บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ถั่วพุ่ม (cowpea, *Vigna unguiculatata*) เป็นพืชตระกูลถั่วที่นิยมใช้สำหรับปลูกเพื่อเป็นปุ๋ยพืชสดในเขตค่อนข้างแห้งแล้งในเอเชียใต้ นอกจากนี้ยังมีการใช้เป็นอาหารและใช้เลี้ยงสัตว์ในเขตแห้งแล้งใน sub-Saharan ในแอฟริกา พืชตระกูลถั่วชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วและตรึงไนโตรเจนได้มาก แต่ให้ผลผลิตเมล็ดค่อนข้างต่ำ (Franzluebbers *et al*.,1994) จากรายงานของ Morris *et al*. (1986), Singh *et al*. (1981) ซึ่งอ้างโดย Franzluebbers *et al*. (1994) ถั่วพุ่มซึ่งปลูกในอินเดียและฟิลิปปินส์ที่มีอายุ 6 สัปดาห์ สามารถสะสม N ในส่วนเหนือดินได้ถึง 70-80 กก./เฮกตาร์ นอกจากนี้ถั่วพุ่มยังมีความสามารถทนแล้งและความเป็นกรดของดินได้ดี (John *et al*., 1992)

เนื่องจากถั่วพุ่มเป็นถั่วชนิดหนึ่งที่สามารถเปลี่ยนรูป N ที่ได้จากการตรึง N ที่ปมถั่วให้เป็นสารประกอบยูริไอด์ และเคลื่อนย้าย N ในรูปของสารประกอบยูริไอด์จากปมไปยังส่วนเหนือดินผ่านท่อน้ำเลี้ยง (xylem) ดังนั้นในการประเมินปริมาณ N ที่ได้จากการตรึง N ของถั่วพุ่มจึงสามารถใช้วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบของ N จากน้ำเลี้ยงได้ (Mcclurre and Tsrael, 1979 อ้างโดย Herride and Peoples, 2002a) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวเรียกว่า วิธีวิเคราะห์ยูริไอด์ในท่อน้ำเลี้ยง (xylem solute method) สำหรับวิธีการวัดการตรึง N ของถั่วชนิดต่างๆที่อยู่ในกลุ่มลำเลียงยูริไอด์ จำเป็นต้องใช้วิธีการเก็บข้อมูลจากการปลูกถั่ว 6-8 ครั้ง ตั้งแต่ระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบจนถึงช่วงท้ายของระยะเจริญพันธุ์ (Herride, 1982 ; People *et al*., 1989 อ้างโดย Herride and Peoples, 2002a)

Herride and Peoples (2002b) ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ N โดยยูริไอด์เทคนิคที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างพืชและวิเคราะห์องค์ประกอบจากท่อน้ำเลี้ยงเพียง 1 ครั้งตลอดฤดูเพาะปลูก ในการศึกษาใช้พืชตระกูลถั่ว 4 ชนิด ได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วพุ่ม ถั่วเขียวผิวมัน (*V. radiate*) ถั่วเขียวผิวดำ (black gram, *V. mango*) เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงจากท่อน้ำเลี้ยงที่ระยะ R.3.5-R.4 ซึ่งเป็นระยะที่ฝักเริ่มติดเมล็ดเพียงระยะเดียว เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาสัดส่วนของยูริไอด์-N จากท่อน้ำเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบกับ N ทั้งหมดและประเมินหาเปอร์เซ็นต์ของ N ที่ได้จากการตรึง (% N derived from air, % Ndfa) จากสัดส่วนของยูริไอด์- N ในท่อน้ำเลี้ยง พบว่าวิธีการที่พัฒนาโดยการใช้การเก็บข้อมูลเพียงหนึ่งครั้งที่ระยะ R.3.5-R.4 เป็นวิธีการที่ใช้ได้ดี % Ndfa ที่เกิดจากการวิเคราะห์สัดส่วน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของยูริไอด์-N ที่ระยะการเจริญเติบโตดังกล่าวใกล้เคียงกับ % Ndfa ที่ได้จากการวิเคราะห์ ^{15}N ของส่วนเหนือดินที่ระยะ R. 6 - 7

สำหรับการคำนวณ % Ndfa ของถั่วพุ่มจากสัดส่วนของยูริไอด์- N ในน้ำเลี้ยงจากตอรากที่ระยะ R.3.5-R.4 นั้น Herride and Peoples (2002b) ได้เสนอสมการสำหรับคำนวณโดยใช้สมการถดถอยระหว่างเปอร์เซ็นต์ยูริไอด์- N ของน้ำเลี้ยงจากตอรากกับเปอร์เซ็นต์ N ที่ได้จากการตรึงโดยวิเคราะห์ ^{15}N (%Pfix) ดังนี้

$$y = 8.6 + 0.75x \qquad (r = 0.97)$$

เมื่อ y คือ % ยูริไอด์-N ของน้ำเลี้ยงจากตอราก

x คือ % Pfix หรือ % Ndfa

ลักษณะทั่วไปของแบรดดีไรโซเบียม (*Bradyrhizobium*)

Bradyrhizobium เป็นเชื้อชนิดโตช้า และผลิตเบสเมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร mineral salt mannitol (Jordan, 1984) ดังนั้นถ้าเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร YM (pH 6.8) ที่เติม bromthymol blue เป็นอินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีฟ้าหรือสีน้ำเงิน (Somasegaran and Hoben, 1994) เชื้อกลุ่มนี้ทำให้เกิดปมในถั่วเหลือง (*Glycine*) cowpea (*Vigna*) siratro (*Macroptitium*) บัว (*Lotus*) และพืชตระกูลถั่วหลายชนิด (Jordan, 1984) ปัจจุบันมีรายงานไว้ 3 สปีชีส์ตามลักษณะความแตกต่างในระดับโมเลกุลคือ *B. japonicum* (Jordan, 1984) *B. elkanii* (Kuykendall *et al*., 1992) และ *B. liaoniogensis* (Xu *et al*., 1995) อ้างโดย Sato *et al*. (1999) สำหรับ bradyrhizobia ที่ยังไม่ได้จัดจำแนกให้จัดอยู่ในกลุ่มของ *Bradyrhizobium* ตามด้วยชื่อของพืชอาศัย (Jordan, 1984)

ความจำเป็นในการคลุกเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว

ในเขตร้อนการขาด N เป็นปัจจัยหนึ่งที่จำกัดการให้ผลผลิตสูงของธัญพืชซึ่งพบบ่อยมากระดับของความขาดแคลน N ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างเช่นความอุดมสมบูรณ์ตามธรรมชาติ ชนิดของพืชที่ปลูกว่าเป็นพืชตระกูลถั่วหรือพืชชนิดอื่นที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่ว ระบบการปลูกพืชและความชำนาญของเกษตรกรที่ปลูกพืชชนิดนั้นๆ สำหรับระบบการปลูกพืชและความชำนาญของเกษตรกรมีหลากหลายคือ มีต่ำแค่ระดับพื้นฐานซึ่งเกษตรกรไม่ได้ใช้เครื่องจักรกลในการเพาะปลูกจนกระทั่งการปลูกแบบการค้าขนาดใหญ่ซึ่งต้องอาศัยเครื่องจักรกลในการดำเนินงาน อย่างไรก็ตามไม่ว่าจะเป็นระดับใด ความสำเร็จในการปลูกพืชตระกูลถั่วขึ้นกับความสามารถของพืชชนิดชนิดนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการตรึง N ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในกรณีที่ดินไม่มีเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่มีประสิทธิภาพอยู่ในดินตามธรรมชาติ ผู้ปลูกสามารถเพิ่มปริมาณเชื้อโดยการคลุกเมล็ดถั่วด้วยเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ผ่านการคัดกรองแล้วว่ามีประสิทธิภาพดี

Date (2000) ได้อ้างถึงผลงานของ Hellriegel (1886a, b) และ Hellriegel and Wilfarth (1888) ซึ่งได้ค้นพบแบคทีเรียที่ทำให้พืชตระกูลถั่วเกิดปมและเป็นผลทำให้มีการใช้ดินที่มีการปลูกถั่วมาก่อนคลุกเมล็ดถั่วก่อนปลูกและยังได้อ้างถึงผลงานของ Beijerinck (1888) ซึ่งได้แยกเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วบริสุทธิ์ได้จากปมถั่วซึ่งเป็นผลให้มีการเริ่มใช้หัวเชื้อไรโซเบียมในรูปของผงดินพีทและต่อมาก็ได้มีการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมในรูปแบบอื่นๆ (Fred *et al*., 1932 อ้างโดย Date, 2000) แต่ก็มีรายงานเกี่ยวกับความล้มเหลวในการใช้เชื้ออยู่เสมอซึ่งความล้มเหลวในการใช้เชื้อไรโซเบียมมีสาเหตุมาจากการใช้หัวเชื้อที่มีคุณภาพต่ำ เชื้อไรโซเบียมที่ใช้คลุกไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้บนเมล็ดที่ผ่านการคลุกเชื้อ เชื้อที่อยู่ในหัวเชื้อไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในดินหรือในบริเวณรากถั่ว หรือเชื้อที่ใช้ไม่สามารถแข่งขันกับเชื้อไรโซเบียมที่มีอยู่ในธรรมชาติในการเข้าไปสร้างปมกับต้นถั่วที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อ ซึ่งปัญหาเหล่านี้พบทั้งในถั่วที่ใช้ผลิตเมล็ดเพื่อการบริโภค ถั่วที่เป็นพืชอาหารสัตว์และถั่วที่ปลูกเป็นพืชบำรุงดิน ในบางกรณีเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่มีอยู่ในดินตามธรรมชาติสามารถสร้างปมที่มีประสิทธิภาพได้สำหรับพืชตระกูลถั่วชนิดใหม่ที่เพิ่งปลูกในพื้นที่เป็นครั้งแรก และพืชตระกูลถั่วหลายชนิดก็สามารถเกิดปมกับเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วหลากหลายพันธุ์ ในขณะที่พืชตระกูลถั่วบางชนิดจะเกิดปมที่มีประสิทธิภาพกับเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วบางสายพันธุ์เท่านั้น (Date, 1977)

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันยังไม่มีกฎเกณฑ์ทั่วไปที่ผู้ปลูกถั่วสามารถใช้ทำนายลักษณะการตอบสนองของพืชตระกูลถั่วต่อเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ผ่านการคัดเลือกแล้วหรือการตอบสนองต่อเชื้อที่มีอยู่ในดินตามธรรมชาติ แต่ Thies *et al*. (1991) ได้เสนอโมเดลที่จะใช้ทำนายการตอบสนองของพืชตระกูลถั่วต่อเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วซึ่งโมเดลดังกล่าวได้คำนึงถึงปริมาณของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในธรรมชาติและสภาวะของ N ในดิน จากความรู้เกี่ยวกับความจำเพาะเจาะจงในการเกิดปมและประสิทธิภาพในการตรึง N ในพืชตระกูลถั่วที่อยู่ในเขตร้อนซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาโดยเฉพาะพื้นที่ที่เปิดใหม่สำหรับใช้ในการปลูกพืช จุดประกายให้เห็นถึงความจำเป็นในการใช้เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วและมีรายชื่อที่พืชตระกูลถั่วที่มีความจำเพาะเจาะจงในการเกิดปมกับเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วเพิ่มขึ้น ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ขัดแย้งกับรายงานเดิมที่มีอยู่ก่อนหน้านี้ที่กล่าวว่า พืชตระกูลถั่วที่อยู่ในเขตร้อนสามารถเกิดปมได้ดีกับเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่อยู่ในดินตามธรรมชาติและไม่มีความจำเป็นในการใช้เชื้อ จากรายงานของ Ayanaba (1977) และ Graham (1985) ได้กล่าวถึงพื้นที่บางพื้นที่ในบริเวณตอนกลางของอเมริกา อเมริกากลาง และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประเทศอินเดียซึ่งถั่วเหลืองมีการตอบสนองต่อการใช้เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในช่วงตั้งแต่ 14-603% สำหรับพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองส่วนใหญ่ในโลกพันธุ์ถั่วเหลืองพัฒนามาจากถั่วเหลืองลูกผสมของประเทศอเมริกา ซึ่งค่อนข้างมีความจำเพาะเจาะจงในการเกิดปมและการตรึง N กับเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วบางสายพันธุ์ ในขณะที่ถั่วเหลืองจากเอเชียไม่ค่อยมีความจำเพาะเจาะจง (promiscuous) กับสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว และส่วนใหญ่ไม่ตอบสนองต่อการใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว (Iita, 1978, 1979; Pluver *et al*., 1982 อ้างโดย Date, 2000) และไม่สามารถตรึง N ได้ดีเมื่อใช้สายพันธุ์ไรโซเบียมที่มาจากประเทศอเมริกา (Keysea *et al*., 1982; Eaglesham, 1985 อ้างโดย Date, 2000)

ในแง่ของความจำเป็นในการใช้เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว Allen and Allen (1958) (อ้างโดย Date, 2000) ได้กล่าวถึงสภาวะที่การใช้แบคทีเรียปมรากถั่วจะได้ผลดีดังนี้

1. เมื่อพื้นที่ที่จะปลูกถั่วไม่เคยมีการปลูกถั่วมาก่อนหรือถั่วที่จะปลูกเป็นถั่วต่างกลุ่มกับถั่วที่เคยปลูกในพื้นที่นั้นมาก่อน
2. เมื่อพื้นที่ที่จะปลูกถั่วมีการเกิดปมน้อย
3. เมื่อมีการปลูกถั่วตามหลังพืชชนิดอื่นที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่ว
4. เมื่อพื้นที่ที่จะปลูกถั่วเป็นพื้นที่เสื่อมโทรมซึ่งเพิ่งได้รับการฟื้นฟูสภาพ

นอกจากนี้การใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วจะได้ผลดีหรือไม่ยังขึ้นอยู่กับความจำเพาะของถั่วที่จะปลูกต่อเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว การแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่มีประสิทธิภาพดีหลังจากปลูกถั่วครั้งแรก ประวัติการปลูกถั่วในพื้นที่ และจำนวนครั้งของการปลูกถั่วอย่างต่อเนื่อง

สาเหตุในการใช้เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วไม่ได้ผล

ความล้มเหลวในการคลุกเชื้อมักเกิดจากสาเหตุใดสาเหตุหนึ่งดังต่อไปนี้ (Singleton and Tavares, 1986)

1. เชื้อที่ใช้คลุกไม่สามารถแข่งขันกับเชื้อที่มีอยู่เดิมในดิน
2. เชื้อที่คลุกไม่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ เนื่องจากดินมีอุณหภูมิหรือความชื้นต่ำเกินไป
3. ดินที่ใช้ปลูกมีความเป็นประโยชน์ของไนโตรเจนในดินสูง
4. เชื้อที่มีอยู่เดิมในดินมีประสิทธิภาพดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เกณฑ์ประเมินปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดิน

ในการหาปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินใช้วิธีการหาปริมาณโดยวิธี plant infection count โดยนำดินที่จะหาปริมาณเชื้อไรโซเบียมไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้มีความเข้มข้นของสารละลายดินในระดับต่างๆ ใส่สารละลายดินแต่ละความเข้มข้นให้กับต้นถั่วที่ใช้เป็นพืชอาศัย ซึ่งปลูกใน plastic growth pouch เพื่อให้เชื้อไรโซเบียมที่อยู่ในสารละลายดินเข้าไปสร้างปมที่รากถั่ว แต่ละความเข้มข้นใช้ต้นถั่ว 2-5 ต้นในการทดสอบ นับจำนวนต้นถั่วที่มีปม จากจำนวนต้นถั่วที่มีปมนำไปอ่านค่าปริมาณของเชื้อไรโซเบียมในดินจากตาราง most probable number (MPN) (Somasegaran and Hoben, 1994)

สำหรับเกณฑ์การประเมินปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินโดยวิธี plant infection count มีดังนี้ (Vincent, 1970)

ปริมาณเชื้อไรโซเบียม (เซลล์/กรัมดินแห้ง)	การประเมิน
< 25	มีน้อยมาก
25 - 1000	มีน้อย
1000 - 100000	มีมาก
> 100000	มีมากที่สุด

รายงานการศึกษาปริมาณเชื้อไรโซเบียมในธรรมชาติในเขตกึ่งแห้งแล้งและกึ่งชื้นของ Maingi *et al.* (2006) พบว่ามีประชากรเชื้อในธรรมชาติ $2.59x10^2$-$1.89x10^5$ เซลล์/กรัมดิน และ $1.33x10^2$-$7.56x10^3$ เซลล์/กรัมดินตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่เพียงพอต่อการตรึง N และการเกิดปมของถั่วเหลืองของทั้ง 2 พื้นที่ ในปีเดียวกัน Theuri *et al.* (2006) ศึกษาปริมาณของเชื้อพื้นเมืองที่เกิดปมกับถั่ว cowpea และ common bean ในดินของประเทศเคนยาตอนกลางซึ่งมีค่า pH 4-6.4 พื้นที่ที่มีค่า pH 4 จะมีเชื้อในธรรมชาติ 78 เซลล์/กรัมดิน ในขณะที่พื้นที่อื่นมีปริมาณเชื้อมากกว่า 900 เซลล์/กรัมดิน Fening and Denso (2002) และ Fening *et al.* (2001) ศึกษาปริมาณและประเมินศักยภาพการตรึง N ของเชื้อธรรมชาติกับถั่ว cowpea 45 สายพันธุ์ในดิน 20 ชนิดที่ประเทศกรานา พบว่าดินส่วนใหญ่มีปริมาณเชื้อไรโซเบียมสูง คืออยู่ในช่วง 0.6x10-$3.1x10^4$ เซลล์/กรัมดิน พื้นที่ 60% มีเชื้อมากกว่า $3x10^3$ เซลล์/กรัมดิน ในแง่ของประสิทธิภาพการตรึง N สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น ineffective 6% moderately effective 68% และ highly effective 26% สำหรับกลุ่มที่ตรึง N ได้ดีสามารถให้ผลผลิตถั่วได้ดีเท่ากับการใส่ปุ๋ย 70 กก.N/เฮกตาร์ ซึ่งการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อในธรรมชาติหากคัดเลือกแล้วสามารถใช้เป็นหัวเชื้อที่มีประสิทธิภาพได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความสามารถในการแข่งขันการเข้าสู่ปมของเชื้อไรโซเบียม

1. ปัจจัยด้านชีวภาพ (Bological factor) เช่น bacteriophages (Evans *et al*., 1979 อ้างโดย Romdhane *et al*., 2007) epiphytic bacteria (Handelsmom and Brill, 1985 อ้างโดย Romdhane *et al*., 2007) ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในธรรมชาติ (Thies *et al*., 1991, 1992) และใน Rhizosphere (Moawat *et al*., 1984) ในกรณีผลกระทบเนื่องจาก epiphytic bacteria นั้น จากรายงานของ Handelsmom and Brill (1985) พบว่า *Erwinia herbicola* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบบนเมล็ดของถั่ว alfalfa ทุกพันธุ์สามารถยับยั้งกระบวนการเข้าไปสร้างปมในระยะแรกของเชื้อ *R. meliloti* บางสายพันธุ์ที่มีความอ่อนแอ (sensitive) ต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ โดยที่เชื้อ *E. herbicola* สร้าง toxin หรือขัดขวางไม่ให้เชื้อ *R. meliloti* เกาะติดรากขนอ่อนของถั่ว alfalfa ได้ ในกรณีของ bacteriophage จากรายงานของ Schwinghamer and Blockwell (1987) ซึ่งอ้างโดย Dowling and Broughton (1986) พบว่า *R. trifolii* ซึ่งมี virus (phage) อยู่ในเซลล์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. trifolii* สายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อ virus อย่างรุนแรง Dowling and Broughton (1986) ยังได้อ้างถึงผลงานของ Evan *et al*. (1979) และ Barnet (1980) ซึ่งพบว่าการใส่ virus ที่มีความรุนแรง (virulent bacteriophage) ให้ *R. trifolii* 2 สายพันธุ์ เป็นผลทำให้สายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อ virus ในบริเวณถั่ว clover มีปริมาณน้อยลง ซึ่งทำให้สายพันธุ์ที่ต้านทาน virus สร้างปมได้มากขึ้น นอกจากนี้ Almendras and Bottomley (1985) และ Stacy *et al*. (1984) อ้างโดย Dowling and Broughton (1986) ยังได้รายงานว่าความอ่อนแอหรือความต้านทานต่อ virus ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วมีผลกระทบต่อความสามารถในการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วกับพืชอาศัย เนื่องจากตำแหน่งที่พืชอาศัยขับสาร polysaccharide เป็นตำแหน่งที่แบคทีเรียกับพืชอาศัยเกิดปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน และเป็นตำแหน่งเดียวกันกับที่ virus เข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามในสภาพแปลงทดลองปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วกับ virus อาจแตกต่างไปจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการ เพราะอนุภาคดินเหนียวและอินทรียวัตถุอาจทำให้ผลกระทบในทางลบดังกล่าวลดลงหรือไม่เกิดขึ้น (Rossen et al., 1984 อ้างโดย Dowling and Broughton, 1986)

สำหรับอิทธิพลของ rhizosphere ซึ่งเป็นดินที่ได้รับอิทธิพลจากรากพืชและเป็นดินในพื้นที่ประมาณ 2 ซม.จากผิวรากเป็นบริเวณที่มีคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน และไวตามินสะสมอยู่ในปริมาณที่สูง (Rovira, 1596 อ้างโดย Dowling and Broughton, 1986) และเป็นบริเวณที่มีการแข่งขันระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆรวมทั้งเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วสูงมาก เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วต้องเพิ่มจำนวนประชากรในบริเวณ rhizosphere และเกาะยึดกับรากถั่วที่เป็นพืชอาศัยเพื่อเข้าไปสร้างปม จากรายงานของ Moawat *et al*. (1984) ซึ่งได้ศึกษาการแข่งขันในการเกิดปมของเชื้อ *B. japonicum* 3 serogroup พบว่าในช่วง 1 สัปดาห์หลังการปลูกถั่วประชากรของ *B. japonicum* ทั้ง 3 serogroup เพิ่มขึ้นจาก 10^4 เซลล์/กรัมเป็น 10^6 เซลล์/กรัม ในขณะที่ดินที่ไม่ได้ปลูกถั่วมีประชากรของเชื้อดังกล่าวคงอยู่ที่ 10^4 เซลล์/กรัม ประชากรของเชื้อ *B. japonicum* serogroup 123 ซึ่งครอบครองปมที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เกิดขึ้นทั้งหมดได้ถึง 60-100% มีประชากรของเชื้อในบริเวณ rhizosphere ไม่แตกต่างจาก serogroup ที่เหลืออีก 2 serogroup ประชากรของเชื้อทั้ง 3 serogroup ในบริเวณ rhizosphere ยังคงเดิมในช่วงตั้งแต่ออกดอกจนถึงฝักเริ่มติดเมล็ด จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาดังกล่าว ผู้ทดลองสรุปว่าการมราเชื้อ serogroup 123 มีความสามารถในการแข่งขันดีกว่าไม่ใช่เป็นเพราะเชื้อ serogroup นี้มีความสามารถเหนือกว่า serogroup อื่นในการครอบครองพื้นที่ในบริเวณ rhizosphere อย่างไรก็ตาม การที่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วมีประชากรเพิ่มขึ้นในบริเวณ rhizosphere อาจเกี่ยวข้องกับความสามารถคงอยู่รอดของเชื้อสำหรับการปลูกถั่วในฤดูกาลต่อไป (Bushy, 1984 อ้างโดย Dowling and Broughton, 1986)

2. ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ (Trinick *et al*., 1983 อ้างโดย Romdhane *et al.*, 2007) ความเป็นกรดเป็นด่างของดิน โดยการจำกัดการอยู่รอดของเชื้อไรโซเบียมในดิน ซึ่งเชื้อไรโซเบียมมีความแตกต่างกันของสายพันธุ์ในการปรับตัวภายใต้สภาพดินที่มี pH ต่างๆ (Damirgi *et al*., 1967 อ้างโดย Romdhane *et al*., 2007; Appunu and Dhar, 2006) N ในดิน (Mcneil, 1982 อ้างโดย Romdhane *et al*., 2007) การเจริญเติบโตของพืช ความเป็นพิษของ Al ในดิน (Wolff *et al*., 1991)

3. ความสามารถของเชื้อที่ใช้ในการมีชีวิตรอดในดินเพื่อการสร้างปมในฤดูกาลถัดไป (Brockwell and Davis, 1987 อ้างโดย Romdhane *et al*., 2007)

4. พันธุ์ของถั่วและการเข้ากันได้ของเชื้อและพืชอาศัย

5. วิธีการใช้เชื้อ จากรายงานของ Bogino *et al*. (2008) ศึกษาความสามารถในการแข่งขันของ *Bradyrhizobium* ที่ใช้เป็นการค้ากับเชื้อที่มีอยู่ตามธรรมชาติ และวิธีการใส่เชื้อ 2 วิธีคือ การคลุกเชื้อกับเมล็ดโดยตรงในอัตรา $2x10^6$ เซลล์/เมล็ด และใส่เชื้อลงไปในร่องปลูกในอัตรา 1.5 ลิตร/เฮกตาร์ ซึ่งเชื้อที่ใช้ทั้งสองวิธีเป็นของเหลวมีปริมาณเชื้อ 10^9 เซลล์/มล. โดยทำการทดลองในกระถาง ผลการทดลองพบว่า วิธีการคลุกเชื้อกับเมล็ดโดยตรงทำให้เชื้อ *Bradyrhizobium* ที่ใช้สามารถเกิดปมได้เพียง 9% จากปมที่เกิดขึ้นทั้งหมด ในขณะที่การใส่เชื้อในร่องปลูกทำให้เชื้อสามารถเข้าไปสร้างปมได้ถึง 78%

ผลของปริมาณเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในดินต่อความสามารถในการแข่งขันเข้าสู่ปมของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว

มีรายงานที่หลากหลายเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในดินกับการตอบสนองของต้นถั่วต่อการคลุกเชื้อ จากรายงานของ Ikram and Broughton (1980) ซึ่งได้ศึกษาความสามารถของเชื้อไรโซเบียม 8 สายพันธุ์ในการเกิดปมกับถั่ว *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. ในดินที่แตกต่างกัน 3 ชนิดคือ ดินเหนียวปนทราย (Renggam series) ดินร่วนปนทราย (Sungei Buloh series) และดินเหนียวปนร่วน (Munchong series) ทั้งในกระถางและ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แปลงทดลอง พบว่าจากการทดลองในกระถางดินที่ใช้ทดลองมีเชื้อในธรรมชาติ 4-13 cell/กรัมดิน ไรโซเบียมทั้ง 8 สายพันธุ์มีเพียง 2 สายพันธุ์คือสายพันธุ์ RRIM 56 และ 698 ซึ่งสร้างปมได้มากกว่า 50 % ในดินทุกชนิด สำหรับในดินเหนียวปนร่วน เชื้อสายพันธุ์ RRIM 56 สามารถสร้างปมได้ถึง 90% ถ้าเชื้อในธรรมชาติมี 5 เซลล์/กรัมดิน แต่ถ้ามีถึง 700 เซลล์/กรัมดิน เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสร้างปมได้เพียง 14% ส่วนการทดลองในแปลงทดลอง ในดินชนิดเดียวกันที่มีเชื้อธรรมชาติ 700 cell/กรัมดิน พบว่าการใส่เชื้อไรโซเบียมทั้ง 8 สายพันธุ์ไม่ทำให้ถั่วมีการตอบสนองต่อการใส่เชื้อ โดยเชื้อที่ใส่สามารถสร้างปมได้ไม่เกิน 18% ของจำนวนปมทั้งหมดที่เกิดขึ้นที่รากและมี 2 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างปมเลย จากการทดลองนี้ Ikram และ Broughton (1980) ได้ให้ข้อคิดเห็นว่าไม่มีความจำเป็นในการใส่เชื้อสำหรับการปลูกถั่วสำหรับดินที่มีเชื้อยู่ในธรรมชาติปริมาณมาก แต่ก็พบว่าสายพันธุ์ที่ใช้ในการคลุกเมล็ดสามารถสร้างปมได้มากขึ้นเมื่อระยะเวลาต่อมา

Singleton and Tavares (1986) ศึกษาปริมาณเชื้อไรโซเบียมในดินที่มีผลต่อการใช้เชื้อคลุกกับเมล็ดถั่วจำนวน 6 ชนิดที่ปลูกในดิน 4 ชนิดในมลรัฐฮาวาย ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในธรรมชาติอยู่ในช่วงตั้งแต่ 6x10-1x10^4 เซลล์/กรัมดิน พบว่าเชื้อที่ใช้คลุกเมล็ดสามารถสร้างปมได้ 76% ของจำนวนปมทั้งหมดเมื่อมีเชื้อในธรรมชาติ 2x10 เซลล์/กรัมดิน และจากรายงานของ Beattie and Handelsman (1993) อ้างโดย Palaniappan *et al.* (1997) พบว่าถ้าดินมีเชื้อพื้นเมืองมากกว่า 100 เซลล์/กรัมดินถั่วที่ปลูกมีการตอบสนองต่อการใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วน้อยหรือไม่มีการตอบสนองต่อการใส่เชื้อเลย ถ้าดินไม่มีเชื้อเลยการใส่เชื้อ 10^2 เซลล์/เมล็ด ก็ทำให้ถั่วมีการตอบสนองต่อการใส่เชื้อสูงสุด หากจะให้เชื้อที่ใช้คลุกสร้างปมได้ถึง 50% ของจำนวนปมที่เกิดขึ้นทั้งหมดต้องใส่เชื้อให้มากกว่าเชื้อพื้นเมือง 1000 เท่า (Weaver and Frederick, 1974 อ้างโดย Palaniappan *et al*., 1997)

จากรายงานของ Thies *et al*. (1991) ซึ่งได้ศึกษาปริมาณของเชื้อไรโซเบียมในธรรมชาติที่มีอิทธิพลต่อการตอบสนองการใส่เชื้อไรโซเบียมกับถั่ว 9 ชนิดในสภาพแปลงทดลองที่มีปริมาณเชื้อในดินตั้งแต่ 0-3.5x10^4 เซลล์/กรัมดิน รวม 29 การทดลอง พบว่ามี 22 การทดลองซึ่งคิดเป็น 76% ของการทดลองทั้งหมดที่การใส่เชื้อไรโซเบียมมีผลทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นมากกว่า 100 กก./เฮกตาร์ และมี 11 การทดลองซึ่งเป็น 38% ที่การใส่เชื้อไรโซเบียมมีผลทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในจำนวนถั่วที่ใช้ศึกษาถั่วเหลืองมีการตอบสนองต่อการใช้เชื้อมากที่สุด ในขณะที่ถั่ว cowpea ไม่ตอบสนองต่อการใส่เชื้อทุกการทดลอง ส่วนถั่วพันธุ์อื่นมีการตอบสนองต่อการใส่เชื้อผันแปรตามพื้นที่ การตอบสนองต่อการใส่เชื้อและความสามารถในการแข่งขันจะแปรผกผันกับจำนวนเชื้อในธรรมชาติ ถ้าในดินมีเชื้อในธรรมชาติ 50 เซลล์/กรัมดิน ถั่วจะไม่ตอบสนองต่อการใส่เชื้อหากปริมาณเชื้อในธรรมชาติมีน้อยกว่า 10 เซลล์/กรัมดิน การใส่เชื้อมีผลทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญร้อยละ 85 ของการทดลองทั้งหมดและเมื่อปริมาณเชื้อมีมากกว่า 10 เซลล์/กรัมดิน การทดลองซึ่งการใส่เชื้อมีผลทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นมีประมาณ 6% ของการทดลองทั้งหมด นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบชนิดของเชื้อที่อยู่ในปม พบว่าแม้เชื้อที่ใช้คลุกอยู่ในปมได้ถึง 50% ผลผลิตก็ไม่จำเป็นจะต้องเพิ่มขึ้น ผลผลิตถั่วจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญได้เมื่อเชื้อที่ใช้สามารถสร้างปมถึง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

66% ต่อมาในปี 1992 Thies *et al.* ได้ศึกษาปัจจัยสภาพแวดล้อมต่อการแข่งขันเข้าสู่ปมของเชื้อไรโซเบียม พบว่าปัจจัยสภาพแวดล้อมที่มีความสัมพันธ์ต่อความสามารถในการแข่งขันของเชื้อที่ใช้คลุกอย่างมีนัยสำคัญคือ ปริมาณของเชื้อในธรรมชาติ และได้เสนอสมการที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ดังกล่าวไว้ดังนี้

$$y = 97.88 - 15.03 (\log_{10}(x+1))$$

เมื่อ y = เปอร์เซ็นต์การเกิดปมของเชื้อที่ใช้คลุก
x = ปริมาณเชื้อไรโซเบียมในธรรมชาติโดยวิธี MPN count

Mcdermott and Graham (1990) รายงานว่าในพื้นที่ทางตะวันออกเฉียงใต้ของอเมริกาหัวเชื้อไรโซเบียมที่ผลิตเป็นการค้าและมีประสิทธิภาพสูงเมื่อใช้กับถั่วเหลืองที่ปลูกในแปลงสร้างปมได้น้อย สาเหตุส่วนหนึ่งมาจากสายพันธุ์ที่ใช้ไม่มีความสามารถอยู่รอดได้ในดินในช่วงที่ระบบรากถั่วเหลืองกำลังพัฒนาและเป็นผลทำให้ให้สายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถแข่งขันกับเชื้อไรโซเบียมที่มีอยู่ตามธรรมชาติได้ นอกจากนี้ทั้งสองยังได้ทำการศึกษาความสามารถในการแข่งขันและประสิทธิภาพของ *Bradyrhizobium japonigum* รวมทั้งหมด 9 สายพันธุ์ ซึ่งมี 7 สายพันธุ์ที่มีการใช้เป็นหัวเชื้อทางการค้าและอีก 2 สายพันธุ์มาจากการแยกเชื้อจากปมที่เกิดขึ้นในแปลง โดยมี USDA110 เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ ในการศึกษาใช้ตัวชี้วัดสองอย่างคือ จำนวนปมที่เกิดขึ้นในแต่ละตำแหน่งของรากและตำแหน่งหรือระยะห่างของปมที่เกิดขึ้นเมื่อเทียบกับปลายรากซึ่งทำเครื่องหมายไว้ พบว่าสายพันธุ์ที่แข่งขันได้ไม่ค่อยดีจะเข้าไปสร้างปมในตำแหน่งใกล้กับปลายรากและมีจำนวนปมไม่มากนัก เมื่อนำข้อมูลด้านความสามารถในการแข่งขันมาหาความสัมพันธ์กับทั้งสองตัวชี้วัด พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ

จากรายงานของ Denton *et al*. (2003) ซึ่งได้ศึกษาความสามารถในการแข่งขันของเชื้อ *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ที่ใช้เป็นการค้ากับเชื้อธรรมชาติที่แยกได้จากแปลงปลูกจำนวน 2 isolates ในการเกิดปมกับถั่ว clover โดยงานทดลองนี้เป็นงานวิจัยต่อเนื่องจากปี 2002 พบว่า เชื้อไรโซเบียมที่ใช้ผลิตหัวเชื้อเป็นการค้าเมื่อใช้กับถั่วที่ปลูกในดินซึ่งมีสภาพเป็นด่างไม่สามารถแข่งขันกับเชื้อธรรมชาติได้ต่อมาจึงทำการทดลองในกระถางที่บรรจุทรายผสมกับ vermiculite พบว่าหัวเชื้อที่ใช้ผลิตเป็นการค้าสามารถแข่งขันเกิดปมได้ดีกว่าเชื้อที่แยกได้จากธรรมชาติ แต่เมื่อปลูกถั่วในกระถางที่บรรจุดินที่มีสภาพเป็นด่างที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อและเพิ่มปริมาณเชื้อที่ได้จากธรรมชาติ พบว่าหลังการใส่เชื้อปริมาณของเชื้อที่ใช้ผลิตหัวเชื้อเป็นการค้าในดินที่ใช้ทดลองลดลงและทำให้สัดส่วนของเชื้อดังกล่าวในปมที่เกิดขึ้นลดลงด้วย การทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้เชื้อที่ผลิตเป็นการค้าไม่ประสบความสำเร็จในการเพิ่มผลผลิตถั่วที่ปลูกในแปลงได้เนื่องจากหัวเชื้อทางการค้าไม่สามารถอยู่รอดได้ในสภาพดังกล่าว จึงทำให้ปมส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจากเชื้อในธรรมชาติ สำหรับเชื้อในธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพดีสามารถใช้ผลิตเป็นหัวเชื้อในทางการค้าได้ ดังรายงานของ Blanco *et al*. (2010) ซึ่งได้ทดสอบความสามารถในการแข่งขันในการเกิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปมของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ธรรมชาติ 2 สายพันธุ์กับเชื้อไรโซเบียมที่ใช้ผลิตหัวเชื้อเชิงการค้า เชื้อธรรมชาติที่ใช้ศึกษาแยกได้จากปมถั่วจากพื้นที่ซึ่งไม่มีการคลุกเชื้อไรโซเบียมในธรรมชาติ โดยที่สายพันธุ์หนึ่งมีประสิทธิภาพดีส่วนอีกสายพันธุ์หนึ่งไม่มีประสิทธิภาพ พบว่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีสามารถแข่งขันเข้าสู่ปมได้อย่างสมบูรณ์เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่ใช้เป็นการค้า ส่วนเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่มีประสิทธิภาพไม่สามารถแข่งขันได้กับเชื้อธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพและกับเชื้อไรโซเบียมที่ใช้ผลิตหัวเชื้อเป็นการค้า

อย่างไรก็ตามก็มีหลายพื้นที่ที่การใส่เชื้อสามารถปรับปรุงการเจริญเติบโต เพิ่มผลผลิตให้แก่ถั่ว และสามารถแข่งขันได้ดีกับเชื้อในธรรมชาติ จากรายงานของอำพรรณและคณะ, (2537) ศึกษาการตอบสนองการใส่เชื้อไรโซเบียมในพื้นที่เกษตรกรในหมู่บ้านต่างๆ 8 หมู่บ้าน ณ กิ่งอำเภอปางมะผ้า จังหวัดแม่ฮ่องสอนและพบว่าการใส่เชื้อไรโซเบียมมีผลทำให้ผลผลิตในปีแรกเพิ่มขึ้น 30-70% และเชื้อไรโซเบียมที่ใช้ในปีแรกยังมีชีวิตอยู่รอด และมีประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิตของถั่วแดงในปีที่ 2 ในช่วง 3-37% ของผลผลิตถั่วแดงที่ปลูกโดยไม่คลุกเชื้อ จากรายงานของ Denso and Owiredut (1988) การใส่เชื้อ *Bradyrhizibium* เพียง 10^3 เซลล์/เมล็ดก็ทำให้จำนวนปมการสะสม N และน้ำหนักแห้งของถั่ว cowpea เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่คลุกเชื้อ แต่การเพิ่มขึ้นจะมากน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของดิน แต่การใส่เชื้อ 10^2 เซลล์/เมล็ดไม่เพียงพอที่จะทำให้ถั่วมีการตอบสนองต่อการใส่เชื้อ การใช้เชื้อที่ผลิตเป็นการค้ายังสามารถสร้างปมได้ถึง 60-94% ของปมทั้งหมด การทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะเพิ่มการเกิดปม การตรึง N และผลผลิตของถั่ว cowpea โดยการใช้เชื้อที่เหมาะสมในการคลุกเชื้อ Brutti *et al.* (1999) ได้ใช้หัวเชื้อ *Bradyrhizibium* ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่โดยการคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการแข่งขันในการปลูกถั่วเหลืองในประเทศอาเจนตินา โดยปลูกถั่วในแปลงที่มีเชื้อธรรมชาติ $5.5x10^2$ เซลล์/กรัมดิน พบว่าเชื้อ *Bradyrhizibium* ที่ใช้สามารถแข่งขันและเข้าสู่ปมได้เป็นส่วนใหญ่และยังทำให้น้ำหนักแห้งของถั่วเหลืองสูงสุดอีกด้วย เช่นเดียวกับ Simon and Salava (2006) ได้ทดสอบความสามารถในการแข่งขันการเกิดปมกับถั่ว clover ของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ใหม่กับเชื้อในธรรมชาติในกระถาง พบว่าเชื้อไรโซเบียมที่ใช้มีประสิทธิภาพในการตรึง N และสามารถเกิดปมได้แม้ใช้ปริมาณเชื้อเพียง $1x10^3$แต่ยังสามารถแข่งขันกับเชื้อในธรรมชาติได้ดี

รายงานของ Romdhane *et al.* (2007) ทดสอบการตอบสนองของถั่ว chickpea ต่อเชื้อ *Mesorhizobium ciceri* ซึ่งคัดเลือกมาจากในแปลงและมีประสิทธิภาพดี (Romdhane *et al.*, 2004, 2005 อ้างโดย Romdhane *et al.*, 2007) ในดินที่ขาด N P สภาพอากาศไม่เหมาะสม และมีเชื้อไรโซเบียมในธรรมชาติโดยทำการทดลองที่ประเทศทูนีเซีย พบว่าเชื้อ *Mesorhizobium ciceri* ที่ใช้ทำให้จำนวนปมและน้ำหนักแห้งของถั่ว chickpea ทุกพื้นที่เพิ่มขึ้นและเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดปมเป็นส่วนใหญ่อีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการที่ใช้ศึกษาด้านความสามารถในการแข่งขันเข้าสู่ปมของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว

ในการผลิตหัวเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วนำไปใช้คลุกเมล็ดสำหรับการเพิ่มผลผลิตถั่วจะใช้เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพดี ซึ่งการคัดเลือกเชื้อที่เหมาะสมจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะแวดล้อม ความสามารถในการแข่งขันเข้าสู่ปมของพืชอาศัย และประสิทธิภาพการตรึง N ของเชื้อภายใต้สภาพแวดล้อมในพื้นที่ที่ใช้ในการปลูกถั่ว (Selenska-Pobell, 1994 อ้างโดย Blanco *et al*., 2010) การศึกษาความสามารถในการแข่งขันของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วโดยการตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อในปมสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ (Ramirez *et al*., 1998; Chamway and Holl, 1986 อ้างโดย Blanco *et al*., 2010; Denso and Owiredut, 1988; Thies *et al*., 1992; Pepper *et al*., 1989) ส่วนประกอบของ extracellular polysaccharide (Minamisava *et al*., 1992) สมบัติทางซีโรโลยี (Ikram and Broughton, 1979; Denso and Owiredut, 1988; Jenkins and Bottomley, 1985) รูปแบบของแถบโปรตีนหรือ Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) การวิเคราะห์ gel-immune-diffusion (Jenkins and Bottomley, 1985) immunological หรือ ELISA (Brutti *et al*., 1999) plasmid profile (Pepper *et al*., 1989) การผลิตเมลานิน (Blanco *et al*, 2010)

สำหรับวิธีการศึกษาโดยการใช้ลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) อาศัยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ซึ่งมีบทบาทมากในปัจจุบันมีหลากหลายวิธีเช่นวิธีการใช้ random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Selenka-Pobell *et al*., 1995, 1996; Young and Cheng, 1998; Simon and Salava, 2006) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA (Hashem *et al*., 2006) การติดฉลาก ^{32}P บนยีน (Pepper *et al*., 1989) การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA จาก REP- และ ERIC-PCR (DeBroijin, 1992; Denton *et al*., 2002; Svening *et al*., 2001) และการใช้ *gusA* gene (Diouf *et al*., 2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การจัดจำแนก rhizobia ด้วยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA จาก REP- และ ERIC-PCR

การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA จาก REP- และ ERIC-PCR เริ่มต้นจากการค้นพบ repetitive extragenic palindromic sequences (REP) หรือ palindromic unit (PU) ภายในจีโนมของ *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium* (Stern *et al*., 1984) และ enterrobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences หรือ intergenic repeat unit (IPU) ภายในจีโนมของ *E. coli S. typhimurium* และแบคทีเรียกรัมลบบางสปีชีส์ (Sharples *et al*.,

1990) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองชนิดมีลักษณะเป็น highly conserved inverted repeat และมีลำดับเบสในนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน Versalovic *et al.* (1991) ได้ศึกษาการกระจายตัวของลำดับ REP และ ERIC ใน eubacteria ด้วยเทคนิค slot blot hybridization และ PCR กับ genomic DNA โดยใช้ probe และ primer ที่มีเบสคู่สมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ REP และ ERIC ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกับ REP และ ERIC ภายในจีโนมของแบคทีเรียกรัมลบกลุ่ม enteric และในสปีชีส์ที่เกี่ยวข้อง ผลผลิตจาก PCR ให้ลายพิมพ์ DNA ที่ใช้แยกความแตกต่างของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองในระดับสปีชีส์และสายพันธุ์ (strain) ได้ และนับว่าเป็นการศึกษาแรกที่จุดประกายให้นำเทคนิค REP- และ ERIC-PCR มาใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรีย

หลังจากนั้น DeBruijn *et al.* (1992) นำเอาเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียในแฟมิลี *Rhizobiaceae* คือ *Rhizobium Bradyrhizobium Azorhizobium* และ*Agobacterium* และแบคทีเรียจีนัส *Pseudomonas* พบว่าลายพิมพ์ DNA ของแบคทีเรียชนิดต่างๆมีความแตกต่างกันและลายพิมพ์ DNA ของ R. *meliloti* ก็มีความแตกต่างกัน ซึ่งสัมพันธ์กับการจัดจำแนกด้วยวิธี multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) (Eardly *et al*., 1990) ผลที่ได้นอกจากแสดงให้เห็นว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกับ REP และ ERIC ในแบคทีเรียแฟมิลี *Rhizobiaceae* และ *Pseudomonas* แล้วยังชี้ให้เห็นถึงประสิทธิผลในการใช้เทคนิคดังกล่าวสำหรับแยกความแตกต่างกันของ *Rhizobium* ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันได้

Judd *et al*. (1993) ใช้ REP-PCR และ ERIC-PCR จัดกลุ่ม *Bradyrhizobium japonicum* ที่สัมพันธ์กับ *B. japonicum serocluster* 123 *B. japonicum* ใน serogroup 129 และ *Bradyrhizobium* spp. ในการทดลองนี้มีการวิเคราะห์ RFLP ด้วย hyperreiterated probe ร่วมด้วย พบว่าลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการทดลองแต่ละซ้ำมีความใกล้เคียงกัน ชี้ให้เห็นว่าเทคนิคนี้ให้ผลที่มีความสม่ำเสมอ (reproducibility) ผลจากการวิเคราะห์เดนโดรแกรมแสดงให้เห็นว่า เทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกัน ซึ่งไม่สามารถทำได้ถ้าใช้วิธีอื่น ข้อมูลจาก REP-PCR และ ERIC-PCR เมื่อใช้ร่วมกันสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่าง *Bradyrhizobium* spp. ชนิดต่างๆ ที่มีความหลากหลายสูงและผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค RFLP

Niamsup and Bhromsiri (1988) ได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ ERIC-PCR เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ของ *Rhizobium leguminosarum* พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ Mg^{2+} เท่ากับ 2.5 mM และ annealing temperature ที่ 48 $^{\circ}$ C เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำ ERIC-PCR และสามารถให้ลายพิมพ์ DNA ที่ใช้แยกความแตกต่างของเชื้อที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิง 3 สายพันธุ์ออกจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กันได้ เมื่อนำสภาวะดังกล่าวไปใช้ในการจัดจำแนก *R. leguminosarum* จำนวน 33 isolates พบว่าสามารถจัดกลุ่มเชื้อได้เป็น 11 กลุ่ม

ในการศึกษาสายพันธุ์ของไรโซเบียมในปมถั่วด้วยวิธีการ PCR-DNA fingerprint Santasup *et al*., (2000) ได้พัฒนาวิธีการทางชีวโมเลกุลเพื่อใช้ศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียมในปมถั่วแดงที่ผ่านการอบแห้งซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอนได้แก่ 1) การสกัด genomic DNA จากเซลล์ของไรโซเบียมที่อยู่ในปมถั่วที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 ^{0}C โดยการต้มใน water bath 2) การตกตะกอน DNA ที่สกัดได้โดยใช้ เอทานอลและ 3) การทำให้ DNA บริสุทธิ์โดยใช้ Sephadex G-50 column วิธีการดังกล่าวสามารถใช้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์ของเชื้อไรโซเบียมได้เป็นอย่างดี และสามารถใช้ตรวจสอบการเกิดปมของเชื้อที่ใช้คลุกเมล็ดสำหรับถั่วที่ปลูกในแปลงทดลองได้

ในปี 2551 ฉายกริชได้จำแนกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนในถั่วพุ่มโดยใช้เทคนิค ERIC- และ REP-PCR ซึ่งในการทดลองได้ใช้การเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์แบคทีเรียปมรากถั่วที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูง ปานกลาง และต่ำ พบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ต่างกันทั้งหมด และในกลุ่มแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนสูง ได้แก่ CP-PHT4 CP-TLA5 และ CP-NK3 ก็เป็นสายพันธุ์ต่างกันอีกด้วย จากการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมของ ERIC- และ REP-PCR ที่ใช้จำแนกแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนในถั่วพุ่มมีดังนี้

ตาราง 1 สภาวะ (condition) ที่เหมาะสมในการทำ REP- และ ERIC-PCR (ฉายกริช, 2551)

	REP-PCR			**ERIC-PCR**	
I	95 ^{o}C 6 min.	1 cycle	I	95 ^{o}C 5 min.	1 cycle
II	94 ^{o}C 1 min. 42 ^{o}C 1 min. 65 ^{o}C 8 min.	40 cycles	II	94 ^{o}C 1 min. 49 ^{o}C 1 min. 72 ^{o}C 5 min.	40 cycles
III	65 ^{o}C 16 min.	1 cycle	III	72 ^{o}C 10 min.	1 cycle
IV	Final constant temperature 4 ^{o}C		IV	Final constant temperature 4 ^{o}C	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้อดีของเทคนิค REP- และ ERIC-PCR genomic fingerprint (ชนกานต์, 2545)

จากการรวบรวมข้อมูลของชนกานต์ (2545) ได้ข้อสรุปเกี่ยวกับข้อดีของเทคนิค REP- และ ERIC-PCR genomic fingerprint ไว้ดังนี้

1. เป็นเทคนิคที่ให้ผลที่มีความคงที่ถ้ามีการควบคุมปัจจัยต่างๆ ในขั้นตอนทำ PCR และ gel electrophoresis ให้คงที่และมีมาตรฐาน

2. เป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็ว แต่มีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกและหาเอกลักษณ์เชื้อสายพันธุ์ต่างๆได้ดีเนื่องจาก สามารถใช้ primer เพียงชนิดเดียวในการจัดจำแนกและบ่งชี้เชื้อที่มีความใกล้เคียงกันสูงหรือเชื้อที่มีความแตกต่างกันมากได้ ในกรณีที่มีความซับซ้อนของรูปแบบลายพิมพ์จาก REP- และ ERIC-PCR ก็สามารถดัดแปลงได้โดยเลือกใช้คู่ primer หลายๆแบบเพื่อให้ครอบคลุมกับระดับความใกล้ชิดของตัวอย่าง นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวสามารถใช้วิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่ายในการวิเคราะห์ผลผลิตจาก PCR ไม่จำเป็นต้องใช้เทคนิคที่เกี่ยวข้องสารรังสีและใช้เวลานาน เช่น southern blot hybridization และ polyacrylamide gel electrophoresis อีกทั้งยังเป็นวิธีที่มี PCR เป็นพื้นฐานสามารถใช้ DNA แม่แบบที่มีปริมาณน้อยในการวิเคราะห์ได้จึงไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงเชื้อและทำ DNA ให้บริสุทธิ์ DNA ที่เตรียมได้จากเซลล์หรือปมของพืชอาศัยสามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้โดยตรง

การทดลองในสภาพต่างๆ และปริมาณการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาความสามารถในการแข่งขันการเกิดปมของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว

ในการศึกษาความสามารถของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในการแข่งขันการเกิดปมกับพืชอาศัย สามารถใช้วิธีการทดลองในห้องปฏิบัติการ การทดลองในโรงเรือนไปจนถึงการทดลองในสภาพแปลงทดลอง ปริมาณการสุ่มเก็บตัวอย่างปมเพื่อนำไปศึกษาชนิดของเชื้อไรโซเบียมที่อยู่ในปมจะแตกต่างกันไปตามการทดลองแต่ละสภาพ สำหรับการทดลองในห้องปฏิบัติการได้แก่ รายงานของ Malek *et al.* (1998) ที่ปลูกถั่ว *Astragalus sinicus* ในหลอดทดลองขนาด 40x150 mm ใช้ถั่ว 1 เมล็ด/หลอดทดลอง จำนวน 10 ซ้ำและสุ่มเก็บตัวอย่างปม 30 ปม/กรรมวิธีก่อนที่จะนำไปแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และนำไปจำแนกชนิดของเชื้อไรโซเบียมที่อยู่ในปม สำหรับการทดลองที่ใช้วิธีการปลูกพืชในกระถางวัสดุปลูกที่ใช้ได้แก่ vermiculite ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วหรืออาจมีการผสมทรายในอัตราส่วนต่างๆ เช่น ทราย: vermiculite ในอัตรา 9:1 (Mcdermott and Graham, 1990) หรือ 1:1 (Palaniappan *et al*., 1997) จำนวนปมที่ใช้แต่ละการทดลองมีความหลากหลายเช่น ใช้ตัวอย่างปมที่เกิดขึ้นทั้งหมด (Denton *et al*., 2003, Lochner *et al*., 1989, Romdhane *et al*., 2007) 100 ปม/กรรมวิธี (Bogino *et al*., 2008) เก็บปมเฉพาะ tap root (Mcdermott and Graham, 1990) และ 80 ปม/กรรมวิธี (Palaniappan *et al*., 1997) เป็นต้น นอกจากนี้หลายการทดลองมีการใช้ทราย (Blanco et al., 2010) ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วและเก็บตัวอย่างปม 10 ปมใน 3 ซม.แรกของรากที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เกิดขึ้น/กระถาง (Blanco *et al*., 2010) quartz (Lochner *et al*., 1989) และ perlite (Romdhane *et al*., 2007)

นอกจากนี้การทดลองในสภาพโรงเรือนก็สามารถใช้การปลูกถั่วในกระถางที่บรรจุดินจากแปลงทดลองซึ่งมีเชื้อไรโซเบียมในธรรมชาติอยู่ดังรายงานของ Singleton and Taveres (1986) ในการทดลองดังกล่าวผู้ทดลองได้เก็บตัวอย่างปมถั่ว 6 ชนิดได้แก่ ถั่วเหลือง cowpea *Leucaena leucocephala* ถั่วลิสง *Phaseolus lunatus* และ *Phaseolus vugalis* อย่างน้อย 35 ปมหรือ 5% ของจำนวนปมทั้งหมด/กรรมวิธีในกระถางที่บรรจุดิน 7 กิโลกรัมก่อนที่จะนำไปตรวจสอบชนิดของเชื้อไรโซเบียมในปมด้วยวิธีทาง serology ในการทดลองของ Denso *et al.* (1988) ทดสอบความสามารถในการแข่งขันของเชื้อไรโซเบียมที่ใช้กับเชื้อไรโซเบียมในธรรมชาติโดยปลูกถั่วพุ่ม 2 ต้น/กระถางที่บรรจุดิน 1.5 กก.และเก็บตัวอย่างปม 20 ปม/ซ้ำ ส่วนการทดลองของ Simon and Salava (2006) ซึ่งปลูกถั่ว clover ในกระถางขนาดบรรจุดิน 10 กก.เก็บปมถั่ว clover จำนวน 10 ปม/กระถาง และตรวจสอบชนิดของเชื้อไรโซเบียมโดยใช้เทคนิค amplified polymorphic DNA (RAPD) ในขณะที่ Amarger and Lobreau (1982) ใช้การปลูกถั่วในดินโดยใช้กระถางที่มีความจุบรรจุ 1 ลิตร และเก็บปมที่จะใช้ศึกษาชนิดของเชื้อในปม 20 ปม/กระถาง ส่วน Law *et al.* (2007) ปลูกถั่วในกระถางขนาดบรรจุดิน 1.8 กก./กระถางและศึกษาเชื้อในปมโดยเก็บปมจาก tap root ทั้งหมดและอีก 18 ปมจาก lateral root /กระถาง ส่วน Cregen *et al.* (1989) ปลูกถั่วในดินในกระถางขนาดความจุ 2.2 ลิตรและเก็บปม 17-62 ปม/กระถางเพื่อใช้ศึกษาเชื้อในปมถั่ว

สำหรับการทดลองในแปลงทดลอง จากรายงานของ Svenning *et al.* (2001) ซึ่งปลูกถั่ว clover ในสภาพแปลงได้เก็บตัวอย่างปม 10 ปมที่ได้จาก รากแก้ว/ต้นและคัดเลือกต้นถั่วจำนวน 9-12 ต้น/กรรมวิธีหลังจากนั้นนำปมไปแยกเชื้อไรโซเบียมเพื่อตรวจสอบชนิดของเชื้อไรโซเบียมที่อยู่ในปมด้วยเทคนิค ERIC-PCR ส่วนการทดลองของ Hungria *et al.* (2003) ใช้ตัวอย่างปม 40 ปม/กรรมวิธีและ Thies *et al.* (1991, 1992) สุ่มเก็บตัวอย่างปมจากแปลงทดลองจำนวน 24-36 ปม/แปลง และนำไปทดสอบด้วยวิธีทาง serology (fluorescent antibodies) ในขณะที่ Brutti *et al.* (1999) ใช้ตัวอย่างปมทั้งหมดที่เกิดขึ้นจาก 15 ต้น/แปลง และนำไปทดสอบเชื้อไรโซเบียมในปมด้วยวิธี ERISA จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นกล่าวได้ว่าปริมาณการสุ่มเก็บตัวอย่างปมถั่วขึ้นกับการออกแบบการทดลองและเทคนิคที่ใช้จำแนกชนิดของเชื้อที่อยู่ในปม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved