บทนำ และวัตถุประสงค์

นับตั้งแต่ Hellriegel และ Wilfarth ได้พิสูจน์ว่าพืชตระกูลถั่วหลายชนิดมีปมรากซึ่งภายในมีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจน (N) ที่มีอยู่มากถึง 78% ในอากาศ โดยไม่ต้องพึ่งธาตุไนโตเจนในดินตั้งแต่ปี คศ.1888 (พ.ศ. 2431) นักจุลชีววิทยาทางดินได้ทำการศึกษาค้นคว้าวิจัยเพื่อสร้างความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับเชื้อไรโซเบียม (rhizobia) และการตรึงไนโตเจนจากอากาศในปมรากถั่ว (root-nodules) ต่อเนื่องกันเรื่อยมานับเป็นเวลา 108 ปี จนในที่สุดวิทยาการด้านนี้ได้รับการพัฒนาจนกลายเป็นเทคโนโลยีการใช้เชื้อไรโซเบียมเพื่อเพิ่มผลผลิตพืชตระกูลถั่วที่พิสูจน์ชัดเจนแล้วว่าได้ผลและยอมรับปฏิบัติการอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะเกษตรกรในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น สหรัฐอเมริกา อังกฤษ แคนาดา ออสเตรเลีย นิว-ซีแลนด์ ฯลฯ ในส่วนของประเทศไทย งานวิจัยเชื้อไรโซเบียมดำเนินมาเป็นหลายสิบปีแล้ว โดยผู้เชี่ยวชาญของหน่วยงานในกระทรวงเกษตรฯ และสถาบันอุดมศึกษาหลายแห่ง จนในปัจจุบันการส่งเสริมเทคโนโลยีการใช้เชื้อได้แพร่กระจายลงไปสู่เกษตรกร โดยเฉพาะกลุ่มเกษตรกรที่เป็นสมาชิกของศูนย์ขยายพันธ์พืชที่มีหน้าที่ต้องผลิตเมล็ดถั่วลิสง ถั่วเหลือง และถั่วเขียวที่มีคุณภาพสูง เพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธ์ ซึ่งในกระบวนการผลิตมีการสาธิตแสดงการใช้เชื้อที่ถือเป็นเงื่อนไขที่เกษตรกรที่เป็นสมาชิกจะต้องนำไปปฏิบัติ โดยใช้เชื้อไรโซเบียมที่ผลิตในประเทศโดยกลุ่มวิจัยจุลินทรีย์ดิน กรมวิชาการเกษตร

อย่างไรก็ดีแม้ว่าแนวปฏิบัติในการใช้เชื้อจะไม่ยุ่งยากสลับซับซ้อนมากนัก แต่ด้วยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เป็นสิ่งที่มีชีวิตขนาดเล็กมาก ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า เป็นเชื้อที่ไม่สร้างเอ็นโดสปอร์ (endospore) จึงได้รับความกระทบกระเทือนและตายได้ง่ายเมื่อกระทบสภาพที่ไม่เหมาะสม เช่น น้ำท่วมขัง หรือร้อนจัด ปัญหาในเรื่องนี้เกิดขึ้นและส่งผลกระทบทั้งหัวเชื้อไรโซเบียมที่อยู่ในถุงบรรจุ และเชื้อไรโซ-เบียมที่ถูกใส่ลงไปในดินโดยผ่านการคลุกเมล็ดแล้ว ทำให้ผลดีของใช้เชื้อในระดับเกษตรกรมีความลุ่มๆ ดอนๆ ขาดความสม่ำเสมอ และในหลายๆ กรณีจำเป็นต้องใช้เชื้อซ้ำซากในแทบทุกครั้งก่อนการปลูกพืชตระกูลถั่วโดยเฉพาะในพื้นที่ที่ถูกใช้ปลูกพืชที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่ว เช่น มันสำปะหลัง อ้อย หรือปอแก้ว ต่อเนื่องกันมาเป็นเวลานาน ซึ่งจะมีผลทำให้ประชากรเชื้อไรโซเบียมในดินลดลงจนทำให้ถั่วที่นำมาปลูกมีปัญหาในการติดปม (Luangchaisri, 1995) แนวทางประการหนึ่งที่จะแก้ไขปัญหานี้ได้อย่างถาวรคือ การจัดการดินให้มีประชากรเชื้อไรโซเบียมอยู่ในระดับสูงอยู่ตลอดซึ่งจะส่งผลดีต่อการติดปมรากและการตรึงไนโตรเจนของถั่วที่นำมาปลูกในพื้นที่นั้น โดยไม่มีความจำเป็นต้องคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไรโซเบียมซ้ำแล้วซ้ำเล่าเหมือนที่ปฏิบัติกันอยู่ในปัจจุบันด้วยเหตุนี้ความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับประชากรเชื้อไรโซเบียมภายในดินอันจะส่งผลดีต่อการจัดการในแนวทางใหม่นี้จึงนับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

งานวิจัยโครงการนี้จึงได้ดำเนินการโดยมี วัตถุประสงค์ ดังนี้

1. ศึกษาถึงบทบาทและความเกี่ยวข้องระหว่างวัชพืชตระกูลถั่วที่มีปมรากและพบอยู่ทั่วไปในระบบนิเวศธรรมชาติต่อการติดปมของพืชตระกูลถั่วเศรษฐกิจ (economic หรือ food legumes)
2. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไรโซเบียมที่สร้างปมรากและตรึงไนโตรเจนจากอากาศร่วมกับวัชพืชตระกูลถั่วและเชื้อไรโซเบียมที่ติดปมรากและตรึงไนโตรเจนร่วมกับถั่วเศรษฐกิจ

วิธีการทดลอง

งานวิจัยที่ดำเนินการประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

- **การแยกเชื้อไรโซเบียมจากปมรากพืชตระกูลถั่ว**

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการออกสำรวจภาคสนามเพื่อเก็บตัวอย่างวัชพืชตระกูลถั่ว 5 ชนิด ได้แก่

1.1 โสนขน *(Aeschynomene americana)*

1.2 ถั่วเลื้อย (unidentified species)

1.3 โสนเขียว *(Sesbania sp.)*

1.4 โสนม่วง *(Sesbania sp.)*

1.5 หิ่งเหย *(Crotalaria straita)*

การเก็บตัวอย่างพืชกระทำจากพื้นที่ที่แตกต่างกัน 4 จุด (ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น) ตัวอย่างพืชถูกนำมายังห้องปฏิบัติการ เพื่อล้างดินจากราก และคัดเลือกปมรากที่สมบูรณ์ที่สุดเพื่อการแยกและเตรียมเชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์ (pure cultures) (ภาพที่ 3) โดยจัดเตรียมเชื้อ 1 isolate จาก 1 จุดที่เก็บตัวอย่างพืช (เชื้อ 1 islolate แยกและเตรียมจากปมสมบูรณ์ 1 ปม) ดังนั้นจึงมีเชื้อ 4 isolates สำหรับวัชพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิด

เทคนิคการทำการแยกและเตรียมเชื้อไรโซเบียมบริสุทธิ์ใช้วิธีของ Vincent, 1973 แต่เปลี่ยนสารกำจัดเชื้อที่ติดมาด้านนอกปมจาก 0.1% $HgCl_2$ ที่มีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมเป็นน้ำยา chlorox 10% การเพาะเลี้ยงเชื้อทำใน Yeast Mannitol Agar ที่เติมสี Bromothymol Blue (B.T.B) ในอัตรา 5 ml ต่อลิตรอาหารเพื่อช่วยให้การจำแนกเชื้อมีความง่ายและแม่นยำยิ่งขึ้น

- **การเตรียมเชื้อไรโซเบียมจากปมรากวัชพืชตระกูลถั่วเพื่อทดสอบการติดปมรากในถั่วเศรษฐกิจ**

เชื้อบริสุทธิ์ (pure cultures) จากปมรากถั่วทุก isolates ถูกนำไปเพาะเลี้ยงใน Yeast Mannitol Broth (YMB) เป็นเวลา 10 วันที่ $30^{\circ}C$

- **ชุดกระป๋องเบียร์สำหรับเพาะเลี้ยงพืชในสภาพปลอดเชื้อ** (Sterile Beer Cans' sets)

ด้วยพืชตระกูลถั่วเศรษฐกิจได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วพุ่มเป็นถั่วที่มีเมล็ดขนาดใหญ่จึงไม่สามารถทำการทดสอบโดยเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองในอาหารวุ้นที่ใช้ได้ผลดีกับถั่วเมล็ดเล็กได้ คณะผู้วิจัยจึงได้คิดค้นชุดที่ใช้ทดสอบชนิดใหม่ขึ้นโดยใช้กระป๋องเบียร์ที่ใช้แล้วมาตัดส่วนบนออกแล้วเติมก้อนกรวดเล็กปนทรายหยาบลงไปจนเต็ม เติมน้ำยาเลี้ยงพืชที่ปราศจากไนโตรเจน (N-free plant nutrient solution (ใช้

สูตรน้ำยาของ C.S.I.R.O. Cunningham Lab. Australia) ลงไปประมาณ 4/5 ส่วนของความสูง จากนั้นปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียม (aluminum foil) รัดแผ่นอะลูมิเนียมไว้ให้แน่นด้วยยางรัด จากนั้นนำชุดเลี้ยงพืชที่เตรียมขึ้นทั้งหมดไปนึ่งเพื่อทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 121°C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนใช้ปลูกพืช (รูปที่.2)

- **ถั่วเศรษฐกิจที่ใช้ในการทดสอบ มี 3 ชนิด ได้แก่**
    1. ถั่วเหลือง *(Glycine max)* พันธ์ สจ.4
    2. ถั่วเขียวผิวมัน *(Vigna radiata)*
    3. ถั่วพุ่ม *(Vigna unguiculata)*

- **วิธีการเตรียมกล้าพืชปลอดเชื้อ**

คัดเลือกเมล็ดพันธ์ที่สมบูรณ์ของถั่วแต่ละชนิดกำจัดจุลินทรีย์ที่ติดมาบริเวณด้านนอกเมล็ด โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ ภายนอกปมโดยใช้น้ำยา chlorox 10% แต่ใช้เวลา 2 นาที จากนั้นนำเมล็ดลงเพาะใน petri plates ที่เทวุ้น 1.0% ไว้บางๆ โดยใช้ aseptic technique (เทคนิคปฏิบัติที่ปราศจากการปลอมปนของเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอก) นำ plates เข้าตู้เพาะที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้กล้าพืชที่มีรากยาวประมาณ 1-1.5 ซม. นำกล้าพืชลงปลูกในชุดกระป๋องเบียร์ ชุดละ 1 ต้น ผ่านรูเจาะขนาดเล็กบนแผ่นอะลูมิเนียมบาง โดยใช้ sterile pipette ชุดปลูกพืชทั้งหมดถูกนำเข้าเพาะเลี้ยงในห้องเลี้ยงพืช (growth room) ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ประมาณ 25°C และช่วงแสงตั้งไว้ที่ กลางวัน (มีแสง) 14 ชั่วโมง กลางคืน (มืด) 10 ชั่วโมง

- **การใส่เชื้อไรโซเบียม (Inoculation)**

เชื้อไรโซเบียมที่เพาะเลี้ยงไว้ใน Yeast Mannitol Broth (YMB) เป็นเวลา 10 วันที่ 30°C จนขุ่นจัด มีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^8 - 10^9 เซลล์ต่อ ml. ถูกถ่ายโดยใช้ sterile pipette ผ่านรูเจาะลงบริเวณโคนต้นพืชที่เพาะเลี้ยงไว้แล้วเป็นเวลา 1 สัปดาห์ในห้องเลี้ยงพืช โดยใช้อัตราการให้เชื้อ 5 ml/พืชหรือต่อชุดเลี้ยงพืช

- **ตำรับทดลอง**

เพื่อให้การทดสอบครั้งนี้สมบูรณ์ที่สุดจึงได้จัดตำรับทดลองไว้ดังนี้ โดยใช้ 3 ซ้ำต่อตำรับทดลอง ใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design)

1. ไม่ใส่เชื้อ ไม่ใส่ไนโตรเจน
2. ไม่ใส่เชื้อ ใส่ไนโตรเจน (ใส่ 0.5% KNO_3 ในอัตรา 70 ppm/ชุด)
3. ใส่เชื้อ ไม่ใส่ไนโตรเจน

* ใส่เชื้อไรโซเบียมจากปมรากวัชพืชตระกูลถั่ว โดยทดสอบ 4 isolates/ชนิดของวัชพืชตระกูลถั่ว

- **การตรวจสอบและบันทึกข้อมูล**

การตรวจสอบดำเนินการภายหลังที่เพาะเลี้ยงถั่วเศรษฐกิจในห้องเลี้ยงพืชได้ 50 วัน เพื่อบันทึกข้อมูลต่อไปนี้

1. สีใบ

ให้คะแนนสีเขียวของใบพืชโดยใช้เกณฑ์ดังนี้

คะแนน 1 = เหลืองซีด (ใช้ใบพืชในตำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ - ไม่ใส่ไนโตรเจน เป็นหลัก)

คะแนน 2 = เขียวอ่อน

คะแนน 3 = เขียว

คะแนน 4 = เขียวเข้ม (ใช้ใบพืชในตำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ ใส่ไนโตรเจน เป็นหลัก)

2. การติดปมราก (Nodulation)

นำพืชที่เพาะเลี้ยงไว้ออกจากชุดเพาะเลี้ยงโดยใช้ความระมัดระวัง ล้างรากในน้ำที่ใส่ไว้ในถังพลาสติก เพื่อขจัดเศษกรวดทรายที่ติดมากับราก จากนั้นตรวจสอบการติดปมราก

3. ข้อมูลการเจริญเติบโต

เก็บข้อมูลการเจริญเติบโต เช่น น้ำหนักสดต้นและน้ำหนักสดราก เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตโดยโปรแกรม DMRT (F - Test, Lsd และ C.V.)

ผลการทดลอง

- **การสร้างปมรากของเชื้อไรโซเบียมจากวัชพืชตระกูลถั่วในถั่วเศรษฐกิจ**

การทดลองนี้ดำเนินการในสภาพปลอดเชื้อ (sterile) วัสดุ อุปกรณ์ทุกอย่างได้รับการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อนใช้โดยการนึ่งในหม้อนึ่งความดันปฏิบัติการในภายหลังทุกอย่าง กระทำโดยใช้ aseptic techniques โดยเคร่งครัดเพื่อป้องกันการปลอมปนของเชื้อจุลินทรีย์ (โดยเฉพาะเชื้อไรโซเบียม) จากภายนอก ทั้งนี้เพื่อควบคุมเชื้อไรโซเบียมให้อยู่ในระบบโดยไม่ก่อผลกระทบเรื่องการปนเปื้อน (contamination) ไปยังชุดทดลองชุดอื่น ผลการดำเนินการนี้ยืนยันได้จากข้อมูลที่พบว่าไม่มีพืชในตำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อและตำรับทดลองที่ใส่ไนโตรเจนและไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม ติดปมรากเลยแม้แต่กรณีเดียว (ตารางที่ 3)

ในส่วนของความสามารถในการเข้าสร้างปมรากของถั่วเหลือง ถั่วเขียวและถั่วพุ่มของเชื้อไรโซเบียมจากปมรากวัชพืชตระกูลถั่ว 5 ชนิด ที่ทดสอบมีผลสรุปดังนี้

1. เชื้อไรโซเบียมจากปมรากวัชพืชตระกูลถั่วทั้ง 5 ชนิดที่ทดสอบไม่สามารถเข้าสร้างปมรากในถั่วเหลือง (ตารางที่ 1, 2)
2. เชื้อจากปมรากโสนขนทุกกรณีที่ทดสอบสามารถเข้าสร้างปมรากในถั่วเขียว และถั่วพุ่ม มีจำนวนปมเฉลี่ยเท่ากับ 18 ปม/ต้นในถั่วเขียว และ 39 ปม/ต้นในถั่วพุ่ม โดยสีใบของถั่วเขียวจะเหลืองซีด (คะแนน = 1) ในขณะที่ใบถั่วพุ่มจะมีสีเขียวอ่อน (คะแนน = 2) (ตารางที่ 1)
3. เชื้อจากปมรากถั่วเลื้อย (unidentified species) สามารถเข้าสร้างปมรากในถั่วเขียว และถั่วพุ่ม ครึ่งหนึ่งของจำนวนเชื้อที่ทดสอบ โดยมีจำนวนปมเท่ากับ 25 ปม/ต้น ในถั่วเขียวและ 29 ปม/ต้นในถั่วพุ่ม เชื้อที่เข้าสร้างปมรากถั่วก่อกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนจากอากาศและมีผลทำให้สีใบของทั้งถั่วเขียวและถั่วพุ่มมีสีใบเขียวเข้ม มีค่าคะแนน 3.66 และ 3.83 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)
4. เชื้อจากโสนเขียวไม่สามารถสร้างปมรากในถั่วเขียว แต่สามารถเข้าสร้างปมรากในถั่วพุ่มในทุกกรณีที่ทดสอบ โดยมีจำนวนปมเฉลี่ยเท่ากับ 8 ปม/ต้น พืชที่ติดปมมีสีใบเหลืองซีด (ค่าคะแนน = 1.42) (ตารางที่ 1)
5. เชื้อจากปมรากโสนม่วงสามารถเข้าสร้างปมรากทั้งในถั่วเขียว และถั่วพุ่ม โดยครึ่งหนึ่งของจำนวนเชื้อที่ทดสอบสามารถเข้าสร้างปมรากในถั่วเขียว (จำนวนปมเฉลี่ยเท่ากับ 3 ปม/ต้น) และในกรณีของถั่วพุ่มเชื้อที่ทดสอบสามารถเข้าสร้างปมรากได้ทั้งหมด (จำนวนปมเฉลี่ยเท่ากับ 23 ปม/ต้น) อย่างไรก็ดี พืชที่มีปมรากเหล่านี้มีสีใบเหลืองซีดมีค่าคะแนน 1.33 และ 1.83 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

6. เชื้อรากปมรากของหิ่งเหยสามารถเข้าสร้างปมราก ในทุกกรณีที่ทดสอบทั้งในถั่วเขียวและถั่วพุ่ม โดยมีจำนวนปมเท่ากับ 23 และ 39 ปม/ต้นในถั่วเขียวและถั่วพุ่มตามลำดับ การติดปมรากของทั้งถั่วเขียวและถั่วเหลืองโดยเชื้อไรโซเบียมจากปมรากของหิ่งเหยมีผลทำให้สีใบของพืชเขียวเข้มมีค่าคะแนนเท่ากับ 3.67 และ 4.00 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ข้อมูลการติดปมรากของถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วพุ่ม และจำนวนปม/ต้น เนื่องจากการใส่เชื้อ 4 ชนิด (isolates) จากวัชพืชตระกูลถั่วแต่ละชนิดแสดงไว้ในตารางที่ 2

• ผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช (ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วพุ่ม)

– สีใบ

ด้วยเหตุที่พืชที่ปลูกในการทดลองนี้ได้รับธาตุอาหารในรูปน้ำยาเพาะเลี้ยงพืชที่ปราศจากไนโตรเจน (N-free plant nutrient solution) ดังนั้นพืชในตำรับทดลองนี้ไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม จะมีสีใบเหลืองซีดที่สุด เพราะขาดธาตุ N ในขณะที่พืชในตำรับทดลองที่ใส่ธาตุ N จะมีใบเขียวเข้ม ในตำรับทดลองที่ใส่เชื้อพืชติดปมราก และมีใบเขียวเข้มจึงเป็นผลจากการตรึงไนโตรเจน โดยเชื้อภายในปมราก ผลกระทบในเรื่องการติดปมและสีใบได้ให้รายละเอียดไว้แล้วในตอนต้น แต่อาจสรุปได้เป็นการเฉพาะว่าทั้งถั่วเขียวและถั่วพุ่มมีสีใบเขียวเข้มเมื่อได้รับเชื้อไรโซเบียมจากปมรากของถั่วเลื้อย (กรณีเชื้อเข้าสร้างปมราก) และหิ่งเหย (ตารางที่ 1) (ภาพที่ 3)

• การเจริญเติบโตทางลำต้นและราก

– ถั่วเหลือง

การใส่เชื้อไรโซเบียมจากปมรากวัชพืชตระกูลถั่วไม่มีผลทำให้ถั่วเหลืองติดปม ดังนั้นการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองตำรับทดลองที่ใส่เชื้อและไม่ใส่เชื้อไรโซเบียมจึงต่ำกว่าตำรับทดลองที่ใส่ไนโตรเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

- ถั่วเขียว

พืชชนิดนี้สามารถติดปมจากการใส่เชื้อไรโซเบียมของวัชพืชตระกูลถั่วทุกชนิดที่ทดสอบ ยกเว้นเชื้อจากโสนเขียว น้ำหนักสดต้นของถั่วเขียวทั้งกรณีที่ติดปมรากไม่แตกต่างจากตำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อและค่าน้ำหนักสดต้นทั้งสองตำรับทดลองต่ำกว่าพืชที่ใส่ไนโตรเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในขณะที่น้ำหนักสดรากของพืชในทุกตำรับทดลองไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3)

- ถั่วพุ่ม

พืชชนิดนี้สามารถติดปมรากโดยเชื้อไรโซเบียมจากปมรากวัชพืชตระกูลถั่วที่ทดสอบทั้ง 5 ชนิด น้ำหนักสดรากของพืชจากทุกตำรับทดลองไม่แตกต่างกัน ในขณะที่น้ำหนักสดต้นถั่วพุ่มในตำรับทดลองที่ใส่เชื้อไรโซเบียมจากโสนขน ถั่วเลื้อย โสนเขียว และโสนม่วง ไม่แตกต่างจากตำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม พืชที่ได้รับเชื้อไรโซเบียมจากหิ่งเหยมีค่าน้ำหนักสดต้นสูงกว่าตำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อไรโซเบียมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และน้ำหนักสดต้นของถั่วพุ่มมีค่าสูงที่สุดในตำรับทดลองที่ใส่ไนโตรเจน (ตารางที่ 3)

ข้อมูลการเจริญเติบโต (น้ำหนักสดต้น, น้ำหนักสดราก) การติดปม (จำนวนปม/ต้น) เนื่องจากการใส่เชื้อ 4 ชนิด (isolates) จากปมรากวัชพืชตระกูลถั่วทั้ง 5 ชนิด แสดงไว้ในตารางที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 ในภาคผนวก

• สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาโครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของแนวคิดและความพยายามที่จะอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) โดยมุ่งเน้นการใช้พืชท้องถิ่นที่ในปัจจุบันได้รับความกระทบกระเทือนจนเกิดความเสียหายอย่างใหญ่หลวงโดยการกระทำของมนุษย์ ความสูญเสียดังที่กล่าวนี้มีสาเหตุใหญ่ 2 ประการคือ การทำลายถิ่นที่อยู่ (habitat) ของสิ่งที่มีชีวิต (พืชและสัตว์) และการนำเข้าซึ่งสิ่งที่มีชีวิต (พืชและสัตว์) จากถิ่นที่อื่น (วิสุทธิ์, 2539) ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้การศึกษาเพื่อใช้ประโยชน์จากวัชพืชที่ถือว่าเป็นศัตรูพืชเศรษฐกิจในไร่-นา จึงเกิดขึ้น (จักรกฤษณ์ และเทพฤทธิ์ 2530) ความสนใจในเรื่องการใช้วัชพืชตระกูลถั่วที่ติดปมรากและเจริญเติบโตได้ดีโดยธรรมชาติเป็นปุ๋ยพืชสดแทนพืชนำเข้า (introduced species) จากต่างประเทศ เช่น โสนอัฟริกัน *(Sesbania rostrata)* (Patcharapreecha, P et al 1994) จึงเกิดขึ้นด้วยข้อสังเกตุที่ว่าวัชพืชท้องถิ่นเหล่านี้มีวิวัฒนาการและมีข้อได้เปรียบกว่าพืชนำเข้าหลายประการ ไม่ว่าจะเป็นความง่ายในการติดปมราก (การแนะนำให้เกษตรกรใช้เชื้อไรโซเบียม ในแนวคิดของคณะทำงานถือว่าเป็นการเพิ่มขั้นตอนในการปฏิบัติ โดยเฉพาะกรณีของการใช้เชื้อไรโซเบียมสำหรับพืชตระกูลถั่วปุ๋ยพืชสด) ความทนทานต่อความแห้งแล้ง สภาวะฝนทิ้งช่วง ความต้านทานต่อโรคและแมลงและผลผลิตเมล็ด ซึ่งวัชพืชเหล่านี้มีผลผลิตเมล็ดสูงอยู่แล้วโดยธรรมชาติ

ข้อได้เปรียบข้อนี้จะแก้ปัญหาการขาดแคลนเมล็ดพันธ์พืชตระกูลถั่วปุ๋ยพืชสดอย่างรุนแรงและจำเป็นต้องใช้งบประมาณเป็นจำนวนมหาศาลต่อปีเพื่อผลิตเมล็ดให้เกษตรกรอย่างที่ดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน การดำเนินการศึกษาเพื่อใช้วัชพืชตระกูลถั่วที่มีอยู่ในท้องถิ่นเป็นปุ๋ยพืชสดจึงเกิดขึ้นอย่างเป็นระบบโดยใช้การกำหนดแผนงานแบบการเสนอโครงการวิจัยขนาดเล็กแต่ต่อเนื่องจนพบจากการศึกษาเบื้องต้น (preliminary investigation) ว่าวัชพืชตระกูลถั่วที่เป็นพืชท้องถิ่นหลายชนิดมีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นปุ๋ยพืชสด (จักรกฤษณ์ และคณะ 2535 ; สุรศักดิ์ และคณะ 2536) การศึกษาเพื่อให้องค์ความรู้ในเรื่องนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้นจึงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดมาโดยมุ่งเน้นที่จะใช้หิ่งเหย *(Crotalaria straita)* เป็นปุ๋ยพืชสดในพื้นที่ดอน (สุรศักดิ์, 2536;) และใช้โสนขน *(Aeschynomene americana)* เป็นพืชสดในพื้นที่นา (สงัด, 2539)

องค์ความรู้เกี่ยวกับความเป็นไปของเชื้อไรโซเบียมในดินและความเป็นไปของเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐานที่ใส่ลงไปในดิน เพื่อเพิ่มผลผลิตของพืชตระกูลถั่วเศรษฐกิจมีอยู่ค่อนข้างจำกัด ข้อมูลการวิจัยบ่งว่า ความจำเป็นของการใช้เชื้อไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วเป้าหมายขึ้นอยู่กับประวัติการใช้ที่ดินเพื่อการเกษตร เช่น พืชตระกูลถั่วเป้าหมายจะแสดงการตอบสนองน้อยมากหรือไม่แสดงการตอบสนองต่อการใส่เชื้อสายพันธุ์มาตรฐานในพื้นที่ๆ เคยปลูกพืชตระกูลถั่วชนิดนั้นมาก่อน (Luangchaisri, 1995)

การศึกษาวิจัยถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไรโซเบียมที่สร้างปมรากวัชพืชตระกูลถั่วที่เจริญเติบโตอยู่ทั่วไปในระบบนิเวศธรรมชาติและเชื้อไรโซเบียมที่สร้างปมรากและตรึงไนโตรเจนร่วมกับถั่วเศรษฐกิจ เช่น ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วพุ่ม นอกจากจะเป็นแนวทางใหม่ (innovative) แล้วยังเป็นการอนุรักษ์และส่งเสริมการใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชท้องถิ่นด้วย ข้อมูลที่ได้รับจึงถือได้ว่าเป็นการค้นพบเรื่องใหม่ที่แสดงว่า

1. เชื้อไรโซเบียมในปมรากวัชพืชตระกูลถั่วมีความสัมพันธ์กับเชื้อไรโซเบียมที่สร้างปมรากและตรึงไนโตรเจนกับพืชตระกูลถั่วเศรษฐกิจ
2. ข้อมูลเบื้อนต้นที่ได้รับแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์หลายรูปแบบตั้งแต่ไม่มีความสัมพันธ์กันเลย เช่น ในกรณีของถั่วเหลือง ซึ่งไม่มีเชื้อไรโซเบียมจากวัชพืชตระกูลถั่วชนิดใดเลยที่สามารถเข้าสร้างปมรากของพืชชนิดนี้ สอดคล้องกับข้อมูลการวิจัยในอดีตที่พบว่าถั่วเหลืองเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีความต้องการเชื้อไรโซเบียมอย่างจำเพาะเจาะจง (highly specific) จนถึงความสัมพันธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ที่เชื้อทุก isolates ที่ทดสอบสามารถเข้าสร้างปมรากถั่วเศรษฐกิจ เช่น ถั่วเขียวและถั่วพุ่มได้
3. ข้อมูลการเจริญเติบโตของลำต้น และรากที่เสนอไว้ในรายงานนี้ ไม่แสดงการตอบสนองของพืชต่อการใส่เชื้อไรโซเบียมอาจเป็นเพราะชุดที่จัดขึ้นเพื่อการวิจัยมีปริมาตรและความจุเล็กเกินไปที่จะเพาะเลี้ยงพืชทดสอบให้เจริญเติบโตถึงจุดที่พืชสามารถแสดงการตอบสนองได้อย่างเต็มที่ แต่ชุดทดสอบนี้ก็จัดว่าเป็นชุดที่มีความเหมาะสมเป็นอย่างยิ่งต่อการทดสอบความสัมพันธ์ของเชื้อไรโซเบียมที่สร้างปมรากวัชพืชตระกูลถั่วและถั่วเศรษฐกิจ เพราะควบคุมสภาพปลอดเชื้อ (sterile) ได้ดีและถั่วเศรษฐกิจที่ใช้ทดสอบมีเมล็ดและกล้าพืชขนาดใหญ่ไม่สามารถใช้การเพาะในหลอดทดลองในอาหารวุ้น ซึ่งเป็นแนวปฏิบัติมาตรฐานในห้องปฏิบัติการที่เหมาะสมเฉพาะกับถั่วที่มีเมล็ดขนาดเล็กได้
4. อย่างไรก็ดีโดยอาศัยสีของใบพืชซึ่งมีความเขียวแตกต่างกันตั้งแต่สีเหลืองซีดในตำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อและไม่ใส่ไนโตเจน จนถึงสีเขียวเข้มในตำรับทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ แต่ใส่ไนโตรเจนเราสามารถชี้โดยอาศัยค่าคะแนนสีของใบพืชว่า เชื้อในปมรากมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตเจนสูงหรือต่ำ โดยใช้ชุดทดสอบที่สร้างขึ้นนี้
5. จากข้อมูลการติดปมรากและสีใบผลของทดลองในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อไรโซเบียมจากวัชพืชตระกูลถั่วเมื่อเข้าสร้างปมรากในถั่วเศรษฐกิจแล้วมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศต่ำ เช่นกรณีของเชื้อจากโสนขน โสนเขียว และโสนม่วง และเชื้อไรโซเบียมประเภทที่เมื่อเข้าสร้างปมรากในถั่วเศรษฐกิจแล้วมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศสูง เช่นกรณีของเชื้อจากปมรากของถั่วเลื้อยและหิ่งเหย

6. ข้อมูลที่เสนอในรายงานนี้นอกจากจะเป็นการเสนอองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับเชื้อไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วแล้วยังสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลที่สามารถนำไปใช้เพื่อการจัดการเชื้อไรโซเบียมในดิน อันจะส่งผลให้สามารถใช้การจัดการที่เหมาะสมเพื่อให้พืชตระกูลถั่วเป้าหมายที่จะนำมาปลูกในพื้นที่ติดปมรากและได้รับประโยชน์จากการตรึงไนโตเจนในปมรากอย่างเต็มที่โดยไม่จำเป็นต้องใช้วิธีการใช้เชื้อสายพันธ์มาตรฐาน "อย่างซ้ำซาก" อย่างที่ปฏิบัติกันอยู่ทั่วโลกในปัจจุบันนี้ก็ได้

7. ข้อเสนอแนะ สมควรมีการศึกษา-วิจัยในเรื่องนี้ต่อไปเพื่อขยายฐานข้อมูลให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นโดยครอบคลุมถึงเชื้อไรโซเบียมในวัชพืชชนิดอื่นที่ยังไม่ได้รับการศึกษาเชื้อไรโซเบียมจากไม้ยืนต้นตระกูลถั่วบางชนิด เช่น แคบ้าน กระถิน จามจุรี กระถินเทพา มะขามเทศ ฯลฯ นอกจากนี้สมควรเพิ่มจำนวนเชื้อต่อวัชพืชให้มากขึ้น เพื่อความถูกต้องแม่นยำของข้อมูล

ตารางที่ 1

การสร้างปมของเชื้อไรโซเบียมจากปมรากวัชพืชตระกูลถั่วในถั่วเศรษฐกิจ

วัชพืชตระกูลถั่ว	ถั่วเศรษฐกิจ		
	ถั่วเหลือง	ถั่วเขียว	ถั่วพุ่ม
(1) โสนขน *(Aeschynomene americana)*			
จำนวนเชื้อที่สามารถสร้างปม (%)	0	100	100
จำนวนปม/ต้น	0	18	39
ค่าคะแนนความเขียวของใบ	1.00	1.00	2.00
(2) ถั่วเลื้อย *(Unidentified species)*			
จำนวนเชื้อที่สามารถสร้างปม (%)	0	50	50
จำนวนปม/ต้น	0	25	29
ค่าคะแนนความเขียวของใบ	1.00	3.66	3.83
(3) โสนเขียว *(Sesbania sp.)*			
จำนวนเชื้อที่สามารถสร้างปม (%)	0	0	100
จำนวนปม/ต้น	0	0	8
ค่าคะแนนความเขียวของใบ	1.00	1.00	1.42
(4) โสนม่วง *(Sesbania sp.)*			
จำนวนเชื้อที่สามารถสร้างปม (%)	0	50	100
จำนวนปม/ต้น	0	3	23
ค่าคะแนนความเขียวของใบ	1.00	1.33	1.83
(5) หิ่งเหย *(Crotalaria straita)*			
จำนวนเชื้อที่สามารถเข้าสร้างปม (%)	0	100	100
จำนวนปม/ต้น	0	23	39
ค่าคะแนนความเขียวของใบ	1.00	3.67	4.00

ตารางที่ 2

การติดปมและจำนวนปม/ต้นของถั่วเหลือง ถั่วเขียวและถั่วพุ่มเมื่อใส่เชื้อไรโซเบียมจากวัชพืชตระกูลถั่ว

วัชพืชตระกูลถั่ว	การติดปม (จำนวนปม/ต้น)		
	ถั่วเหลือง	ถั่วเขียว	ถั่วพุ่ม
1. โสนขน *(Aeschynomene americana)*			
– เชื้อที่ 1	0	13	37
– เชื้อที่ 2	0	14	38
– เชื้อที่ 3	0	30	45
– เชื้อที่ 4	0	14	35
2. ถั่วเลื้อย *(Unidentified species)*			
– เชื้อที่ 1	0	0	0
– เชื้อที่ 2	0	0	0
– เชื้อที่ 3	0	27	26
– เชื้อที่ 4	0	23	33
3. โสนเขียว *(Sesbania sp.)*			
– เชื้อที่ 1	0	0	7
– เชื้อที่ 2	0	0	18
– เชื้อที่ 3	0	0	5
– เชื้อที่ 4	0	0	2

ตารางที่ 2 (ต่อ)

วัชพืชตระกูลถั่ว	การติดปม (จำนวนปม/ต้น)		
	ถั่วเหลือง	ถั่วเขียว	ถั่วพุ่ม
4. โสนม่วง *(Sesbania sp.)*			
– เชื้อที่ 1	0	4	22
– เชื้อที่ 2	0	2	27
– เชื้อที่ 3	0	0	18
– เชื้อที่ 4	0	0	27
5 . หิ่งเหย *(Crotalaria straita)*			
– เชื้อที่ 1	0	25	22
– เชื้อที่ 2	0	30	27
– เชื้อที่ 3	0	24	18
– เชื้อที่ 4	0	25	27

ตารางที่ 3

การเจริญเติบโตของถั่วเหลือง ถั่วเขียวและถั่วพุ่ม เมื่อใส่เชื้อจากปมรากวัชพืชตระกูลถั่ว

ตำรับทดลอง	น้ำหนักสด (มิลลิกรัม/ต้น)					
	ถั่วเหลือง		ถั่วเขียว		ถั่วพุ่ม	
	ต้น	ราก	ต้น	ราก	ต้น	ราก
1. ใส่เชื้อไรโซเบียมจากปมราก						
– โสนขน	899^{C}	912^{bc}	703b	1,158	1,025^{bc}	1,427
(จำนวนเชื้อที่สร้างปม %)**		(0)		(100)		(100)
– ถั่วเลื้อย	985^{bc}	865^{bc}	792^{b}	1,115	918^{bc}	1,476
(จำนวนเชื้อราที่สร้างปม %)		(0)		(50)		(75)
– โสนเขียว	927^{c}	883^{bc}	648^{b}	1,019	979^{bc}	1,476
(จำนวนเชื้อที่สร้างปม %)		(0)		(0)		(75)
– โสนม่วง	955^{c}	827^{c}	717^{b}	1,285	1,082^{bc}	1,165
(จำนวนเชื้อที่สร้างปม %)		(0)		(25)		(100)
– หิ่งเหย	1,000^{bc}	912^{c}	890^{c}	970	1,132^{b}	1,179
(จำนวนเชื้อที่สร้างปม %)		(0)		(100)		(100)
2. ไม่ใส่เชื้อ	1,132^{ab}	1,024^{b}	654^{b}	624	857^{c}	1,474
(จำนวนเชื้อที่สร้างปม %)		(0)		(0)		(0)
3. ใส่ไนโตรเจน	1,200^{a}	1,227^{a}	1,348^{a}	1,029	1,739^{a}	1,547
(0.5% KNO_3 อัตรา 70 ppm/ต้น)						
(จำนวนเชื้อที่สร้างปม %)		(0)		(0)		(0)
	*	*	*	NS	*	NS
CV	8.40%	9.71%	27.16%	25.31%	13.76%	16.36%

* แตกต่างกันที่ $p<0.05$ ทางสถิติ

** คำนวณจากการทดสอบ 12 กรณี