บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *Bradyrhizobium* spp. จากปมรากถั่วเหลืองที่ปลูกในเขตอำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัย และจากดินจังหวัดนครนายก

B.japonicum ที่แยกได้จากปมถั่วเหลือง ที่ปลูกในบริเวณที่ยังไม่มีการใช้ปุ๋ยไรโซเบียมมาก่อน ในเขตอำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัย จำนวน 41 ไอโซเลต และจากจังหวัดนครนายก จำนวน 55 ไอโซเลต ในปี ค.ศ.1973 กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงการเกษตรและสหกรณ์ บางเขน ได้ทำการแยกและจำแนกชนิดของเบรดิไรโซเบียม จากพื้นที่แต่ละจังหวัดในประเทศไทย พบ *Bradyrhizobium* spp. จากจังหวัดเพชรบุรี จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ THA205 จากจังหวัดสระบุรี จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์THA301 และTHA302 จากจังหวัดชัยนาท จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์THA201 THA202 THA304 THA305 และTHA306 จากจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์THA307 และจากจังหวัดราชบุรี จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ THA307 และTHA507 ส่วนสายพันธุ์ *B.japonicum* พบที่จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ THA1 THA6 THA7 และ THA9 พบที่จังหวัดลำปางจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ สายพันธุ์THA2 THA3และTHA5 และในปี ค.ศ.1985 พบเชื้อ *Bradyrhizobium* spp.ที่จังหวัดราชบุรี จำนวน 2 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์THA209 และTHA507 Minamisawa และคณะ (1992) แยก *B. japonicum* 49 ไอโซเลต จากไร่ Nakazawa ซึ่งมีขนาด 3,500 ตารางเมตร ในสถานีทดลอง Niigata เมือง Nagaoka จังหวัด Niigata ประเทศญี่ปุ่นในปี ค.ศ. 1987 ซึ่งเป็นบริเวณที่เคยปลูกถั่วเหลืองเป็นระยะเวลา 45 ปี โดยไม่มีการใส่เชื้อมาก่อน ลักษณะของ *B. japonicum* ที่ได้จากการทดสอบทางชีวเคมี เป็นลักษณะของเบรดิไรโซเบียมตามที่ Jordan (1984) ได้ระบุไว้ และ ที่สำคัญคือสามารถผลิตด่างและเกิดปมกับถั่วซิราโทรได้

จึงแน่ใจว่าเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกมาได้เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไปเป็น *Bradyrhizobium* spp.

การจำแนกและจัดกลุ่ม *Bradyrhizobium* spp. ที่คัดแยกได้ โดยลักษณะทางเซรุ่มวิทยาใช้เทคนิคทางด้าน Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

เชื้อ *B. japonicum* ที่แยกจากปมถั่วเหลืองที่ปลูกในเขตอำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัย และจากปมถั่วเหลืองที่ปลูกในดินจังหวัดนครนายก รวมจำนวนทั้งสิ้น 96 ไอโซเลต สามารถจัดกลุ่มได้ 7 กลุ่ม คือ พวกอยู่ในกลุ่ม THA5 พบ 9 ไอโซเลต TAL 944 พบ 17 ไอโซเลต TAL 377 พบ 2 ไอโซเลต USDA 142 พบ 2 ไอโซเลต TAL 432 พบ 2 ไอโซเลต USDA 76 พบ 3 ไอโซเลต และ พวกที่ไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มใดเลยมีจำนวนทั้งสิ้น 61 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่า *B.japonicum* กลุ่มเดียวกัน ยังมีความแตกต่างตามลักษณะฟีโนไทป์ออกไปอีก ซึ่งในปี ค.ศ.1980 Noel และ Brill แยกโปรตีนโดยวิธี SDS เจลอิเลคโตรโฟลิซิส (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *R.japonicum* ทั้งหมด 11 สายพันธุ์ ถูกแยกออกเป็น 5 กลุ่ม ทางเซรุ่มวิทยาคือ c2 c3 123 110 และc1 ในกลุ่ม c2 ได้แก่สายพันธุ์ 71a 111 121 ในกลุ่ม c3 ได้แก่สายพันธุ์ 31 ในกลุ่ม 123 ได้แก่สายพันธุ์ 123 ในกลุ่ม 110 ได้แก่ สายพันธุ์ 16 110 และ กลุ่ม c1 ได้แก่สายพันธุ์ 3 6 24 และ 138 ตามลำดับ โดยจัดรูปแบบของโปรตีน เทียบกับกลุ่มทางเซรุ่มวิทยาโดยวิธีแอคกลูติเนชั่น นอกจากนี้แต่ละสายพันธุ์ที่อยู่ในซีโรกรุ๊ปสามารถแยกออกไปได้อีก และFuhrmann (1990) ได้แยกเชื้อ *B.japonicum* จากปมถั่วเหลืองจากที่ 18 แห่งในมลรัฐ Delaware ได้จำนวน 360 ไอโซเลต ทำการจัดกลุ่มทางเซรุ่มวิทยาโดยวิธี ELISA สามารถแยกได้เป็น 12 กลุ่ม ได้แก่ Serogroup 6 31 38-115 46 76 94 110 122 123 122/123 130 และกลุ่มที่ไม่ทำปฏิกิริยากับเซรุ่มใดเลย นอกจากนี้ ในปี ค.ศ.1990 Minamisawa ศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ ของ *B.japonicum* 25 สายพันธุ์ โดยดูลักษณะการสร้างไรโซไบท็อกซิน ไฮโดรเจนอัพเทค และส่วนประกอบของ EPS (extracellular polysaccharide)และทำการตัดโครโมโซมัลดีเอนเอ เพื่อไฮบริไดซ์กับโพรบของ *nifDK* และ *nifE* ของ *B.japonicum* USDA 110 สามารถแบ่ง *B.japonicum*

ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ จีโนไทป์ 1 และจีโนไทป์ 2 นอกจากนี้ยังพบว่า จีโนไทป์1ไม่ผลิตไรโซไบท๊อกซิน EPS ประกอบด้วยกลูโคส แมนโนส กาแลคโตส 4-O-เมทธิลกาแลคโตส และกรดกาแลคทูโรนิค แต่กลุ่ม 2 ผลิตไรโซไบทอกซิน EPS ประกอบด้วย แรมโนส และ 4-O-เมทธิลกลูคูโรนิคแอซิด มี 23 สายพันธุ์ ที่มีไฮโดรเจนอัพเทค จากการไฮบริไดซ์กับโพรบดีเอนเอปรากฏแถบดีเอนเอที่ 5.9 kb และ ในปี ค.ศ.1991 Basitและคณะ ตรวจสอบลักษณะฟีโนไทป์ของ 34 สายพันธุ์ของ*B.japonicum* serogroup 110 พบว่า แต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันในด้านความสามารถ ในการสร้างปม และการตรึงไนโตรเจนกับ *Glycine max* (L) Merr.cv. Williams 13 สายพันธุ์ มีการทำงานของอัพเทคไฮโดรจีเนส เมื่อเลี้ยงเซลอิสระ ในที่ที่มีไฮโดรเจน 2 เปอร์เซ็นต์ และออกซิเจน แต่ละสายพันธุ์ผลิต โคโลนีที่ใหญ่ มีเมือก หรือ โคโลนีเล็ก แห้ง และพบว่าลักษณะของโคโลนีไม่มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน ดังนั้น จึงเป็นไปได้ที่ว่า *B.japonicum* ที่พบทั้ง 96 ไอโซเลต สามารถที่จะจำแนกออกเป็นกลุ่มย่อยๆได้อีกมากมาย โดยอาศัยความแตกต่างของจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของเชื้อในแต่ละกลุ่ม

ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *B. japonicum* แต่ละไอโซเลต

น้ำหนักแห้งของส่วนลำต้นถั่วเหลือง

ตารางที่ 6 แสดงประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *B. japonicum* จำนวน 96 ไอโซเลต ในรูปของน้ำหนักแห้งของส่วนลำต้นถั่วเหลือง โดยเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยที่ได้จากต้นถั่วเหลืองที่ไม่ได้ใส่เชื้อ ผลการทดลองได้เปรียบเทียบ การเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองสายพันธุ์ สจ.5โดยการชั่งน้ำหนักแห้งของต้น ปรากฏว่า น้ำหนักแห้งของต้นที่ใส่เชื้อตลอดจนไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6,11) สาเหตุที่ต้นถั่วเหลืองแต่ละต้นมีน้ำหนักแห้งของต้นแตกต่างกัน ก็เพราะประสิทธิภาพของไรโซเบียมแต่ละเชื้อ ไรโซเบียมเชื้อใดมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้สูง ย่อมทำให้ต้นถั่วเหลืองมีการเจริญเติบโตได้ดี มีน้ำหนักแห้งของต้นสูงไปด้วย (Ruiz-argueso et al., 1979) ทั้งนี้เพราะไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพ ช่วยเพิ่มธาตุไนโตรเจนให้แก่ต้นถั่วเหลือง ทำให้ต้นถั่วเหลืองมีการ

เจริญเติบโตดี จำนวนใบมาก ใบมีขนาดใหญ่ ในขณะที่ต้นถั่วเหลืองที่ได้รับเชื้อที่ไม่มีประสิทธิภาพและต้นที่ไม่ใส่เชื้อ ทำให้ต้นถั่วเจริญเติบโตช้า จำนวนใบ กิ่งก้านมีน้อยและเล็กลีบ มีสีเหลืองอ่อน ซึ่งเป็นอาการของการขาดธาตุไนโตรเจน จากตารางที่ 5 *B.japonicum* ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม THA 5 มีจำนวน 9 ไอโซเลต กลุ่ม TAL 377 มีจำนวน 2 ไอโซเลต กลุ่ม TAL 944 มีจำนวน 17 ไอโซเลต กลุ่ม TAL 432 มีจำนวน 2 ไอโซเลต กลุ่ม USDA 76 มีจำนวน 3 ไอโซเลตและกลุ่ม USDA 142 มีจำนวน 2 ไอโซเลต พบว่าให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักต้นแห้งอยู่ในช่วง 0.64-1.86 1.03-1.17 0.55-1.53 0.87-1.34 0.70-0.93 และ 0.90-0.91 กรัมต่อต้นตามลำดับ ซึ่งในปี พ.ศ. 2536 นันทกร บุญเกิด และคณะพบว่ากลุ่ม THA 5 USDA 142 จะให้น้ำหนักต้นแห้งสูง คือ อยู่ในช่วง 2.46-3.82 กรัมต่อต้น TAL 432 TAL 944 และ USDA 76 จะให้น้ำหนักแห้งต้นอยู่ในช่วง 2.06-2.38 กรัมต่อต้น

จำนวนปม

การทดสอบประสิทธิภาพของเบรดิไรโซเบียมแต่ละเชื้อกับถั่วเหลืองสายพันธุ์ สจ.5 พบว่าไรโซเบียมแต่ละเชื้อทำให้ต้นถั่วเกิดจำนวนปมแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 7,12) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อไรโซเบียมต่างกันมีประสิทธิภาพในการทำให้ต้นถั่วเกิดปมได้มากน้อยไม่เท่ากัน สอดคล้องกับการทดลองของ McDermott และคณะ(1984)ซึ่งพบว่าการใช้ไรโซเบียมต่างสายพันธุ์กันทำให้จำนวนปมถั่วเหลืองแตกต่างกัน Nutman (1969) ได้รายงานเกี่ยวกับการเกิดปมได้มากหรือน้อยกว่าขึ้นอยู่กับ ความเหมาะสมระหว่างไรโซเบียมกับต้นถั่วในขั้นตอนต่างๆ ของการเข้ารากและทำให้เกิดปม นับตั้งแต่การปลดปล่อยสารของรากพืชสำหรับการเจริญของไรโซเบียม ชนิดที่จะเข้าสู่รากอย่างเฉพาะเจาะจงการกระตุ้นรากขนอ่อนให้โค้งงอก่อนเข้าสร้างปมโดยไรโซเบียม การจับตัวกันระหว่างเซลของไรโซเบียมกับรากขนอ่อนและขั้นตอนไรโซเบียมสร้างท่อ (infection thread) ผ่านเซลพืชเข้าไปในส่วนของราก ดังนั้นอาจจะสรุปได้ว่า การที่ไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ทำให้ต้นถั่วเกิดปมได้มากหรือน้อย ขึ้นกับพันธุกรรมของไรโซเบียม และความเหมาะสมกันระหว่างไรโซเบียมกับต้นถั่ว ในแต่ละขั้นตอนของการเกิดปม ในกรณีที่ไรโซเบียมบางเชื้อทำให้เกิดปมได้น้อย ก็อาจเพราะว่าในขั้นตอนใดขั้นตอน

หนึ่งหรือหลายขั้นตอนของกระบวนการเกิดปม มีความไม่เหมาะสมมากกว่าสายพันธุ์อื่น ทำให้จำนวนปมที่เกิดขึ้นโดยไรโซเบียมเหล่านั้นอยู่ในระดับต่ำ เมื่อเทียบกับไรโซเบียมเชื้ออื่นๆ ส่วนต้นถั่วที่ไม่ใส่เชื้อไรโซเบียมก็ไม่สามารถเกิดปมได้ จากตารางที่ 5 *B.japonicum* ที่จัดอยู่ในกลุ่ม THA5 TAL377 TAL944 TAL432 USDA76 และ USDA142 ให้จำนวนปมอยู่ในช่วง 16.0-69.5 26.2-29.8 11.7-50.7 30.8-59.2 25.5-32.2 และ 12.3-18.2 ปมต่อต้น ซึ่งในปีพ.ศ.2536 นันทกร บุญเกิด และ คณะ พบว่า USDA 76 TAL 432 TAL 944 และ THA 5 จะให้จำนวนปมอยู่ในช่วง 30-43 ปมต่อต้น และ USDA 142 ให้จำนวนปม 24-26 ปมต่อต้น

ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปมกับน้ำหนักแห้งของต้น จากการวิเคราะห์ที่หาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปมกับน้ำหนักแห้งของต้นถั่วมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติมีค่า r = 0.60 ดังแสดงใน ตารางที่ 15 สอดคล้องกับการทดลองของ Wynne.และคณะ(1980) และ นันทกร บุญเกิด และคณะ (2536) ที่พบว่าจำนวนปมมีความสัมพันธ์กันโดยตรงกับน้ำหนักแห้งของต้น ซึ่งแสดงว่าไรโซเบียมเชื้อใด ทำให้ต้นถั่วเกิดปมได้มาก ก็จะทำให้ต้นถั่วมีการเจริญเติบโตได้ดี มีน้ำหนักแห้งของต้นสูง และถ้าเชื้อใดให้จำนวนปมน้อย ต้นถั่วเจริญเติบโตช้า มีน้ำหนักแห้งของต้นต่ำ แต่จากการทดลองได้ค่า r ต่ำแสดงว่าจำนวนปมกับน้ำหนักแห้งของส่วนลำต้นถั่วเหลืองไม่ค่อยมีความสัมพันธ์กันเพราะอาจเป็น numerous ineffective nodules

เบรดิไรโซเบียมบางไอโซเลตเช่น SS5 SS15 SS18 และ SSN26 ให้จำนวนปมน้อยแต่มีน้ำหนักแห้งของต้นถั่วเหลืองสูง และเบรดิไรโซเบียมบางไอโซเลต เช่น SS12 SS17 SS19 และ SSN3 ให้จำนวนปมมากแต่ให้น้ำหนักแห้งของต้นต่ำ อาจเนื่องมาจากขนาดของปมที่เกิดขึ้น กล่าวคือเชื้อไรโซเบียมที่ให้จำนวนปมมาก แต่เป็นปมขนาดเล็กมีเนื้อเยื่อปมที่จะทำการตรึงไนโตรเจนได้น้อย ไม่สมดุลย์กับธาตุอาหารที่พืชต้องการสูญเสียให้กับไรโซเบียม โดยเฉพาะคาร์โบไฮเดรตที่พืชได้จากการสังเคราะห์แสงทำให้พืชเจริญช้า ต้นเตี้ย น้ำหนักแห้งของต้นต่ำ หรือเชื้อนี้เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการสร้างปม แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนก็ได้ และในกรณีที่เชื้อไรโซเบียมให้จำนวนปมน้อยแต่น้ำหนักแห้งของส่วนลำต้นถั่วเหลืองสูงเพราะขนาดของปมใหญ่ ปริมาตรเนื้อเยื่อของปมทั้งหมดจึงมีมาก ทำการตรึงไนโตรเจนได้สูง ต้นถั่ว

มีการเจริญเติบโต น้ำหนักแห้งของต้นก็สูงไปด้วย และเป็นเชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงด้วย

น้ำหนักแห้งปม

เนื่องจากไรโซเบียมแต่ละเชื้อมีความสามารถในการสร้างเนื่อเยื่อปม ได้แตกต่างกัน Nutman(1969) ก็พบว่า ทั้งในถั่วและในไรโซเบียมมีปัจจัยทางพันธุกรรมที่จะควบคุมจำนวนปม และขนาดของปมที่เกิดขึ้น โดยที่ปัจจัยดังกล่าวต่างก็เป็นอิสระต่อกัน ดังนั้นปริมาณเนื้อเยื่อปมที่เกิดขึ้นกับต้นถั่วจะมีมากหรือน้อยน่าจะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของเชื้อ และความเหมาะสมระหว่างเชื้อของไรโซเบียมกับต้นถั่วเหลือง จากตารางที่ 5 *B.japonicum* ที่จัดอยู่ในกลุ่ม THA 5 TAL 377 TAL 944 TAL 432 USDA 76 และ USDA 142 ให้น้ำหนักแห้งปมอยู่ในช่วง 0.04-0.18 0.10 0.04-0.22 0.10-0.20 0.09-0.13 และ 0.06-0.10 กรัมต่อต้น ซึ่งในปี พ.ศ. 2536 นันทกร บุญเกิด และ คณะ พบว่า THA 5 และ USDA 142 ให้น้ำหนักปมแห้ง อยู่ในช่วง 0.18-0.27 กรัมต่อต้น TAL 944 TAL 432 และ USDA 76 ให้น้ำหนักปมแห้งอยู่ในช่วง 0.13-0.18 กรัมต่อต้น

ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของปมกับจำนวนปม จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปมกับน้ำหนักแห้งปม พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่า r =0.63 ดังแสดงในตารางที่ 15 สอดคล้องกับรายงานของ Wynne และคณะ(1980)ที่พบว่าไรโซเบียมสายพันธุ์ใดสร้างปมได้มากทำให้น้ำหนักแห้งของปมสูงตามไปด้วย แต่จากกการทดลอง r ที่ได้มีค่าต่ำ แสดงว่าภายใต้ภาวะการทดลองที่ใช้จำนวนปมไม่มีความสัมพันธ์มากกับน้ำหนักแห้งปมเพราะขนาดของปมที่มีอาจเป็นขนาดต่างๆกัน กล่าวคือมีทั้งกลุ่มไรโซเบียมที่ให้จำนวนปมมากและมีน้ำหนักแห้งของปมสูง กลุ่มไรโซเบียมที่ให้จำนวนปมมากแต่มีน้ำหนักแห้งของปมต่ำ กลุ่มไรโซเบียมที่ให้จำนวนปมน้อยและมีน้ำหนักแห้งปมต่ำ และกลุ่มไรโซเบียมที่ให้จำนวนปมน้อยแต่น้ำหนักแห้งของปมสูง ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณเนื่อเยื่อของปมที่ถูกสร้างขึ้น จากการกระตุ้นของไรโซเบียมที่อยู่ในลักษณะแบคทีรอยด์ภายในปม เช่นกลุ่มที่ไรโซเบียมให้จำนวนปมมากแต่น้ำหนักแห้งของปมต่ำเพราะปมมีขนาดเล็กปริมาตรทั้งหมดของเนื้อเยื่อปมน้อย ก็ทำให้น้ำหนักแห้งของปมต่ำไปด้วย และกลุ่มที่มีปมน้อยแต่ให้น้ำหนักแห้งของปมสูงก็เพราะเป็นปมขนาดใหญ่ ปริมาตรเนื้อเยื่อทั้งหมดของปมมาก

ทำให้น้ำหนักแห้งของปมสูงไปด้วย

ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของปมกับน้ำหนักแห้งของต้น จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของปมกับน้ำหนักแห้งของต้น พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่า r = 0.72 ดังแสดงในตารางที่ 15 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Albrecht และคณะ (1979) พบว่าน้ำหนักแห้งของปมมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญเติบโตของต้นถั่วอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อัตราการตรึงไนโตรเจน

จากการทดลองเมื่อเปรียบเทียบอัตราการตรึงไนโตรเจนของเชื้อเบรดิไรโซเบียม แต่ละเชื้อ ปรากฏว่าเชื้อไรโซเบียมต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 9 ทำให้อัตราการตรึงไนโตรเจนต่างกันด้วย ดังที่ Kang และคณะ (1991) ศึกษาการอยู่ร่วมกัน ของ *B.japonicum* กับถั่วเหลืองโดยใส่เชื้อ *B.japonicum* ที่อยู่ในดิน Korean ทั้ง 7 แห่ง โดยใช้ความเจือจางที่ 10 เท่า และ 1000 เท่า พบว่าปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้ แตกต่างไปตามสายพันธุ์ของไรโซเบียม จากตารางที่ 5 *B.japonicum* ที่จัดอยู่ในกลุ่ม THA 5 TAL 377 TAL 944 TAL 432 USDA 76 และ USDA 142 ให้ ARA อยู่ในช่วง 0.77-2.63 0.83-1.75 0.39-4.24 3.10-4.46 1.26-2.23 และ 0.87-2.23 ไมโครโมลต่อชั่วโมงต่อต้น ซึ่งในปี พ.ศ. 2536 นันทกร บุญเกิด และ คณะ พบว่า THA 5 USDA 142 TAL 432 TAL944 และ USDA 76ให้ค่า ARA 8.36 6.36 4.61 3.27 และ 1.36ไมโครกรัมต่อชั่วโมงต่อต้น ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง ARA กับ น้ำหนักแห้งของต้น จำนวนปม น้ำหนักแห้งของปม พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตารางที่15 มีค่า r = 0.49 0.50 และ 0.63 ตามลำดับ แสดงว่าเชื้อไรโซเบียมที่มีการตรึงไนโตรเจนได้สูงจะมีประสิทธิภาพ ในการทำให้ต้นถั่วเจริญเติบโต ทั้งในด้านส่วนสูง มวลชีวภาพ การทำให้เกิดปม และการสร้างเนื้อเยื่อปมได้สูงด้วย แต่มีบางสายพันธุ์ที่น้ำหนักแห้งต้นสูง จำนวนปมสูง น้ำหนักแห้งปมสูง แต่มีค่า ARA ต่ำ อาจเนื่องมาจากการสังเคราะห์แสงของพืชเกิดได้ไม่เต็มที่ เพราะในห้อง

ทดลองมีความเข้มแสงจำกัด ทำให้อาหารที่เชื้อจะดึงไปใช้มีน้อยลง การทำงานของเซลจึงลดลงไปด้วย มีผลให้ค่า ARA ที่ได้ต่ำ

การศึกษาฟีโนไทป์ของ *hup*

จากการตรวจสอบลักษณะฟีโนไทป์ของยีน *hup* ใน *Bradyrhizobium japonicum* ที่แยกได้จากปมถั่วเหลืองที่ปลูกในเขตอำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัย จำนวน 41 ไอโซเลต และจากปมถั่วเหลืองที่ปลูกในดิน จังหวัดนครนายก จำนวน 55 ไอโซเลต พบลักษณะฟีโนไทป์ *hup* 0 และ 5.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การศึกษาโดยวิธีนี้ก็เพื่อทดสอบว่ามีการสร้างไฮโดรเจนเกิดขึ้นหรือไม่ ภายใต้ภาวะการทดลองที่ใช้ ดังนั้นการที่ตรวจไม่พบฟีโนไทป์ของยีน *hup* อาจเป็นเพราะภาวะการทดลองไม่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของยีน *hup* ในไอโซเลตที่แยกได้ Fuhrmann (1990) พบว่ามีเพียง 15 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการแสดงออกของไฮโดรจีเนส ซึ่งยังน้อยกว่า Keyser และคณะ. (1984) รายงานไว้ว่าพบ *B. japonicum* จากถั่วเหลืองใน Delaware สายพันธุ์ *hup*$^+$ ถึง 25 เปอร์เซ็นต์จากตัวอย่างทั้งหมด 28 ปม การทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของ *hup* บนการเจริญของพืช และบนการตรึงไฮโดรเจน ได้มีการออกแบบการทดลองออกเป็น 2 ประเภท คือการเปรียบเทียบแยกกลุ่มของไอโซเลตที่เป็น *hup*$^+$ และ *hup*$^-$ และการศึกษาเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ *hup*$^+$ และ *hup*$^-$ (Cunningham et al., 1985) ในกรณีของ *B. japonicum* ในการทดลองพบว่าสายพันธุ์ *hup*$^+$ ให้ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งของต้น จำนวนปม น้ำหนักแห้งปม และอัตราการตรึงไนโตรเจน สูงกว่าสายพันธุ์ *hup*$^-$ ไรโซเบียมบางสายพันธุ์สร้างระบบไฮโดรจีเนสในแบคทีรอยด์ในปมพืชตระกูลถั่ว ถั่วเหลืองที่ใส่เชื้อ *B. japonicum* ที่มีระบบไฮโดรจีเนสจะตรึงไนโตรเจน และให้ผลผลิตได้สูงกว่าพวกที่ขาดเอ็นไซม์ไฮโดรจีเนส (Schubert et al.,1978 และ Albrecht et al.,1979)

ในปี 1983 Pahwa และDogra ได้ทดสอบไอโดรเจนอัพเทค จำนวน 25 ไอโซเลต ของ mung bean (*Vigna mungo*) โดยใช้ไตรเฟลนิลเตตราโซเลียมคลอไรด์ (triphenyl tetrazoliumchloride) ไอโซเลตที่สามารถทำปฏิกิริยากับสีได้รวดเร็วในขั้นต้นๆของการเจริญ แสดงว่าไอโซเลตนั้นสามารถดึงไอโดรเจนกลับเข้าไปใช้ได้ (*hup*$^+$) นอกจากนี้ยังได้นำเชื้อที่จำแนกแล้วไปทดสอบกับพืชในเรือนทดลอง พบว่าพืชที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ *hup*$^+$ จะให้ปริมาณน้ำหนักแห้งของลำต้นและปมมากกว่า พวกพืชที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ *hup*$^-$

จากผลการทดลอง ถึงแม้ว่าไอโซเลต SSN10, SSN46, SSN52 จะมีลักษณะฟีโนไทป์ของยีน *hup* แต่ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน .ทั้งน้ำหนักต้นแห้ง จำนวนปม น้ำหนักปมแห้ง และ ARA ก็ไม่ได้อยู่ในกลุ่มไอโซเลตที่ให้ผลผลิตสูงสุด ตารางที่ 18 แสดงว่าลักษณะฟีโนไทป์ของยีน *hup* เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนน้อยมาก เช่นเดียวกับที่ LaFavre และFotch (1983) ปลูก Pigeon pea (*Cajanus cajan*(c.) Mill sp.) ในดินที่มี ^{15}N เป็นตัววัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน เป็นระยะเวลา 51วันหลังการปลูก จากการวิเคราะห์ ^{15}N จากบริเวณส่วนลำต้น พบว่าประมาณ 91-94เปอร์เซ็นต์ ของไนโตรเจนได้มาจากการตรึงไนโตรเจน Pigeon peas ที่ใส่เชื้อสายพันธุ์ P132(*hup*$^+$) พบปริมาณไนโตรเจนสูงกว่าพวกที่ใส่เชื้ออื่นๆและพวกที่ไม่ใส่เชื้อ แต่ก็มีอยู่ 2 สายพันธุ์ *hup*$^+$ ที่ให้ปริมาณไนโตรเจนต่ำกว่าพวก *hup*$^-$ ในปี ค.ศ.1985 Cunningham และคณะ ใช้ *R.leguminosarum* 3855 (*hup*$^-$) ทดสอบกับ *Pisum sativum* L.และ *Vicia benghalensis* L. จากการวัดเคลดาห์ลโดยตรงแสดงให้เห็นว่า อย่างน้อยที่สุด 1 สายพันธุ์ของ*hup*$^-$ สามารถตรึงไนโตรเจนได้มากพอๆกับพวก *hup*$^+$ การวัดอะเซทธิลีนรีดักชั่น ไอโดรเจนที่เกี่ยวข้อง $^3H_2$ และ น้ำหนักต้นแห้ง พบว่าไอโดรเจนที่สร้างขึ้นโดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส ไม่จำเป็นสำหรับการเพิ่มการตรึงไนโตรเจน และสายพันธุ์ *hup*$^-$ มีประโยชน์ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์ *hup*$^+$และในปี ค.ศ.1987 Drevon และ คณะ หาค่าผลของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสใน *B.japonicum* บนการตรึงไนโตรเจน โดยการเปรียบเทียบการเจริญของ *Vigna* และ *Glycine* โดยสายพันธุ์ *hup*$^+$และ *hup*$^-$พบว่าการเจริญของพืชที่ใส่เชื้อที่ไม่มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนส อย่างน้อยที่สุดจะเท่ากับการเจริญของสาย

พันธุ์ที่มีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสสำหรับ *Glycine usuriensis* และ *Glycine max* cv. Hodgsonในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจะสูงเมื่อใช้สายพันธุ์ *hup*$^-$ จะเห็นได้ว่าพลังงานที่ได้จากการนำไฮโดรเจนกลับเข้าไปใช้ภายในเซล เป็นเพียงปัจจัยหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเท่านั้น และปัจจัยที่สำคัญที่สุดก็คือ ภาวะสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของพืช ดังนั้นปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน นอกจาก *nif nod* และ *hup* แล้วน่าจะมีปัจจัยอื่น หรือยีนส์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องสำหรับการตรึงไนโตรเจนร่วมอยู่ด้วย ซึ่งจะต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมต่อไปอีก

ข้อเสนอแนะในการทดลองครั้งต่อไป

1. ควรนำเบรดิไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพที่ได้จากการคัดเลือก ไปทดสอบในกระถางปลูกในเรือนทดลองก่อน แล้วจึงนำไปทดสอบในสภาพไร่(field tests) ซึ่งเป็นการทดสอบขั้นสุดท้ายก่อนที่จะนำเชื้อไรโซเบียมไปใช้ หรือแนะนำให้เกษตรกรเพื่อประเมินความสามารถในการตรึงไนโตรเจน การแข่งขันกับไรโซเบียมที่มีอยู่ในดิน และความทนทานต่อสภาพแวดล้อม และมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูง
2. ควรทำการทดลองหาการผลิตไฮโดรเจน โดยทุกไอโซเลทซ้ำอีก 2 ครั้ง
3. ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ *hup* เพื่อสามารถสังเกตการแสดงออกของเชื้อเบรดิไรโซเบียม ที่มีการแสดงออกของ*hup* ได้อย่างง่ายๆได้