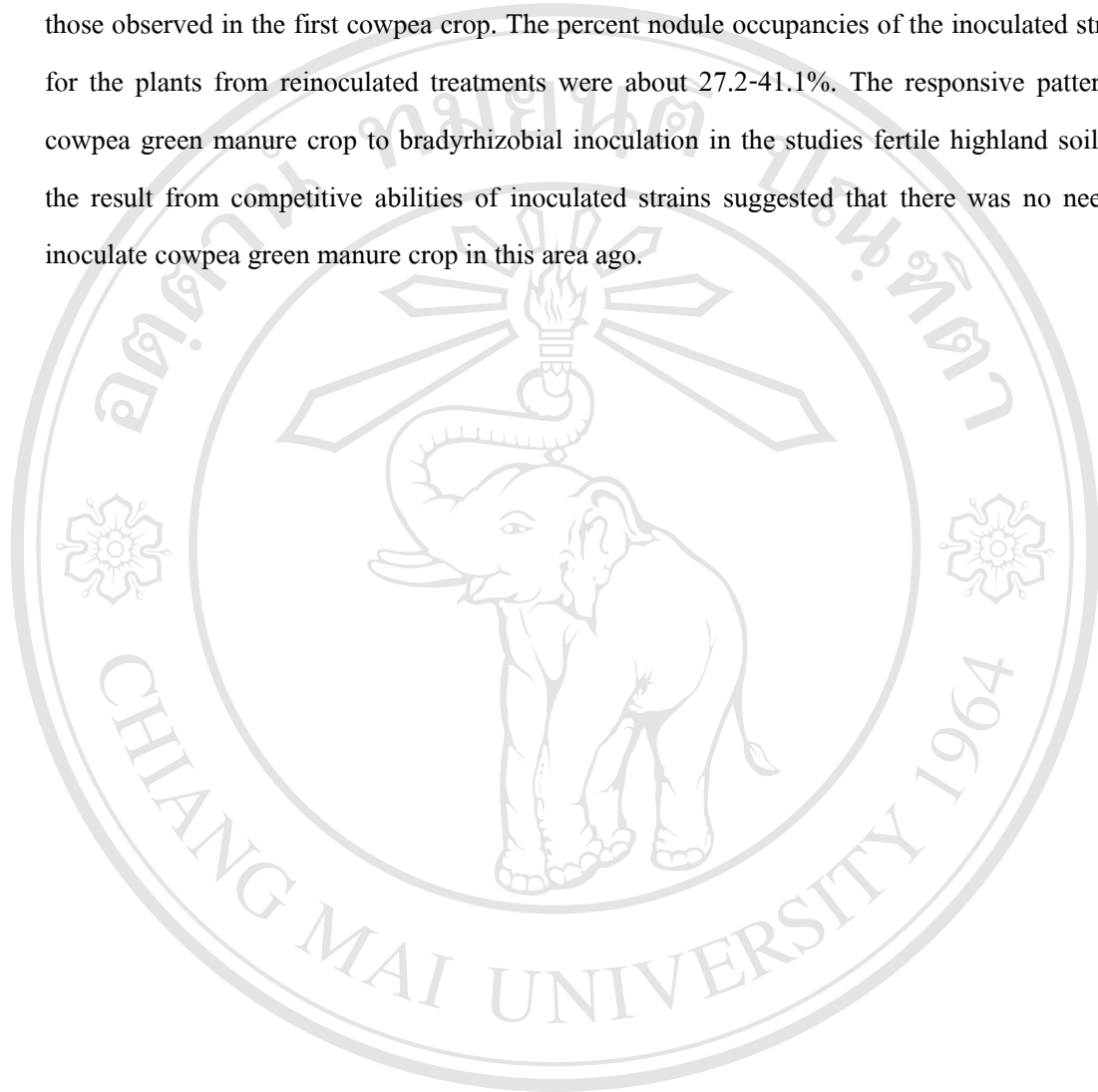
The competitive abilities of inoculated root nodule bacterial (*Bradyrhizobium* sp.) strains for nodulation with cowpea green manure plants grown on highland areas were evaluated by molecular technique. The experiments consisted of two working steps. In the first step, the field experiments were conducted in order to study the response of cowpea to three inoculated bradyrhizobial strains and the necessity to reinoculate in the subsequent cultivation of this green manure legume. In the second step, pot trails were used to study the competitive abilities of the seed inoculated root nodule bacterial strains against the indigenous root nodule bacteria for nodulation with cowpea. Two crops of cowpea were cultivated for both working steps. The used three inoculated root nodule bacterial strain as follows; CP-PHT4 CP-TLA5 and CP-NK3 were previously tested for their effectiveness. The field experiments were conducted at two highland areas with different soil fertility. At Mae Sapok, Royal Project Highland Development Center, the soil was acidic and infertile while that at Nong Hoi, Royal Project Highland Development Center, the soil was fertile with pH 7.0-7.6. For the first cultivation of cowpea in the fields and in the pots, four treatments were used for each experiment. The first treatment was uninoculated control while the rest three treatments were inoculated treatments with CP-PHT4 CP-TLA5 and CP-NK3 respectively. In the second cowpea cultivation, there were 7 treatments as follows; Tr. 1) non inoculated control, Tr. 2 4 and 6) inoculation with CP-PHT4 CP-TLA5 and CP-NK3 only for the

first cowpea cultivation, Tr. 3 5 and 7) inoculation with CP-PHT4 CP-TLA5 and CP-NK3 respectively for the second crop of cowpea. Each of root nodule bacterial inoculants in the form of peat powder was applied at seed sowing by seed coating at the rate of  $10^6$  cells/seed using gum Arabic 30% as stickening agent for all experiments. The experimental design used in the first and the second cultivations of cowpea in the field in each experimental site was randomized complete block with 4 replications. The collected data were nodule dry weight, fresh and dry weight including N uptake of the above ground parts at R. 3.5 growth stage, percent and the amount of N fixed throughout the growing season by analysis of ureide in root breeding sap at R. 3.5 stage. For pot trails, the soil collected from each experiment site was used for cultivation of cowpea using 10 kg soil/pot. The experimental design for each pot trial for each soil was completely randomized design with 4 replications using 3 plans/pot/replication. In the first cultivation of cowpea, there were 8 pots in the uninoculated control treatment while in the inoculated treatments there were 12 pots for each treatment. The first four pots were used for data collection of the first cowpea cultivation while the rest were used for the second cultivation. All nodules formed at the roots at the length of 0-5 5-10 cm. and below 10 cm. were collected at R. 3.5 stage and then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  prior to nodule occupancy study of the inoculated root nodule bacterial strains by REP- and ERIC-PCR. The nodule samples for strain identification by PCR were randomly selected at the rate of 5% of the total numbers of nodules formed at each root length mentioned above. Throughout the growing season for each crop of cowpea for both pot and field experiments, the plants were irrigated as necessary. It was found that, in the highland area where the soil was acidic and infertile with the population of indigenous cowpea root nodule bacteria of  $1.26 \times 10^2$  cell/g, cultivation during the hot dry season gave dry biomass of the above ground part about 183 kg/rai, N uptake of 6.5 kg N/rai, nodule dry weight of 1.67 g/plant, percentage of fixed N of 84% of the total N uptake and the amount of fixed N of 5.7 kg N/rai. No significant response of cowpea to inoculation of each bradyrhizobial strain was obtained according to the effects on nodule dry weight, biomass and N accumulated in the above ground part, percentage and the amount of fixed N. There were no significant among the tested bradyrhizobial strains for their competitive ability against the indigenous cowpea root nodule bacteria. The percentage of nodules occupied by the inoculated strains was within the ranges of 46.5-51.8. In the second crop of cowpea which was grown in the rainy season, the plants from uninoculated plot gave dry

biomass of the above ground part of 321 kg/rai, with N uptake of 8 kg/rai, nodule dry weight of 0.6 g/plant, percentage of fixed N of 72% and the amount of fixed N of 5.9 kg N/rai. Reinoculation of each bradyrhizobial strain in the second crop of cowpea cultivation did not have significant effect on nodule dry weight, biomass and N uptake of the above ground part, percentage and the amount of seasonal fixed N compared to uninoculated control and the single inoculated treatments. The plants from the single inoculated treatments contained the nodules formed by the inoculated strain about 0-23.5% of the total numbers of nodules in the root system. Reinoculation in the second crop of cowpea cultivation resulted in percent nodule occupancies of the inoculated strains of 12.7-59.3% which CP-PHT4 strain showed the best infective ability. The information on nodulation, dry weight and N up take of the above ground part, percentage and the amount of fixed N of uninoculated cowpea, percentage of nodule occupancies of the inoculated bradyrhizobial strains and the responsive pattern of cowpea to inoculated strains inoculated strains indicated that it was not necessary to use root nodule bacterial inoculation for cowpea green manure crop in the studied area with acidic infertile soil.

In the highland area with the fertile soil and soil pH of 7.0-7.6 containing indigenous population of cowpea rhizobia of  $2.22 \times 10^2$  cell/g, the first crop of cowpea green manure plants grown in the rainy season did not respond significantly to the three bradyrhizobial inoculated treatments in terms of nodulation, biomass and N uptake of the above ground part, percentage and the amount of seasonal fixed N. The inoculated cowpea plants could give very high biomass (694 kg/rai) and N uptake (20.5 kg/rai) of the above ground part but the fixed N was only 33.8% of the total N uptake indicating that the soil contained high level of mineralization N. Under this condition, the leguminous plant did not respond to root nodule bacterial inoculation. The three tested bradyrhizobial strains did not differ significantly for their nodule occupancies. The nodules occupied by these strains were within the range of 28.3-60.5% of the total numbers of nodules in the root system. Reinoculation of these bradyrhizobial strains for the subsequent cowpea crop grown in the cool dry season did not have significant effects on nodulation, biomass and N uptake of the above ground part, percentage and the amount of seasonal fixed N in comparison with uninoculated control and the single inoculated treatments in the first crop. In the cool dry season, uninoculated cowpea plants could give biomass of the above ground part of 202 kg/rai, N uptake of 6.3 kg N/rai, percentage of fixed N of 57% and amount of fixed N of 3.76 kg N/rai. The plants

from single inoculated treatments contained the nodules formed by inoculated strains within the range of 14.8-38.9% of the total numbers of nodules in the root system which were lower than those observed in the first cowpea crop. The percent nodule occupancies of the inoculated strains for the plants from reinoculated treatments were about 27.2-41.1%. The responsive pattern of cowpea green manure crop to bradyrhizobial inoculation in the studies fertile highland soil and the result from competitive abilities of inoculated strains suggested that there was no need to inoculate cowpea green manure crop in this area ago.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved