สารบาญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	**ค**
บทคัดย่อภาษาไทย	**ง**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**ซ**
สารบาญ	**ฎ**
สารบาญตาราง	**ฒ**
สารบาญภาพ	**ด**
สารบาญตารางภาคผนวก	**ถ**
อักษรย่อและสัญลักษณ์	**ธ**
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
ลักษณะทั่วไปของแบรดดีไรโซเบียม (*Bradyrhizobium*)	4
ความจำเป็นในการคลุกเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว	4
สาเหตุในการใช้เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วไม่ได้ผล	6
เกณฑ์ประเมินปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดิน	7
ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความสามารถในการแข่งขันการเข้าสู่ปมของเชื้อไรโซเบียม	8
ผลของปริมาณเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในดินต่อความสามารถในการแข่งขันเข้าสู่ปมของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว	9
วิธีการที่ใช้ศึกษาด้านความสามารถในการแข่งขันเข้าสู่ปมของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว	13
การจัดจำแนก rhizobia ด้วยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA จาก REP- และ ERIC-PCR	13
ข้อดีของเทคนิค REP- และ ERIC-PCR genomic fingerprint	15

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
การทดลองในสภาพต่างๆ และปริมาณการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาความสามารถในการแข่งขันการเกิดปมของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว	16
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	18
3.1 การทดลองในแปลงทดลอง	18
3.1.1 การศึกษาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มที่ใช้ปรับปรุงบำรุงดินบนพื้นที่สูงในแปลงทดลอง	21
3.1.2 การศึกษาความจำเป็นในการใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในการปลูกถั่วพุ่มในฤดูกาลปลูกที่ 2	22
3.2 การศึกษาความสามารถของสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกเมล็ดในการเกิดปมกับถั่วพุ่ม	23
บทที่ 4 ผลการทดลอง	26
4.1 ผลการศึกษาด้านประสิทธิผลในการใช้แบคทีเรียปมรากถั่วในการปลูกถั่วพุ่มบนดินในพื้นที่สูง	26
4.1.1 การทดลอง ณ ศูนย์ฯแม่สะป๊อกซึ่งดินเป็นกรดที่ pH 5.2-5.4	26
4.1.1.1 ฤดูกาลปลูกที่ 1	26
4.1.1.2 ฤดูกาลปลูกที่ 2	28
4.1.2 สถานีวิจัยและพัฒนาโครงการหลวงหนองหอย	31
4.1.2.1 ฤดูกาลปลูกที่ 1	31
4.1.2.2 ฤดูกาลปลูกที่ 2	33
4.2 ผลการศึกษาความสามารถของสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกเมล็ดในการเกิดปมกับถั่วพุ่ม	36
4.2.1 ผลการศึกษาความสามารถของสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกเมล็ดในการเกิดปมกับถั่วพุ่มในฤดูกาลปลูกครั้งแรก	36
4.2.2 ผลการศึกษาความจำเป็นในการใช้เชื้อซ้ำในฤดูกาลปลูกที่ 2	38

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	46
การทดลอง ณ ศูนย์ฯแม่สะป๊อกซึ่งดินเป็นกรดที่ pH 5.2-5.4	46
การทดลอง ณ ศูนย์ฯหนองหอยซึ่งดินมี pH 7.0-7.6	51
สรุปผลการทดลอง	57
เอกสารอ้างอิง	59
ภาคผนวก	67
ภาคผนวก ก	68
ภาคผนวก ข	85
ประวัติผู้เขียน	90

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญตาราง

ตาราง		หน้า
1	สภาวะ (condition) ที่เหมาะสมในการทำ REP- และ ERIC-PCR	15
2	ผลการใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วต่อน้ำหนักสดและแห้งของส่วนเหนือดิน น้ำหนักแห้งปม ดัชนี ureide สัมพัทธ์ ปริมาณ N ที่ตรึงได้จากอากาศ ปริมาณ N ทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดิน (N-uptake) % N ที่ได้จากการตรึงของถั่วพุ่มดำที่ปลูกในแปลงทดลองของศูนย์ฯแม่สะป๊อกในระยะ R. 3.5	27
3	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในฤดูกาลปลูกที่ 1 และ 2 ต่อน้ำหนักสดและแห้งส่วนเหนือดิน น้ำหนักแห้งปม ปริมาณ N ทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดิน (N-uptake) ของถั่วพุ่มดำที่ปลูกในแปลงทดลองของศูนย์ฯแม่สะป๊อกในระยะ R. 3.5	29
4	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในฤดูกาลปลูกที่ 1 และ 2 ต่อดัชนี ureide สัมพัทธ์ (%RUI) ปริมาณ N ที่ตรึงได้จากอากาศ % N ที่ได้จากการตรึง ของถั่วพุ่มดำที่ปลูกในแปลงทดลองของศูนย์ฯแม่สะป๊อกในระยะ R. 3.5	29
5	ผลการใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วต่อน้ำหนักสดและแห้งของส่วนเหนือดิน น้ำหนักแห้งปม ดัชนี ureide สัมพัทธ์ ปริมาณ N ที่ตรึงได้จากอากาศ ปริมาณ N ทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดิน (N-uptake) % N ที่ได้จากการตรึงของถั่วพุ่มดำที่ปลูกในแปลงทดลองของสถานีฯหนองหอยในระยะ R. 3.5 (60 วันหลังปลูก)	32
6	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในฤดูกาลปลูกที่ 1 และ 2 ต่อน้ำหนักสดและแห้งส่วนเหนือดิน น้ำหนักแห้งปม ปริมาณ N ทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดิน (N-uptake) ของถั่วพุ่มดำที่ปลูกในแปลงทดลองของศูนย์ฯหนองหอย ในระยะ R. 3.5	34
7	ผลของการใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในฤดูกาลปลูกที่ 1 และ 2 ต่อดัชนี ureide สัมพัทธ์ (%RUI) ปริมาณและ % N ที่ได้จากการตรึงของถั่วพุ่มดำที่ปลูกในแปลงทดลองของศูนย์ฯหนองหอยในระยะ R. 3.5	35
8	ผลของสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกเมล็ดต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดปมตามระยะรากของถั่วพุ่มในฤดูกาลปลูกครั้งแรกของดินจากศูนย์ฯแม่สะป๊อก	37

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
9	ผลของสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกเมล็ดต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดปมตามระยะรากของถั่วพุ่มในฤดูกาลปลูกครั้งแรกของดินจากศูนย์ฯหนองหอย	38
10	ผลของสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกเมล็ดต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดปมตามระยะรากของถั่วพุ่มในฤดูกาลปลูกที่ 2 ของดินจากศูนย์ฯแม่สะป๊อก	39
11	ผลของสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกเมล็ดต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดปมตามระยะรากของถั่วพุ่มในฤดูกาลปลูกที่ 2 ของดินจากศูนย์ฯ หนองหอย	40

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญภาพ

รูป		หน้า
1	การสุ่มเก็บตัวอย่างปมจากต้นถั่วพุ่มในแต่ละกระถางตามช่วงการเกิดปมบนรากของถั่วพุ่ม	24
2	สภาพพื้นที่ที่ใช้ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มในดินที่เป็นกรดในพื้นที่สูง	26
3	ลักษณะการเจริญเติบโตของต้นถั่วพุ่มในแปลงทดลองศูนย์ฯแม่สะป๊อกที่ระยะ R. 3.5 อายุ 50 วันหลังปลูกสำหรับฤดูกาลปลูกที่ 1	27
4	ลักษณะการเจริญเติบโตของต้นถั่วพุ่มในแปลงทดลองศูนย์ฯแม่สะป๊อกที่ระยะ R. 3.5 สำหรับฤดูกาลปลูกที่ 2	28
5	ต้นถั่วพุ่มดำในแปลงทดลองสถานีหนองหอยฤดูกาลแรกที่ระยะ R. 3.5 อายุ 60 วันหลังปลูก	33
6	ลักษณะของการเจริญเติบโตของต้นถั่วพุ่มในแปลงทดลองในสถานีหนองหอยในฤดูกาลปลูกที่ 2 (อายุ 49) วันหลังปลูก	33
7	การเจริญเติบโตของต้นถั่วพุ่มจากการทดลองในกระถางในระยะ R. 3.5 โดยใช้ดินจากพื้นที่ของศูนย์ฯแม่สะป๊อก (ก) และศูนย์หนองหอย (ข)	36
8	ลายพิมพ์ DNA จากปมถั่วพุ่ม (lane 4-19) ในฤดูกาลปลูกที่ 1 เปรียบเทียบกับเชื้อบริสุทธิ์แต่ละสายพันธุ์ (lane 1 2 และ 3 เป็นเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์ CP-PHT4 CP-TLA5 และ CP-NK3 ตามลำดับ) โดยใช้เทคนิค REP-PCR (ก) และ ERIC-PCR (ข)	37
9	ตัวอย่างลายพิมพ์ DNA จากปมถั่วพุ่มที่ระยะรากต่างๆ และแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดปมของถั่วพุ่มที่ปลูกในดินจากศูนย์ฯแม่สะป๊อกในฤดูกาลปลูกที่ 1 โดยใช้เทคนิค REP-PCR โดยที่ lane 1 เป็นลายพิมพ์ DNA ของเชื้อบริสุทธิ์ของสายพันธุ์แบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกเมล็ดเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบและ lane 2-12 เป็นลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากปมถั่วพุ่ม	42

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญภาพ (ต่อ)

รูป		หน้า
10	ตัวอย่างลายพิมพ์ DNA จากปมถั่วพุ่มที่ระยะรากต่างๆ และแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดปมของถั่วพุ่มที่ปลูกในดินจากศูนย์ฯแม่สะป๊อกในฤดูกาลปลูกที่ 1 โดยใช้เทคนิค ERIC-PCR โดยที่ lane 1 เป็นลายพิมพ์ DNA ของเชื้อบริสุทธิ์ของสายพันธุ์แบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกเมล็ดเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบและ lane 2-12 เป็นลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากปมถั่วพุ่ม	43
11	ตัวอย่างลายพิมพ์ DNA จากปมถั่วพุ่มที่ระยะรากต่างๆ และแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดปมของถั่วพุ่มที่ปลูกในดินจากศูนย์ฯหนองหอยในฤดูกาลปลูกที่ 1 โดยใช้เทคนิค REP-PCR โดยที่ lane 1 เป็นลายพิมพ์ DNA ของเชื้อบริสุทธิ์ของสายพันธุ์แบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกเมล็ดเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบและ lane 2-12 เป็นลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากปมถั่วพุ่ม	44
12	ตัวอย่างลายพิมพ์ DNA จากปมถั่วพุ่มที่ระยะรากต่างๆ และแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดปมของถั่วพุ่มที่ปลูกในดินจากศูนย์ฯหนองหอยในฤดูกาลปลูกที่ 1 โดยใช้เทคนิค ERIC-PCR โดยที่ lane 1 เป็นลายพิมพ์ DNA ของเชื้อบริสุทธิ์ของสายพันธุ์แบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกเมล็ดเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบและ lane 2-12 เป็นลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากปมถั่วพุ่ม	45

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวก		หน้า
ก 1	ส่วนประกอบของสารละลายผสมสำหรับการทำ REP-PCR	82
ก 2	ส่วนประกอบของสารละลายผสมสำหรับการทำ ERIC-PCR	83
ก 3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer ที่ใช้ในการทดลอง	83
ก 4	โปรแกรมในการทำ REP- และ ERIC-PCR	84
ข 1	แสดง ANOVA ของน้ำหนักสด (SFW) และแห้งของส่วนเหนือดิน (SDW) น้ำหนักแห้งปมของถั่วพุ่มดำ (NDW) ที่ปลูกในแปลงทดลองของศูนย์ฯแม่สะป๊อกและศูนย์ฯหนองหอยในระยะ R. 3.5 สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มในการส่งเสริมการตรึงไนโตรเจนของถั่วพุ่มดำ	85
ข 2	แสดง ANOVA ของดัชนี ureide สัมพัทธ์ ปริมาณ N ที่ตรึงได้จากอากาศ ปริมาณ N ทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดิน (N-uptake) % N ที่ได้จากการตรึงของถั่วพุ่มดำที่ปลูกในแปลงทดลองของศูนย์ฯแม่สะป๊อกและศูนย์ฯหนองหอยในระยะ R. 3.5 สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มในการส่งเสริมการตรึงไนโตรเจนของถั่วพุ่มดำ	86
ข 3	แสดง ANOVA ของน้ำหนักสด (SFW) และแห้งของส่วนเหนือดิน (SDW) น้ำหนักแห้งปมของถั่วพุ่มดำ (NDW) ที่ปลูกในแปลงทดลองของศูนย์ฯแม่สะป๊อกและศูนย์ฯหนองหอยในระยะ R. 3.5 สำหรับการศึกษาความจำเป็นในการใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในการปลูกถั่วพุ่มในฤดูกาลที่ 2	87
ข 4	แสดง ANOVA ของดัชนี ureide สัมพัทธ์ ปริมาณ N ที่ตรึงได้จากอากาศ ปริมาณ N ทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดิน (N-uptake) % N ที่ได้จากการตรึงของถั่วพุ่มดำที่ปลูกในแปลงทดลองของศูนย์ฯแม่สะป๊อกและศูนย์ฯหนองหอยในระยะ R. 3.5 สำหรับการศึกษาความจำเป็นในการใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว ในการปลูกถั่วพุ่มในฤดูกาลที่ 2	88

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวก		หน้า
ข 5	แสดง ANOVA ของจำนวนปมของถั่วพุ่มในฤดูกาลเพาะปลูกครั้งแรกสำหรับการศึกษาความสามารถของสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกเมล็ด	89
ข 6	แสดง ANOVA ของจำนวนปมของถั่วพุ่มสำหรับการศึกษาความจำเป็นในการใช้เชื้อซ้ำในฤดูกาลปลูกที่ 2	89

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อักษรย่อ

A	Adenoside nucleotide
ANOVA	analysis of variance
bp	Base pair
C	Cytidine nucleotide
CV	coefficient of variation
df	degree of freedom
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate
EDTA	Ethylene diamine tetraacetate
ERIC	Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences
G	Guanoside nucleotide
I	Inosine nucleotide
IAA	Indoacetic acid
ABA	Abscisic Acid
GA	Gibberellic acid
Kb	Kilobase
mM	Milimolar
M	Molar
MS	mean square
µg	Microgram
µl	Mcroliter
nM	Nanomole
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase chain reaction

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

p mole	Picomole
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
rDNA	Ribosomal deoxyribonucleic acid
REP	Repetitive extragenic palindromic sequences
rep-PCR	PCR DNA fingerprinting with repetitive sequences
RFLP	Restriction fragment length polymorphisms
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
rxn	Reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
T	Thymidine nucleotide
U	Unit
YM	Yeast-manital
YMA	Yeast-manital agar

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved