บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันการเพิ่มจำนวนประชากร เป็นจุดเริ่มต้นของปัญหาต่าง ๆ ที่ตามมามากมาย ที่สำคัญคือ ปัญหาการขาดแคลนอาหารและพลังงานเชื้อเพลิง นักวิจัยจึงได้หันมาให้ความสนใจวิธีการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรซึ่งใช้พลังงานน้อย ปัจจัยหลักที่จำกัดการผลิตทางการเกษตร คือ ปุ๋ยไนโตรเจน ในปัจจุบันประเทศไทย นำเข้าปุ๋ยที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบมูลค่าหลายพันล้านบาท ในปี พ.ศ 2535 อัตรานำเข้าปุ๋ย 2,856,116 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่า 12,178,973 พันบาท อัตราการใช้ปุ๋ย 2,806,784 ตัน ปีพ.ศ 2536 อัตรานำเข้าปุ๋ย 3,337,976 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่า 13,856,574 พันบาท มีการใช้ปุ๋ย 3,195,576 ตัน (ข้อมูลจากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงการเกษตรและสหกรณ์) ดังนั้นเพื่อเป็นการลดการนำเข้าปุ๋ยเคมีซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่ง ที่ทำให้สภาพแวดล้อมเสื่อมคุณภาพ จึงหันมาสนใจการใช้ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนทางชีวภาพของเบรดิไรโซเบียมเช่น *Bradyrhizobium japonicum* เป็นแบคทีเรียที่อยู่แบบพึ่งพาอาศัยในปมรากถั่วเหลือง(*Glycine max*) โดย *B. japonicum* ใช้พลังงานจากการสังเคราะห์แสงของถั่วเหลืองในการตรึงหรือเปลี่ยนไนโตรเจนในอากาศให้เป็นแอมโมเนียซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนในรูปแบบที่ถั่วเหลืองนำไปใช้ต่อได้ ในประเทศไทยได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกถั่วเหลืองเป็นพืชหมุนเวียน โดยหน่วยงานราชการ เช่น กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และ หน่วยงานเอกชน เช่น บริษัทกรุงเทพอุตสาหกรรมเมล็ดพันธุ์ จังหวัดลพบุรี ได้ผลิต *B. japonicum* ออกจำหน่ายแก่เกษตรกร เพื่อใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในการปลูกถั่วเหลืองแทนปุ๋ยเคมี แต่เนื่องจากประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของ *B. japonicum* ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น สายพันธุ์เบรดิไรโซเบียม ความเหมาะสมระหว่างสายพันธุ์เบรดิไรโซเบียมและสายพันธุ์ถั่วเหลือง(Moawad et al.,1984) และสภาวะแวดล้อมที่ทำไร่ถั่วเหลือง เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดหรือด่าง แร่ธาตุ และความเค็มของดิน

(Woomer et al.,1988; Singleton et al., 1992) ทางด้านประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน ของสายพันธุ์เบรดิไรโซเบียม ก็มีความแตกต่างกันมาก เบรดิไรโเบียมแต่ละสปีชีส์มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนในระยะดับต่างๆกัน แม้แต่ในสปีชีส์เดียวกัน หรือต่างสายพันธุ์กันก็มีประสิทธิภาพต่างกันด้วย (Mc Dermott and Graham 1990; Basit et al.,1991) และมีความสำคัญมากในการเพิ่มผลผลิตถั่วเหลือง แต่ขณะนี้ยังไม่มีฟีโนไทป์ (phenotype)ของ *B.japonicum* ที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องชี้ (indicator) ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน โดยไม่จำเป็นต้องเลี้ยงต้นถั่วเหลืองที่มีการเติมเบรดิไรโซเบียมลงในดินหรือทราย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องหาฟีโนไทป์ของ *B. japonicum* เพื่อใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ *B.japonicum* ที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนสูง เพื่อนำสายพันธุ์นั้นไปส่งเสริมให้เกษตรกรใช้ หรือเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการตัดต่อเปลี่ยนแปลงยีนสำหรับสร้างสายพันธุ์ *B.japonicum* ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนตามสภาพดินและภูมิอากาศต่างๆ เพื่อเป็นการส่งเสริม ให้มีการใช้แทนปุ๋ยเคมี ตามท้องที่ซึ่งมีสภาพดินและภูมิอากาศต่างๆได้

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและจำแนกสายพันธุ์ *Bradyrhizobium* spp. ตรวจสอบฟีโนไทป์ของยีน *hup* ของ *B.japonicum* โดยการวิเคราะห์ปริมาณกาซไฮโดรเจน ถ้าปริมาณกาซไฮโดรเจนในหลอดเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างน้อยที่สุด 30 เปอร์เซ็นต์ จะถือว่า *B.japonicum* สายพันธุ์ดังกล่าวมีฟีโนไทป์ของยีน *hup* วัตถุประสงค์อีกประการหนึ่งคือการตรวจสอบความเป็นไปได้ที่จะใช้ฟีโนไทป์ของยีน *hup* ในการทำนายความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของ *B.japonicum* โดยทำการทดลอง เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์ของยีน *hup* ของ *B.japonicum* กับศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของ *B.japonicum*ในปมรากถั่วเหลือง และวัตถุประสงค์ย่อยสำหรับงานวิจัยก็คือเพื่อให้ได้มาซึ่งเชื้อเบรดิไรโซเบียมที่แยกจากดินในแหล่งปลูกถั่วเหลือง เพื่อให้ทราบถึงความแตกต่างของเชื้อที่แยกได้ และประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน งานวิจัยเริ่มจากการแยกและจำแนกสายพันธุ์ *B.japonicum* จากปมรากถั่วเหลือง ที่ปลูกในเขตอำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัยและ จากดินในอำเภอเมือง จังหวัดนครนายก เพื่อวิเคราะห์ฟีโนไทป์ของยีน *hup* และหาความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์ของยีน *hup* กับศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน เพื่อเป็นแนวทางการคัดเลือก *B.japonicum* ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน

สูงโดยไม่ต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน ด้วยการเติมเบรดิไรโซเบียมในการเลี้ยงถั่วเหลือง อันเป็นการลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการทดสอบประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของเบรดิไรโซเบียม ก่อนที่จะนำเบรดิไรโซเบียมไปทดสอบในสภาพไร่ เพื่อแนะนำให้เกษตรกรใช้ต่อไป