รหัสโครงการ SUT3-302-55-36-01

รายงานการวิจัย

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง

Soybean Breeding for N-fixation Improvement under High Nitrogen Condition

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-302-55-36-01

รายงานการวิจัย

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง

Soybean Breeding for N-fixation Improvement under High Nitrogen Condition

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ฐิติพร มะชิโกวา

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุดชล วุ้นประเสริฐ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรรณลดา ติดตะบุตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี การวิจัยครั้งนี้ประสบความสำเร็จได้เป็นอย่างดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ และความร่วมมือจากหลายฝ่ายดังนี้

ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล เหล่าสุวรรณ ที่ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ รวมทั้งคำแนะนำต่างๆ เพื่อเป็นแนวทางที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัย

ฟาร์ม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้ความอนุเคราะห์พื้นที่ปลูกถั่วเหลือง โรงเรือน ห้องปฏิบัติการสำหรับทำการทดลอง รวมทั้งการจัดหาวัสดุและอุปกรณ์พื้นฐานจนการวิจัยสำเร็จด้วยดี

ผู้ช่วยนักวิจัย และนักศึกษาปัญหาพิเศษ ที่มีความตั้งใจ มุ่งมั่น และทุ่มเท ในการเก็บบันทึกข้อมูลงานวิจัยอย่างเต็มความสามารถ

ฐิติพร มะชิโกวา

กันยายน 2558

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง มีความจำเป็นในการผลิตถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อไรโซเบียมร่วมกับการใช้ปุ๋ยเคมีเพื่อให้ได้ผลผลิตสูง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อทดสอบศักยภาพของพันธุ์ถั่วเหลือง พร้อมทั้งคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงในการสร้างปมและตรึงไนโตรเจนได้ดีเมื่อใช้ร่วมกับไรโซเบียมในสภาพการปลูกที่ดินมีไนโตรเจนสูง ดำเนินการทดลอง ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา สำหรับการทดลองมี 2 ส่วน ได้แก่ *ส่วนที่ 1* การประเมินศักยภาพในการสร้างปมราก และการตรึงไนโตรเจนในดินที่มีไนโตรเจนสูงของถั่วเหลืองจากต่างประเทศ 4 พันธุ์ (Harosoy 63, T370, T371, T372) พันธุ์ไทย 5 พันธุ์/สายพันธุ์ (LJ4, ชม.60, สจ.5, M3215, M3217) ปลูกโดยใช้เชื้อไรโซเบียมในการทดสอบ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ USDA110 และ DASA66040 ทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยให้ปุ๋ยไนโตรเจน 2 ระดับ คือใช้สารละลายที่มีและไม่มีไนโตรเจน ผลการทดสอบการปลูกถั่วเหลืองที่ให้สาร ละลายที่ไม่มีไนโตรเจน+ไม่คลุกไรโซเบียม ถั่วเหลืองเจริญเติบโตช้า ใบมีสีเหลือง สำหรับการปลูกที่ไม่ให้ไนโตรเจน+ไรโซเบียม และการปลูกที่ให้ไนโตรเจนสูง+ไรโซเบียม ถั่วเหลืองเจริญเติบโตปกติ อย่างไรก็ตามในสภาพที่มีไนโตรเจนสูงถั่วเหลืองสายพันธุ์ T370 และ T372 มีจำนวนปม น้ำหนักแห้งปม และประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าพันธุ์อื่น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ไรโซเบียม พบว่ามีผลต่อการตรึงไนโตรเจนไม่แตกต่างกัน แต่สายพันธุ์ DASA66040 มีแนวโน้มให้ผลดีกว่าเล็กน้อย *ส่วนที่ 2* เป็นการสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้กับถั่วเหลืองโดย 2 วิธีการ คือ 1) การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี EMS กับถั่วเหลือง 2 พันธุ์ (ชม.60, สจ.5) และวิธีการที่ 2) ทำการผสมระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ต่างประเทศที่มีความสามารถในการสร้างปมได้ดีผสมข้ามกับถั่วเหลืองพันธุ์ไทยที่สามารถปรับตัว และเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมของไทย เมื่อสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้ 2 วิธีแล้วได้สายพันธุ์ที่มีความหลากหลายเป็นจำนวนมาก จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูง และเจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีไนโตรเจนสูงเป็นระยะเวลา 6 ชั่วอายุ สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีองค์ประกอบผลผลิตใกล้เคียงหรือสูงกว่าสายพันธุ์ที่ปลูกในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนต่ำ เมื่อนำสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกมาปลูกทดสอบในสภาพแปลง พบว่ามี 5 สายพันธุ์ (Superior lines) ที่มีจำนวนปม น้ำหนักปม น้ำหนักแห้งต้น องค์ประกอบผลผลิต และให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์เดิม (สจ. 5, T370 และ T372)

คำสำคัญ : ถั่วเหลือง, สายพันธุ์กลาย, การตรึงไนโตรเจน, แบรดี้ไรโซเบียม

Keywords : Soybean, mutant lines, nitrogen fixation, *Bradyrhizobium*

Abstract

Soybean varieties with nitrogen fixation potential under high soil nitrogen environment are needed for soybean yield improvement using the combination of chemical fertilizer and rhizobium inoculation. The objective of this research was to evaluate and screen soybean varieties with high nodulation and nitrogen fixation potential under rhizobium inoculation and high nitrogen application conditions. A series of experiments were conducted at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima. In the first part of the experiments, 4 soybean varieties from world collection (Harosoy 63, T370, T371, T372) and 5 Thai varieties/lines (LJ4, CM.60, SJ.5, M3215, M3217) were evaluated for nodulation and N fixation potential under the inoculation of 2 rhizobium strains (USDA110 and DASA66040). The experiment was carried out under laboratory conditions with the application of 2 nutrient solution formulas (with and without N). The results showed that under non rhizobium inoculation + N-free solution all soybeans had low growth rate and exhibited chlorosis symptoms on the leaves. Under rhizobium inoculation + N-free solution all soybeans had normal growth similarly to soybean grown under non-rhizobium inoculation + N solution. However, under rhizobium inoculation + N solution soybean varieties T370 and T372 exhibited more nodulation, nodule weight and higher nitrogen fixation efficiency than other lines/varieties. There was no statistically significant difference between two rhizobium strains on N fixation efficiency, even though DASA66040 tended to be slightly more efficient. In the second part of the experiments, genotypic variations of soybean lines were produced by: 1) EMS induced mutation of two soybean varieties (CM60 and SJ5) and 2) crossing between high N-fixation varieties from world collection and Thai varieties with good yield performance and adaptability to local conditions. Both methods produced large population of soybean lines with high genotypic variations. Selection of soybean based on N fixation potential and growth performance was carried out under high N application rate for 6 generations. There were several soybean lines having similar or better yield components than the control varieties. All selected lines were grown under field conditions. Five superior lines produced more nodule number and weight, more dry plant weight, yield components and grain yields than the control varieties (SJ5, CM60, T370 and T372).

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... จ

สารบัญรูป ..... ช

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 ตรวจเอกสาร 3

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 16

บทที่ 4 ผลการทดลอง 27

บทที่ 5 บทสรุป 49

บรรณานุกรม 51

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 เนื้อที่เพาะปลูก ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ของถั่วเหลืองที่ปลูกในประเทศไทย..... 4

ตารางที่ 2.2 การผลิต การนำเข้า และความต้องการใช้เมล็ดถั่วเหลืองภายในประเทศ..... 4

ตารางที่ 2.3 ระยะการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง..... 5

ตารางที่ 2.4 การใช้ปุ๋ยเคมี (N-P-K) สำหรับถั่วเหลืองตามลักษณะดิน..... 7

ตารางที่ 2.5 ปริมาณการใช้ธาตุอาหารพืชของถั่วเหลือง..... 8

ตารางที่ 2.6 ปริมาณไนโตรเจนที่ถั่วชนิดต่างๆตรึงได้โดยประมาณในสภาพไร่นา..... 13

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบสารละลายที่ไม่มีไนโตรเจน (N-free medium)..... 17

ตารางที่ 3.2 ผลการวิเคราะห์ดินทรายที่ใช้ในการปลูกเพื่อคัดเลือกถั่วเหลือง..... 22

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งราก และน้ำหนักแห้งต้นของถั่วเหลือง เมื่อปลูกในดินที่มี..... 31
ไนโตรเจนสูง

ตารางที่ 4.2 ค่าสหสัมพันธ์ลักษณะจำนวนปม น้ำหนักแห้งปม และอัตราการตรึงไนโตรเจน..... 31
ของถั่วเหลือง 9 พันธุ์/สายพันธุ์ เมื่อปลูกในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนสูง

ตารางที่ 4.3 จำนวนต้นถั่วเหลืองที่ผ่านการคัดเลือกในชั่วที่ 2 (M_2)..... 36

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ เมื่อปลูกทดสอบ..... 37
ต้นกลายพันธุ์ในชั่ว M_2

ตารางที่ 4.5 จำนวนต้นถั่วเหลืองที่ผ่านการคัดเลือกในชั่วที่ 3–7 (M_3 – M_7)..... 38

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ เมื่อปลูกทดสอบ..... 39
ต้นกลายพันธุ์ในชั่ว M_3

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ เมื่อปลูกทดสอบ..... 40
ต้นกลายพันธุ์ในชั่ว M_4

ตารางที่ 4.8 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ เมื่อปลูกทดสอบ..... 41
ต้นกลายพันธุ์ในชั่ว M_5

ตารางที่ 4.9 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ ของแถวที่ผ่านการคัดเลือก..... 42
ในชั่ว M_6

ตารางที่ 4.10 จำนวนต้นถั่วเหลือง F_1 และจำนวนต้นที่ผ่านการคัดเลือกในชั่วที่ 2–5 (F_2–F_5)..... 43

ตารางที่ 4.11 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ เมื่อปลูกทดสอบต้นในชั่ว F_2 43

ตารางที่ 4.12 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ เมื่อปลูกทดสอบต้นในชั่ว F_3 44

ตารางที่ 4.13 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ เมื่อปลูกคัดเลือกในชั่ว F_4..... 45

ตารางที่ 4.14 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ ของแถวที่ผ่านการคัดเลือก 45
ในชั่ว F_5

ตารางที่ 4.15 ลักษณะต้นถั่วเหลืองที่ได้จากการคัดเลือก 10 สายพันธุ์ ในระยะออกดอก 46

ตารางที่ 4.16 ค่าเฉลี่ยผลผลิต และองค์ประกอบผลผลิตของถั่วเหลือง 10 สายพันธุ์ ในระยะ..... 47
เก็บเกี่ยว

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 ระยะการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง..... 6

รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation)..... 8

รูปที่ 2.3 กลไกการเข้าสร้างปมในพืช..... 9

รูปที่ 2.4 การเข้าสร้างปมของเชื้อไรโซเบียม..... 10

รูปที่ 3.1 การเตรียมดินทราย และการปลูกถั่วเหลือง..... 17

รูปที่ 3.2 การวัดปริมาณการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลือง โดยวิธี Acetylene Reduction Assay..... 19

รูปที่ 3.3 การแยกปมรากถั่วเหลือง..... 20

รูปที่ 3.4 การวัดน้ำหนักราก และน้ำหนักปมรากถั่วเหลือง..... 20

รูปที่ 3.5 แผนการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองโดยวิธีการผสมพันธุ์เพื่อให้สร้างปมในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง..... 21

รูปที่ 3.6 การปลูกทดสอบสายพันธุ์ถั่วเหลืองพร้อมทั้งทำการคัดเลือกเป็นรายต้นในโรงเรือน..... 23
ในชั่ว M_2,M_3

รูปที่ 3.7 การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองโดยวิธีการผสมพันธุ์เพื่อให้สร้างปมในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง..... 25

รูปที่ 4.1 ถั่วเหลือง ก) ให้และไม่ให้ N+ไม่ใช้ไรโซเบียม ข) ให้ N+DASA66040 ค) ให้ N+USDA110..... 27

รูปที่ 4.2 จำนวนปมรากถั่วเหลือง 9 พันธุ์/สายพันธุ์ เมื่อใช้ไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ ในสภาพที่มี..... 28
ไนโตรเจนสูง

รูปที่ 4.3 น้ำหนักแห้งปมถั่วเหลือง 9 พันธุ์/สายพันธุ์ เมื่อใช้ไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ ในสภาพที่มี..... 29
ไนโตรเจนสูง

รูปที่ 4.4 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ARA ของถั่วเหลือง 9 พันธุ์/สายพันธุ์ เมื่อใช้..... 30
ไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ และปลูกในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.5 จำนวนปมรากต่อต้นของถั่วเหลือง 5 พันธุ์ เมื่อใช้ไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ และปลูกใน..... 32
สภาพที่มีไนโตรเจนสูง

รูปที่ 4.6 น้ำหนักปมรากแห้งต่อต้นของถั่วเหลือง 5 พันธุ์ เมื่อใช้ไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ และปลูก..... 33
ในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง

รูปที่ 4.7 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลือง 5 พันธุ์ เมื่อใช้ไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ 33
และปลูกในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง

รูปที่ 4.8 ความงอกของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 และ ชม. 60 เมื่อใช้สารเคมี EMS ความเข้มข้น 0.1..... 35
และ 1.0%

รูปที่ 4.9 สายพันธุ์คัดเลือกจากการกลายพันธุ์และปลูกทดสอบในสภาพที่ ก) ไนโตรเจนต่ำ..... 48
ข) ไนโตรเจนสูง

รูปที่ 4.10 สายพันธุ์คัดเลือกจากการผสมข้ามพันธุ์และปลูกทดสอบในสภาพที่ ก) ไนโตรเจนต่ำ..... 48
ข) ไนโตรเจนสูง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ถั่วเหลือง (Soybean, *Glycine max* (L.)) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่งของโลก เนื่องจากเป็นพืชที่มีปริมาณโปรตีนและปริมาณน้ำมันในเมล็ดสูง เมล็ดสามารถนำมาสกัดน้ำมัน และนำไปแปรรูปเป็นอาหารได้หลายชนิด และกากถั่วเหลืองยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ ซึ่งในปัจจุบันมีการขยายตัวด้านปศุสัตว์อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังสามารถปลูกเป็นพืชบำรุงดินได้เป็นอย่างดี ในอดีต (ปี 2543–2548) ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองประมาณ 1–1.3 ล้านไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2552) แต่ในช่วงหลังจากนั้นพื้นที่ปลูกได้ลดลงเรื่อยๆ จนในปัจจุบันปี 2557 ลดลงเหลือเพียง 0.29 ล้านไร่ และให้ผลผลิตประมาณ 2 แสนตัน/ปี ในขณะที่ความต้องการใช้ถั่วเหลืองภายในประเทศมีสูง ต้องนำเข้าถั่วเหลืองในรูปของเมล็ดถั่วเหลือง น้ำมันถั่วเหลือง และกากถั่วเหลือง ปีละประมาณ 2 ล้านตัน/ปี ซึ่งคิดเป็นมูลค่ากว่า 2 หมื่นล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557) และมีแนวโน้มการนำเข้าถั่วเหลืองเพิ่มขึ้นทุกปี ทั้งในรูปของเมล็ด น้ำมันดิบ และกากถั่วเหลือง อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพื้นที่การปลูกและการผลิตถั่วเหลืองกลับมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องทุกปีดังได้กล่าวมาแล้ว ทั้งนี้เนื่องมาจากถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีปัญหาโรคและแมลงต้องการการดูแลมากกว่าพืชไร่ชนิดอื่นๆ และมีผลผลิตต่อไร่ต่ำ ทำให้การปลูกไม่คุ้มค่ากับการลงทุน เกษตรกรจึงนิยมปลูกพืชไร่ชนิดอื่นที่ให้ผลตอบแทนมากกว่าเป็นพืชหลัก นอกจากนี้พื้นที่การปลูกถั่วเหลืองของประเทศไทยส่วนมากมักเป็นการปลูกหมุนเวียนกับพืชชนิดอื่น และปลูกเป็นพืชตามหลังจากปลูกพืชหลัก เช่น การปลูกถั่วเหลืองภายหลังการปลูกข้าว หรือปลูกหลังข้าวโพด เป็นต้น และเนื่องจากถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีอายุสั้น เก็บเกี่ยวได้เร็ว และยังเป็นพืชบำรุงดิน จึงเหมาะกับการใช้ในระบบการปลูกพืชนี้ และเป็นพืชเสริมรายได้ให้กับเกษตรกรหลังจากปลูกพืชหลัก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเพิ่มผลผลิตต่อไร่ให้สูงขึ้น เพื่อเป็นการจูงใจให้เกษตรกรหันมาปลูกมากขึ้น เป็นเพิ่มการผลิตภายในประเทศให้สูงขึ้นให้เพียงพอกับความต้องการใช้ภายในประเทศ

การให้ผลผลิตของถั่วเหลืองขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ พันธุกรรม และสภาพแวดล้อม การใช้เชื้อไรโซเบียมถือเป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการให้ผลผลิตของถั่วเหลือง โดยหากเปรียบเทียบระหว่างการปลูกถั่วเหลืองที่มีการให้ปุ๋ยไนโตรเจนอย่างเดียวกับการคลุกไรโซเบียมก่อนปลูกเพียงอย่างเดียวแล้ว พบว่าการคลุกเชื้อไรโซเบียมจะทำให้ถั่วเหลืองมีน้ำหนักแห้งและให้ผลผลิตสูงกว่าการให้ปุ๋ยเพียงอย่างเดียวประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ (Sogut, 2006) ดังนั้นในการปลูกถั่วเหลืองให้ได้ผลผลิตสูงจึงนิยมคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไรโซเบียม อย่างไรก็ตามการได้ไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอกับการเจริญเติบโต และการให้ผลผลิต การปลูกถั่วเหลืองให้มีการเจริญเติบโตดี และมีผลผลิตสูง ต้องมีแหล่งของไนโตรเจน ซึ่งนอกจากถั่วเหลืองจะได้ไนโตรเจนจากดิน และจากการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมแล้ว ต้องมีการ

ให้ปุ๋ยไนโตรเจนทางดินด้วย เพื่อให้เพียงพอกับความต้องการของพืช แต่จากหลายการทดลองได้รายงานว่าการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทางดินมีผลกระทบต่อกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม โดยหากใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในปริมาณต่ำจะส่งเสริมให้มีการสร้างปมไรโซเบียม แต่หากให้ไนโตรเจนในระดับสูงจะมีผลทำให้การสร้างปมและปริมาณการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมลดลง (พรพรรณ สุทธิแย้ม และคณะ, 2552; Kucey et al., 1989) ดังนั้นในสภาพการปลูกถั่วเหลืองของประเทศไทยที่มักมีการปลูกเป็นพืชรองตามหลังการปลูกพืชหลักที่มีการให้ปุ๋ยไนโตรเจน และมักมีปุ๋ยไนโตรเจนตกค้างในดินในค่อนข้างสูง นอกจากนี้ในการเพิ่มผลผลิตถั่วเหลืองให้สูงขึ้น นอกจากต้องคลุกเมล็ดพันธุ์ด้วยเชื้อไรโซเบียมแล้ว อาจจำเป็นต้องใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ซึ่งการมีไนโตรเจนตกค้างในดินและการให้ปุ๋ยไนโตรเจนเพิ่มให้แก่ถั่วเหลืองอาจมีผลในการยับยั้งการสร้างปมรากไรโซเบียมของถั่วเหลือง ซึ่งหากต้องการเพิ่มผลผลิตของถั่วเหลืองให้สูงขึ้น แนวทางหนึ่งที่เป็นไปได้คือ การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองเพื่อให้สามารถดูดใช้ไนโตรเจนจากดินได้ดี และสามารถทำงานร่วมกันระหว่างพันธุ์ถั่วเหลืองและสายพันธุ์ไรโซเบียมได้มากในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง เพื่อช่วยให้การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในดินของถั่วเหลืองและจากการตรึงไนโตรเจนจากการอยู่ร่วมกันกับไรโซเบียมเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะทำให้ผลผลิตสูงขึ้นได้ เนื่องจากถั่วเหลืองที่สามารถสร้างปมรากและตรึงไนโตรเจนได้มากในสภาพปลูกที่มีไนโตรเจนในดินสูง นอกจากจะสามารถดูดใช้ไนโตรเจนในดินได้ดีแล้ว ยังสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ปริมาณสูง ทำให้มีประสิทธิภาพในการดูดใช้และตรึงไนโตรเจนได้สูง ซึ่งสามารถเพิ่มการเจริญเติบโต น้ำหนักแห้ง และผลผลิตถั่วเหลืองต่อไร่ให้สูงขึ้นได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทดสอบศักยภาพของพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วเหลือง ในการสร้างปม และอัตราการตรึงไนโตรเจน ในสภาพการปลูกที่มีไนโตรเจนสูง
2. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่สร้างปมและมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูง ในสภาพการปลูกที่มีไนโตรเจนสูง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ประเมินพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วเหลือง เพื่อศึกษาศักยภาพในการสร้างปมและการตรึงไนโตรเจน ในสภาพการปลูกที่มีไนโตรเจนสูง
2. ชักนำพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วเหลืองให้เกิดการกลายพันธุ์ และการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ที่สามารถสร้างปมและตรึงไนโตรเจนได้สูง เพื่อใช้เป็นแหล่งคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูง ในสภาพการปลูกที่มีไนโตรเจนสูง
3. ทดสอบสายพันธุ์ที่ได้จากข้อ 2. ทั้งในสภาพโรงเรือนและแปลงปลูก พร้อมทั้งทำการคัดเลือกเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถสร้างปมและมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนสูง

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 ความสำคัญและสถานการณ์การผลิตถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีความสำคัญและมีบทบาทต่อเศรษฐกิจโลก เนื่องจากมีการนำถั่วเหลืองมาใช้ประโยชน์มากมาย ทำให้มีการไหลเวียนของเงินตรามูลค่าสูงในแต่ละส่วนที่เกี่ยวข้องตั้งแต่การผลิต การตลาด การแปรรูป และใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่างๆ เช่น เมล็ดใช้สกัดน้ำมัน แปรรูป ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมต่อเนื่องอีกหลายชนิด ในปี 2555/56 ผลผลิตถั่วเหลืองของโลกมีผลผลิตรวม 267.48 ล้านตัน เพิ่มขึ้นจาก 239.15 ล้านตัน ในปี 2554/55 คิดเป็นร้อยละ 3.91 ต่อปี ประเทศผู้ผลิตสำคัญ ได้แก่ บราซิล สหรัฐอเมริกา และอาร์เจนตินา ปริมาณผลิตรวม 213.46 ล้านตัน คิดเป็นร้อยละ 79.80 ของผลผลิตโลก สำหรับสถานการณ์การผลิตถั่วเหลืองในประเทศไทย พบว่าพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองลดลงทุกปี โดยในปี 2556 มีเนื้อที่เพาะปลูกเพียง 0.29 ล้านไร่ ลดลงจาก 0.36 ล้านไร่ และมีผลผลิต 76,488 ตัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557) การลดลงของเนื้อที่เพาะปลูก และผลผลิตมีสาเหตุสำคัญ คือ ผลตอบแทนของพืชแข่งขันสูงกว่าการผลิตถั่วเหลือง ทำให้เกษตรกรหันไปปลูกพืชทดแทนชนิดอื่นมากขึ้น ส่งผลกระทบต่อพื้นที่การผลิตถั่วเหลืองของไทยและทำให้ผลผลิตถั่วเหลืองรวมของไทยลดลง สาเหตุอีกประการที่ทำให้การผลิตถั่วเหลืองลดลง เนื่องจากการขาดแคลนเมล็ดพันธุ์ดี อย่างไรก็ตาม ความต้องการใช้เมล็ดถั่วเหลืองภายในประเทศมีเป็นจำนวนมาก โดยในปี 2551/52–2555/56 มีความต้องการใช้เมล็ดปริมาณ 2.218 ล้านตัน ดังนั้นแต่ละปีต้องมีการนำเข้าเมล็ดจากต่างประเทศปริมาณมาก โดยในปี 2555/56 มีการนำเข้าเมล็ดถั่วเหลืองร้อยละ 97.13 ของความต้องการใช้ทั้งหมดประมาณ 2.14 ล้านตัน (ตารางที่ 2.2) ซึ่งถือได้ว่ามีการนำเข้าเมล็ดถั่วเหลืองเป็นอันดับ 7 ของโลก แหล่งนำเข้าสำคัญ ได้แก่ บราซิล สหรัฐอเมริกา อาร์เจนตินา และแคนาดา การใช้ประโยชน์มีหลายวัตถุประสงค์ ได้แก่ สกัดน้ำมัน ทำพันธุ์ และแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารคิดเป็นร้อยละ 74.40 ร้อยละ 0.23 และร้อยละ 25.29 ของความต้องการใช้เมล็ดถั่วเหลืองภายในประเทศทั้งหมด สำหรับคุณภาพของเมล็ดถั่วเหลืองที่ผลิตภายใน ประเทศพบว่ามักมีคุณภาพยังไม่ได้มาตรฐาน นอกจากนี้ยังพบว่าผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่ค่อนข้างต่ำ (263 –272 กก./ไร่) เมื่อเทียบกับต่างประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา บราซิล อาร์เจนตินา และแคนาดา เป็นต้น โดยถั่วเหลืองในประเทศต่างๆ ดังกล่าวมีผลผลิตสูงตั้งแต่ 422–467 กก./ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการวิจัยและพัฒนาถั่วเหลืองเพื่อให้มีปริมาณที่เพียงพอกับความต้องการใช้ภายในประเทศ และผลผลิตที่ได้มีคุณภาพที่ดี

ตารางที่ 2.1 เนื้อที่เพาะปลูก ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ของถั่วเหลืองที่ปลูกในประเทศไทย

รายการ	2554/55	2555/56	2556/57
1. เนื้อที่ปลูก (ล้านไร่)	0.53	0.36	0.29
2. ผลผลิต (ตัน)	137,381	95,065	76,488
3. ผลผลิตต่อไร่ (กก.)	257	261	266

ที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2557)

ตารางที่ 2.2 การผลิต การนำเข้า และความต้องการใช้เมล็ดถั่วเหลืองภายในประเทศ

หน่วย : ตัน

ปี	ผลิต	นำเข้า	ความต้องการใช้ภายในประเทศ			รวม
			สกัดน้ำมัน	ทำพันธุ์	แปรรูป	
2554	137,381	1,994,378	1,727,676	9,607	391,847	2,131,759
2555	95,065	2,119,941	1,679,481	6,544	527,063	2,215,006
2556	76,488	2,141,140	1,649,820	5,167	560,771	2,217,628

ที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2557)

2.2 ระยะการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง (Growth stage identification)

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีอายุสั้น (75-120 วัน) ซึ่งสามารถแบ่งการเจริญเติบโตเป็น 2 ช่วง คือ ระยะการเจริญเติบโตทางลำต้น (vegetative stage) และระยะเจริญพันธุ์ (reproductive stage)

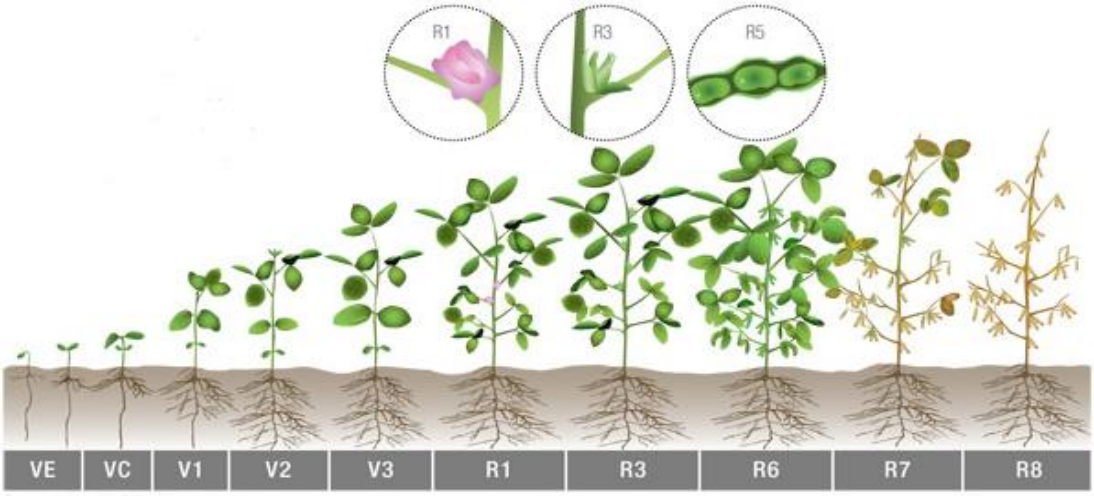
ระยะการเจริญเติบโตทางลำต้น เริ่มนับตั้งแต่ระยะเวลาที่พืชโผล่พ้นพื้นดิน (VE) และหลังจากระยะ VC หรือระยะใบเลี้ยง ระยะการเจริญเติบโตจะถูกกำหนดโดยลำดับข้อ ซึ่งเริ่มจาก V_1 (ข้อที่ 1 ที่มีใบ unifoliolate ติดอยู่) V_2 (ข้อที่ 2 ที่มีใบจริง (trifoliolate) ใบที่ 1 ติดอยู่) V_3 (ข้อที่ 3 ที่มีใบจริงใบที่ 2 ติดอยู่) และ V_4 ตลอดจนถึง $V_{(n)}$ ในการนับจำนวนและลำดับของข้อ นับข้อที่อยู่บนลำต้น (main stem) เท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 2.1 (http://prairiecalifornian.com/soybean-growth-stages/) และแสดงรายละเอียดดังตารางที่ 2.3

สำหรับระยะเจริญพันธุ์ เริ่มตั้งแต่ถั่วเหลืองเริ่มออกดอก ออกฝัก และติดเมล็ด มีการพัฒนาตลอดจนการสะสมน้ำหนักแห้งในเมล็ด และการสุกแก่ ซึ่งระยะการเจริญเติบโตถูกกำหนดด้วยตัวย่อ R แล้วตามด้วยตัวเลข 1, 2, 3... (n) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.1 และแสดงรายละเอียดดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ระยะการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง

Growth stage	ระยะการเจริญเติบโต	รายละเอียด
VE	ระยะโผล่พ้นดิน	ใบเลี้ยงเพิ่งโผล่ และอยู่เหนือผิวดิน
VC	ระยะใบเลี้ยง	ใบประกอบเริ่มคลี่กาง และบอบใบประกอบไม่แตะกัน
V_1	ระยะข้อที่ 1	ใบประกอบที่กางเต็มที่ในข้อที่ 1
V_2	ระยะข้อที่ 2	ใบจริงที่ 1 (1^{st} trifoliolate leaf) คลี่กางออกในข้อที่ 2
V_3	ระยะข้อที่ 3	ต้นถั่วเหลืองมีข้อที่ 3 ข้อแล้วบนลำต้น และในข้อที่ 3 จะมีใบจริงที่ 2 คลี่กางออก
↓	↓	
$V_{(n)}$	ระยะข้อที่ (n) (n-node)	(n) เท่ากับลำดับข้อบนลำต้นที่มีใบจริงคลี่กางออกเต็มที่
R_1	เริ่มออกดอก	มีดอกบานหนึ่งดอกบนข้อใดๆ บนลำต้น
R_2	ออกดอกเต็มที่	มีดอกบานที่ข้อใดข้อหนึ่งบนข้อบนสุดสองข้อ
R_3	เริ่มติดฝัก	ฝักยาวขนาด 5.0 มม. ปรากฏขึ้นที่ข้อใดข้อหนึ่งบนสุด 4 ข้อ
R_4	ติดฝักเต็มที่	ฝักยาวขนาด 2.0 ซม. ปรากฏขึ้นที่ข้อใดข้อหนึ่งบนข้อบนสุด 4 ข้อ บนลำต้นที่มีใบคลี่กางเต็มที่
R_5	เริ่มติดเมล็ด	เมล็ดยาวขนาด 3.0 มม. ในฝักที่ติดอยู่ในข้อใดข้อหนึ่งบนข้อบนสุด 4 บนลำต้นที่มีใบคลี่กางเต็มที่
R_6	เมล็ดพัฒนาเต็มที่	ฝักมีเมล็ดสีเขียวเจริญเติบโตจนเต็มช่องว่างของฝักปรากฏให้เห็นในข้อใดข้อหนึ่ง 4 ข้อบนสุดของลำต้น
R_7	เริ่มสุกแก่	ฝักใดฝักหนึ่งบนลำต้นที่เริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล หรือน้ำตาลไหม้ หรือดำ
R_8	สุกแก่เต็มที่	95 เปอร์เซ็นต์ของฝักที่เปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล หรือน้ำตาลไหม้

ที่มา : อภิพรรณ พุกภักดี (2545)



รูปที่ 2.1 ระยะการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง

2.3 การปลูกและดูแลรักษาถั่วเหลือง

การปลูกถั่วเหลืองในดินที่เป็นกรดจัด (pH ต่ำกว่า 5.5) ควรลดความเป็นกรดของดินด้วยการใส่ปูนขาวอัตรา 100-200 กก./ไร่ สำหรับดินที่ค่อนข้างเป็นทราย หรืออัตรา 200-400 กก./ไร่ สำหรับดินเหนียว ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้ปุ๋ยเคมี การปลูกถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อไรโซเบียมที่ถูกต้อง คือทำให้เชื้อที่ใส่ลงไปเข้าสู่รากเพื่อสร้างปมให้ได้มากที่สุด ดังนั้นสามารถทำได้โดยการนำมาคลุกกับเมล็ดก่อนปลูกจึงเป็นวิธีการที่ได้ผลดี การคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไรโซเบียม มีขั้นตอนดังนี้

1. นำเมล็ดที่จะนำมาปลูกใส่ลงในภาชนะ
2. ใส่สารที่ช่วยให้เชื้อติดเมล็ดดี หรือสารเหนียว เช่น น้ำเชื่อม หรือแป้งเปียกเจือจาง โดยใช้สารเชื่อมประมาณ 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร เทลงไปในเมล็ดถั่วเหลืองประมาณ 15 กิโลกรัม แล้วกวนเมล็ดเบาๆ ให้เปียกทั่วกัน
3. ใส่เชื้อไรโซเบียม 1 ถุง หรือประมาณ 200 กรัม ลงในถังภาชนะที่มีเมล็ดถั่ว 15 กิโลกรัม ซึ่งเคลือบด้วยสารเหนียวแล้ว คนเบาๆ จนกระทั่งทุกเมล็ดถั่วเหลืองมีผงเชื้อติดอย่างสม่ำเสมอไม่ควรบดขยี้เมล็ด เพราะจะทำให้เมล็ดแตก ทำให้เปอร์เซ็นต์ความงอกลดลง
4. เมล็ดที่คลุกเชื้อ ควรนำไปปลูกทันที อาจแบ่งปริมาณที่คลุกเชื้อแล้วบางส่วนไว้ในร่ม หรือหาวัสดุที่รักษาความชื้นปกปิด แล้วทยอยปลูกให้หมดภายใน 1 วัน

อย่างไรก็ตาม การปลูกถั่วเหลืองในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนสูงการเกิดปมในรากถั่วจะช้าและมีปริมาณลดลง ถั่วแต่ละชนิดแต่ละพันธุ์จะใช้ไรโซเบียมชนิดไม่เหมือนกัน เช่น การปลูกถั่วเหลืองควรใช้ไรโซเบียมชนิดเข้าได้กับถั่วเหลืองโดยเฉพาะ หรือถั่วลิสงควรใช้ไรโซเบียมเฉพาะกับถั่วลิสง ข้อดีของการใช้เชื้อไรโซเบียม คือช่วยเพิ่มผลผลิตถั่วโดยลดต้นทุนการผลิต เพราะเชื้อราคาถูกเพียงถุงละประมาณ 10 บาท ซึ่งใช้ปลูกถั่วได้ 1 ไร่ ทำให้เกษตรกรสามารถมีผลกำไร

การดูแลรักษาโดยการใช้ปุ๋ยเคมีเป็นปัจจัยการผลิตที่สำคัญปัจจัยหนึ่ง ในการเพิ่มผลผลิตถั่วเหลือง การใช้ปุ๋ยเคมีกับถั่วเหลืองหลังปลูกข้าว เกษตรกรที่ปลูกข้าวนาปรังส่วนใหญ่มักจะมีการใช้ปุ๋ยเคมีทุกครั้งที่ปลูกข้าว บางปีเกษตรกรปลูกพืชไร่อายุสั้น เช่น ถั่วเหลืองแทนการปลูกข้าวนาปรังผลผลิตถั่วเหลืองที่ได้จะค่อนข้างสูง เนื่องจากผลตกค้างของปุ๋ยเคมีที่สะสมติดต่อกันนานๆ จากการใช้ปุ๋ยกับข้าว แล้วยังมีประโยชน์ต่อถั่วเหลืองที่ปลูกตามอย่างเพียงพอ

หลักการในการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างมีประสิทธิภาพจำเป็นต้องคำนึงถึงชนิดดิน และสมบัติของดินรวมถึงแร่ธาตุอาหารพืชในดิน ซึ่งทราบได้จากการวิเคราะห์ดิน นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงวิธีเขตกรรม หรือการจัดการ ซึ่งแต่ละพื้นที่ปลูกอาจจะแตกต่างกัน ดังนั้นความเข้าใจถึงชนิดดิน และสมบัติดินจะช่วยให้การใช้ปุ๋ยได้อย่างเหมาะสม นอกจากได้ผลตอบแทนอย่างคุ้มค่าต่อการลงทุนจากการใช้ปุ๋ยแล้ว ยังเป็นแนวทางหนึ่งในการผลิตพืชอย่างยั่งยืนอีกด้วย การใช้ธาตุอาหารพืชเพื่อเพิ่มผลผลิตถั่วเหลือง จะใช้ชนิดและอัตราใดขึ้นกับชนิด และระดับความอุดมสมบูรณ์ของดิน เมื่อปลูกในดินที่ค่อนข้างเป็นทรายจะต้องใช้ปุ๋ยมากกว่า เมื่อปลูกในดินที่เป็นดินร่วนหรือดินเหนียว ทั้งนี้เพราะดินที่ค่อนข้างเป็นทรายจะมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำกว่าดินเหนียวหรือร่วนเหนียว การใช้ปุ๋ยเคมีตามชนิดดินดังแสดงในตารางที่ 2.4 (สุวพันธ์ รัตนะรัต, มปป.) ซึ่งส่วนต่างๆ ของถั่วเหลืองมีความต้องการใช้ธาตุอาหารแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.4 การใช้ปุ๋ยเคมี (N-P-K) สำหรับถั่วเหลืองตามลักษณะดิน

เนื้อดิน	**ปริมาณธาตุอาหารแนะนำ (N, P_2O_5, K_2O กก./ ไร่)**	**สูตรปุ๋ยที่ควรใช้ (N-P_2O_5-K_2O)**	**อัตราการใช้ (กก./ไร่)**
ดินเหนียวสีแดง	3, 6, 3	12-24-12	20-30
		16-16-8	30-40
		8-24-24	25-35
		0-3-0 (หินฟอสเฟต)	50-200
ดินเหนียวสีดำ	0, 6, 0	0-46-0	15-20
		0-40-0	15-20
ดินร่วนเหนียวสีน้ำตาล	0, 6, 0	0-46-0	15-20
		0-40-0	15-20
ดินร่วนทราย	3, 9, 6	12-24-12	30-40
		16-16-8	40-50

การปลูกถั่วเหลืองในดินทุกชนิด ควรคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไรโซเบียมตอนปลูก เพื่อทดแทนการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.5 ปริมาณการใช้ธาตุอาหารพืชของถั่วเหลือง

ส่วนของพืช	ธาตุอาหารพืช (กก./ไร่)[1]		
	ไนโตรเจน (N)	ฟอสฟอรัส (P)	โพแทสเซียม (K)
เมล็ด	18.3	2.1	5.8
ต้น + ใบ	5.3	0.8	3.7
ราก	2.9	0.4	2.1
รวม	**27.0**	**3.3**	**11.6**

[1]ผลผลิตเมล็ดถั่วเหลือง 300 กก./ไร่

ที่มา : น้อย เธียรนันท์ และนพชัย สวนมาลี (2535)

2.4 การตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation) ของไรโซเบียม

การตรึงไนโตรเจนในปมรากถั่วเกิดขึ้น เนื่องจากการอยู่ร่วมกันของถั่วเหลืองและไรโซเบียม (Rhizobium) ซึ่งไรไซเบียมเป็นเชื้อแบคทีเรียที่จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต สามารถสร้างปมในรากของถั่วได้ สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยอาศัยแส้ (flagella) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 28 ถึง 30 องศาเซลเซียส สามารถใช้น้ำตาลแอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์บางชนิดเป็นแหล่งของพลังงาน

การตรึงก๊าซไนโตรเจนเป็นการเปลี่ยนรูปจากก๊าซไนโตรเจน (N_2) ในบรรยากาศ หรืออากาศในดินให้อยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogen) ซึ่งตำแหน่งในการตรึงก๊าซไนโตรเจนนั้นจะเกิดในปมรากหรือลำต้นของพืชตระกูลถั่ว (สมศักดิ์ วงใน, 2541) โดยการตรึงไนโตรเจนในปมรากถั่วเหลืองเกิดขึ้นภายในแบคทีรอยด์ โดยถั่วเป็นแหล่งให้คาร์บอนในรูปน้ำตาลแก่ ไรโซเบียม คาร์โบไฮเดรตที่ถูกสร้างขึ้นในกระบวนการสังเคราะห์แสงจะถูกขนย้ายผ่านท่ออาหารไปยังปมรากของถั่ว ซึ่งในกระบวนการของหายใจของไรโซเบียมนั้นนำไปสู่กระบวนการ reduction ของ NADH ไปเป็น NADH + H^+ จากนั้น NADH จะ reduce ferridoxin ต่อไปจะได้อิเล็กตรอน และ ATP ซึ่งจะถูกใช้ในกระบวนการ reduction ของ N_2 ให้กลายเป็น NH_4^+ เมื่อถูกขนย้ายออกจากไรโซเบียมจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรด glutamic และ amides (glutamine และ asparagine) เคลื่อนย้ายจากเซลล์ cortex ไปยัง pericycle แล้วขึ้นไปยังโฟลเอม จากนั้นสารประกอบไนโตรเจนจะเคลื่อนที่ต่อไปทั่วในต้นพืช โดยปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนแสดงในรูปที่ 2.2 (Madigan et al., 2000)

$$N_2 + 8e^- + 16MgATP + 8H^+ \xrightarrow{\text{Nitrogenase}} 2NH_3 + H_2 + 16MgADP + 16Pi$$

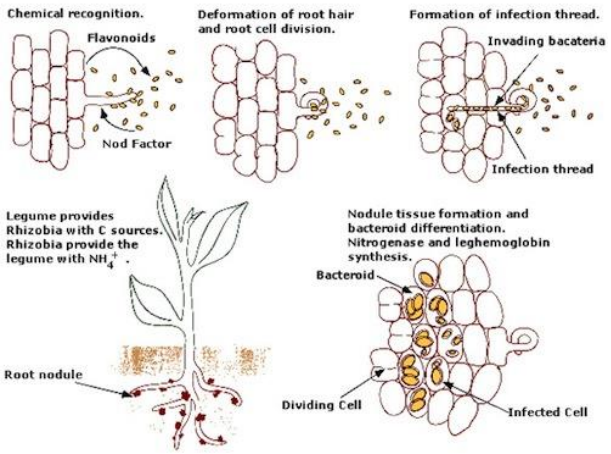
รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน (Nitrogen fixation)

2.5 การสร้างปมของเชื้อไรโซเบียม

การเข้าสร้างปมของไรโซเบียมในพืชตระกูลถั่วนั้น ทั้งแบคทีเรีย และพืชจะต้องมีปัจจัยควบคุมที่สอดคล้องกันคือ genes โดยที่ในเชื้อไรโซเบียมมี nod genes เป็นตัวควบคุม และเมื่อเชื้อไรโซเบียมเข้าไปในเซลล์พืชแล้วไปกระตุ้นให้เกิดความเปลี่ยนแปลงภายในราก โดยมีการสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ให้เกิดปมขึ้นมา (รูปที่ 2.3 และ 2.4) ซึ่งการเข้าสร้างปมมี 2 แบบ คือ การเข้าสร้างปมโดยการสร้าง infection thread และการเข้าสร้างปมโดยไม่มีการสร้าง infection thread

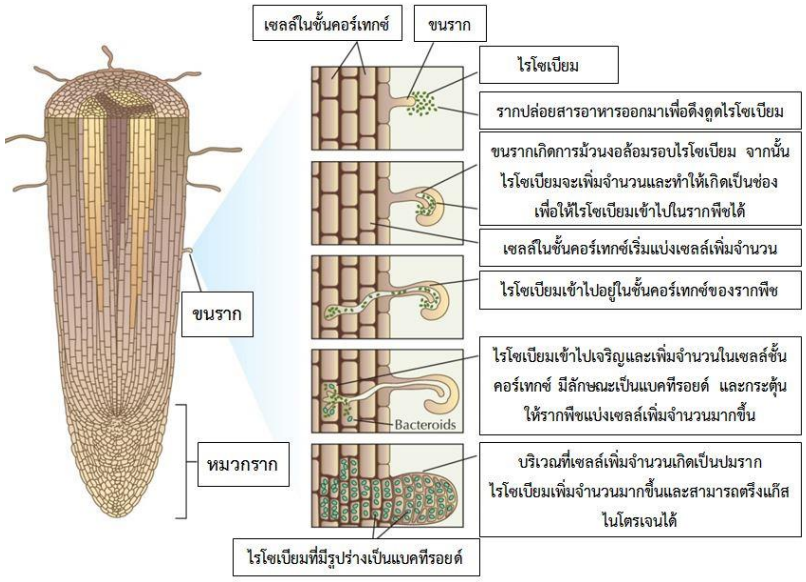
1) การเข้าสร้างปมโดยการสร้าง infection thread เชื้อไรโซเบียมจะสร้างสารประกอบ IAA ขึ้นมาจาก Tryptophan พืชปลดปล่อยออกมาทำให้รากม้วนงอ และผนังเซลล์ด้านในของรากขนอ่อนจะยุบตัวเป็นท่อกลวงเข้าไปภายในรากเป็นท่อเล็กๆ เรียกว่า infection thread จะเจริญเข้าไปถึงชั้น cortex แล้วเจาะเข้าไปภายในเซลล์ โดยที่เซลล์พืชจะสร้าง envelope หุ้มกลุ่มเซลล์ของแบคทีเรีย จากนั้นเซลล์ของแบคทีเรียที่อยู่ในเซลล์พืชจะเปลี่ยนรูปร่างและขนาดใหญ่ขึ้น เรียกว่า bacteroid ในขณะเดียวกันพืชจะผลิตสารที่เรียกว่า leghaemoglobin ขึ้นมาโดยเข้ามาอยู่ระหว่างเยื่อ envelope และ cell membrane ของ bacteroid เพื่อทำหน้าที่ควบคุมปริมาณ O_2 ในกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนที่เกิดขึ้นจากไรโซเบียม

2) การเข้าสร้างปมโดยไม่มีการสร้าง infection thread แบคทีเรียจะเข้าไปในรากพืชตรงรอยต่อของเซลล์แบบ intercellular infection เมื่อเข้าถึงเซลล์ชั้น cortex แล้วแบคทีเรียจะปล่อย enzyme ออกมาย่อยผนังเซลล์พืชและเข้าไปเจริญภายในเซลล์พืชอีกทีหนึ่ง ปมของพืชที่เกิดขึ้นในลักษณะนี้จะมีปมขึ้นตรงส่วนที่ lateral root แยกออกมาจาก main root พืชที่สร้างปมแบบนี้ได้แก่ ถั่วลิสง เป็นต้น



รูปที่ 2.3 กลไกการเข้าสร้างปมในพืช

http://www.biochem.duke.edu/modules/biochem_raetz_lab/index.php?id=6



รูปที่ 2.4 การเข้าสร้างปมของเชื้อไรโซเบียม (http://biology.ipst.ac.th/?p=2169)

2.6 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม

ไรโซเบียมที่อาศัยในพืชตระกูลถั่วมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของถั่วและเชื้อไรโซเบียมแล้ว ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความสมดุลของสภาพแวดล้อมที่พอเหมาะต่อการสังเคราะห์แสง และการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เนื่องจากไรโซเบียมเมื่อเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อพืชแล้วจำเป็นต้องอาศัยสารประกอบต่างๆ จากพืชในการทำกิจกรรมต่างๆ ซึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการตรึงไนโตรเจนมีดังนี้

1) ความเป็นกรดเป็นด่างของดิน (pH) ดินที่เหมาะสมควรมี pH ระหว่าง 6.5-7.5 คือ เป็นดินที่เป็นกรดอ่อนจนถึงเป็นกลาง เมื่อดินเป็นกรดจัด ค่า pH < 6 ไรโซเบียมบางสายพันธุ์จะสร้างปมน้อย ตรึงไนโตรเจนได้ต่ำ เนื่องจากจะเกิดความเป็นพิษจากธาตุเหล็ก (Fe) และอะลูมิเนียม (Al) ในดิน และอาจมีธาตุแคลเซียม (Ca) ในระดับต่ำ ไม่เพียงพอต่อความต้องการของไรโซเบียม

2) อุณหภูมิและความชื้นของดิน ดินที่มีความชื้นสูง และอุณหภูมิประมาณ 28–30 องศาเซลเซียสจะทำให้เชื้อไรโซเบียมเจริญเติบโตได้ดีกว่าดินที่มีความชื้นต่ำ และอุณหภูมิสูง

3) ปริมาณของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในดิน สารพิษที่อาจเกิดจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นๆ ในดินจะเป็นอันตรายต่อการดำรงชีพของไรโซเบียม เช่น Bacteriophage หรือ Protozoa จุลินทรีย์เหล่านี้ถ้ามีมากเกินไปจะทำให้ปริมาณของไรโซเบียมในดินลดลง นอกจากนี้สิ่งมีชีวิตอื่นๆในดิน เช่น ตัวอ่อนของแมลง ไส้เดือนฝอย (Nematode) หากมีมากจะเข้าทำลายปมถั่วได้

4) ปริมาณธาตุอาหารพืชในดิน ได้แก่ ปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โมลิบดินัม แคลเซียม ล้วนมีอิทธิพลยิ่งต่อกระบวนการตรึงไนโตรเจน ไรโซเบียมจะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นหากดินมีธาตุ

อาหารฟอสฟอรัส แคลเซียม และโมลิบดินัม เพียงพอ บ่อยครั้งที่พบว่าการใช้หินฟอสเฟต (มีฟอสฟอรัสและแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ) หรือการใช้ปุ๋ยที่มีโมลิบดินัมหรือปูน (มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ) โดยเฉพาะเมื่อปลูกถั่วในดินที่เป็นกรดจัด (pH ต่ำกว่า 5.5) จะช่วยสร้างปมที่รากถั่วและตรึงไนโตรเจนได้มากขึ้น และถึงแม้ถั่วเหลืองต้องการไนโตรเจนสูง แต่ไนโตรเจนในดินสูงไม่ช่วยส่งเสริมให้มีการตรึงไนโตรเจน การปลูกถั่วที่มีการใช้เชื้อไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน (ปุ๋ยเคมี) จะลดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของปมรากลง บ่อยครั้งที่ไม่พบการตรึงถั่วจากการใช้ไรโซเบียมเมื่อปลูกถั่วเหลืองในดินที่เปิดใหม่ ซึ่งมีอินทรียวัตถุหรือมีไนโตรเจนในดินสูง พืชจะใช้ไนโตรเจนจากดินมากกว่าไนโตรเจนจากการตรึงของไรโซเบียม ซึ่งมีผลทำให้เกิดกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนลดลงด้วย (Carroll et al., 1985a) เนื่องจากไนโตรเจนจะเข้าไปมีผลขัดขวางกระบวนการสร้าง nitrogenase enzyme ในแบคทีเรีย โดยหลายงานวิจัยพบว่าเมื่อดินมีไนโตรเจนสูงมีผลทำให้การสร้างปมลดลง 22–33 เปอร์เซ็นต์ และทำให้น้ำหนักปมลดลง 50–70 เปอร์เซ็นต์ (Herridge and Brockwell, 1988; Wiersma and Orf, 1992)

5) แหล่งของคาร์บอน (C) ไรโซเบียมจะใช้แหล่งอาหารคาร์บอนที่ได้จากการสังเคราะห์แสงของพืชในรูปของน้ำตาลซูโครส นอกจากนี้ยังมีแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ ที่ได้จากพืชด้วย เช่น succinate, fumalate และ acetate ขึ้นอยู่กับชนิดของไรโซเบียมและชนิดของถั่ว

2.7 ความต้องการไนโตรเจนของถั่วเหลือง

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญมีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืช มีสารประกอบที่สำคัญ เช่น โปรตีน คลอโรฟีน และกรดนิวคลีอิก เป็นต้น โดยเฉลี่ยในพืชจะมีไนโตรเจนประมาณ 1.5 ถึง 5.0% ของน้ำหนักแห้ง (Haynes, 1986) ถั่วเหลืองเป็นพืชที่ต้องการใช้ธาตุไนโตรเจนสูง ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ในเมล็ดถั่วเหลืองในสภาพการเจริญเติบโตที่เหมาะสมพบไนโตรเจนในเมล็ดมากถึง 38 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ โพแทสเซียม และฟอสฟอรัส จากการวิจัยพบว่าในการผลิตถั่วเหลืองให้เจริญเติบโตดี มีน้ำหนักเมล็ดสูง (ผลผลิต 300 กิโลกรัม/ไร่) จะต้องใช้ธาตุอาหารไนโตรเจน โพแทสเซียม และฟอสฟอรัส ประมาณ 27.0, 3.3 และ 11.6 กิโลกรัม/ไร่ ตามลำดับ (น้อย เธียรนันท์ และนพชัย สวนมาลี, 2535) ดังนั้นไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญมากในการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของถั่วเหลือง การเจริญทางลำต้นและใบ (vegetative stage) เป็นช่วงการเจริญเติบโตที่มีการตอบสนองต่อการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนสูง (Demooy and Suthetland, 1979) โดยหากช่วงแรกของการปลูกพร้อมกับคลุกเชื้อไรโซเบียมการใช้ปุ๋ยในปริมาณต่ำในช่วง 2 สัปดาห์หลังงอก ส่งเสริมให้ต้นถั่วมีการเกิดปมเพิ่มขึ้น ไนโตรเจนที่ถั่วเหลืองใช้ในการเจริญเติบโตได้รับสองทาง คือไนโตรเจนที่มีอยู่ในดิน หรือปุ๋ย และไนโตรเจนจากอากาศผ่านกระบวนการตรึงไนโตรเจน โดยถั่วเหลืองจะสามารถรับทางใดขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืช และสภาพแวดล้อม มีรายงานการวิจัยที่พบว่าการขาดไนโตรเจนในช่วง 2-4 สัปดาห์ก่อนการออกดอก ทำให้ผลผลิตของถั่วเหลืองลดลงมากกว่าการขาดไนโตรเจนในระยะอื่น สำหรับการขาดไนโตรเจนในช่วง 2 สัปดาห์หลังการออกดอก ไม่มีผลทำให้ผลผลิตลดลง โดยในระยะแรกของการเจริญเติบโตจนถึงระยะติดฝักเต็มที่ (R4) ปริมาณไนโตรเจนส่วนใหญ่สะสมไว้

ในใบคิดเป็น 70% ของไนโตรเจนทั้งหมดในส่วนเหนือดิน หลังจากพ้นระยะนี้ปริมาณไนโตรเจนในส่วนของใบจะลดลง และปริมาณไนโตรเจนในส่วนของลำต้นจะเพิ่มขึ้นเป็นลำดับจนถึงช่วงระยะ R4 ถึง R7 จะมีปริมาณคงที่คือ 21-22% ของไนโตรเจนทั้งหมด (Hanway and Weber, 1971; Egli et al., 1978) ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีความต้องการไนโตรเจนสูงเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต และสร้างผลผลิตมากกว่าพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น โดยปริมาณไนโตรเจนที่ถั่วเหลืองต้องการใช้สร้างเมล็ดประมาณ 29 มก.N/กรัม ของ photosynthate ในขณะที่พืชอื่น เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี และถั่วลิสง ต้องการเพียง 10, 11, 16 และ 18 มก./กรัม ของ photosynthate (Sinclair and Dewit, 1975)

สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่ถั่วเหลืองใช้ในการเจริญเติบโต พบว่ามาจากหลายแหล่งและขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ หลายปัจจัย ได้แก่ พันธุกรรมของถั่วเหลือง ปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนที่ถั่วเหลืองดูดใช้จากดิน (N-uptake) ขบวนการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียม (Biological Nitrogen Fixation; BNF) และการตอบสนองต่อไนโตรเจนในดิน โดยจากการวิเคราะห์สัดส่วนของไนโตรเจนที่พบในถั่วเหลืองพบว่ามาจากการตรึงไนโตรเจน (BNF) ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (LaRue and Patterson, 1981; Harper, 1987; Salvagiotti et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าปริมาณไนโตรเจนในดินมีอิทธิพลในการควบคุมการสร้างปมและการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลือง หากมีไนโตรเจนในดินสูงจะมีผลในทางลบต่อการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสและกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียมและการสร้างปมของถั่วเหลือง ส่งผลให้การตรึงไนโตรเจนและการสร้างปมลดลง มีรายงานว่าการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสามารถทำได้ 2 แนวทางคือ การจัดการให้ถั่วเหลืองมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยให้ได้รับปัจจัยการผลิตเต็มที่ และรวมการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงขึ้น (Peoples et al., 1995)

2.8 ปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้

ไรโซเบียมและพืชตระกูลถั่วจะตรึงไนโตรเจนได้มากน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับระดับของธาตุไนโตรเจนในดิน ถ้าในดินมีไนโตรเจนในระดับต่ำการตรึงไนโตรเจนจะมีมากที่สุด ถ้าในดินไม่ขาดไนโตรเจน พืชได้รับไนโตรเจนจากดินเพียงพอการตรึงไนโตรเจนจะมีน้อย หรือไม่ตรึงไนโตรเจน ดังนั้นถ้ามีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนลงไปในดินในปริมาณมากไรโซเบียมจะไม่ตรึงไนโตรเจน (ชลิดา ปัญญาด้วง, 2550; พรพรรณ สุทธิแย้ม และคณะ, 2554) การประเมินการตรึงไนโตรเจนของพืชตระกูลถั่วชนิดต่างๆ (ตารางที่ 2.6) พบว่าปริมาณของไนโตรเจนที่ไรโซเบียมตรึงได้นั้นเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโต และให้ผลผลิตของพืชตระกูลถั่วชนิดนั้นๆ โดยไม่จำเป็นต้องให้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนและหากสภาวะต่างๆ เหมาะสม โดยมีไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนแล้ว นอกจากจะช่วยทำให้การเจริญเติบโต และผลผลิตของพืชตระกูลถั่วสูงแล้ว เมื่อทำการไถกลบพืชตระกูลถั่วนั้นลงสู่ดิน โดยเฉพาะพืชตระกูลถั่วที่ใช้เป็นปุ๋ยพืชสด เช่น โสนชนิดต่างๆ ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ในอัตราที่ค่อนข้างสูง เมื่อทำการไถกลบลงดินจะเกิดการย่อยสลาย และปลดปล่อยไนโตรเจนสู่ดินเป็นประโยชน์ต่อพืชที่ปลูกตามต่อไป โดยไรโซเบียมสามารถตรึงไนโตรเจนให้กับพืชตระกูลถั่วบางชนิดมีปริมาณตั้งแต่ประมาณ 5 ถึง 143 กก.N/ไร่ (สมพร ชุนห์ลือชานนท์, 2541)

ตารางที่ 2.6 ปริมาณไนโตรเจนที่ถั่วชนิดต่างๆตรึงได้โดยประมาณในสภาพไร่นา

พืช	ปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้โดยประมาณ (กก.N/ไร่/ปี)
ถั่วเหลือง	10 – 28
ถั่วเขียว	10 – 55
ถั่วลิสง	12 – 50
ถั่วพุ่ม	12 – 57
ถั่วแดงหลวง	7 – 11
ถั่วมะแฮะ	27 – 45
ถั่วปากอ้า	7 – 88

ที่มา : FAO (1984)

ถั่วเหลืองจะได้ไนโตรเจนจากการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมระหว่าง 25–75 เปอร์เซ็นต์ (Hardy et al., 1973; Zhang et al., 1986; George et al., 1988; Guffy et al., 1989) ขึ้นกับพันธุ์ถั่วเหลือง สายพันธุ์ไรโซเบียม สภาพแวดล้อม และวิธีการวัดปริมาณการตรึงไนโตรเจน แต่โดยเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (LaRue and Patterson, 1981) ปริมาณการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลืองประมาณ 40–120 กก./เฮกตาร์ (Gardner et al., 1985) หรือ 10-27 kg N/ไร่/ปี (FAO, 1998) Kucey et al (1989) ได้ทดลองโดยคลุกเชื้อไรโซเบียมให้กับเมล็ดถั่วเหลืองก่อนปลูก พบว่าถั่วเหลืองมีการตรึงไนโตรเจนได้ดีเมื่อมีปุ๋ยไนโตรเจนในดินระดับต่ำ แต่หากให้ไนโตรเจนทางดินในระดับสูงจะทำให้การตรึงไนโตรเจนลดลง และผลผลิตไม่แตกต่างกับการปลูกโดยคลุกเชื้อไรโซเบียมเพียงอย่างเดียว เหตุที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากปริมาณปุ๋ยไนโตรเจนในดินมีสหสัมพันธ์ในทางลบกับความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (Salvagiotti et al., 2008) โดยเมื่อมีปุ๋ยไนโตรเจนในดินสูงจะไปลดกิจกรรมของเอนไซม์ nitrogenase มีผลทำให้การตรึงไนโตรเจนลดลง และยับยั้งการสร้างปม ส่งผลให้มีน้ำหนักแห้งและผลผลิตของถั่วเหลืองลดลง (พรพรรณ สุทธิแย้ม และคณะ, 2554) จากหลายงานวิจัยพบว่าหากให้ปุ๋ยไนโตรเจนในระดับสูง จะมีผลทำให้การสร้างปมลดลง 22–33 เปอร์เซ็นต์ และทำให้น้ำหนักปมลดลง 50–70 เปอร์เซ็นต์ (Herridge and Brockwell, 1988; Wiersma and Orf, 1992) อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตของถั่วเหลืองภายใต้สภาพการปลูกปกติ ซึ่งส่วนใหญ่จะมีการคลุกเมล็ดพันธุ์ด้วยไรโซเบียมและมีการให้ปุ๋ยเคมีในระยะเจริญเติบโต เนื่องจากการคลุกเชื้อไรโซเบียมเพียงอย่างเดียวผลผลิตของถั่วเหลืองไม่สูงมากนัก ดังนั้นไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงของไรโซเบียม (ประมาณ 50–60 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต และการให้ผลผลิตของถั่วเหลือง ดังนั้นในสภาพการปลูกทั่วไปจึงมักมีการให้ปุ๋ยไนโตรเจนทางดินด้วย เพื่อให้ได้ผลผลิตสูง อย่างไรก็ตามปริมาณไนโตรเจนมีอิทธิพลต่อการสร้างปม และการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลือง ดังนั้นเพื่อให้มีการดูดใช้ปุ๋ยไนโตรเจนจากดินของถั่วเหลืองได้ดี และเพิ่มการตรึงไนโตรเจนให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น แนวทางหนึ่งที่เป็นไปได้ คือการพัฒนาพันธุ์ถั่วเหลืองให้สามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง โดยให้ถั่วเหลืองสามารถดูดใช้

ไนโตรเจนจากดินได้ดี และสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ดี ไม่ถูกยับยั้งโดยปริมาณของไนโตรเจนในดิน ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตให้กับถั่วเหลืองได้มากกว่าการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ ไรโซเบียม (Betts and Herridge, 1987) และจากรายงานของ Herridge and Rose (1994) พบว่าความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลืองเป็นลักษณะที่ถูกควบคุมโดยยีนน้อยคู่ อย่างไรก็ตามพบมีอัตราพันธุกรรมต่ำ (36 เปอร์เซ็นต์) และขึ้นกับสภาพแวดล้อม ซึ่งได้แก่ ปริมาณไนโตรเจนในดิน ความร้อน ความชื้น เป็นต้น ทำให้การคัดเลือกทำได้ยาก อย่างไรก็ตาม Herridge et al. (1990) พบว่าอัตราการตรึงไนโตรเจนมีสหสัมพันธ์สูงกับการสร้างปมราก นั่นคือหากคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีจำนวนปมมาก แสดงว่าถั่วเหลืองมีการตรึงไนโตรเจนสูงด้วย ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีการตรึงไนโตรเจนสูงอาจทำได้โดยการคัดเลือกจากต้นที่มีจำนวนปมมากได้

2.9 การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีการสร้างปมไรโซเบียมในสภาพที่มีไนโตรเจนในดินสูง

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญมีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืช มีสารประกอบที่สำคัญ เช่น โปรตีน คลอโรฟีน และกรดนิวคลีอิก เป็นต้น โดยเฉลี่ยในพืชจะมีไนโตรเจนประมาณ 1.5 ถึง 5.0% ของน้ำหนักแห้ง (Haynes, 1986) ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ในถั่วเหลือง ในสภาพการเจริญเติบโตที่เหมาะสมพบมากถึง 38 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากปริมาณไนโตรเจนในเมล็ดทั้งหมดนี้ เป็นไนโตรเจนที่ได้จากขบวนการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณไนโตรเจนส่วนที่เหลือได้มา จากไนโตรเจนในดิน (Weber, 1966a) จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าถั่วเหลืองบางสายพันธุ์มีความสามารถสูงในการสร้างปมราก ซึ่งมีเชื้อไรโซเบียมได้ในสภาพดินที่มีปริมาณไนโตรเจนสูง ซึ่งถั่วเหลืองที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีในสภาพที่มีไนโตรเจนในดินสูง นอกจากพันธุกรรมของพืชแล้วความจำเพาะเจาะจงของสายพันธุ์ไรโซเบียมต่อชนิดหรือพันธุ์ของถั่วเหลือง เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การตรึงไนโตรเจนมีประสิทธิภาพมากขึ้น มีการทดลองที่สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่ทนต่อสภาพดินที่มีไนโตรเจนสูง เพื่อให้สามารถใช้เชื้อไรโซเบียมร่วมกับการใช้ปุ๋ยเคมีการปลูกถั่วเหลือง โดยการนำถั่วเหลืองสายพันธุ์กลายจากการฉายรังสีจำนวน 121 สายพันธุ์ มาปลูกร่วมกับการใช้ไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างๆ ในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนสูง ซึ่งผลการทดลองนี้สามารถคัดเลือกได้สายพันธุ์ไรโซเบียมที่ตรึงไนโตรเจนได้ดีในสภาพที่มีไนโตรเจนสูงจำนวน 200 สายพันธุ์ (พรพรรณ สุทธิแย้ม และคณะ, 2552) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลือง ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อไรโซเบียม ซึ่งจะส่งผลให้มีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสภาพแวดล้อมที่มีไนโตรเจนในดินสูง โดยการทดลองใช้เชื้อไรโซเบียมทนไนเตรทสูงในการคลุกเมล็ดถั่วเหลืองร่วมกับให้ปุ๋ยเคมี พบว่าได้ถั่วเหลืองมีผลผลิตและเปอร์เซ็นต์โปรตีนในเมล็ดสูงกว่าการใช้เชื้อไรโซเบียมปกติ (วิทยา ธนานุสนธิ์, 2545; พรพรรณ สุทธิแย้ม และคณะ, 2554)

การสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้กับถั่วเหลืองเพื่อเป็นแหล่งสำหรับการคัดเลือกพันธุ์สามารถทำได้หลายวิธี โดยวิธีที่พบว่าประสบความสำเร็จมาก คือ การทำให้กลายพันธุ์โดยการนำเมล็ดไปฉายด้วยรังสีแกมมา (Gamma ray) ที่ระดับ 100–200 Gy และวิธีการใช้สารเคมี (EMS) ที่ความเข้มข้น 0.5–1.0

เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลา 4–6 ชั่วโมง งานทดลองของ Carroll et al. (1985b) ได้ปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้ทนทานต่อสภาพการปลูกที่มีไนโตรเจนในดินสูง ซึ่งทำได้โดยนำเมล็ดถั่วเหลืองมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี EMS ที่ความเข้มข้น 0.44 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลา 4 ชั่วโมง และที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดมาปลูกแล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาพการปลูกที่มีไนโตรเจนสูงจากการทดลองพบว่าสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่ได้จากการคัดเลือกสามารถเพิ่มจำนวนปมรากได้ 3-5 เท่า และผลผลิตของถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับพันธุ์เดิม หลายงานทดลองได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองให้สามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีในดินที่มีไนโตรเจนสูง ซึ่งได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีจำนวนปม น้ำหนักแห้งปม และมีการตรึงไนโตรเจนสูงขึ้น และยังพบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตถั่วเหลืองให้สูงขึ้นได้ (Wu and Harper, 1990; Song et al., 1995; Herridge and Rose, 2000; Bhatia et al., 2001)

ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้สามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ดีในสภาพดินมีไนโตรเจนสูง และมีการใช้เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ที่มีความจำเพาะเจาะจง จะช่วยให้การตรึงไนโตรเจนเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถใช้ปุ๋ยไนโตรเจนจากดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งมีผลต่อการตรึงไนโตรเจนได้ดีขึ้น น่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถช่วยให้ถั่วเหลืองตรึงไนโตรเจนได้มากขึ้น ซึ่งจะช่วยเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่ให้แก่ถั่วเหลืองได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การประเมินพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วเหลือง ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง

พันธุ์/สายพันธุ์ ถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ สายพันธุ์จากแหล่งรวบรวมพันธุ์ (USDA ARS-Grin, Soybean Germplasm Collection, Illinois, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่มีรายงานว่าเป็นพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างปมและตรึงไนโตรเจนได้สูง 4 พันธุ์ คือ Harosoy 63, T370, T371, T372 (Accession PI 548575, PI 634761, PI 634762, PI 634763 ตามลำดับ) (www.ars-grin.gov/npgs/) สายพันธุ์ LJ 4 และพันธุ์ไทย 2 พันธุ์ คือ พันธุ์เชียงใหม่ 60 (ชม.60, CM60) และพันธุ์ สจ. 5 (SJ5) นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์อายุสั้นที่ปรับปรุงพันธุ์โดยโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองของสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (โครงการปีงบประมาณ 2551–2553) ที่มีอายุออกดอกและอายุเก็บเกี่ยวสั้น 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ M3217 และ M3215 (ฐิติพร มะชิโกวา, 2554) นำเมล็ดพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วเหลืองทั้งหมด ปลูกทดสอบในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง (ให้ไนโตรเจน 5 mM KNO_3) โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) และจัดทรีตเมนต์แบบแฟกตอเรียล [ประกอบด้วย 3 แฟคเตอร์ ได้แก่ ระดับไนโตรเจน (ไนโตรเจนระดับสูง และไม่ให้ไนโตรเจน) ไรโซเบียม (2 สายพันธุ์) ถั่วเหลือง (8 พันธุ์/สายพันธุ์)] เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างปมราก และประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน เมื่อถั่วเหลืองเจริญเติบโตถึงระยะ R1 เก็บข้อมูลจำนวนปม น้ำหนักแห้งปม และวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน โดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) (Somasegaran and Hoben, 1994) โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

3.1.1 การเตรียมดินทรายเพื่อปลูกทดสอบถั่วเหลือง โดยนำดินทรายมาทำความสะอาด แล้วบรรจุลงในกระป๋อง (Leonard's jar assembly) ที่เตรียมไว้ประมาณ ¾ ของกระป๋อง (รูปที่ 3.1) จากนั้นนำดินทรายที่ทำความสะอาดแล้วมาทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 120 °C ความดัน 15 (lb/in^2) เป็นเวลา 20 นาที

3.1.2 การเตรียมเมล็ดถั่วเหลือง โดยนำเมล็ดสายพันธุ์ต่างๆ ที่กล่าวมาแล้ว มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ และ Clorox แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำไปเพาะลงในในกระดาษเพาะจนเมล็ดมีรากงอก จากนั้นย้ายลงปลูกในกระป๋องที่บรรจุดินทรายที่ผ่านการอบในข้อ 3.1.1 (รูปที่ 3.1)

3.1.3 การเตรียมสารละลายธาตุอาหารพืช (Plant nutrient solution) เตรียมในลักษณะ stock solution โดยเตรียมสารละลายที่ไม่มีส่วนประกอบของไนโตรเจน (N-free medium) ตามสูตรของ Broughton and Dilworth (1970) ซึ่งมีองค์ประกอบดังตารางที่ 3.1 เพื่อใช้สำหรับรดต้นถั่วเหลือง

*การเตรียม stock solution โดยการผสมองค์ประกอบต่างๆ ที่แสดงในตารางที่ 3.1 แล้วปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.6–6.8 โดยใช้ NaOH จากนั้นนำไป autoclave ที่ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

รูปที่ 3.1 การเตรียมดินทราย และการปลูกถั่วเหลือง

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบสารละลายที่ไม่มีไนโตรเจน (N-free medium)

Stock Solution	Chemical substances	g/liter
1	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	294.1
2	KH_2PO_4	136.1
3	$FeC_6H_5O_7 \cdot 3H_2O$	6.7
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	123.3
	K_2SO_4	87.0
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.338
4	H_3BO_3	0.247
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.288
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.100
	$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	0.056
	$Na_2MoO_2 \cdot 2H_2O$	0.048

3.1.4 การปลูกและดูแลรักษาต้นถั่วเหลือง นำเมล็ดถั่วเหลืองที่เริ่มงอกจากข้อ 3.1.2 มาปลูกในทรายที่อบฆ่าเชื้อไว้แล้ว (ข้อ 3.1.1) ก่อนกลบดินทำการปลูกเชื้อ (inoculation) ไรโซเบียมที่เตรียมไว้ปริมาณ 10^8 เซลล์ต่อเมล็ด ซึ่งในการทดลองนี้เปรียบเทียบการใช้ไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 และ *Bradyrhizobium* sp. DASA66040 แล้วกลบด้วยดินทรายหนาประมาณ 1–2 ซม. จากนั้นเติมน้ำในกระป๋องด้านล่าง ปลูกถั่วเหลืองไว้ ณ ห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และวางกระปุกที่ปลูกถั่วเหลืองไว้บนชั้นที่มีการให้แสง 11.8 ชั่วโมง และเมื่อถั่วเหลืองงอกและมีอายุประมาณ 7 วันรดด้วยสารละลาย 2 ทรีตเมนต์ ได้แก่ สารละลายที่ไม่มีไนโตรเจน (N-free medium) และสารละลายที่มีไนโตรเจน (ใช้ N-free medium + KNO_3) โดยใช้ KNO_3 ที่ความเข้มข้น 5 mM ดังนั้นทรีตเมนต์ต่างๆ ของการทดลองนี้ ได้แก่

T1 : ไม่ให้ไนโตรเจน + ไม่ใช้ไรโซเบียม
T2 : ไม่ให้ไนโตรเจน + ไรโซเบียม DASA66040
T3 : ไม่ให้ไนโตรเจน + ไรโซเบียม USDA110
T4 : ให้ไนโตรเจนสูง + ไม่ใช้ไรโซเบียม
T5 : ให้ไนโตรเจนสูง + ไรโซเบียม DASA66040
T6 : ให้ไนโตรเจนสูง + ไรโซเบียม USDA110

3.1.5 การเก็บข้อมูล ทำการเก็บข้อมูลลักษณะต่างๆ ของถั่วเหลือง 9 พันธุ์/สายพันธุ์ ดังนี้

-ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลือง โดยตรวจวัดได้จากค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Nitrogenase activity) ที่เกิดขึ้นภายในปมรากถั่วเหลือง หรือปริมาณไนโตรเจนที่สามารถตรึงได้โดยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) (Somasegaran and Hoben, 1994) ซึ่งได้ทำการเก็บข้อมูลเมื่อถั่วเหลืองอยู่ในระยะ R1 หรืออายุประมาณ 32 วันหลังจากปลูก ทำการเก็บตัวอย่างรากถั่วที่มีปมติดอยู่โดยตัดส่วนของลำต้นออกตั้งแต่ข้อแรก แยกเอาทรายออกอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้ปมหลุดจากราก จากนั้นนำตัวอย่างรากถั่วกับปมที่ติดอยู่กับรากทั้งหมดวางลงในขวดพลาสติกที่ทราบปริมาตรแน่นอน (รูปที่ 3.2) ปิดด้วยจุกยางให้แน่นสนิท จากนั้นเติมแก๊สอะเซทิลีนลงในขวดพลาสติกเพื่อใช้เป็น substrate ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยใช้เข็มฉีดยาดูดอากาศออกจากขวดแก้ว 10 % ของปริมาตรขวด แล้วฉีดแก๊สอะเซทิลีนลงไปแทนที่อากาศ และบ่มไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นใช้เข็มฉีดยาดูดแก๊สออกจากขวดที่บ่มไว้เพื่อนำตัวอย่างไปฉีดและวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณเอทิลีนด้วยเครื่อง gas chromatograph (GC)

รูปที่ 3.2 การวัดปริมาณการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลือง โดยวิธี Acetylene Reduction Assay

สามารถคำนวณหาปริมาณแก๊สเอทิลีน โดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของเอทิลีนมาตรฐานจากสูตร

$$\text{อัตราการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลือง} = \frac{10^3 \times B \times V}{2200 \times \text{Std.} \times A \times 22.4}$$

หน่วยเป็นไมโครโมลของเอทิลีน (C_2H_4) ต่อต้นพืชต่อชั่วโมง เมื่อใช้เอทิลีนมาตรฐานที่ทราบปริมาตรที่แน่นอน (2,200 มล.) (Hardy et al., 1973)

B = พื้นที่ใต้กราฟของพืชตัวอย่าง

V = ปริมาตรของขวดกรวยแก้วที่ใช้เก็บตัวอย่างเป็นมิลลิลิตร

Std. = พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยของแก๊สอะเซทิลีนมาตรฐาน

A = เวลาที่ใช้ในการรีดิวซ์แก๊สอะเซทิลีนเป็นชั่วโมง

- จำนวนปมราก และน้ำหนักแห้งของปมราก เมื่อถั่วเหลืองมีอายุ 32 วันหลังปลูก เมื่อวัดปริมาณการตรึงไนโตรเจนแล้ว นำมานับจำนวนปมรากต่อต้นของถั่วเหลืองแต่ละสายพันธุ์ จากนั้นแยกปมรากไปอบที่ 80 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักแห้งปมรากเป็นรายต้นดังแสดงในรูปที่ 3.3

- น้ำหนักแห้งของต้น และน้ำหนักแห้งของราก โดยหลังจากแยกปมรากออกจากต้นแล้ว นำส่วนของต้น และรากถั่วเหลืองไปอบที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อชั่งน้ำหนักแห้งของต้น และราก (รูปที่ 3.4)

รูปที่ 3.3 การแยกปมรากถั่วเหลือง

รูปที่ 3.4 การวัดน้ำหนักราก และน้ำหนักปมรากถั่วเหลือง

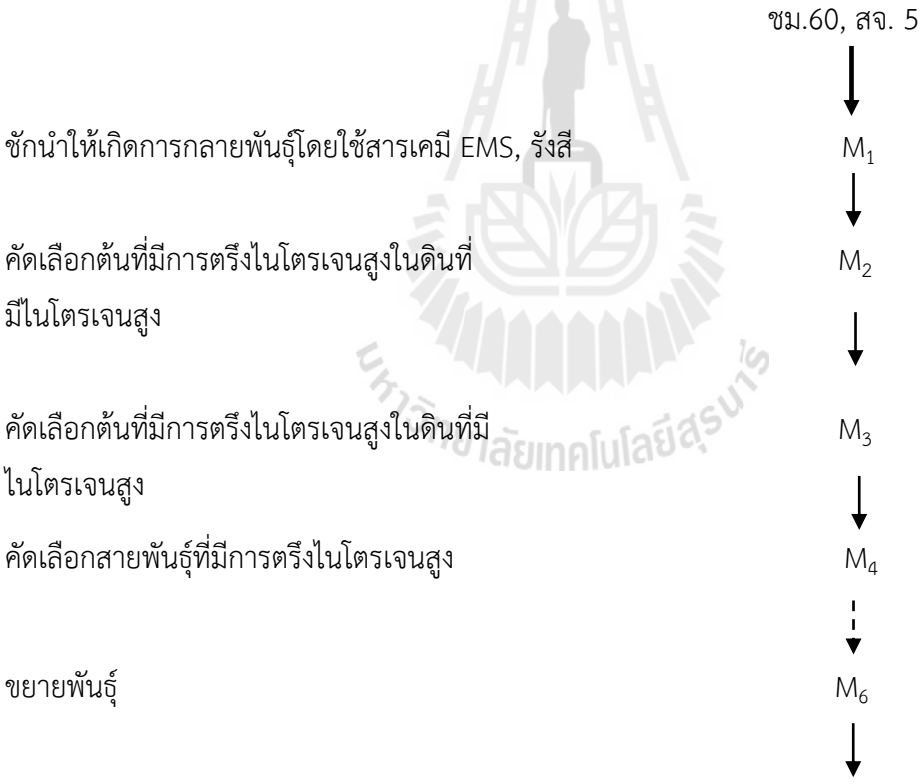
นำข้อมูลต่างๆ มาวิเคราะห์วาเรียนซ์ เพื่อเปรียบเทียบระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์และสายพันธุ์ต่างๆ วิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตรึงไนโตรเจน จำนวนปมราก น้ำหนักแห้งปมราก น้ำหนักแห้งต้น น้ำหนักแห้งรากถั่วเหลือง

การทดสอบสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (ครั้งที่ 2)

จากผลการทดลองที่ 3.1 เมื่อได้ผลของถั่วเหลืองพันธุ์/สายพันธุ์ ต่างๆ ทำการทดสอบถั่วเหลืองในห้องปฏิบัติการซ้ำอีกครั้ง เพื่อยืนยันศักยภาพของพันธุ์/สายพันธุ์ ถั่วเหลือง และสายพันธุ์ไรโซเบียม รวมถึงความสามารถในการอยู่ร่วมกันระหว่างพันธุ์ถั่วเหลืองและสายพันธุ์ของไรโซเบียม โดยจะเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงจากผลการทดสอบครั้งที่ 1 แล้วนำมาทดสอบกับเชื้อ ไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ (DASA66040, USDA110) และให้ไนโตรเจนในระดับสูง และไม่ให้ไนโตรเจน การดูแลรักษาต้นถั่วเหลืองทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยทดลองในห้องควบคุมอุณหภูมิ มีการให้แสงเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 นอกจากนี้การบันทึกข้อมูลของลักษณะต่างๆ ได้แก่ จำนวนปมราก น้ำหนักแห้งปมราก และประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน มีวิธีการและขั้นตอนเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.2 การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้สามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีในสภาพไนโตรเจนสูงโดยวิธีกลายพันธุ์

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์สามารถทำได้หลายวิธี แต่จากหลายงานทดลองพบว่าวิธีที่นิยมและได้ผลดี ได้แก่ การชักนำให้กลายพันธุ์โดยการนำเมล็ดถั่วเหลืองไปฉายรังสีแกมมา และการนำเมล็ดไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี ซึ่งหลายงานทดลองได้รายงานว่าสารเคมีที่สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และสามารถเลือกได้ต้นสายพันธุ์กลาย คือ การใช้สารละลาย Ethyl Methane Sulfonate (EMS) ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกใช้สารเคมี EMS เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งเมื่อเมล็ดผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้ว (เมล็ด M_1) นำมาปลูกและสังเกตลักษณะต่างๆ พร้อมกับทำการคัดเลือก เนื่องจากผลการประเมินพันธุ์เบื้องต้นในการทดลองที่ 3.1 พบว่าถั่วเหลืองพันธุ์ไทยที่สามารถสร้างปมรากในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง ได้แก่ พันธุ์ สจ.5 และ ชม.60 ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงได้เลือก 2 พันธุ์นี้ มาใช้ในการทดลองสำหรับขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จนถึงขั้นตอนการคัดเลือกตลอดการวิจัยในครั้งนี้ มีรายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 แผนการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองโดยวิธีกลายพันธุ์เพื่อให้ตรึงไนโตรเจนได้ดีในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง

3.2.1 การชักนำถั่วเหลืองให้เกิดการกลายพันธุ์

การชักนำให้กลายพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมา นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยนำเมล็ดไปฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 10, 20, 30, 40 krad จากนั้นนำเมล็ดมาปลูกทดสอบในสภาพแปลงเพื่อขยายพันธุ์และบันทึกลักษณะต่างๆ ซึ่งเมื่อปลูกในสภาพแปลงเมล็ดมีความงอกต่ำมาก และมีลักษณะผิดปกติจนไม่สามารถให้เมล็ดได้ จึงไม่สามารถทดสอบต่อเนื่องได้

การชักนำให้กลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี (Ethyl Methane Sulfonate; EMS) นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม. 60 และ สจ. 5 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยนำเมล็ดไปแช่ในสารเคมี EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 1.0% เป็นเวลา 6 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ (Caroll et al., 1985) เมล็ดที่ผ่านการแช่สารละลายเรียกว่าเมล็ด M_1 นำเมล็ดไปปลูกแล้วบันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอก ลักษณะความผิดปกติ และลักษณะต่างๆ ที่จำเป็น เมื่อถึงอายุเก็บเกี่ยวทำการเก็บเมล็ดไว้เพื่อปลูกทดสอบ เมล็ดที่ได้นี้เรียกว่าเมล็ด M_2 ซึ่งจะใช้ในการปลูกเพื่อคัดเลือกในชั่วต่อไป

การวิเคราะห์ดินที่ใช้ในการปลูกทดสอบถั่วเหลือง นำดินทรายจากพื้นที่ไม่เคยปลูกพืชตระกูลถั่วมาก่อนมาใช้ในการปลูกในกระถาง เพื่อทดสอบและคัดเลือกถั่วเหลืองที่เกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และลูกที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ ก่อนนำดินไปใช้ปลูกถั่วเหลืองทำการวิเคราะห์ธาตุอาหารในดิน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินพื้นที่เดียวกันเป็น 2 จุด (2 ตัวอย่าง) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.2 ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่าดินมีเนื้อเป็นดินทราย มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.91–6.02 แสดงว่ามีความเป็นกรดอ่อน ดินไม่เค็มเนื่องจากมี EC ต่ำ (135–141 µs/cm) มีอินทรียวัตถุในดินต่ำมาก นอกจากนี้ยังมีธาตุอาหารในดินต่ำมาก (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 ผลการวิเคราะห์ดินทรายที่ใช้ในการปลูกเพื่อคัดเลือกถั่วเหลือง

ตัวอย่างดิน	**pH**	**EC**	**OM**	**P**	**K**	**Ca**	**Mg**	**S**	**เนื้อดิน**
		(µs/cm)	(%)	--------		(ppm)	--------		
ตัวอย่างที่ 1	5.91	135	0.24	0.3	30	18	20	5	ทราย
ตัวอย่างที่ 2	6.02	141	0.25	0.2	28	18	22	4	ทราย

3.2.2 การประเมินและคัดเลือกถั่วเหลืองหลังจากทำให้เกิดการกลายพันธุ์

1) การประเมินและคัดเลือกถั่วเหลืองในชั่ว M_2 นำเมล็ด M_2 ที่ได้จากการชักนำให้กลายพันธุ์ (CM60-0.1%, CM60-1%, SJ5-0.1%, SJ5-1%) มาปลูกเพื่อประเมินและทดสอบในโรงเรือนโดยใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจน 2 ระดับ คือ ในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนต่ำ และสูง (ปุ๋ยไนโตรเจนระดับสูงใช้ KNO_3 ในระดับ 5 mM) โดยให้ระดับต่ำเป็น control และไนโตรเจนระดับสูงในการคัดเลือก ก่อนปลูกนำเมล็ดมาคลุก

ด้วยเชื้อไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ คือ USDA110 และ DASA66040 เช่นเดียวกับการทดลองในห้องปฏิบัติการ การดูแลรักษา การรดน้ำให้น้ำทุกวันด้วยปริมาณเท่าๆ กันทุกต้น และรดด้วยสารละลายที่มีปริมาณไนโตรเจนสูง และไม่มีไนโตรเจน (N-free medium) ทุก 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 3.6 เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยว บันทึกจำนวนฝักต่อต้น เมล็ดต่อต้น และน้ำหนักแห้งราก น้ำหนักแห้งต้น เป็นรายต้น แล้วนำข้อมูลที่ได้จากต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนสูงเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจากต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนต่ำ แล้วคัดเลือกเฉพาะต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนสูง หากมีลักษณะที่ต้องการไม่แตกต่าง หรือดีกว่ากับต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนต่ำ ถือว่ามีประสิทธิภาพตรึงไนโตรเจนสูง ทำการคัดเลือกไว้

รูปที่ 3.6 การปลูกทดสอบสายพันธุ์ถั่วเหลืองพร้อมทั้งทำการคัดเลือกเป็นรายต้นในโรงเรือนในชั่ว M_2, M_3

2) การประเมินและคัดเลือกถั่วเหลืองในชั่ว M_3 การประเมินและทดสอบถั่วเหลืองในชั่วนี้ได้ทำในโรงเรือนเช่นเดียวกับ M_2 โดยทำการปลูกทดสอบเพื่อประเมินเป็นรายต้น นำเมล็ดที่ผ่านการคัดเลือกในข้อ 1) (เมล็ด M_3 ที่ได้จากประชากร M_2) มาปลูกทดสอบเป็นรายต้นในสภาพโรงเรือนที่ดินมีไนโตรเจนสูง สำหรับการทดสอบในชั่วนี้ใช้เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA66040 เพียงอย่างเดียว เพราะจากการทดลองที่ผ่านมาได้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ DASA66040 มีแนวโน้มให้ผลดีกว่าเล็กน้อยจึงได้เลือกใช้ในการทดลองนี้ เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวบันทึกจำนวนฝักต่อต้น เมล็ดต่อต้น และน้ำหนักแห้งราก น้ำหนักแห้งต้น เป็นรายต้น แล้วคัดเลือกเฉพาะต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนสูงโดยเปรียบเทียบลักษณะกับค่าเฉลี่ยของต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนต่ำ หากต้นที่ปลูกคัดเลือกมีลักษณะที่ต้องการไม่แตกต่างหรือดีกว่าต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนต่ำทำการคัดเลือกไว้ (เมล็ดที่ได้จากชั่วนี้เป็นเมล็ด M_4)

3) การประเมินและคัดเลือกถั่วเหลืองในชั่ว M_4 นำเมล็ด M_4 ที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 2) มาปลูกขยายพันธุ์เป็นรายต้นต่อแถวในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนสูง ก่อนการปลูกคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไรโซเบียม *Bradyrhizobium* sp. DASA66040 การปลูกและดูแลรักษาทำเช่นเดียวกับการคัดเลือกในข้อ 2) และเมื่อถั่วเหลืองถึงระยะ R1 วัดปริมาณการตรึงไนโตรเจนโดยสุ่มมาเป็นรายต้นจากแต่ละแถว เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวบันทึกจำนวนฝักต่อต้น เมล็ดต่อต้น และผลผลิตรายต้น แล้วคัดเลือกต้นภายในแถวที่ดี โดยคัดเลือกเฉพาะต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนสูงโดยเปรียบเทียบลักษณะกับค่าเฉลี่ยของต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนต่ำ หากมีลักษณะที่ต้องการไม่แตกต่าง หรือดีกว่าต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนต่ำ ทำการคัดเลือกไว้ (เมล็ดที่ได้จากข้อนี้เป็นเมล็ด M_5)

4) การประเมินและคัดเลือกถั่วเหลืองในชั่ว M_5 นำเมล็ด M_5 ที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 3) มาปลูกทดสอบในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง โดยปลูกเป็นรายแปลง ก่อนการปลูกคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA66040 เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวสุ่มต้นภายในแถว แถวละ 5 ต้น ทำการบันทึกลักษณะจำนวนปมราก น้ำหนักแห้งปมราก จำนวนฝักต่อต้น เมล็ดต่อต้น และผลผลิตรายต้น แล้วเปรียบเทียบลักษณะแถวที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนสูงกับค่าเฉลี่ยของต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนต่ำ หากมีลักษณะที่ต้องการไม่แตกต่างหรือดีกว่าต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนต่ำทำการคัดเลือกไว้เป็นรายแถว ซึ่งแสดงว่าสายพันธุ์เหล่านี้มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงในสภาพการปลูกที่ดินมีไนโตรเจนสูง เมล็ดที่ได้จากข้อนี้เป็นเมล็ด M_6 ซึ่งจะใช้ในการขยายพันธุ์และทดสอบต่อไป

5) การขยายพันธุ์และคัดเลือกถั่วเหลืองในชั่ว M_6 นำเมล็ด M_6 ที่ได้จากการคัดเลือกในข้อ 4) มาปลูกทดสอบในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง โดยปลูกเป็นรายแปลงก่อนปลูกคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA66040 เมื่อถั่วเหลืองถึงระยะ R1 สุ่มต้นจากแต่ละแปลงย่อยจำนวน 4 ต้น เพื่อวัด จำนวนปมราก น้ำหนักแห้งของปม (เนื่องจาก Herridge et al. (1990) พบว่าอัตราการตรึงไนโตรเจนมีสหสัมพันธ์สูงกับการสร้างปมราก) น้ำหนักแห้งราก น้ำหนักแห้งต้น และเมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวบันทึกจำนวนฝักต่อต้น น้ำหนักแห้งเมล็ดต่อต้น และผลผลิต เป็นรายแถว จากนั้นคัดเลือกเฉพาะแถวที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนสูงโดยเปรียบเทียบลักษณะต่างๆ กับค่าเฉลี่ยของแถวที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนต่ำ หากมีลักษณะไม่แตกต่างหรือ

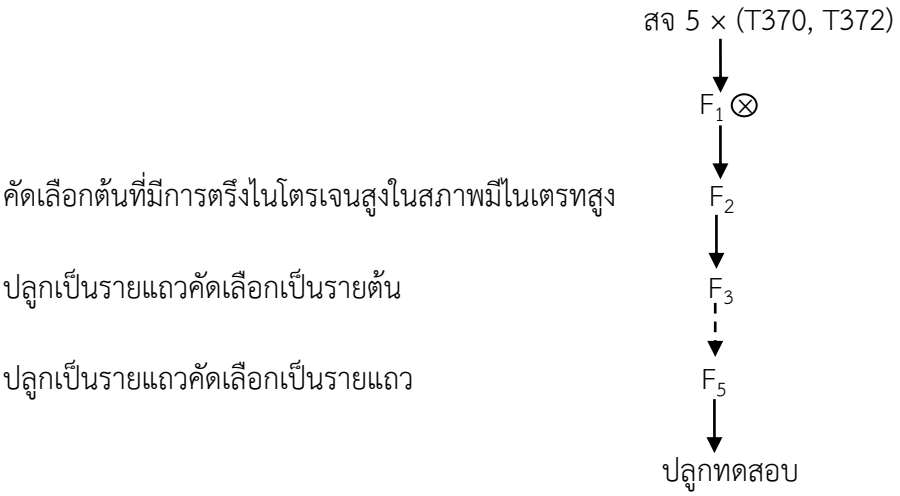
ดีกว่าต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนต่ำทำการคัดเลือกไว้เป็นรายแปลง ซึ่งแสดงว่าสายพันธุ์เหล่านี้มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้ดีในสภาพการปลูกที่ดินมีไนโตรเจนสูง เมล็ดที่ได้จากข้อนี้เป็นเมล็ด M_7 ซึ่งจะใช้ในการปลูกทดสอบต่อไป

3.3 การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงโดยวิธีการผสมพันธุ์

1) การผสมข้ามพันธุ์ จากผลการทดลองที่ 3.1 ที่พบว่าถั่วเหลืองพันธุ์ไทยที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ดีในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง ได้แก่ พันธุ์ สจ. 5 นำมาผสมข้ามกับพันธุ์จากต่างประเทศที่ผ่านการทดสอบจากข้อ 3.1 ซึ่งได้แก่พันธุ์ T370 และ T372 พันธุ์เหล่านี้พบว่ามีจำนวนปมต่อต้น และประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูง เมื่อปลูกในสภาพที่มีไนเตรทสูง ซึ่งเมื่อผสมข้ามได้เมล็ด F_1 แล้วนำเมล็ดลูกผสมไปปลูกแล้วปล่อยให้ผสมตัวเองได้เมล็ด F_2 ซึ่งจะใช้ในการคัดเลือกในขั้นต่อไป (แสดงดังรูปที่ 3.7) จำนวน 2 คู่ผสม ได้แก่ สจ. 5 x พันธุ์ต่างประเทศ (T370) และ พันธุ์ สจ. 5 x T372

2) การประเมินและคัดเลือกถั่วเหลืองในชั่ว F_2 นำเมล็ด F_2 ของแต่ละคู่ผสมมาปลูกทดสอบในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง (โดยใช้ KNO_3 ที่ความเข้มข้น 5 mM) โดยในการปลูกจะคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไรโซเบียม *Bradyrhizobium* sp. DASA66040 และเมื่อถั่วเหลืองถึงระยะ R1 วัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน โดยวิธีนับจำนวนปม ชั่งน้ำหนักแห้งรากและต้น เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวบันทึกจำนวนฝักต่อต้น เมล็ดต่อต้น และผลผลิตรายต้น แล้วคัดเลือกต้นที่มีปริมาณการตรึงไนโตรเจนสูง โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับการคัดเลือกสายพันธุ์กลายในชั่ว M_2

3) การประเมินและคัดเลือกในชั่ว F_3 – F_5 ทำการคัดเลือกโดยมีวิธีการเหมือนกับการคัดเลือกโดยวิธีกลายพันธุ์ (ใน M_3, M_4 และ M_5) เมื่อคัดเลือกต้นในชั่ว F_3 นำไปคัดเลือกในสภาพที่มีไนโตรเจนสูงจะได้ต้นในชั่ว F_4 จากนั้นนำต้นที่ผ่านการคัดเลือกไปปลูกเป็นต้นต่อแถว และคัดเลือกเป็นรายแถวในชั่ว F_5 จากนั้นนำสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกไปปลูกขยายพันธุ์ และใช้ในการทดสอบ (รูปที่ 3.7)



รูปที่ 3.7 การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองโดยวิธีการผสมพันธุ์เพื่อให้สร้างปมในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง

3.4 การปลูกทดสอบสายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือก

นำสายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกจากข้อ 3.2 และ 3.3 (10 สายพันธุ์) มาปลูกทดสอบรวมกับพันธุ์เปรียบเทียบ 2 พันธุ์ (T372 และ สจ. 5) ในสภาพแปลงที่ดินมีไนโตรเจนสูง ในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ทำการวิเคราะห์ดินก่อนปลูก แล้วให้ปุ๋ย KNO_3 เพื่อให้มีไนโตรเจนในระดับสูง ให้มีความเข้มข้นประมาณ 5 mM) ก่อนปลูกเมล็ดของทุกสายพันธุ์/พันธุ์ คลุกเชื้อไรโซเบียม *Bradyrhizobium* sp. DASA66040 จากนั้นนำถั่วเหลืองสายพันธุ์ดังกล่าวปลูกทดสอบในแปลง โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD แต่ละพันธุ์จะปลูกโดยมีระยะระหว่างแถว 50 ซม. ระหว่างต้น 20 ซม. แปลงละ 4 แถวๆ ยาว 5 เมตร ปลูกหลุมละ 2 ต้น เมื่อถั่วเหลืองถึงระยะ R1 ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อเก็บข้อมูลต่างๆ ได้แก่ จำนวนปมราก น้ำหนักแห้งของปมราก น้ำหนักแห้งต้น น้ำหนักแห้งราก และเมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวบันทึกลักษณะองค์ประกอบผลผลิต และผลผลิตเป็นรายต้น

- จำนวนปมราก และน้ำหนักแห้งของปมรากต่อต้น โดยนับจำนวนปมรากเป็นรายต้น (สุ่มวัด 5 ต้นจากแต่ละแปลงย่อย) จากนั้นนำปมรากอบที่อุณหภูมิ 80 ˚C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อชั่งหาน้ำหนักแห้งของปมรากต่อต้น

- น้ำหนักแห้งของต้น และน้ำหนักแห้งของราก ส่วนของต้น และรากถั่วเหลือง (สุ่มวัด 5 ต้นจากแต่ละแปลงย่อย) หลังจากแยกปมออกแล้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 ˚C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อชั่งหาน้ำหนักแห้งของต้น และน้ำหนักแห้งราก

- องค์ประกอบผลผลิต ในระยะสุกแก่ทำการสุ่มตัวอย่างแปลงละ 10 ต้น เพื่อวัดองค์ประกอบผลผลิต ได้แก่ จำนวนฝักต่อต้น เมล็ดต่อต้น น้ำหนัก 100 เมล็ด และผลผลิตต่อต้น

- ผลผลิตถั่วเหลือง เมื่อถึงอายุสุกแก่ทำการเก็บเกี่ยวถั่วเหลืองแล้วนำกะเทาะเมล็ด จากนั้นวัดน้ำหนักผลผลิตที่ได้เป็นรายแปลง (ผลผลิตต่อพื้นที่)

นำข้อมูลมาวิเคราะห์วาเรียนซ์ เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนระหว่างพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนสูง วิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปมราก น้ำหนักแห้งปม ราก กับน้ำหนักแห้งต้น น้ำหนักแห้งราก และผลผลิตถั่วเหลือง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การประเมินพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วเหลือง ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง

การประเมินถั่วเหลือง 9 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์เชียงใหม่ 60 (ชม.60), สจ. 5, LJ 4, M3215, M3217 และพันธุ์ต่างประเทศจากแหล่งรวบรวมพันธุกรรม ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ดีในดินที่มีไนโตรเจนสูง 4 พันธุ์ (Harosoy 63, T370, T371, T372) โดยการทดลองนี้ได้ทำในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง และไม่มีไนโตรเจน และใช้เชื้อไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ (DASA66040, USDA110) เมื่อปลูกถั่วเหลืองในสภาพที่มีการให้และไม่ให้ไนโตรเจนแต่ไม่ใช้เชื้อไรโซเบียม พบว่าการให้ไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวถั่วเหลืองมีการเจริญเติบโตได้แต่ไม่มีการสร้างปมราก (รูปที่ 4.1ก รูปล่าง) ในขณะที่สภาพที่ไม่ใช้เชื้อไรโซเบียมและไม่มีการให้ไนโตรเจนพบว่าถั่วเหลืองทุกพันธุ์/สายพันธุ์มีใบสีเหลืองอ่อน (รูปที่ 4.1ก รูปบน) สำหรับการปลูกในสภาพที่มีการใช้เชื้อไรโซเบียมและดินมีไนโตรเจนสูง ต้นถั่วเหลืองมีใบสีเขียวเข้ม (รูปที่ 4.1ข เมื่อใช้ N+DASA66040 และรูป 4.1ค เมื่อใช้ N+USDA110) และเมื่อวัดจำนวนปมราก น้ำหนักแห้งปมราก และประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน ได้ผลการทดลองดังอธิบายด้านล่าง

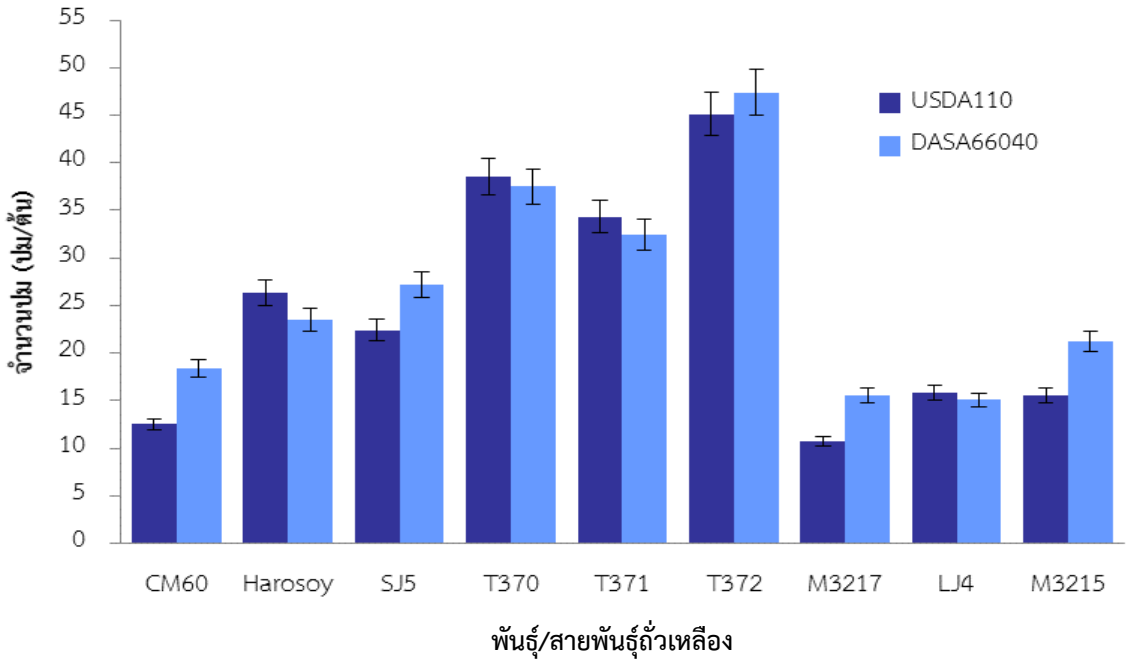
อย่างไรก็ตาม การทดลองปลูกถั่วเหลืองโดยคลุกเชื้อไรโซเบียมและไม่ให้ไนโตรเจน (ให้สารละลาย N-free medium) พบมีการสร้างปมรากถั่วเหลืองปริมาณน้อยกว่าการให้ในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง

รูปที่ 4.1 ถั่วเหลือง ก) ให้และไม่ให้ N+ไม่ใช้ไรโซเบียม ข) ให้ N+DASA66040 ค) ให้ N+USDA110

สำหรับการปลูกในสภาพที่ไม่มีไนโตรเจนแต่ใช้ไรโซเบียม และปลูกในดินทรายที่มีไนโตรเจนต่ำมาก (จากการวิเคราะห์ดินมีค่าต่ำ 0.14 ค่าที่เหมาะสมคือ 0.5) พบว่าถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์มีปม (8–12 ปม/ต้น) และมีน้ำหนักแห้งปมน้อยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ไม่ว่าจะใช้ไรโซเบียมสายพันธุ์ใด นั่นเป็นเพราะในสภาพดินที่มีไนโตรเจนต่ำมาก ไรโซเบียมสร้างปมได้น้อยเพราะมีไนโตรเจนไม่เพียงพอ (Mengel et al., 2012)

จำนวนปมรากต่อต้น จากการเก็บข้อมูลลักษณะถั่วเหลือง ทั้งในสภาพที่ให้และไม่ให้ไนโตรเจน พบว่าการไม่ใช้เชื้อไรโซเบียมไม่มีการสร้างปมราก สำหรับการทดลองที่มีการใช้เชื้อไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ พบจำนวนปมรากต่อต้นของถั่วเหลืองพันธุ์/สายพันธุ์ต่างๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 โดยพันธุ์ต่างประเทศจากแหล่งรวบรวมพันธุกรรม (T370, T371, T372) มีจำนวนปมรากต่อต้นมากกว่าพันธุ์อื่นๆ และพันธุ์ที่มีจำนวนปมรากมากที่สุดคือ T372 (45 และ 47 ปม/ต้น เมื่อใช้เชื้อไรโซเบียม USDA110 และ DASA66040 ตามลำดับ) ในขณะที่สายพันธุ์ M3217 มีจำนวนปมน้อยที่สุด (10 และ 15 ปม/ต้น เมื่อใช้เชื้อไรโซเบียม USDA110 และ DASA66040 ตามลำดับ) และพันธุ์ไทยส่วนใหญ่มีจำนวนปมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามพันธุ์ สจ.5 เป็นพันธุ์ที่ให้จำนวนปมต่อต้นมากกว่าพันธุ์อื่นๆ ไม่ว่าใช้ร่วมกับเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ใด ซึ่งการที่มีจำนวนปมรากต่างกันเนื่องจากเชื้อไรโซเบียมเข้าไปสร้างปมราก และตรึงไนโตรเจนร่วมกับสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่เหมาะสมเท่านั้น (Barnes et al., 1981)

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนปมรากของถั่วเหลืองเมื่อใช้ไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อไรโซเบียม DASA66040 มีความสามารถในการอยู่ร่วมกันกับถั่วเหลืองพันธุ์ต่างๆ ได้ดีกว่า เนื่องจากเมื่อใช้เชื้อชนิดนี้มีผลให้ถั่วเหลืองสร้างปมรากได้มากกว่า โดยเฉพาะเมื่อใช้กับถั่วเหลืองพันธุ์ T372 พบว่ามีจำนวนปมรากต่อต้นสูงสุด

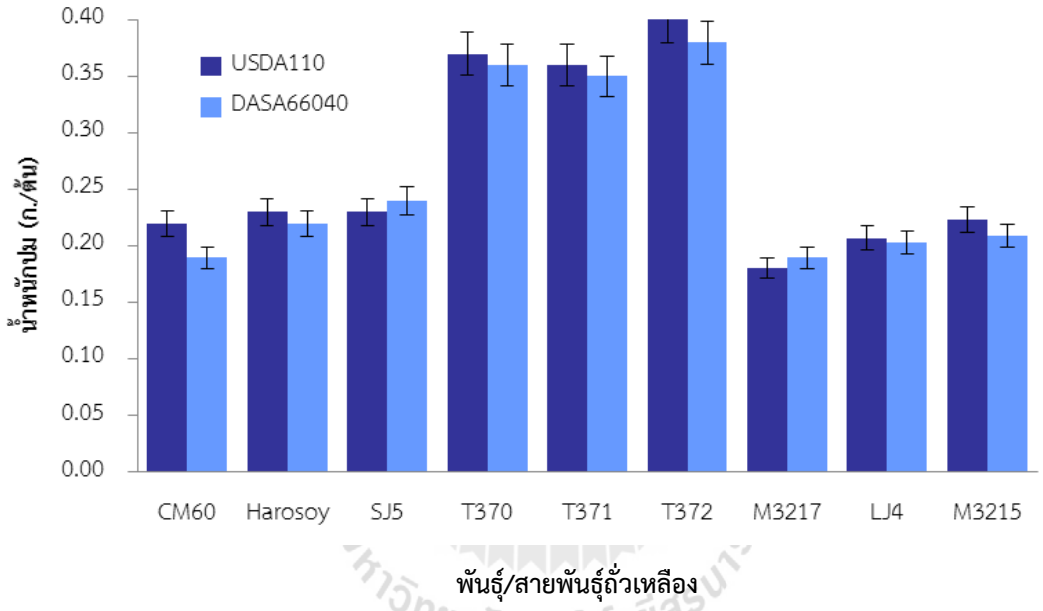


รูปที่ 4.2 จำนวนปมรากถั่วเหลือง 9 พันธุ์/สายพันธุ์ เมื่อใช้ไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ ในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง

น้ำหนักแห้งปมราก จากการเก็บน้ำหนักแห้งปมรากถั่วเหลือง 9 พันธุ์/สายพันธุ์ พบว่าการปลูกที่ไม่มีการใช้เชื้อไรโซเบียมไม่มีการสร้างปมราก สำหรับสภาพที่มีการเชื้อไรโซเบียมและให้ไนโตรเจนระดับสูง พบว่าน้ำหนักแห้งปมรากต่อต้นของพันธุ์จากแหล่งรวบรวมพันธุกรรม (T370, T371, T372) มีน้ำหนักแห้ง

ปมสูงกว่าพันธุ์อื่นๆ เช่นเดียวกับจำนวนปมรากต่อต้น (รูปที่ 4.3) โดยพันธุ์ที่มีน้ำหนักแห้งปมมากที่สุดคือ T372 เมื่อใช้ไรโซเบียม DASA66040 (น้ำหนักปม 0.40 กรัม/ต้น) ในขณะที่ถั่วเหลืองพันธุ์ T370 ที่มีน้ำหนักแห้งปมรากสูงไม่ว่าจะอยู่ร่วมกับไรโซเบียมสายพันธุ์ใดก็ตาม โดยมีน้ำหนักแห้งปม 0.37 และ 0.36 กรัม/ต้น เมื่อใช้เชื้อ USDA110 และ DASA66040 ตามลำดับ (รูปที่ 4.3) สำหรับถั่วเหลืองพันธุ์ไทยที่มีน้ำหนักแห้งปมสูง ได้แก่ สายพันธุ์ LJ4 และ M3215 ถึงแม้จะมีจำนวนปมต่อต้นน้อย แต่มีน้ำหนักแห้งปมมากกว่าพันธุ์อื่น

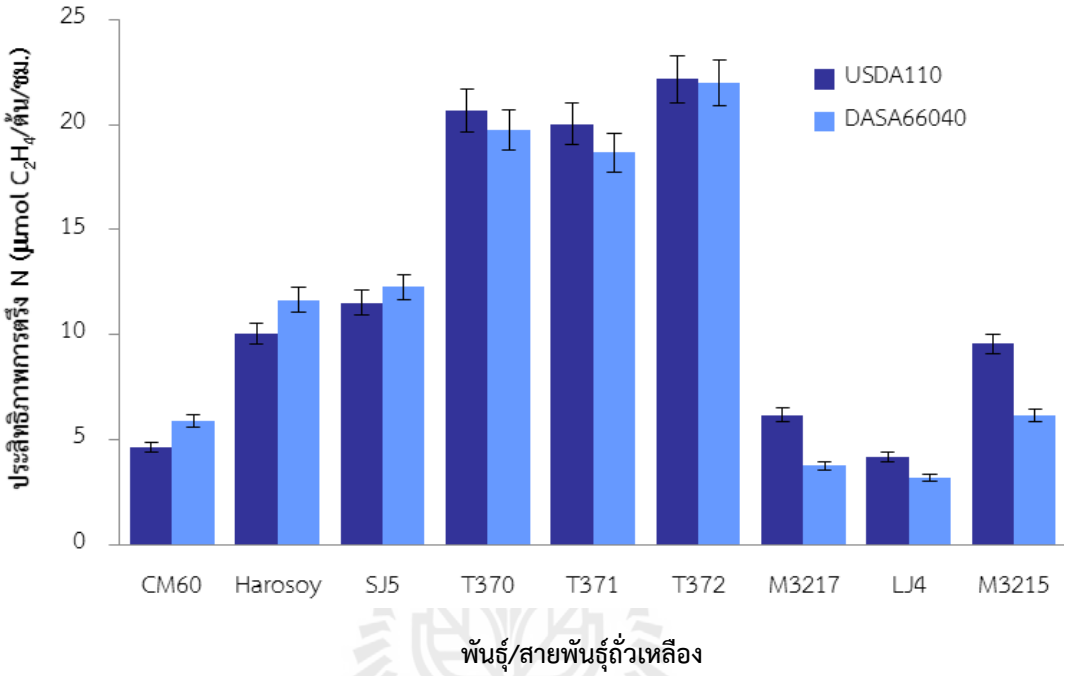
เมื่อเปรียบเทียบการใช้เชื้อไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ พบการใช้ไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA66040 มีแนวโน้มในการอยู่ร่วมกับถั่วเหลืองได้ดีกว่า เนื่องจากมีผลให้ถั่วเหลืองมีน้ำหนักแห้งปมรากสูงกว่าการปลูกถั่วเหลืองที่ใช้เชื้อไรโซเบียม USDA110



รูปที่ 4.3 น้ำหนักแห้งปมถั่วเหลือง 9 พันธุ์/สายพันธุ์ เมื่อใช้ไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ ในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง

ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน การปลูกถั่วเหลืองที่ไม่มีการใช้ไรโซเบียมทั้งในดินที่มีไนโตรเจนสูงและไม่ให้ไนโตรเจน ไม่พบมีการสร้างปมรากจึงไม่สามารถวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้ สำหรับในสภาพที่มีการใช้เชื้อไรโซเบียมและให้ไนโตรเจนในระดับสูง พบว่าประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลือง (วัดโดยวิธี Acetylene Reduction Assay, ARA) พันธุ์/สายพันธุ์ต่างๆ มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนที่วัดได้สูงสุด ได้แก่ พันธุ์ T370, T371 และ T372 มีค่า 18.7–22.0 μmol C_2H_4 /ต้น/ชม. (รูปที่ 4.4) ในขณะที่ถั่วเหลืองพันธุ์ไทยมีการตรึงไนโตรเจนต่ำกว่า โดยสายพันธุ์ M3217 และ LJ4 มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนต่ำที่สุด (3.2–6.2 μmol C_2H_4 /ต้น/ชม.) อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ไทยพบว่าพันธุ์ สจ.5 มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด โดยมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน 12.3 และ 11.5 μmol C_2H_4 /ต้น/ชม. เมื่อใช้ไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA66040 และ USDA110 ตามลำดับ

การใช้เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างกันมีผลต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนไม่แตกต่างกัน โดยเมื่อใช้ไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA66040 มีผลต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนซึ่งสูงกว่าการใช้สายพันธุ์ USDA110 เมื่อใช้กับถั่วเหลืองพันธุ์ ชม. 60, Harosoy 63, T370, T371, T372 อย่างไรก็ตามถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5, M3215, M3217, LJ4 เมื่อใช้ร่วมกับไรโซเบียม USDA110 มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าการใช้สายพันธุ์ DASA66040



รูปที่ 4.4 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ARA ของถั่วเหลือง 9 พันธุ์/สายพันธุ์ เมื่อใช้ไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ และปลูกในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง

น้ำหนักแห้งต้น และน้ำหนักแห้งราก เมื่อวัดน้ำหนักแห้งต้นและรากของถั่วเหลืองพันธุ์/สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อถั่วเหลืองอายุ 32 วัน (ตารางที่ 4.1) ซึ่งพบว่าน้ำหนักแห้งราก และน้ำหนักแห้งต้นของถั่วเหลืองพันธุ์ต่างๆ มีความแตกต่างกันเล็กน้อย นั่นเป็นเพราะว่าแต่ละพันธุ์มีพันธุกรรมต่างกัน จึงมีการเจริญเติบโตต่างกัน จึงทำให้มีน้ำหนักแห้งต้นและรากแตกต่างกัน

หากพิจารณาถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ที่มีการใช้เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่างกัน (DASA66040 หรือ USDA110) พบว่าน้ำหนักแห้งรากของแต่ละพันธุ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตาม พันธุ์ ชม. 60 และ สจ. 5 มีแนวโน้มที่มีความแตกต่างกันมากเมื่อใช้ไรโซเบียมต่างสายพันธุ์กัน สำหรับลักษณะน้ำหนักแห้งต้นของแต่ละพันธุ์ก็ไม่มีความแตกต่างมากระหว่างไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ ดังนั้นการใช้ไรโซเบียมต่างสายพันธุ์กันไม่มีผลทำให้น้ำหนักแห้งราก และต้นแตกต่างกัน ดังนั้นไรโซเบียม 2 สายพันธุ์นี้มีผลต่อน้ำหนักแห้งต้นและรากของถั่วเหลืองพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบนี้ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งราก และน้ำหนักแห้งต้นของถั่วเหลือง เมื่อปลูกในดินที่มีไนโตรเจนสูง

พันธุ์/สายพันธุ์	น้ำหนักแห้งราก			น้ำหนักแห้งต้น		
	DASA66040	USDA110	STDEV	DASA66040	USDA110	STDEV
ชม.60	0.295	0.219	0.054	0.411	0.494	0.059
Harosoy 63	0.277	0.248	0.021	0.579	0.671	0.065
สจ.5	0.280	0.201	0.056	0.594	0.580	0.010
T370	0.252	0.225	0.019	0.625	0.586	0.028
T371	0.287	0.268	0.013	0.474	0.385	0.063
T372	0.266	0.278	0.008	0.443	0.486	0.030
M3217	0.259	0.236	0.016	0.374	0.321	0.037
LJ 4	0.216	0.240	0.017	0.507	0.492	0.011
M3215	0.334	0.365	0.022	0.428	0.443	0.011

เมื่อวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน จำนวนปมราก น้ำหนักแห้งปมราก น้ำแห้งต้น ในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนสูง พบว่าประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน (โดยวิธี ARA) มีสหสัมพันธ์สูงกับลักษณะอื่นๆ (ตารางที่ 4.2) โดยมีค่าสหสัมพันธ์ (r) สูงกับน้ำหนักแห้งปมราก (r = 0.640**) จำนวนปมราก (r = 0.769**) และน้ำหนักแห้งต้น (r = 0.589**) ซึ่งประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนมีสหสัมพันธ์กับจำนวนปมราก และน้ำหนักแห้งปมราก ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Herridge et al. (1990) ที่พบว่าประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนมีสหสัมพันธ์สูงกับการสร้างปมราก นั่นคือเมื่อมีการตรึงไนโตรเจนสูงขึ้นจะทำให้มีจำนวนปมรากสูงด้วย และเมื่อวิเคราะห์สหสัมพันธ์จำนวนปมรากและน้ำหนักแห้งปมพบว่ามีค่าสหสัมพันธ์สูงเช่นกัน (r = 0.682**) ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับงานทดลองของ Stajkovic et al. (2011) ที่พบว่าทั้งสองลักษณะมีสหสัมพันธ์ต่อกันสูง

ตารางที่ 4.2 ค่าสหสัมพันธ์ลักษณะจำนวนปม น้ำหนักแห้งปม และอัตราการตรึงไนโตรเจน ของถั่วเหลือง 9 พันธุ์/สายพันธุ์ เมื่อปลูกในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนสูง

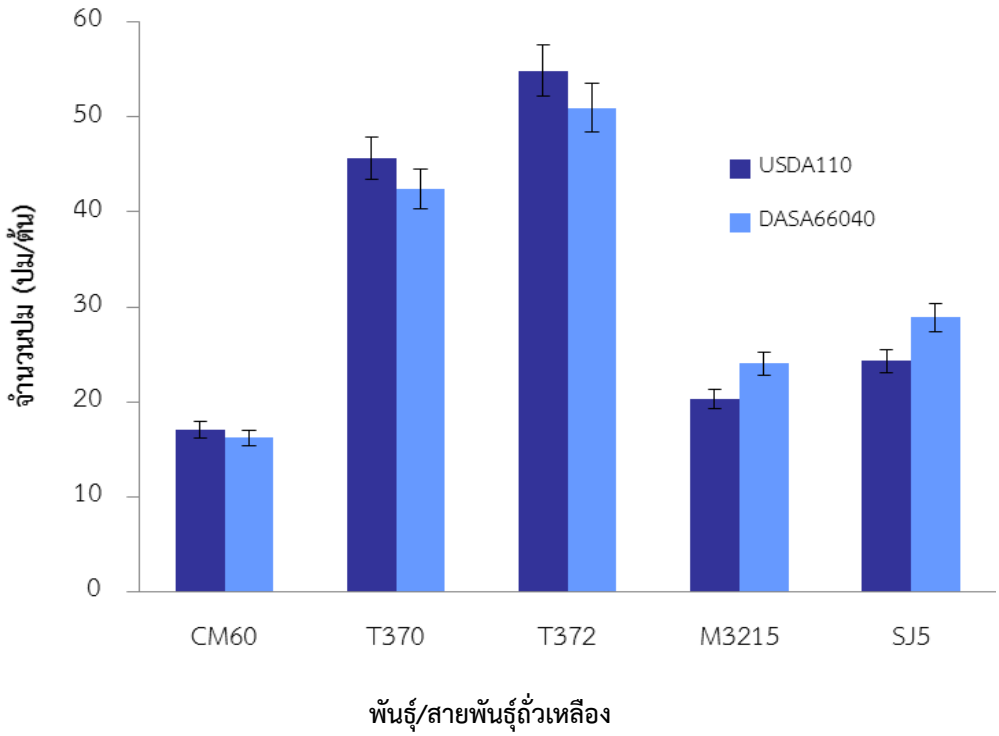
ลักษณะ	น้ำหนักแห้งปมราก	จำนวนปมราก	น้ำหนักแห้งราก	น้ำหนักแห้งต้น
อัตราการตรึงไนโตรเจน	0.640**	0.769**	0.301	0.589**
น้ำหนักแห้งปมราก		0.682**	0.291	0.210
จำนวนปมราก			0.377*	0.335*
น้ำหนักแห้งราก				0.247

*, ** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 ตามลำดับ

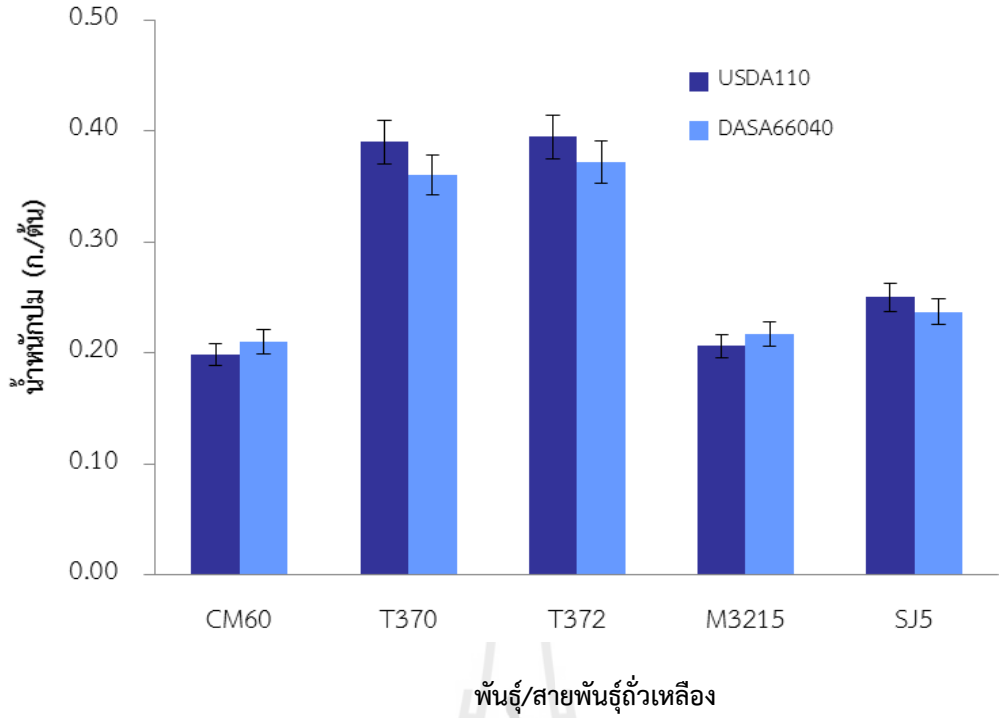
การทดสอบสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (ครั้งที่ 2)

ผลการปลูกทดสอบถั่วเหลืองในห้องปฏิบัติการซ้ำอีกครั้ง เพื่อยืนยันศักยภาพของพันธุ์ถั่วเหลืองและสายพันธุ์ไรโซเบียม พบว่าได้ผลการทดสอบคล้ายกับการทดสอบครั้งที่ 1 คือถั่วเหลืองต่างพันธุ์กันเมื่อนำมาปลูกในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนต่างกัน โดยพันธุ์ T370 และ T372 ซึ่งเป็นพันธุ์จากแหล่งรวบรวมพันธุกรรม มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน มีจำนวนปมต่อต้น และน้ำหนักแห้งปม สูงกว่าพันธุ์ไทย (พันธุ์ ชม. 60, สจ.5, LJ4) ดังแสดงในรูปที่ 4.5 และรูปที่ 4.6 อย่างไรก็ตามหากเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ไทยด้วยกันแล้ว พบว่าพันธุ์ สจ.5 มีจำนวนปมรากและน้ำหนักแห้งปมรากต่อต้นสูงกว่าพันธุ์อื่นๆ

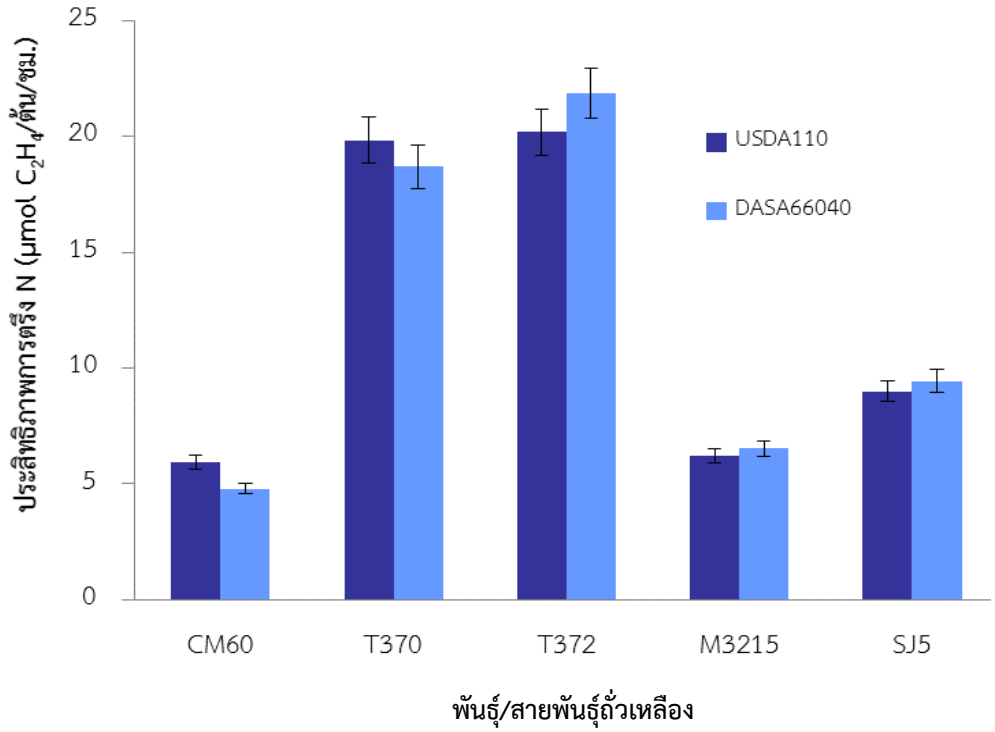
สำหรับประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลืองพันธุ์ต่างๆ ได้ผลเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 แต่ในการทดลองครั้งที่ 2 นี้ได้ค่าสูงกว่าเล็กน้อย (รูปที่ 4.7) เมื่อพิจารณาความเข้ากันได้ของเชื้อไรโซเบียม พบว่าถั่วเหลืองทุกพันธุ์มีการตอบสนองหรือมีการอยู่ร่วมกันกับไรโซเบียมสายพันธุ์ USDA110, DASA66040 ไม่แตกต่างกันมากนัก อย่างไรก็ตาม DASA66040 มีแนวโน้มให้ผลดีกว่าเนื่องจากพบว่าเกือบทุกลักษณะของถั่วเหลืองมีค่าสูงกว่า (แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ)



รูปที่ 4.5 จำนวนปมรากต่อต้นของถั่วเหลือง 5 พันธุ์ เมื่อใช้ไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ และปลูกในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง



รูปที่ 4.6 น้ำหนักปมรากแห้งต่อต้นของถั่วเหลือง 5 พันธุ์ เมื่อใช้ไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ และปลูกในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง



รูปที่ 4.7 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลือง 5 พันธุ์ เมื่อใช้ไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ และปลูกในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง

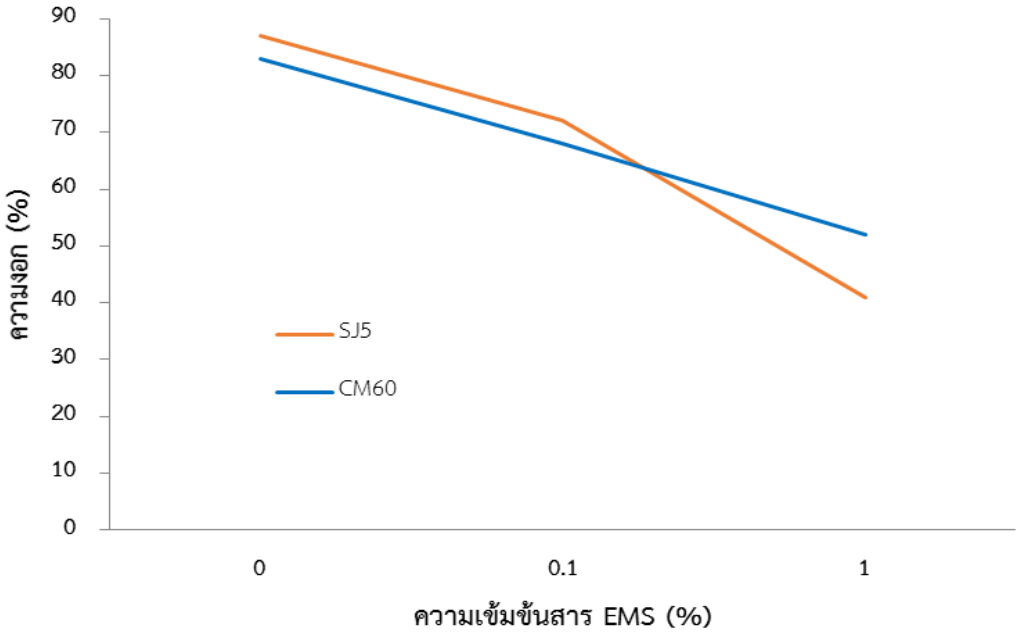
4.2 การขยายพันธุ์และทดสอบการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองจากต่างประเทศในสภาพแปลง

เมื่อได้เมล็ดถั่วเหลืองจากแหล่งรวบรวมพันธุกรรมแล้วนำเมล็ดที่ได้ไปปลูกขยายพันธุ์ และปลูกเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองพันธุ์ไทย พร้อมเก็บข้อมูลลักษณะต่างๆ ซึ่งผลการปลูกทดสอบพบว่าถั่วเหลืองจากแหล่งรวบรวมพันธุกรรมจากต่างประเทศทั้ง 4 พันธุ์ (Harosoy 63, T370, T371, T372) เมื่อปลูกในสภาพแวดล้อมของประเทศไทยมีอายุออกดอกเร็ว โดยมีอายุออกดอกหลังจากปลูก 25–27 วัน ซึ่งเร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ไทยที่มีอายุออกดอก 30–35 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าพันธุ์จากต่างประเทศมีลำต้นเตี้ยและเล็ก ส่งผลให้มีจำนวนฝักต่อต้น เมล็ดต่อต้น และน้ำหนักเมล็ดต่อต้นต่ำกว่าพันธุ์ของไทย อย่างไรก็ตามหากเปรียบเทียบจำนวนปมในการทดลองที่ 1 แล้ว พบว่าพันธุ์จากต่างประเทศมีจำนวนปมรากต่อต้นสูงกว่าพันธุ์ไทย ดังนั้นหากจะนำถั่วเหลืองจากต่างประเทศมาใช้ปลูกในสภาพแวดล้อมของไทยโดยตรงทำได้ยาก จำเป็นต้องมีการปรับปรุงลักษณะต่างๆ ให้เหมาะสม โดยอาจมีการผสมข้ามกับพันธุ์ไทยเพื่อให้มีลักษณะทางพันธุกรรมที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี และมีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยได้ดี

4.3 การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงโดยวิธีการกลายพันธุ์

4.3.1 เปอร์เซ็นต์ความงอกและการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองหลังจากทำให้เกิดการกลายพันธุ์

เมื่อนำเมล็ดถั่วเหลือง 2 พันธุ์ (ชม. 60 และ สจ. 5) ซึ่งเป็นพันธุ์ไทยที่มีการเจริญเติบโตดี และให้ผลผลิตค่อนข้างสูง มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีการแช่ด้วยสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0.10 และ 1.0% มีผลต่อความงอกของเมล็ด เมื่อทดสอบเมล็ดพันธุ์ที่ไม่ผ่านการแช่ด้วยสารละลาย EMS พบว่าพันธุ์ ชม. 60 และ สจ. 5 มีความงอกที่ 84 และ 87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.7) แต่เมื่อนำเมล็ดไปแช่ EMS ที่ความเข้มข้น 0.1% มีความงอกเหลือเพียง 70 และ 72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อใช้สารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 1.0% มีผลให้ความงอกของเมล็ดลดลงมากกว่าที่ระดับ 0.1% โดยพันธุ์ สจ. 5 มีความงอกเหลือเพียง 40 เปอร์เซ็นต์ และ ชม. 60 มีความงอก 60 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสารเคมี EMS นอกจากเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชแล้ว ยังมีผลต่อความงอกของเมล็ดพันธุ์ โดยเมื่อให้สารละลายที่ความเข้มข้นสูงมีผลให้ความงอกลดลง เมื่อวิเคราะห์การตอบสนองต่อความเข้มข้นของ EMS พบว่าพันธุ์ สจ.5 มีการตอบสนองมากกว่าเพราะเมื่อความเข้มข้นสูงทำให้ความงอกลดลงมากกว่าพันธุ์ ชม. 60 เช่นเดียวกับการทดลองของ Karthika and Lakshmi (2006) ที่พบว่าพันธุ์ถั่วเหลืองต่างกันถ้าใช้ EMS ความเข้มข้นต่ำมีการตอบสนองไม่ต่างกัน (มีเปอร์เซ็นต์ความงอกไม่แตกต่างกัน) แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นของ EMS สูงขึ้น พันธุ์ที่ต่างกันมีการตอบสนองไม่เหมือนกัน โดยบางพันธุ์จะมีความงอก และอัตราการอยู่รอดลดต่ำมาก



รูปที่ 4.8 ความงอกของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 และ ชม. 60 เมื่อใช้สารเคมี EMS ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0%

เมื่อนำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 และ ชม. 60 ที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี EMS เมื่อนำมาปลูกทดสอบในสภาพแปลงเพื่อทดสอบและขยายพันธุ์ถั่วเหลือง 2 พันธุ์ (สจ.5 และ ชม.60) ที่ผ่านการแช่สาร EMS ที่ความเข้มข้น 2 ระดับ (0.1 และ 1%) โดยเมล็ดในชั่ว M_1 ของพันธุ์ ชม.60 ที่ความเข้มข้น EMS 0.1 และ 1% จำนวน 219 และ 182 เมล็ดตามลำดับ มีเมล็ดที่งอกและสามารถเจริญเติบโตได้ 138 และ 77 ต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) สำหรับพันธุ์ สจ.5 ที่ความเข้มข้น EMS 0.1 และ 1.0% มีจำนวน 228 และ 264 เมล็ด ตามลำดับ มีเมล็ดที่งอกและสามารถเจริญเติบโตได้ 142 และ 119 ต้น ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 นอกจากนี้ยังพบว่าต้นที่งอกมีลักษณะต่างๆ และการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างจากต้นพ่อ-แม่พันธุ์ แต่มีบางส่วนที่แตกต่างจากพ่อ-แม่ เช่น มีต้นเตี้ยหรือสูงกว่า มีขนมากขึ้น บางต้นมีใบหงิกงอ ข้อสั้น ใบมีสีเขียวเข้ม เป็นต้น ซึ่งในการทดลองอื่นพบเช่นกันว่าการกลายพันธุ์ทำให้มีลักษณะต่างๆ ที่ผิดปกติในถั่วเหลือง (Khan and Tyagi, 2013) สำหรับการปลูกในชั่ว M_1 นี้เป็นการปลูกเพื่อขยายพันธุ์ และยังไม่มีการคัดเลือก การคัดเลือกจะเริ่มทำในชั่ว M_2 ซึ่งเป็นชั่วอายุที่มีการกระจายตัวสูง

4.3.2 ผลการประเมินและคัดเลือกถั่วเหลืองหลังจากทำให้เกิดการกลายพันธุ์

การประเมินและคัดเลือกถั่วเหลืองกลายพันธุ์ในชั่ว M_2 การประเมินและทดสอบถั่วเหลืองได้ทำในโรงเรือน ซึ่งจำนวนสายพันธุ์ที่ประเมินในชั่วนี้มีจำนวน 2,638 เมล็ด ซึ่งเป็น CM60 ที่ EMS 0.1 และ 1% จำนวน 690 และ 388 เมล็ด SJ5 ที่ EMS 0.1 และ 1% จำนวน 750 และ 616 เมล็ด ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) เมื่อปลูกทดสอบเพื่อประเมินได้ใช้เชื้อไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ (USDA 110, DASA66040) โดยได้ใช้ความเข้มข้นของไนโตรเจน 2 ระดับ ซึ่งให้ระดับต่ำเป็น control และไนโตรเจนระดับสูงในการคัดเลือก ผลการ

ทดลองแสดงในตารางที่ 4.4 โดยพบว่าถั่วเหลืองทุกประชากรในชั่ว M_2 มีการกระจายตัวของลักษณะต่างๆ สูง เนื่องจากมีความแตกต่างของลักษณะมาก หากพิจารณาการให้ไนโตรเจนระดับต่างกันในถั่วเหลืองประชากรเดียวกัน เมื่อให้ไนโตรเจนในระดับต่ำร่วมกับการใช้เชื้อไรโซเบียมมีผลทำให้ลักษณะต่างๆ ของถั่วเหลืองสูงกว่าเมื่อใช้เชื้อไรเบียมในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนระดับสูง เช่น มีค่าเฉลี่ยความสูง น้ำหนักฝักต่อต้น เมล็ดต่อต้น ราก และต้น เมื่อปลูกถั่วเหลืองในสภาพที่มีไนโตรเจนต่ำจะมีค่ามากกว่าเมื่อปลูกในดินที่มีไนโตรเจนสูง (ตารางที่ 4.4)

เนื่องจากการประเมินประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ARA และการคัดเลือกโดยนับจำนวนปมต่อต้น และน้ำหนักปม ไม่สามารถทำได้ในสภาพแปลง เนื่องจากต้องทำลายต้นพืช และหากทำลายต้นพืชแล้วจะไม่สามารถใช้ในการคัดเลือกได้ การทดลองจึงได้คัดเลือกจากลักษณะที่เกี่ยวข้อง เช่น น้ำหนักแห้งต้น น้ำหนักแห้งราก (ในการทดลองที่ 1 พบว่าประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน และจำนวนปมราก มีสหสัมพันธ์ในทางบวกกับน้ำหนักแห้งต้นและราก) จากการประเมินลักษณะต่างๆ เป็นรายต้น ซึ่งทำให้สามารถคัดเลือกต้นที่ตรงตามต้องการจากในชั่ว M_2 ได้จำนวน 388 ต้น โดยมาจากประชากรของ CM60-0.1%, CM60-1%, SJ5-0.1% และ SJ5-1% จำนวน 105, 60, 108 และ 115 ต้น ตามลำดับ ซึ่งต้นที่ผ่านการคัดเลือกในชั่วนี้ (M_2) นำไปปลูกเพื่อคัดเลือกในชั่ว M_3 ต่อไป

ตารางที่ 4.3 จำนวนต้นถั่วเหลืองที่ผ่านการคัดเลือกในชั่วที่ 2 (M_2)

สายพันธุ์	ชั่วอายุ	เมล็ดที่ปลูก	ต้นที่คัดเลือก	สายพันธุ์	ชั่วอายุ	เมล็ดที่ปลูก	ต้นที่คัดเลือก
CM60 0.1%	M_1	219	138	**SJ5 0.1%**	M_1	228	142
	M_2	690	105[1]		M_2	750	108
CM60 1%	M_1	182	77	**SJ5 1%**	M_1	264	119
	M_2	388	60		M_2	616	115

[1] จำนวนต้นที่ผ่านการคัดเลือกได้จากต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนสูงเท่านั้น

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ เมื่อปลูกทดสอบต้นกลายพันธุ์ในชั่ว M_2

พันธุ์ถั่วเหลือง/ระดับ EMS	ทรีตเมนต์*	ความสูง (ซม.)	น้ำหนักแห้ง (ก./ต้น)			
			เมล็ด	ฝัก	ราก	ต้น
SJ5 0.1%	DASA66040+LN	67.9±5.3	9.14±2.1	3.26±1.5	3.02±1.2	5.08±1.2
	DASA66040+HN	61.0±12.9	9.68±2.6	3.09±1.8	2.33±1.4	5.01±1.8
	USDA110+LN	71.5±6.9	7.65±1.9	3.57±1.3	2.28±0.9	5.54±1.3
	USDA110+HN	48.8±14.1	5.44±2.3	3.33±1.6	2.11±1.3	4.48±1.7
SJ5 1.0%	DASA66040+LN	57.0±7.7	8.34±2.2	3.13±1.4	2.84±1.0	5.14±1.2
	DASA66040+HN	51.0±15.2	5.88±3.4	2.62±1.9	2.55±1.5	4.76±1.6
	USDA110+LN	56.0±6.5	8.01±2.4	3.78±1.4	2.42±0.9	4.20±1.1
	USDA110+HN	42.0±14.8	5.96±3.0	3.45±2.0	2.06±1.3	4.11±1.7
CM60 0.1%	DASA66040+LN	61.1±7.3	7.27±2.1	3.46±1.3	2.08±0.9	4.53±1.3
	DASA66040+HN	60.0±13.2	5.18±2.8	3.30±1.7	2.05±1.2	6.22±2.0
	USDA110+LN	49.7±6.8	4.62±2.5	2.57±1.2	2.43±1.1	4.29±1.3
	USDA110+HN	61.6±12.7	4.29±3.5	2.44±1.5	2.54±1.4	5.17±1.8
CM60 1.0%	DASA66040+LN	80.5±7.9	7.84±2.3	3.29±1.3	3.38±1.2	7.49±1.4
	DASA66040+HN	58.6±12.5	7.28±3.2	3.14±1.6	3.63±1.5	6.87±2.0
	USDA110+LN	66.7±8.3	6.43±1.8	3.79±1.2	2.46±0.9	7.79±1.4
	USDA110+HN	64.1±16.4	5.19±2.7	4.06±2.1	2.42±1.3	8.28±2.1

*เชื้อไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ และให้ไนโตรเจน 2 ระดับ คือ LN = ระดับต่ำ (control) และ HN = ระดับสูง (5 mM KNO_3)

การประเมินและคัดเลือกถั่วเหลืองกลายพันธุ์ในชั่ว M_3 การประเมินและทดสอบถั่วเหลืองในชั่วนี้ได้ทำในโรงเรือนเช่นเดียวกับ M_2 โดยปลูกทดสอบเพื่อประเมินเป็นรายต้น ซึ่งจากในชั่วที่ผ่านมาได้คัดเลือกนำมาปลูกในชั่ว M_3 ทั้งหมด 428 ต้น (CM60-0.1%, CM60-1%, SJ5-0.1% และ SJ5-1% จำนวน 105, 60, 108 และ 115 ต้น ตามลำดับ) (ตารางที่ 4.5) สำหรับประชากรของ CM60-1% งอกน้อย นอกจากนี้ต้นที่งอกมีลักษณะลำต้นเตี้ย มีน้ำหนักแห้งต้น และรากต่ำมาก จึงไม่ผ่านการคัดเลือก สำหรับการทดสอบในชั่วนี้ใช้เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA66040 เพียงอย่างเดียว เพราะจากการทดลองที่ผ่านมาได้ผลไม่แตกต่างกันมาก

ประกอบกับ DASA66040 มีแนวโน้มให้ผลดีกว่าเล็กน้อยจึงได้เลือกใช้ในการทดลองนี้ สำหรับการเจริญเติบโตและลักษณะต่างๆ ของถั่วเหลืองในชั่วนี้ พบว่ามีการกระจายตัวสูง เช่น การเจริญเติบโต และลักษณะต่างๆ จึงคัดเลือกไว้เป็นรายต้นจำนวนมาก ซึ่งค่าเฉลี่ยลักษณะต่างๆ ของแต่ละประชากรนี้แสดงไว้ในตารางที่ 4.6 ซึ่งได้ผลคล้ายกับประชากรในชั่วที่ 2 (M_2) คือค่าเฉลี่ยของต้นที่ปลูกเพื่อเปรียบเทียบในดินที่มีไนโตรเจนต่ำ + ไรโซเบียม พบมีการเจริญเติบโตดีกว่าในดินที่มีไนโตรเจนสูง + ไรโซเบียม เมื่อประเมินแล้วทำการคัดเลือกต้นที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี และลักษณะต่างๆ สูง ในดินที่มีไนโตรเจนสูง ทำให้สามารถคัดเลือกได้จำนวน 155 สายพันธุ์ โดยได้จาก CM60-0.1%, SJ5-0.1% และ SJ5-1% จำนวน 50, 52 และ 53 ต้น ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 จำนวนต้นถั่วเหลืองที่ผ่านการคัดเลือกในชั่วที่ 3–7 (M_3 – M_7)

สายพันธุ์	ชั่วอายุ	ต้นที่ปลูก	ต้นที่คัดเลือก
SJ5 0.1%	M_3	108 ต้น	52 ต้น
	M_4	52 แถว	21 ต้น
	M_5	21 แถว	15 แถว
ขยายพันธุ์และคัดเลือก	M_6	15 สายพันธุ์	3 สายพันธุ์
ปลูกทดสอบ	M_7	3 สายพันธุ์	3 สายพันธุ์
SJ5 1%	M_3	115 ต้น	53 ต้น
	M_4	53 แถว	16 ต้น
	M_5	16 แถว	8 แถว
ขยายพันธุ์และคัดเลือก	M_6	8 สายพันธุ์	3 สายพันธุ์
ปลูกทดสอบ	M_7	3 สายพันธุ์	3 สายพันธุ์
CM60 0.1%	M_3	105 ต้น	50 ต้น
	M_4	50 แถว	23 ต้น
	M_5	23 แถว	12 แถว
ขยายพันธุ์และคัดเลือก	M_6	12 สายพันธุ์	2 สายพันธุ์
ปลูกทดสอบ	M_7	2 สายพันธุ์	2 สายพันธุ์

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ เมื่อปลูกทดสอบต้นกลายพันธุ์ในชั่ว M_3

พันธุ์ถั่วเหลือง/ ระดับ EMS	ทรีตเมนต์*	ความสูง (ซม.)	น้ำหนักแห้ง (ก./ต้น)			
			เมล็ด	ฝัก	ราก	ต้น
SJ5 0.1%	DASA66040+LN	78.7±5.24	6.36±1.7	6.00±1.2	2.97±0.7	6.54±0.7
	DASA66040+HN	69.6±8.55	5.69±2.5	5.25±1.6	2.80±1.1	6.02±1.0
SJ5 1%	DASA66040+LN	84.2±6.11	7.79±1.8	6.82±1.2	3.13±0.8	7.45±0.8
	DASA66040+HN	98.3±9.25	6.89±2.6	6.31±1.8	3.03±1.2	8.19±1.3
CM60 0.1%	DASA66040+LN	84.6±5.29	8.54±1.8	7.27±1.3	3.29±0.7	9.57±0.8
	DASA66040+HN	89.3±7.84	7.70±2.9	6.59±1.9	2.81±1.0	8.80±1.2

*ให้ไนโตรเจน 2 ระดับ คือ LN = ระดับต่ำ (control) และ HN = ระดับสูง (5 mM KNO_3)

การประเมินและคัดเลือกถั่วเหลืองกลายพันธุ์ในชั่ว M_4 การประเมินและทดสอบถั่วเหลืองในชั่วนี้ โดยนำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากชั่ว M_3 จำนวน 155 สายพันธุ์ (CM60-0.1%, SJ5-0.1% และ SJ5-1% จำนวน 50, 52 และ 53 ต้น ตามลำดับ) มาปลูกเป็นรายแถวในดินที่มีไนโตรเจนต่ำ และสูง โดยมีค่าเฉลี่ยของลักษณะต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 ซึ่งพบว่าค่าเฉลี่ยของลักษณะต่างๆ มีความแปรปรวนน้อยลง หรือมีการกระจายตัวน้อยกว่าในประชากรในชั่วก่อน อย่างไรก็ตามพบว่าค่าเฉลี่ยของลักษณะต่างๆ ต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนต่ำ+ไรโซเบียม มีการเจริญเติบโตดีกว่าค่าเฉลี่ยของต้นที่คลุกเมล็ดด้วยไรโซเบียมแล้วปลูกในดินที่มีไนโตรเจนสูง

สำหรับในขั้นตอนการคัดเลือก โดยการเก็บข้อมูลลักษณะต่างๆ เพื่อประเมินต้นที่มีลักษณะต่างๆ เท่ากับหรือดีกว่า control แล้วคัดเลือกไว้จำนวน 60 สายพันธุ์ ซึ่งได้จาก CM60-0.1%, SJ5-0.1% และ SJ5-1% จำนวน 23, 21 และ 16 ต้น ตามลำดับ ซึ่งสายพันธุ์เหล่านี้นำไปปลูกและคัดเลือกในชั่ว M_5 ต่อไป

ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ เมื่อปลูกทดสอบต้นกลายพันธุ์ในชั่ว M_4

พันธุ์ถั่วเหลือง/ ระดับ EMS	ทรีตเมนต์*	ความสูง (ซม.)	น้ำหนักแห้ง (ก./ต้น)			
			เมล็ด	ฝัก	ราก	ต้น
SJ5 0.1%	DASA66040+LN	58.1±3.85	6.80±1.5	4.80±1.0	3.02±0.6	6.58±0.6
	DASA66040+HN	58.9±6.45	6.45±2.1	4.30±1.3	2.87±0.9	6.30±0.8
SJ5 1%	DASA66040+LN	58.3±3.76	5.82±1.3	3.27±0.9	2.81±0.7	5.14±0.6
	DASA66040+HN	60.7±5.32	4.05±2.3	3.15±1.2	2.70±1.0	5.38±0.7
CM60 0.1%	DASA66040+LN	53.7±4.07	7.78±1.6	5.00±1.1	2.72±0.5	7.24±0.6
	DASA66040+HN	54.7±5.44	6.79±2.3	4.32±1.4	2.67±0.8	7.33±0.8

*ให้ไนโตรเจน 2 ระดับ คือ LN = ระดับต่ำ (control) และ HN = ระดับสูง (5 mM KNO_3)

การประเมินและคัดเลือกถั่วเหลืองกลายพันธุ์ในชั่ว M_5 การประเมินและทดสอบถั่วเหลืองในชั่วนี้ โดยนำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จาก M_4 จำนวน 60 สายพันธุ์ มาปลูกเป็นรายแถวในดินที่มีไนโตรเจนต่ำและสูง มีค่าเฉลี่ยของลักษณะต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 ซึ่งพบว่าค่าเฉลี่ยของลักษณะต่างๆ มีการกระจายตัวน้อยกว่าในประชากรในชั่วก่อน และค่าเฉลี่ยของลักษณะต่างๆ ของแถวที่คลุกเมล็ดด้วยไรโซเบียมแล้วปลูกในดินที่มีไนโตรเจนสูง พบว่ามีการเจริญเติบโตใกล้เคียงค่าเฉลี่ยของแถวที่คลุกเมล็ดด้วยไรโซเบียม+ดินมีไนโตรเจนต่ำ (control) แสดงให้ถึงมีความก้าวหน้าในการคัดเลือก เนื่องจากสายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกมีการเจริญเติบโตที่ดี

สำหรับการคัดเลือกในชั่วนี้ทำเป็นรายแถว หากพบว่าแถวใดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับหรือดีกว่า control จะถูกคัดเลือกไว้ ซึ่งในชั่วอายุนี้สามารถคัดเลือกได้ 35 สายพันธุ์ ที่มาจาก CM60-0.1%, SJ5-0.1% และ SJ5-1% จำนวน 12, 15 และ 8 แถว/สายพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งสายพันธุ์เหล่านี้นำไปปลูกขยายพันธุ์และคัดเลือกในชั่ว M_6

ตารางที่ 4.8 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ เมื่อปลูกทดสอบต้นกลายพันธุ์ในชั่ว M_5

พันธุ์ถั่วเหลือง/ ระดับ EMS	ทรีตเมนต์*	ความสูง (ซม.)	น้ำหนักแห้ง (ก./ต้น)			
			เมล็ด	ฝัก	ราก	ต้น
SJ5 0.1%	DASA66040+LN	80.2±3.67	7.22±1.2	3.17±0.8	3.19±0.6	7.39±0.6
	DASA66040+HN	93.5±4.81	7.81±1.9	3.08±0.9	3.28±0.8	7.86±0.7
SJ5 1%	DASA66040+LN	92.5±3.28	7.13±1.3	3.85±0.8	2.70±0.7	6.23±0.5
	DASA66040+HN	98.9±3.75	7.76±1.8	4.00±1.0	3.20±0.8	8.62±0.8
CM60 0.1%	DASA66040+LN	69.9±3.96	9.13±1.1	5.84±0.7	2.67±0.7	8.72±0.6
	DASA66040+HN	75.6±4.38	9.56±2.0	6.00±1.0	3.26±0.9	8.66±0.8

*ให้ไนโตรเจน 2 ระดับ คือ LN = ระดับต่ำ (control) และ HN = ระดับสูง (5 mM KNO_3)

การประเมินและคัดเลือกถั่วเหลืองกลายพันธุ์ในชั่ว M_6 การประเมินและทดสอบถั่วเหลืองในชั่วนี้ทำเช่นเดียวกับการคัดเลือกใน M_5 พบว่าสายพันธุ์ที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนสูง+ไรโซเบียม ส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตและมีลักษณะต่างๆ ใกล้เคียงค่าเฉลี่ยของต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนต่ำ+ไรโซเบียม (control) และบางแถวมีลักษณะดีกว่า จึงได้คัดเลือกแถวที่มีลักษณะที่ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับ control ไว้จำนวน 8 สายพันธุ์ ซึ่งได้จาก CM60-0.1%, SJ5-0.1% และ SJ5-1% จำนวน 2, 3 และ 3 สายพันธุ์ ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยของลักษณะต่างๆ ของแต่ละสายพันธุ์แสดงในตารางที่ 4.9 ซึ่งสายพันธุ์ทั้งหมดมีจำนวนปมต่อต้นมากกว่า control และ SJ5-0.1-2 มีจำนวนปมรากต่อต้นสูงที่สุด (71 ปม/ต้น) ในขณะที่ CM60-0.1-1 มีน้ำหนักแห้งของลักษณะองค์ประกอบผลผลิตสูงกว่าสายพันธุ์อื่น จากการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงเหล่านี้นำเมล็ดไปปลูกทดสอบในแผนการทดลองในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.9 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ ของแถวที่ผ่านการคัดเลือกในชั่ว M_6

พันธุ์ถั่วเหลือง/ ระดับ EMS	ทรีตเมนต์[1]	จำนวน ปมราก[2]	ความสูง (ซม.)	น้ำหนักแห้ง (ก./ต้น)			
				เมล็ด	ฝัก	ราก	ต้น
SJ5 0.1%	Control	68	48.2	3.73	2.11	1.40	4.45
	SJ5-0.1-1	66	45.6	3.68	2.27	1.88	4.88
	SJ5-0.1-2	71	47.2	3.56	2.21	1.54	5.41
	SJ5-0.1-2	67	46.9	3.80	2.32	1.77	5.12
SJ5 1%	Control	64	58.4	5.09	2.26	2.00	4.91
	SJ5-1-1	66	52.9	5.74	2.38	2.29	4.70
	SJ5-1-2	65	57.4	5.35	2.18	2.10	4.92
	SJ5-1-3	69	58.5	5.44	2.40	2.06	5.02
CM60 0.1%	Control	61	52.7	5.04	2.42	2.32	5.06
	CM60-0.1-1	66	55.1	6.53	2.60	2.38	5.34
	CM60-0.1-2	64	50.3	5.41	2.38	2.16	4.94

[1] ให้ไนโตรเจน 2 ระดับ คือระดับต่ำ (control) และระดับสูง (5 mM KNO_3)

[2] ค่าเฉลี่ยของสายพันธุ์ต่างๆ มาจากการสุ่มวัดต้นภายในแถวจำนวน 5 ต้น/แถว

4.4 การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงโดยวิธีการผสมข้ามพันธุ์

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองโดยการผสมข้ามระหว่างถั่วเหลืองจากแหล่งรวบรวมพันธุกรรม (T370 และ T372) และพันธุ์ สจ.5 ซึ่งเป็นถั่วเหลืองพันธุ์ไทย โดยพันธุ์จากต่างประเทศเป็นพันธุ์ที่มีจำนวนปมต่อต้นสูง แต่เมื่อปลูกในสภาพแวดล้อมของไทยที่มีช่วงวันสั้นถึงแม้จะมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าพันธุ์ไทย แต่ออกดอกเร็ว ลำต้นเตี้ย และผลผลิตต่ำ ในขณะที่พันธุ์ สจ.5 เจริญเติบโตได้ดี แต่หากมีการปลูกในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนสูงร่วมกับการคลุกเมล็ดด้วยไรโซเบียม มักให้ผลผลิตได้ไม่สูงเท่าที่ควร ผู้วิจัยจึงได้นำถั่วเหลือง 3 พันธุ์มาผสมข้ามกันได้ 2 คู่ผสม ได้แก่ SJ5xT370 และ SJ5xT372 ได้เมล็ดในชั่ว F_1 จำนวน 37 และ 41 เมล็ด ตามลำดับ เมื่อนำมาปลูกมีบางเมล็ดไม่งอก จึงเหลือเพียง 26 และ 38 ต้น และสามารถผลิตเมล็ดได้ดังแสดงในตารางที่ 4.10 เมื่อได้เมล็ด F_2 ทำการปลูกเพื่อประเมินและคัดเลือกในโรงเรือนในสภาพดินที่มีไนโตรเจนสูง ซึ่งในชั่วนี้พบมีการกระจายตัวสูงของลักษณะต่างๆ เช่นเดียวกับประชากร M_2 ของการทดลองที่ผ่านมา เมื่อคัดเลือกเป็นรายต้น สามารถคัดเลือกต้นที่ตรงตามต้องการได้ 48 ต้น โดยมาจากคู่

SJ5xT370 จำนวน 25 ต้น และ SJ5xT372 จำนวน 23 ต้น โดยมีค่าเฉลี่ยของแต่ละประชากรดังแสดงในตารางที่ 4.11 จากนั้นนำเมล็ดไปปลูกคัดเลือกในชั่ว F_3 ต่อไป

ตารางที่ 4.10 จำนวนต้นถั่วเหลือง F_1 และจำนวนต้นที่ผ่านการคัดเลือกในชั่วที่ 2–5 (F_2–F_5)

สายพันธุ์	ชั่วอายุ	ต้นที่ปลูก	ต้นที่คัดเลือก
SJ5 x T370	F_1	26 ต้น	97 เมล็ด
	F_2	97 ต้น	25 ต้น
	F_3	25 แถว	10 ต้น
	F_4	10 แถว	2 แถว
ขยายพันธุ์และคัดเลือก	F_5	2 สายพันธุ์	1 สายพันธุ์
SJ5 x T372	F_1	38 ต้น	104 เมล็ด
	F_2	104 ต้น	23 ต้น
	F_3	23 แถว	11 ต้น
	F_4	11 แถว	2 แถว
ขยายพันธุ์และคัดเลือก	F_5	2 สายพันธุ์	1 สายพันธุ์

ตารางที่ 4.11 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ เมื่อปลูกทดสอบต้นในชั่ว F_2

พันธุ์ถั่วเหลือง, ระดับ EMS	ทรีตเมนต์*	ความสูง (ซม.)	น้ำหนักแห้ง (ก./ต้น)			
			เมล็ด	ฝัก	ราก	ต้น
SJ5 x T370	DASA66040+LN	47.2±8.4	5.67±2.0	2.78±1.3	1.89±0.9	4.87±1.2
	DASA66040+HN	50.5±11.9	5.32±2.8	2.55±1.8	1.85±1.4	4.47±1.9
SJ5 x T372	DASA66040+LN	53.0±7.8	5.55±2.3	2.71±1.4	2.00±1.0	5.79±1.4
	DASA66040+HN	56.5±12.7	5.32±3.2	2.64±1.7	1.98±1.6	5.57±2.0

*ให้ไนโตรเจน 2 ระดับ คือ LN = ระดับต่ำ (control) และ HN = ระดับสูง (5 mM KNO_3)

การปลูกทดสอบต้น F_3 ที่คัดเลือกจากชั่วก่อนที่มีต้นจากคู่ผสม SJ5 x T370 และ SJ5 x T372 จำนวน 25 และ 23 ต้น ตามลำดับ ภายใต้การปลูกในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนสูง เมื่อประเมินและคัดเลือกคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี และไม่แตกต่างหรือดีกว่าต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนต่ำ ซึ่งผลจากการประเมินลักษณะต่างๆ แสดงเป็นค่าเฉลี่ยในตารางที่ 4.12 เมื่อคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่ดีตามวัตถุประสงค์ได้จำนวน 21 ต้น โดยได้จากคู่ SJ5xT370 จำนวน 10 ต้น และ SJ5xT372 จำนวน 11 ต้น (ตารางที่ 4.10) ในระยะเก็บเกี่ยวเก็บเมล็ดเป็นรายต้น นำเมล็ดที่ได้จากการคัดเลือก (F_4) ไปปลูกทดสอบเป็นรายแถว

ตารางที่ 4.12 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ เมื่อปลูกทดสอบต้นในชั่ว F_3

พันธุ์ถั่วเหลือง/	ทรีตเมนต์*	ความสูง	น้ำหนักแห้ง (ก./ต้น)			
ระดับ EMS		(ซม.)	เมล็ด	ฝัก	ราก	ต้น
SJ5 x T370	DASA66040+LN	53.1±5.1	6.60±2.1	2.87±0.8	3.13±0.8	7.21±1.0
	DASA66040+HN	59.8±7.3	6.05±2.5	2.58±1.3	3.02±1.2	6.90±1.6
SJ5 x T372	DASA66040+LN	69.6±4.9	7.67±1.9	3.30±0.8	3.52±0.9	8.90±1.3
	DASA66040+HN	69.0±8.6	7.53±2.3	3.08±1.4	3.30±1.4	8.35±1.8

*ให้ไนโตรเจน 2 ระดับ คือ LN = ระดับต่ำ (control) และ HN = ระดับสูง (5 mM KNO_3)

เมื่อนำเมล็ดจากชั่วก่อนจากคู่ SJ5xT370 และ SJ5xT372 ทั้งหมดรวม 21 ต้น มาปลูกทดสอบเป็นรายแถว จากนั้นประเมินภายใต้สภาพที่ดินมีไนโตรเจนสูง แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี มีลักษณะต่างๆ ไม่แตกต่างหรือดีกว่าต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนต่ำ สามารถคัดเลือกได้ 4 สายพันธุ์ ซึ่งได้จากคู่ผสม SJ5xT370 และ SJ5xT372 อย่างละ 2 สายพันธุ์ โดยในตารางที่ 4.13 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนปมรากต่อต้น ความสูง น้ำหนักแห้งองค์ประกอบผลผลิตของ 4 สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือก ซึ่งมีลักษณะต่างๆ ดีกว่าต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนต่ำ และพบว่าสายพันธุ์ SJ70-2 มีลักษณะต่างๆ สูงกว่าพันธุ์เปรียบเทียบและสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ

ตารางที่ 4.13 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ เมื่อปลูกคัดเลือกในชั่ว F_4

พันธุ์ถั่วเหลือง/ ระดับ EMS	ทรีตเมนต์[1]	จำนวน ปมราก	ความสูง (ซม.)	น้ำหนักแห้ง (ก./ต้น)			
				เมล็ด	ฝัก	ราก	ต้น
SJ5 x T370	Control	77	62.5	6.83	2.92	2.73	4.38
	SJ70-1	81	72.4	7.57	3.60	2.59	4.70
	SJ70-2	83	81.7	8.44	3.98	3.16	5.15
SJ5 x T372	Control	78	73.3	8.41	3.08	2.80	4.46
	SJ72-1	80	61.5	7.83	3.83	3.03	4.70
	SJ72-2	79	62.4	8.57	3.92	3.34	5.06

[1] ให้ไนโตรเจน 2 ระดับ คือระดับต่ำ (control) และระดับสูง (5 mM KNO_3)

เมื่อนำเมล็ดของ 4 สายพันธุ์ จากชั่ว F_4 มาขยายพันธุ์พร้อมประเมินและคัดเลือกภายใต้สภาพดินที่มีไนโตรเจนสูง คัดเลือกสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตได้ดี และไม่แตกต่างหรือดีกว่าต้นที่ปลูกในดินที่มีไนโตรเจนต่ำ ทำให้สามารถคัดเลือกได้จำนวน 2 สายพันธุ์ โดยได้จากคู่ผสม SJ5xT370 และ SJ5xT372 อย่างละ 1 สายพันธุ์ และค่าเฉลี่ยของลักษณะต่างๆ ของแต่ละสายพันธุ์แสดงในตารางที่ 4.14 ซึ่งพบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมีความสูงไม่แตกต่างจากต้นที่ปลูกในสภาพดินที่มีไนโตรเจนต่ำ แต่มีน้ำหนักแห้งเมล็ด ฝัก ราก และน้ำหนักแห้งต้น สูงกว่า control เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวเก็บเมล็ดเป็นรายแปลง จากนั้นนำสายพันธุ์ที่คัดเลือกไปปลูกทดสอบโดยใช้แผนการทดลอง

ตารางที่ 4.14 ค่าเฉลี่ยความสูง และน้ำหนักแห้งของลักษณะต่างๆ ของแถวที่ผ่านการคัดเลือกในชั่ว F_5

พันธุ์ถั่วเหลือง/ ระดับ EMS	ทรีตเมนต์[1]	จำนวน ปม/ต้น[2]	ความสูง (ซม.)	น้ำหนักแห้ง (ก./ต้น)			
				เมล็ด	ฝัก	ราก	ต้น
SJ5 x T370	Control	77	65.4	6.48	3.53	2.19	7.69
	SJ70-2	83	62.8	6.72	3.85	2.33	7.80
SJ5 x T372	Control	78	74.1	4.57	2.27	2.44	6.46
	SJ72-2	80	69.5	4.79	2.43	2.52	6.73

[1] ให้ไนโตรเจน 2 ระดับ คือระดับต่ำ (control) และระดับสูง (5 mM KNO_3)

[2] ค่าเฉลี่ยของสายพันธุ์ต่างๆ มาจากการสุ่มวัดต้นภายในแถวจำนวน 5 ต้น/แถว

4.3 การปลูกทดสอบสายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือก

จากการปลูกทดสอบถั่วเหลืองลูกชั่วที่ 7 ที่คัดเลือกได้จำนวน 10 สายพันธุ์ โดยได้จากการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย 8 สายพันธุ์ (SJ5_0.1_1, SJ5_0.1_2, SJ5_0.1_3, SJ5_1_11, SJ5_1_12, SJ5_1_13, CM60_0.1_1, CM60_0.1_2) และสายพันธุ์จากการผสมข้าม 2 สายพันธุ์ (CS_SJ70_2, CS_SJ72_2) มาปลูกเปรียบเทียบกับพ่อแม่พันธุ์อีก 2 พันธุ์ (สจ.5 และ T372) ได้ผลคือ ในระยะออกดอก หรือประมาณ 33 วันหลังปลูก พบลักษณะความสูงของต้นที่ได้จากการคัดเลือกมีตั้งแต่ 32–42 ซม. ซึ่งไม่แตกต่างกับพันธุ์ สจ. 5 ที่มีความสูง 35 ซม. แต่แตกต่างกับพันธุ์ T372 ที่มีความสูงต้นเพียง 24 ซม. สำหรับน้ำหนักแห้งปมราก พบว่าสายพันธุ์จากการคัดเลือกมีน้ำหนักไม่แตกต่างจากพันธุ์ T372 ที่มีความสามารถในการสร้างปมในสภาพที่มีไนโตรเจนสูงที่มี 79 ปม/ต้น (สายพันธุ์จากการคัดเลือกมีจำนวน 71–81 ปม/ต้น ยกเว้นสายพันธุ์ SJ5_0.1_1 ที่มีเพียง 67 ปม/ต้น) อย่างไรก็ตาม ทุกสายพันธุ์มีจำนวนปมรากมากกว่าพันธุ์ สจ. 5 และยังพบว่าน้ำหนักแห้งปมรากมีค่าสอดคล้องกับจำนวนปมราก คือ ทุกสายพันธุ์มีค่าไม่แตกต่างจาก T372 แต่มีค่ามากกว่าพันธุ์ SJ5 สำหรับน้ำหนักแห้งต้นและราก ไม่พบความแตกต่างระหว่างพันธุ์

ตารางที่ 4.15 ลักษณะต้นถั่วเหลืองที่ได้จากการคัดเลือก 10 สายพันธุ์ ในระยะออกดอก

สายพันธุ์	ความสูงต้น	ความยาวราก	จำนวนปมราก	น้ำหนักปมราก	น้ำหนักราก	น้ำหนักต้น
	(ซม.)	(ซม.)	(ปม/ต้น)	(ก./ต้น)	(ก./ต้น)	(ก./ต้น)
SJ 5	35 ab	12 b	48 c	0.213 d	2.18	6.76
T372	24 b	16 ab	79 ab	0.552 a	2.22	6.02
SJ5_0.1_1	33 ab	17 ab	67 b	0.365 bc	2.21	7.43
SJ5_0.1_2	32 ab	17 ab	75 ab	0.492 ab	2.34	8.62
SJ5_0.1_3	35 ab	19 a	72 ab	0.425 bc	2.39	7.69
SJ5_1_11	38 a	18 ab	71 ab	0.414 bc	2.55	8.93
SJ5_1_12	35 ab	20 a	73 ab	0.456 ab	2.42	9.45
SJ5_1_13	40 a	21 a	74 ab	0.431 abc	2.51	9.03
CM60_0.1_1	34 ab	17 ab	79 ab	0.443 abc	2.48	7.54
CM60_0.1_2	37 ab	17 ab	80 a	0.539 ab	2.36	8.26
CS_SJ70_2	39 a	19 a	81 a	0.530 ab	2.51	8.72
CS_SJ72_2	42 a	16 ab	80 a	0.579 a	2.56	9.64
F-test	*	*	**	**	ns	ns

องค์ประกอบผลผลิต และผลผลิตถั่วเหลือง เมื่อถึงอายุเก็บเกี่ยวเก็บเมล็ดถั่วเหลืองแล้วนำไปชั่งน้ำหนักผลผลิตที่ได้ จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์วาเรียนซ์ พบว่าความสูงต้นที่ได้จากการคัดเลือก 57–65 ซม. ซึ่งไม่แตกต่างจากพันธุ์ สจ. 5 ที่มีความสูงต้น 59 ซม. ในขณะที่พันธุ์ T372 มีความสูงน้อยที่สุดเพียง 33 ซม. นอกจากนี้จำนวนฝักต่อต้นก็ให้ผลการทดสอบไปในทำนองเดียวกัน คือ พันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกมีจำนวนฝักต่อต้นสูงใกล้เคียงกับพันธุ์ สจ. 5 (49 ฝัก/ต้น) และบางสายพันธุ์มีมากถึง 66 ฝักต่อต้น สำหรับลักษณะผลผลิตต่อพื้นที่ (กรัม/ 10 ตรม.) พบว่าเกือบทุกสายพันธุ์มีผลผลิตใกล้เคียงหรือมากกว่าพันธุ์ สจ. 5 ยกเว้นสายพันธุ์ CM60_0.1_2 ที่มีผลผลิต 1,250 กรัม/10 ตรม. อย่างไรก็ตามทุกสายพันธุ์ให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ T372 ที่ให้ผลผลิตเพียง 1,050 กรัม/10 ตรม.

ตารางที่ 4.16 ค่าเฉลี่ยผลผลิต และองค์ประกอบผลผลิตของถั่วเหลือง 10 สายพันธุ์ ในระยะเก็บเกี่ยว

สายพันธุ์	ความสูงต้น	จำนวนฝักต่อต้น	ผลผลิต
	(ซม.)	(ฝัก/ต้น)	(ก./10 ตรม.)
SJ 5	59 ab	52 ab	1,325 ab
T372	33 c	30 c	1,050 b
SJ5_0.1_1	58 ab	49 bc	1,313 ab
SJ5_0.1_2	61 ab	52 ab	1,438 ab
SJ5_0.1_3	63 a	52 ab	1,369 ab
SJ5_1_11	58 ab	50 abc	1,394 ab
SJ5_1_12	60 ab	61 ab	1,431 ab
SJ5_1_13	65 a	50 ab	1,388 ab
CM60_0.1_1	63 ab	51 ab	1,369 ab
CM60_0.1_2	57 ab	66 a	1,250 ab
CS_SJ70_2	60 ab	66 a	1,481 ab
CS_SJ72_2	62 a	54 ab	1,525 a
F-test	**	**	*

จากผลการทดลองปลูกทดสอบถั่วเหลือง 10 สายพันธุ์ ในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนสูง สามารถสรุปได้ว่าถั่วเหลืองที่ได้จากการกลายพันธุ์และประชากรจากการผสมพันธุ์ชั่วที่ 7 แต่ละสายพันธุ์ให้ลักษณะแตกต่างกัน เช่น จำนวนปมต่อต้น น้ำหนักแห้งปม น้ำหนักแห้งต้น น้ำหนักแห้งราก องค์ประกอบผลผลิต และผลผลิตต่างกัน โดยถั่วเหลือง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ SJ5_0.1_2, SJ5_1_11, SJ5_1_12, CS_SJ70_2 และ CS_SJ72_2 ที่พบว่ามีจำนวนปมต่อต้น น้ำหนักแห้งปมสูง และยังพบว่าสายพันธุ์เหล่านี้ให้ลักษณะฝักต่อต้น และผลผลิตสูง

กว่าสายพันธุ์อื่นๆ ในจำนวนนี้สายพันธุ์ CS_SJ72_2 มีลักษณะต่างๆ สูงที่สุด (เมื่อคลุกด้วยเชื้อไรโซเบียม DASA66040) ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้ที่มีการชักนำให้เกิดความปรวนแปรทางพันธุกรรมทั้งโดยวิธีการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีและการผสมข้ามพันธุ์ สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีจำนวนปมราก และสามารถตรึงไนโตรเจนได้ดี และยังพบว่ามีลักษณะองค์ประกอบผลผลิต และผลผลิตสูง ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ดินมีไนโตรเจนสูง นอกจากนี้หลายงานทดลองได้รายงานว่าการตรึงไนโตรเจนได้ดีขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของถั่วเหลือง และความเข้ากันได้ดีระหว่างพันธุ์ถั่วเหลืองและเชื้อไรโซเบียม เนื่องจากการประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนถูกควบคุมด้วยพันธุกรรมของถั่วเหลือง (Wecek and Brill, 1979) และมีรายงานว่าจำนวนปมราก และกิจกรรมการตรึงไนโตรเจน มีอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในระดับสูง (Fernandez and Miller, 1985)

รูปที่ 4.9 สายพันธุ์คัดเลือกจากการกลายพันธุ์และปลูกทดสอบในสภาพที่ ก) ไนโตรเจนต่ำ ข) ไนโตรเจนสูง

รูปที่ 4.10 สายพันธุ์คัดเลือกจากการผสมข้ามพันธุ์และปลูกทดสอบในสภาพที่ ก) ไนโตรเจนต่ำ ข) ไนโตรเจนสูง

บทที่ 5
บทสรุป

5.1 การประเมินพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วเหลือง ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ดีในสภาพที่มีไนโตรเจนสูง

จากการนำถั่วเหลือง 9 พันธุ์/สายพันธุ์ (Harosoy 63, T370, T371, T372, LJ 4, สจ.5, ชม. 60, M3215, M3217) ซึ่งมีทั้งพันธุ์จากแหล่งรวบรวมพันธุกรรมที่มีรายงานว่าสามารถสร้างปมได้จำนวนมาก และพันธุ์ไทยที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตสูงในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย เมื่อนำมาทดสอบในห้องปฏิบัติการทั้งในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนสูงเปรียบเทียบกับการไม่ให้ไนโตรเจน และคลุกเมล็ดโดยไรโซเบียม 2 สายพันธุ์ (USDA110 และ DASA66040) พบว่าในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนสูงสายพันธุ์จากแหล่งรวบรวมพันธุกรรมสามารถสร้างปมรากได้มากกว่าพันธุ์ไทย และยังมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าพันธุ์ไทยประมาณ 2-3 เท่า สำหรับพันธุ์ไทยพบว่าพันธุ์ สจ.5 มีอัตราการตรึงไนโตรเจน และจำนวนปมราก มากกว่าพันธุ์อื่นๆ รองลงมาคือพันธุ์ ชม.60

5.2 การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงโดยวิธีการกลายพันธุ์และการผสมข้ามพันธุ์

5.2.1 การคัดเลือกสายพันธุ์จากประชากรที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี การทดลองได้นำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 และ ชม.60 มาชักนำโดยใช้สาร EMS ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1% ซึ่งพบว่าการใช้สารเคมีที่ความเข้มข้นสูงมีผลให้ความงอกลดลงมากกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ อย่างไรก็ตามการใช้ความเข้มข้นทั้ง 2 ระดับ มีผลทำให้ถั่วเหลืองเกิดความปรวนแปรทางพันธุกรรม โดยในชั่ว M_2 มีความปรวนแปรทางพันธุกรรมสูงสุดประชากรมีความแตกต่างกันมาก ทำให้สามารถคัดเลือกต้นที่มีจำนวนปมรากสูงได้ และเมื่อทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะที่ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับ control (ปลูกในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนต่ำ) จนถึงชั่ว M_6 สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีจำนวนปมรากมากในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนสูง ได้จำนวน 8 สายพันธุ์ โดยคัดเลือกได้จากประชากร CM60-0.1%, SJ5-0.1% และ SJ5-1% จำนวน 2, 3 และ 3 สายพันธุ์ ตามลำดับ

5.2.2 การคัดเลือกสายพันธุ์จากประชากรที่ผสมข้ามพันธุ์ การทดลองได้นำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 มาผสมข้ามพันธุ์กับพันธุ์จากแหล่งรวบรวมพันธุกรรมที่มีจำนวนปมราก และประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูง จำนวน 2 คู่ผสม พบเช่นเดียวกันว่าประชากรในชั่ว F_2 มีความปรวนแปรทางพันธุกรรมสูงสุดประชากรมีความแตกต่างกันมาก และได้คัดเลือกต้นที่มีจำนวนปมรากสูงจนถึงชั่ว F_4 โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะที่ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับ control (ปลูกในสภาพดินมีไนโตรเจนต่ำ) ซึ่งสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีจำนวนปมรากมากในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนสูง ได้จำนวน 2 สายพันธุ์ โดยคัดเลือกได้จากประชากร โดยได้จากคู่ผสม SJ5xT370 และ SJ5xT372 อย่างละ 1 สายพันธุ์

5.2.3 การปลูกทดสอบสายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกในสภาพแปลง การทดลองนี้ได้ทดสอบสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่ได้จากข้อ 5.2.1 และ 5.2.2 จำนวน 10 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์ สจ. 5 และ T372 ผลการทดสอบพบว่าทั้ง 10 สายพันธุ์ มีจำนวนปมรากต่อต้นไม่แตกต่างจากพันธุ์ T372 และยังมีความสูง น้ำหนักแห้งรากและต้น จำนวนฝักต่อต้น และผลผลิตไม่แตกต่างจากพันธุ์ สจ. 5 และในจำนวนนี้มี 5 สายพันธุ์ ได้แก่ SJ5_0.1_2, SJ5_1_11, SJ5_1_12, CS_SJ70_2 และ CS_SJ72_2 ที่มีจำนวนปมรากต่อต้นสูง และมีลักษณะองค์ประกอบผลผลิต และผลผลิต มีแนวโน้มสูงกว่าพันธุ์ สจ. 5 บ่งชี้ว่าสายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกเหล่านี้มีศักยภาพสูงในการเจริญเติบโตในสภาพที่ดินมีไนโตรเจนสูง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายการอ้างอิง

ชลิดา ปัญญาด้วง. 2550. **การผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมถั่วเหลืองโดยวิธีการพ่นแห้ง**. วิทยานิพนธ์ สาขาวิชาปฐพีศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ฐิติพร มะชิโกวา. 2554. การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองอายุสั้นและโปรตีนสูง. ใน รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, 56 หน้า.

ธีระ สมหวัง, พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, นพศูล สมุทรทอง, กิ่งกานท์ พานิชนอก, ธำรงศิลปะ โพธิสูง และ อัจฉรา นันทกิจ. 2552. การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) ให้มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูงโดยไรโซเบียมในลูกผสมชั่วที่ 6. **ข่าวสารเกษตรศาสตร์,** 54 (2): 74-86.

น้อย เธียรนันท์ และนพชัย สวนมาลี. 2535. การปรับปรุงดินเพื่อเพิ่มผลผลิตถั่วเหลือง. ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรการใช้ปุ๋ยกับพืชต่างๆ. กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 95-115.

พรพรรณ สุทธิแย้ม, สุดชล วุ้นประเสริฐ, อัจฉรา นันทกิจ, จิติมา ยถาภูธานนท์, นงนุช เดือนดาว และหทัยรัตน์ เคหา. 2552. การคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่ทนต่อสภาพดินที่มีไนโตรเจนสูง. **ในการประชุมวิชาการพืชไร่วงศ์ถั่วแห่งชาติ ครั้งที่ 2** : ถั่วสร้างคน คนสร้างชาติ. จ.ชลบุรี.วันที่ 27-29 สิงหาคม 2552.

พรพรรณ สุทธิแย้ม, อัจฉรา นันทกิจ, ศิริลักษณ์ จิตรอักษร, จิติมา ยถาภูธานนท์ และสมชาย ผะอบเหล็ก. 2554. การใช้เชื้อไรโซเบียมร่วมกับปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์ เพื่อเพิ่มผลผลิตและโปรตีนในถั่วเหลือง. **ว. แก่นเกษตร 39 ฉบับพิเศษ 3:** 133-122.

วิทยา ธนานุสนธิ์. 2545 ไรโซเบียมและการผลิตปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม. ใน เอกสารวิชาการ ปุ๋ยชีวภาพ. กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2552. **สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2552**. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2557. **สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญ และแนวโน้มปี 2557**. ศูนย์สารสนเทศการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สมพร ชุนห์ลือชานนท์. 2541. **การตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพ**. ภาคปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 223 หน้า.

สมศักดิ์ วงใน. 2541. **การตรึงไนโตรเจน: ไรโซเบียม-พืชตระกูลถั่ว** ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุวพันธ์ รัตนะรัต. ม.ป.ป. **สรุปผลงานวิจัยดินและปุ๋ย ของถั่วเหลือง**. ใน: สรุปผลงานวิจัยดินและปุ๋ยของถั่วเหลือง. หน้า 86-96. ในรายงานผลงานวิจัยถั่วเหลืองกรมวิชาการเกษตร ปี 2531-2541. กรมวิชาการเกษตร.

อภิพรรณ พุกภักดี. 2545 **ถั่วเหลือง: พืชทองของไทย**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัย-เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 325 หน้า.

อัจฉรา นันทกิจ, สมศักดิ์ โคตรพงศ์, จิระศักดิ์ อรุณศรี, จิราลักษณ์ ภูมิไธสง, สุมนา งามผ่องใส และ อาณัติ วัฒนสิทธิ์. 2549. การประเมินศักยภาพไรโซเบียมถั่วเขียวเพื่อใช้ประโยชน์. ในการประชุมวิชาการพืชไร่วงศ์ถั่วแห่งชาติ ครั้งที่ 1 เรื่อง “พืชไร่วงศ์ถั่วเพื่อสุขภาพและความพอเพียง” ณ โรงแรมริมกก รีสอร์ท อ.เมือง จ.เชียงราย. วันที่ 28-30 สิงหาคม 2549.

Barnes, D.K., Heichel, G.H., Vance, C.P., Viands, D.R. and Hardarson, G. 1981. Success and problems encountered shile breeding for enhanced N2-fixation in alfalfa, pp. 233-248. *In* Lyons, J.M., Valentine, R.C., Phillips, D.A., Rains, D.W. and Huffaken, S.C. (eds). Genetic Engineering of Symbiotic Nitrogen Fixation and Conservation of Fixed Nitrogen. Plenum Press, New York.

Bhatia, C.R., Nichterlein, K. and Maluszynski, M. 2001. Mutations affecting nodulation in grain legumes and their potential in sustainable cropping systems. **Euphytica,** 120: 415–432.

Broughton, W.J. and Dilworth, M.J. 1970. Methods in *legume-rhizobium* technology : plant nutrient solutions. In: Somasegaran, P. and Hoben, H.J. (ed). Handbook for Rhizobia. Hawaii: pp. 245-249.

Betts, J.H. and Herridge, D.F. 1987. Isolation of soybean lines capable of nodulation and nitrogen fixation under high levels of nitrate supply. **Crop Sci.** 27: 1156-1161.

Carroll, B.J., McNeil, D.L. and Gresshoff, P.M. 1985a. A super nodulation and nitrate tolerant symbiotic (nts) soybean mutant. **Plant Physiol.** 78(1): 34-40.

Carroll, B.J., McNeil, D.L. and Gresshoff, P.M. 1985b. Isolation and properties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 82: 4,162-4,166.

DeMooy, C.J. and Sutherland, P.L. 1979. Soil–fertility requirement of soybeans with reference to irrigation. In: Hudy, Jackobs W.H., J.A. (Eds.), Irrigated Soybean Production in Arid and Semi-Arid Regions. **TNTSOY Series** No. 20. International Agriculture Publications, University of Illinois, Urbana, Champaign, pp. 276–352.

Egli, D.B., Leggett, J.E. and Wood, J.M. 1978. Influence of soybean seed size and position on the rate and duration of filling. **Agron. J.** 70:127-130.

FAO. 1984. **Legume Inoculants and Their Use**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Room.

FAO Crop Production. 1998. FAOSTAT Database 1998. FAO Rome.

Fernandez, G.C.J. and Miller, J.C. 1985. Estimation of heritability by parent-offspring regression. **Theor. Appl. Genet.** 70: 650–654.

Gardner, F.P., Pearce, R.B. and Mitchell, R.L. 1985. **Physiology of Crop Plants**. The Iowa State University Press. Ames, 327.

George, T., Singleton, P.W. and Bohlool, B.B. 1988. Yield, soil nitrogen uptake, and nitrogen fixation by soybean from four maturity groups grown at three elevations. **Agron. J.** 80: 563-567.

Guffy, R.D., Heuvel, R.M.V, Vasilas, B.L., Nelson, R.L., Frobish, M.A. and Hesketh, J.D. 1989. Evaluation of the N_2 fixation capacity of four genotypes be several methods. **Soil. Biol. Biochem.** 21: 339-342.

Hansen, A.P. 1994. Symbiotic N_2 fixation of crop legumes. **Marglaf-Verlag, Weikersheim**, Germany. 248 p.

Harper J. E. 1987. Nitrogen metabolism. In: Wilcox J. R. (ed) **Soybean : Improvement, Production, and Uses,** 2nd ed. #16 Agron. ASA-CSSA-SSSA, Madison, Wisconsin, 497-533 pp.

Hardy, R.W.F., Burns, R.C. and Holsten, R.D. 1973. Applications of the acetylene ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. **Soil. Biol. Biochem.** 5: 47-81.

Herridge, D.F. and Brockwell, J. 1988. Contribution of fixed nitrogen and soil nitrate to the nitrogen economy of irrigated soybean. **Soil Biol. Biochem.** 20: 211–217.

Herridge, D.F. and Peoples, M.B. 1990. The uriede assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by ^{15}N methods. **Plant Physiol.** 93: 495-503.

Herridge, D.F. and Rose, I.A. 1994. Heritability and repeatability of enhanced N_2 fixation in early and late inbreeding generations of soybean. **Crop Sci**. 34: 360-367.

Herridge, D., and Rose, I. 2000. Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. **Field Crop Res.** 65: 229-248.

Haynes, R.J. 1986. Mineral Nitrogen in the Plant–Soil System. Orlando: Academic Press. 483 p.

Hanway, J.J. and Weber, C.R. 1971. Accumulation of N, P and K by soybean *(Glycine max (L.)* Merrill). **Agron. J.** 63: 406–408.

Karthika, R. and Lakshmi, B.S. 2006. Effect of gamma rays and EMS on two varieties of soybean. **Asian J. Plant Sci.** 5: 721-724.

Khan, M.H. and Tyagi, S.D. 2013. A review on induced mutagenesis in soybean. **J. Cereals Oilseeds**, 4: 19-25.

Kucey, R.M.N., Janzen, H.H. and Leggett, M.E. 1989. Microbially mediated increases in plant available phosphorus. **Adv. Agron**. 42: 199-225.

LaRue, T.A. and Patterson, T.G. 1981. How much nitrogen do legumes fix? **Adv. Agron.** 34: 15-38.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J.B. 2000. **Biology of Microorganisms.** 9th Ed. Upper Saddle River : Prentince Hall.

Mengel, D., Ruiz-Diaz, D., Asebedo, R., and Maxwell, T. 2012. Nitrogen fertilization of nitrogen-stressed soybeans. **Better Crops** 96(1): 14-15.

Peoples, M.B., Ladha, J.K. and Herridge, D.F. 1995. Enhancing legume N_2 fixation through plant and soil management. **Plant Soil.** 174: 83-101.

Salvagiotti, F., Cassman, K.G., Specht, J.E., Welters, D.T., Weiss, A. and Dobermann, A., 2008. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans : A review. **Field Crop Res.** 28: 1-13.

Salvagiotti, F., Specht, J.E., Cassman, K.G., Welters, D.T., Weiss, A. and Dobermann, A., 2009. Growth and Nitrogen fixation in High-Yielding Soybean: Impact of Nitrogen Fertilization. **Agron. J**. 101: 958-970.

Sinclair,T.R. and de Wit, C.T. 1975. Photosynthate and nitrogen requirements for seed production by various crops. **Science** 189: 565–567.

Song, L., Carroll, B.J., Gresshoff, P.M., Herridge, D.F. 1995. Field assessment of super-nodulating genotypes of soybean for yield, N_2 fixation and benefit to subsequent crops. **Soil Biol. Biochem.** 26.

Somasegaran, P. and Hoben. H.J. 1994. The Handbook for Rhizobia : Methods for mass culture of Rhizobia. **World J. Microbiol. Biotech-nol.** 8: 335-336.

Stajkovic, O., Delic, D., Josic, D., Kuzmanovic, D., Rasulic, N. and Knezevic-Vukcevic, J. 2011. Improvement of common bean growth by co-inoculation with Rhizobium and plant growth-promoting bacteria. **Romanian Biotechnological Letters**, 16(1): 5,919–5,926.

Weber, C.R. 1966. Nodulating and nonnodulating soybean isolines. 2 Response to applied N and modified soil conditions. **Agron. J.** 58: 46.

Wecek, T.J. and Brill, W.J. 1979. Simple, rapid assay for screening nitrogen-fixing ability in soybean. **Crop Sci.** 16: 519–523.

Wiersma, J.V. and Orf, J.H. 1992. Early maturing soybean nodulation and performance with selected *Bradyrhizobium japonicum* strains. **Agron. J.** 84: 449-458.

Wu, S. and Harper, J. E. 1990. Nitrogen fixation of nodulation mutants of soybean as affected by nitrate. **Plant Physiol.** 92: 1142-1147.

Zhang, H., Zhang, G., Zhao, G., Wang, X., Xu, B. and Zhao, F. 1986. Nitrogenase activity, nodulation and the N_2 fixation of the indigenous *Rhizobium japonicum*. **Soybean Sci.** 5: 47-56.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี