

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองนี้ เป็นการศึกษาต่อเนื่อง จากการทดลองของศรีศุภร์ (2532) โดยนำเชื้อไวรัส เบียมที่ได้จากพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองในเขตเกษตรน้ำฝนของภาคเหนือ ซึ่งศรีศุภร์ (2532) ได้จำแนกกลุ่มโรคอาศัยลักษณะการเกิดปฏิกริยาทาง เซโรโลยีกับซีรัมของไวรัส เบียมที่มีความต้านทานยาปฏิชีวนะแตกต่างกันเรียบร้อยแล้ว แต่ยังไม่ได้ศึกษาความเข้ากันได้กับถั่วเหลืองพันธุ์ต่าง ๆ มาใช้ในการทดลอง การดำเนินงานทดลอง ทำในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางดิน ภาควิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษ์ศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในช่วงเดือนพฤษภาคม 2532 ถึงเดือน กุมภาพันธ์ 2533 ศึกษารายละเอียดของอุปกรณ์และวิธีการดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมเชื้อไวรัส เบียม

ก. การคัดเลือกเชื้อไวรัส เบียมสายพันธุ์พื้นเมือง

เนื่องจากเชื้อไวรัส เบียมที่รวบรวมได้จากงานทดลองของศรีศุภร์ (2532) มีจำนวนมาก ดังนั้นในการทดลองนี้จะ เลือก เฉพาะเชื้อไวรัส เบียมที่ได้จากพื้นที่ของเกษตรกรในเขตภาคเหนือตอนบนและภาคเหนือตอนล่าง จำนวน 3 ราย ซึ่งปลูกถั่วเหลืองมานานร้อยละ 100 เชื้อไวรัส เบียมที่เข้าในงานทดลองได้จากพื้นที่ต่าง ๆ ดังนี้ บ้านคอยเต่า อำเภอกอยเต่า จังหวัดเชียงใหม่ บ้านคงช้างดี อำเภอมือง จังหวัดอุดรธานี และบ้านย่านยาว อำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัย เชื้อไวรัส เบียมเหล่านี้ได้จากปมถั่วพันธุ์ต่าง ๆ (trap host) จำนวน 3-5 พันธุ์ ได้แก่ ถั่วเหลืองพันธุ์ป่า (*Glycine ussuriensis*) ถั่วเหลืองพิวคา ซึ่งเป็นถั่วเหลืองพื้นเมือง ถั่วเหลืองพันธุ์สง.5 ซึ่งเป็นพันธุ์มาตรฐานของภาคเหนือตอนบน ถั่วเหลืองพันธุ์ Improved Pelican ซึ่งเป็นพันธุ์จากประเทศสหรัฐอเมริกา และถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata*) โดยเลือก

เชื้อไวรัสเบียมที่ได้จากแต่ละ trap host ซึ่งมีหลายกลุ่ม มาเพียง 1 เชื้อต่อกลุ่ม สำหรับเชื้อไวรัสเบียมแต่ละกลุ่ม มีลักษณะในการ เกิดปฏิกิริยากับซีรัมของสายพันธุ์ไวรัสเบียมที่ค้ำทานยาปฏิชีวนะแตกต่างกัน igitงถือว่าเชื้อไวรัสเบียมที่ได้จากแต่ละพื้นที่และจาก trap host ต่างชนิด ในแต่ละกลุ่ม เป็นไวรัสเบียมที่มีสายพันธุ์ต่างกัน จากหลัก เกณฑ์ คังกล่าว สามารถเลือกสายพันธุ์ไวรัสเบียม สำหรับใช้งานทดลองได้ 50 สายพันธุ์ คังรายละเอียดในตารางผนวกที่ 1 สำหรับกลุ่มไวรัสเบียมพื้นเมืองที่ไม่เกิดปฏิกิริยากับไวรัสเบียมที่ใช้ทดสอบ (กลุ่ม NEG) ที่ได้จากแต่ละพื้นที่ และจากแต่ละ trap host ในการทดลองนี้ จะถือว่าเป็นเชื้อที่มีสายพันธุ์ต่างกัน

ข. การเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสเบียมบริสุทธิ์

1. อุปกรณ์สำหรับเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสเบียมบริสุทธิ์

- loop
- Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร
- อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อ (Yeast mannitol broth)

ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้ Mannitol 10.00 กรัม K_2HPO_4 0.05 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.20 กรัม NaCl 0.10 กรัม Yeast Extract 0.50 กรัม และ น้ำกลั่น 1.00 ลิตร ปรับ pH ของสารละลายยาค่า 6.8 นำเบนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ค้ำยหน่อหนึ่งอ็คไอ

2. วิธีการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสเบียมบริสุทธิ์

นำเชื้อไวรัสเบียมบริสุทธิ์แต่ละสายพันธุ์เพาะลงในอาหารเหลว สำหรับเลี้ยงเชื้อ (yeast mannitol broth) ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและบรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน flask ละ 75 มิลลิลิตร แล้วปิด ค้ำยจุกสำลี นำไปวางไว้บนเครื่องเขย่าซึ่งมีความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

(28 องศาเซลเซียส) จนกระทั่งเชื้อมีจำนวนประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณเชื้อที่เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว จะประมาณการโดยการคาดคะเนจากความขุ่นของอาหารเหลว โดยนำชวคอาหารเลี้ยงเชื้อที่เจริญจนอาหารมีความขุ่น ทาบลงบนกระดาษหนังสือพิมพ์ ถ้าความขุ่นของอาหารมีมาก จนทำให้ไม่สามารถเห็นตัวอักษรที่อยู่บนกระดาษได้ แสดงว่ามีเชื้อในปริมาณตามที่ต้องการ คือไม่ต่ำกว่า 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างไวรัส เย็บมสายพันธุ์พื้นเมือง กับแก้ว เหลือง พันธุ์ต่าง ๆ

ก. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับทดสอบความเข้ากันได้

1. อุปกรณ์สำหรับเพาะเมล็ดแก้ว เหลือง

- H_2O_2 3% ใช้สำหรับฆ่าเชื้อผิวเมล็ด
- น้ำล้างที่ฆ่าเชื้อแล้ว
- จานเพาะ เชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว
- กระดาษชำระ

- เมล็ดแก้ว เหลือง ซึ่งประกอบด้วยแก้ว เหลืองพันธุ์มาตรฐาน พันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ต่างประเทศที่ใช้ผลิตพันธุ์ผสม ซึ่งได้มาจากแหล่งต่างๆ ที่มีลักษณะทางภูมิศาสตร์ แตกต่างกัน ดังรายละเอียดในตารางที่ 2

2. อุปกรณ์สำหรับปลูกแก้ว

- กุหลาบพลาสติกอย่างหนา ขนาด 5 x 7.5 นิ้ว
- กระดาษฟาง
- หลอดพลาสติก
- สารละลายที่ใช้ในการปลูกแก้ว ที่มีธาตุอาหารสำหรับการ

เจริญเติบโตของแก้วครบทุกชนิด ยกเว้นธาตุไนโตรเจน ซึ่งมีสูตรอาหารดังตารางที่ 3

ตารางที่ 1 พันธุ์ถั่วเหลืองที่เข้ารับการทดสอบความเข้ากันได้

พันธุ์ถั่วเหลือง	ที่มา
Bossier	พันธุ์ลูกผสมจากประเทศสหรัฐอเมริกา
IITA medium	จาก International Institute of Tropical Agriculture (IITA) ประเทศไนจีเรีย
Coc Chumhat	พันธุ์พื้นเมืองจากประเทศเวียดนาม
ปักกิ่ง	พันธุ์พื้นเมืองจากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน
Dempo	พันธุ์พื้นเมืองจากประเทศอินโดนีเซีย
ISRA	พันธุ์ที่ใช้ผลิตลูกผสม ของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
สง.5	พันธุ์มาตรฐานของภาคเหนือตอนบน
สข.1	พันธุ์มาตรฐานของภาคเหนือตอนล่าง
ชม.60	พันธุ์มาตรฐานของประเทศไทย ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่าง Willium กับ สง.4
มช.001	พันธุ์ลูกผสมระหว่าง ปากช่อง กับ Biloxy (USA) โดยคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ปากช่อง	พันธุ์พื้นเมืองจากประเทศไทย
สารเขียว	พันธุ์พื้นเมืองจากอำเภอป่าซาง จังหวัดแม่ฮ่องสอน

ตารางที่ 2 สารละลายใช้สำหรับปลูกถั่วที่มีธาตุไนโตรเจน (Somasegaran, 1982)

Stock solution	Element	uM	Form	MW	g/l	M
1	Ca	1000	CaCl ₂ .2H ₂ O	147.03	294.1	2.0
2	P	500	KH ₂ PO ₄	136.09	136.1	1.0
3	Fe	10	Fe citrate	355.04	6.7	0.02
	Mg	250	MgSO ₄ .7H ₂ O	246.50	123.3	0.5
	K	250	K ₂ SO ₄	174.06	87.0	0.5
	Mn	1	MnSO ₄ .H ₂ O	169.02	0.338	0.002
4	B	2	H ₃ BO ₃	61.84	0.247	0.004
	Zn	0.5	ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.56	0.288	0.001
	Cu	0.1	CuSO ₄ .5H ₂ O	249.69	0.100	0.0004
	Co	0.1	CoSO ₄ .7H ₂ O	281.12	0.056	0.0002
	Mo	0.1	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.98	0.048	0.0002

หมายเหตุ ถ้าต้องการเตรียมสารละลายปริมาณ 10 ลิตร จะใช้ stock solution ที่ 1-4 ชนิดละ 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 5 ลิตร แล้วทำให้เจือจางโดยเติมน้ำกลั่นเพิ่มจนสารละลายมีปริมาตร 10 ลิตร ในการนี้ที่ต้องการสารละลายธาตุอาหารสำหรับปลูกพืชที่มีธาตุไนโตรเจน ให้เติม KNO₃ ในอัตราส่วน 0.5 กรัม ต่อสารละลาย 1 ลิตร

3. ไรโซเบียมที่เข้าในการทดสอบ ได้แก่ ไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมือง จากเมล็ดพันธุ์ต่าง ๆ จากพื้นที่เกษตรกรรมจังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดอุดรธานี และจังหวัดสุราษฎร์ คังระบันคารางที่ 1 และไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐาน USDA 110 ซึ่งเป็น ไรโซเบียมที่บริสุทธิ์และเจริญในอาหารเหลว

4. ห้องสำหรับปลูกถั่ว ซึ่งติดตั้งฮีทเตอร์ที่ให้แสงสีแดง (GL 40 wt 12-12A) สำหรับให้แสงสว่างแก่ต้นถั่วเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน และปรับอุณหภูมิด้วยเครื่องปรับอากาศ ให้มีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 25 องศาเซลเซียส

ข. วิธีการทดสอบความเข้ากันได้

1. การเพาะถั่วเหลือง ถั่วที่จะใช้เพาะจะนำไปแช่เชื้อที่ผิวเมล็ด โดยการแช่เมล็ดถั่วเหลืองใน H_2O_2 3% เสียก่อน หลังจากนั้นจึงนำไปเพาะในจานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีกระดาษชำระเป็นวัสดุเพาะ และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอ้อแล้ว ในระหว่างการเพาะ จะทำให้กระดาษชำระขึ้นด้วยน้ำกลั่น และเก็บงานเพาะไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งต้นถั่วเหลืองงอก ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 วัน

2. การเตรียมภาชนะปลูกและปลูกถั่วเหลือง เมื่อถั่วเหลืองงอกแล้ว นำลงปลูกในถุงพลาสติก ซึ่งภายในมีกระดาษหางบรรจุอยู่ เพื่อใช้ในการคำนวณราก และดูดซับสารละลายที่ใช้ปลูกถั่วเหลือง โดยให้สารละลายคั่งกล่าวครั้งแรก 60 มิลลิลิตร และปลูกถั่วเหลือง 2 ต้นต่อถุงพลาสติก 1 ใบ นำถุงพลาสติกคั่งกล่าวทิ้งไว้ในที่วางถั่ว เมื่อต้นถั่วเจริญได้ 5 วัน คัดเลือกต้นถั่วเหลืองให้เหลือ 1 ต้นต่อถุง และตัดใบเลี้ยงคู่ออก เพื่อให้ต้นถั่วเหลืองเจริญเติบโต โดยอาศัยธาตุอาหารจากสารละลายที่ใช้ปลูกและจากการตรึงไนโตรเจนเท่านั้น ชั้นคอนกรีตค้ำเนินการภายใต้สภาพห้องสำหรับปลูกถั่ว สำหรับการเพิ่มเติมสารละลายให้แก่ต้นถั่วในระยะต่อมา จะให้สารละลายครั้งละ 90 มิลลิลิตรต่อถุง และเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อไรโซเบียมระหว่างถุง จะให้สารละลายทางหลอดพลาสติก ซึ่งใส่ไว้ในภาชนะปลูกแต่ละใบ

3. การปลูกเชื้อไวรัส เข็มมาให้กับตัว ชั้นตอนนี้จะทำเมื่อตัวเจริญ ได้ 6 วัน ปลูกเชื้อไวรัส เข็มที่เตรียมได้จากชั้นตอนที่ 1 ข้อ ค. ใส่ให้กับตัวที่ได้ จาก ข้อ 2 ปลูกเพาะไวรัส เข็มแต่ละ เชื้อให้แก่ตัว ตัวละ 1 มิลลิลิตร และถือว่าตัว- เหลือง 1 ตัวคือ 1 ซ้ำ

4. แผนการทดลอง

การทดลองมีทั้งหมด 12 การทดลอง ปลูกแต่ละการทดลอง จะ ใช้ตัวเหลืองแต่ละพันธุ์ในการทดสอบ และมีตัวรับการทดลองรวม 53 ตัวรับ คือ การปลูก ตัวเหลืองโดยเฉพาะเชื้อไวรัส เข็มพื้นเมืองสายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 50 เชื้อ ปลูกคือว่า 1 เชื้อ คือ 1 ตัวรับการทดลอง และตัวรับมาตรฐานสำหรับใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพ ของเชื้อไวรัส เข็มพื้นเมืองอีก 3 ตัวรับ คือ การปลูกตัวโดยเฉพาะเชื้อไวรัส เข็มสายพันธุ์มาตรฐาน USDA 110 (S) การปลูกศึกษาใส่ปุ๋ยในโครงเจน 70 ppm $\text{NO}_3\text{-N}$ แต่ไม่ เพาะเชื้อไวรัส เข็ม (N) และการปลูกตัวโดยไม่มีการใส่ปุ๋ยในโครงเจนและไม่เพาะเชื้อ ไวรัส เข็ม (U) แต่ละการทดลอง มีการวางแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) มี 3 ซ้ำ

เนื่องจากข้อจำกัดในด้านขนาดของห้องทดลองและเครื่อง เช่า จึงไม่สามารถจะทดสอบเชื้อไวรัส เข็มสายพันธุ์พื้น เมืองทุกสายพันธุ์ กับตัว เหลืองแต่ละพันธุ์ ได้ในเวลาเดียวกัน ในการดำเนินงานทดลอง จึงแบ่งช่วงเวลาการปลูกตัวเหลืองแต่ละ พันธุ์เป็น 6 ช่วงเวลา ในแต่ละช่วงเวลา จะใช้เชื้อไวรัส เข็มพื้นเมืองสายพันธุ์ต่าง ๆ ในการทดสอบ จำนวน 5-11 เชื้อ แต่มีตัวรับการทดลองมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบ 3 ตัวรับทุกช่วงเวลา

5. การเก็บข้อมูลและการประเมินผลการทดสอบ

เก็บเกี่ยวเมื่อตัวมีอายุได้ 30 วัน เพื่อหาน้ำหนักแห้งต่อต้น ความมกน้อยของบมที่เกิดขึ้น หลังจากนั้นนำบมกัน และรากของตัวแต่ละต้นมาบดรวมกัน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาเบรคเอนค้ในโครงเจนทั้งหมดในตัวอย่างที่ช้โดยวิธี modified

microkjedahl (เนาวรัตน์, 2527) ในการประเมินประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อไรโซเบียม จะใช้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (N uptake) ของต้นถั่วเหลืองเป็นครุชนี้ในการประเมิน โดยมีวิธีการคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (mg N/ต้น)} = \frac{\% N \times \text{น้ำหนักแห้ง (mg/ต้น)}}{100}$$

ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อไรโซเบียมพื้นเมือง จะมีการเปรียบเทียบ 3 ลักษณะ คือ

ก. เปรียบเทียบกับการทดลองที่นำใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และไม่เพาะเชื้อไรโซเบียม และใช้หลักเกณฑ์ซึ่งเสนอโดย Eaglesham (1985) ในการแบ่งกลุ่มดังนี้

1. กลุ่มที่ไม่สร้างปม
2. กลุ่มที่มีประสิทธิภาพ จะให้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นไม่แตกต่างจากการรับที่ใส่ปุ๋ยหรือไม่ใส่ปุ๋ย ที่ระดับ $P > 0.05$

3. กลุ่มที่มีประสิทธิภาพค่อนข้างดี จะให้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นแตกต่างจากการรับที่ใส่ปุ๋ยหรือไม่ใส่ปุ๋ย ที่ระดับ $P < 0.05$

4. กลุ่มที่มีประสิทธิภาพดี จะให้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นแตกต่างจากการรับที่ใส่ปุ๋ยหรือไม่ใส่ปุ๋ย ที่ระดับ $P < 0.01$

5. กลุ่มที่มีประสิทธิภาพดีมาก จะให้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นแตกต่างจากการรับที่ใส่ปุ๋ยหรือไม่ใส่ปุ๋ย ที่ระดับ $P < 0.001$

ข. เปรียบเทียบกับการทดลองที่เพาะเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์มาตรฐาน ซึ่งสามารถจะแบ่งกลุ่มไรโซเบียมพื้นเมืองออก เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนต่ำกว่าสายพันธุ์มาตรฐาน ซึ่งให้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในต้นต่ำกว่า และแตกต่างจากสายพันธุ์มาตรฐานที่ระดับ $P < 0.05$

2. กลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการครึ่งในโครเจนไม่แตกต่างจากสายพันธุ์มาตรฐาน ซึ่งทำให้ปริมาณในโครเจนทั้งหมดในต้น ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์มาตรฐานที่ระดับ $P > 0.05$

3. กลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการครึ่งในโครเจนดีกว่าสายพันธุ์มาตรฐาน ซึ่งให้ครรชนีผลผลิตในโครเจนมากกว่า และแตกต่างจากสายพันธุ์มาตรฐานที่ระดับ $P < 0.05$

ค. เปรียบเทียบกับคาร์บการทดลองที่มีการใส่ปุ๋ยในโครเจน ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มโรโซเบียมพื้นเมืองได้เป็น 3 กลุ่ม

1. กลุ่มที่ให้ปริมาณในโครเจนทั้งหมดในต้น ต่ำกว่าคาร์บการทดลองที่มีการใส่ปุ๋ยในโครเจน ซึ่งให้ปริมาณในโครเจนทั้งหมดในต้นต่ำกว่า และแตกต่างจากการใส่ปุ๋ยในโครเจน ที่ระดับ $P < 0.05$

2. กลุ่มที่ให้ปริมาณในโครเจนทั้งหมดในต้น ไม่แตกต่างจากคาร์บการทดลองที่มีการใส่ปุ๋ยในโครเจน ซึ่งทำให้ปริมาณในโครเจนทั้งหมดในต้นไม่แตกต่างจากการใส่ปุ๋ยที่ระดับ $P > 0.05$

3. กลุ่มที่ให้ปริมาณในโครเจนทั้งหมดในต้น มากกว่าคาร์บการทดลองที่มีการใส่ปุ๋ยในโครเจน ซึ่งทำให้ปริมาณในโครเจนทั้งหมดในต้นมากกว่า และแตกต่างจากการใส่ปุ๋ยในโครเจน ที่ระดับ $P < 0.05$

ความเข้ากันได้ระหว่างเชื้อโรโซเบียมกับพันธุ์ถั่วเหลือง พิจารณาจากความสามารถในการเกิดปม และประสิทธิภาพในการครึ่งในโครเจน โดยถือว่าเชื้อโรโซเบียมที่เข้ากับพันธุ์ถั่วได้ดี จะต้องสร้างปมได้และครึ่งในโครเจนได้ดีกว่าสายพันธุ์มาตรฐาน