

การใช้เทคนิคทางด้านนิวเคลียร์และวิธีการอื่นๆ เพื่อการคัดเลือก ถั่วเขียวและเชื้อไรโซเบียมเพื่อการตรึงไนโตรเจน และเพิ่มผลผลิตถั่วเขียว

Screening with Nuclear and Other Techniques for Yield and N₂ Fixation in Mungbean

นันทกร บุญเกิด¹ ปรีชา วดีศิริศักดิ์² อัจฉรา นันทกิจ² เศรษฐา ศิริพิณฑ³
และ Toshifumi Murakami⁴

Nantakorn Boonkerd¹, Precha Wadisirisuk², Achara Nantakit², Setha Siripin³
and Toshifumi Murakami⁴

ABSTRACT

Mungbean (*Vigna radiata*) is a nitrogen fixing crop. To be most useful to farmers the recommended mungbean should obtain nitrogen from atmosphere through symbiotic fixation with rhizobia. The objective of this study was to select mungbean lines and rhizobial strains for high nitrogen fixation. Results obtained from screening of 423 mungbean lines indicated that there were variation in nitrogen fixation, nodulation nitrogenase activity and growth of mungbean lines. The mungbean lines VA 1948, VC 1776, VC 3128, VC 1830, VC 1693 and VC 2335 were higher in nitrogen fixation than the recommended cultivars. Using ¹⁵N natural abundance technique to quantify the amount of nitrogen fixed found that mungbean line fixed nitrogen ranging from 0-300 mg N per plant for 35 days. It was interesting to find that the hybrid line F7 of VC 2768 A/1560 D which was the highest fixing line could fix N up to 19.2 kg per rai, resulted in the farmer could get more profit of 235-300 baht when using this line. In estimating seasonal fixing of nitrogen, it was found that mungbean start fixing N in small amount at early stage and gradually increased until reach maximum at pod filling stage or about 41-45 days and the N fixed was gradually declined until stop fixing at maturity. Investigating of rhizobial strains infecting mungbean cultivars revealed that some strains were specific to a mungbean cultivar. However most mungbean rhizobia were effective. There were high correlation among nodule number, nodule mass, ARA and plant biomass. To quantify nitrogen fixation in mungbean under field condition it is necessary to find a suitable reference or non fixing crop. It was found that sorghum was the most suitable reference plant for measuring N₂ fixation in mungbean. Under normal field condition the selected mungbean line could fix N upto 70%.

Key words: *Bradyrhizobium spp*, mungbean, nitrogen fixation

1 กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร

Soil Microbiology Research Group, Soil Science Division, Department of Agriculture, Bangkok 10900, Thailand.

2 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

3 บริษัทน้ำตาลนครเพชร

Nakorn Pech Sugar Company

4 Tropical Agriculture Research Center, Ohwashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki, 305, Japan

บทคัดย่อ

ศึกษาศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของถั่วเขียว จำนวน 423 สายพันธุ์ ร่วมกับไรโซเบียม พบว่าถั่วเขียว ที่ศึกษามีความแตกต่างกันในองค์ประกอบของขบวนการ ตรึงไนโตรเจน เช่น จำนวนปมรากต่อต้น น้ำหนักแห้ง ของปมรากต่อต้น กิจกรรมเอ็นไซม์ในไตรจินเนสของปม ราก ปริมาณไนโตรเจนในดินถั่วที่ได้มาจากการตรึงไน- ไตรเจน รวมทั้งปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในดินและ น้ำหนักแห้งของดินถั่วเขียวสายพันธุ์ VC 1948, VC 1776, VC 3128, VC 1830, VC 1693 และ VC 2335 จัดได้ ว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงเมื่อ เปรียบเทียบกับพันธุ์แนะนำของทางราชการ การวิเคราะห์ หาปริมาณธาตุไนโตรเจนไอโซโทปด้วยวิธี ¹⁵N Natural Abundance Technique เพื่อเปรียบเทียบศักยภาพใน การตรึงไนโตรเจนของสายพันธุ์ถั่วเขียว ทำให้ทราบว่า ถั่วเขียวต่างสายพันธุ์กันจะมีความสามารถในการตรึงไน- ไตรเจนแตกต่างกันตั้งแต่ 0-300 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ ต้นภายในระยะเวลาปลูกเพียง 35 วัน แหล่งธาตุไนโตร- เจน ที่ถั่วใช้ในการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตส่วนมาก ได้มาจากขบวนการตรึงไนโตรเจน เมื่อคำนวณการตรึง ไนโตรเจนต่อพื้นที่ปลูกพบว่า สายพันธุ์ F7 VC 2768 A/ 1560 D line 2 สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่าสายพันธุ์ อื่นๆ ของการทดลองครั้งนี้ คือ ตรึงได้สูงถึง 19.2 กิโล- กรัมต่อไร่ ซึ่งทำให้ประหยัดการซื้อปุ๋ยเคมีไนโตรเจนได้ ถึง 235-300 บาทต่อไร่ ศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน ตลอดช่วงระยะการเจริญเติบโตของถั่วเขียวนั้นจะแตกต่าง กันไป โดยที่ถั่วเขียวเริ่มตรึงไนโตรเจนตั้งแต่ช่วงที่มีการ พัฒนาทางลำต้นและใบ การตรึงไนโตรเจนจะเพิ่มขึ้น เรื่อยๆ จนกระทั่งสูงสุดเมื่อถั่วเขียวอยู่ในช่วงมีพัฒนาฝัก และเมล็ดอายุประมาณ 41-45 วัน ภายหลังจาก นั้นศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนจะลดลงจนกระทั่งถั่ว เข้าสู่ช่วงที่เมล็ดสุกแก่และเก็บเกี่ยว สำหรับการศึกษาสาย พันธุ์เชื้อไรโซเบียมกลุ่ม cowpea group ต่อศักยภาพใน การตรึงไนโตรเจนของถั่วเขียวนั้นพบว่า มีเชื้อไรโซเบียม บางสายพันธุ์ที่จำเพาะเจาะจงกับถั่วเขียว และไรโซเบียม

ส่วนใหญ่สามารถเข้าสร้างปมรากและมีกิจกรรมการตรึง ไนโตรเจนร่วมกับถั่วเขียวได้ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างจำนวน และน้ำหนักแห้งปมรากกับกิจกรรมเอ็นไซม์ในไตรจินเนส ของปมรากอยู่ในเกณฑ์ที่สูง ผลการคัดเลือกพืชอ้างอิง เพื่อวัดการตรึงไนโตรเจนในไร่พบว่า ข้าวฟ่างเหมาะสม ที่จะใช้เป็นพืชอ้างอิงเพื่อวัดการตรึงไนโตรเจนในถั่วเขียว และพบว่าในสภาพไร่ถั่วเขียวสามารถตรึงไนโตรเจนได้ถึง 70%

คำนำ

ถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) เป็นพืช ตระกูลถั่วอายุสั้นที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สามารถ ปลูกเป็นทั้งพืชหลักและพืชรองในระบบการปลูกพืช การผลิตถั่วเขียวนั้นจะมุ่งไปถึงการให้ผลผลิตเมล็ดซึ่งมี โปรตีนสูง ย่อยสลายง่ายและสามารถดัดแปลงเป็นอาหาร สำหรับมนุษย์บริโภคได้หลายชนิดในบางครั้งก็ใช้เลี้ยงสัตว์ หรืออาจจะไถกลบถั่วเขียวเป็นปุ๋ยพืชสดเพื่อปรับปรุง โครงสร้างและความอุดมสมบูรณ์ของดิน ลักษณะพิเศษ ของถั่วเขียวอีกหลายๆ อย่างก็คือ ก่อนข้างทนทานต่อ ความแห้งแล้ง มีส่วนประกอบของกรดอะมิโนไลซีนใน เมล็ดสูงกว่าเมล็ดธัญพืช เมื่อรับประทานแล้วเกิดก๊าซ ก่อนข้างน้อยต่างจากถั่วลิสง นอกจากนั้นถั่วเขียวยังปรับ บำบัดเข้ากับสภาพแวดล้อมค่อนข้างกว้างขวาง และที่สำคัญ นั้นถั่วเขียวสามารถตรึงไนโตรเจนได้เมื่ออยู่ร่วมกันกับ เชื้อไรโซเบียม (*Bradyrhizobium* spp.) ดินในเขตร้อน ชื้นเช่นประเทศไทย โดยทั่วๆ ไปนั้นมีความอุดมสมบูรณ์ ค่อนข้างต่ำ การสูญเสียและการชะล้างธาตุไนโตรเจนไป จากดินมีอัตราสูงมาก ดังนั้นแหล่งธาตุสำหรับการเจริญ เติบโตของพืชตระกูลถั่วรวมทั้งถั่วเขียวนั้น ส่วนใหญ่ได้ มาจากขบวนการตรึงไนโตรเจน

การที่จะให้ถั่วเขียวมีการตรึงไนโตรเจนเต็มศักย- ภาพทางด้านพันธุกรรมของถั่วเขียวนั้น จำเป็นที่ถั่วจะต้องได้ รับเชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจน และเชื้อไรโซเบียมส่วนมากก็มีความแตกต่างกันในด้านการตรึงไนโตรเจน (Boonkerd et al., 1978) ในการคัด

เลือกพันธุ์เพื่อการตรึงไนโตรเจนสูงจำเป็นจะต้องใช้ตัวเป็นจำนวนมาก เทคนิค และวิธีการใช้วัดการตรึงไนโตรเจนจำเป็นจะต้องเป็นวิธีที่เชื่อถือได้และใช้ได้สะดวกและรวดเร็วแม่นยำซึ่งมีหลายวิธีได้แก่ acetylene reduction assay (Hardy *et al.*, 1968), ureide assay (McClure *et al.*, 1980) และการใช้ไอโซโทป ^{15}N (Rennie *et al.*, 1978) Herridge (1982) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการวัดการตรึงไนโตรเจนในตัวเหลืองโดยวิธี ureide assay และ acetylene reduction assay อย่างละเอียด และพบว่าทั้ง 2 วิธี มีข้อดีและข้อเสียต่างกันและสรุปว่าในสภาพไร่การวัดโดยวิธี ureide assay เชื่อถือได้ดีกว่า และ Herridge *et al.*, (1990) ยังได้ทำการเปรียบเทียบการวัดการตรึงไนโตรเจนเพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ด้วยวิธี ureide และ natural ^{15}N abundance และพบว่า ทั้ง 2 วิธี ให้ผลใกล้เคียงกัน จึงแนะนำว่าถ้าจะทำการคัดเลือกพันธุ์ตัวเป็นจำนวนมากควรใช้วิธี ureide assay ทำการคัดเลือกให้เหลือจำนวนน้อยก่อน เพื่อง่ายและถูกกว่า

งานวิจัยครั้งนี้ได้ดำเนินงานทั้งในกระถางซีเมนต์และในไร่ การทดลองในกระถางซีเมนต์ได้ใช้เทคนิคของ acetylene reduction และ natural ^{15}N abundance เพื่อคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวให้ได้จำนวนน้อยลงแล้วนำไปทดลองต่อในสภาพไร่และใช้เทคนิคทางด้านนิวเคลียส ^{15}N เพราะเป็นวิธีที่ใช้วัดปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงทั้งหมด

อุปกรณ์และวิธีการ

การคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่เหมาะสมกับถั่วเขียว

นำไรโซเบียมในกลุ่ม cowpea (*Bradyrhizobium* spp.) ที่ได้จากแหล่งต่างๆ จำนวน 30 สายพันธุ์ ทำการคัดเลือกกับถั่วเขียวที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตสูง 4 พันธุ์ คือ VC 2768A, VC 1560D, VC 1973A VC 2768A / 1560D วางแผนงานวิจัยแบบ randomized complete block มี 3 ซ้ำ โดยทำใน Leonard jar ที่ปลูกในเรือนกระจก

การคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวที่ตรึงไนโตรเจนสูงในถังซีเมนต์

ทำการคัดเลือกถั่วเขียวจำนวน 423 สายพันธุ์ที่ได้

มาจากแหล่งต่างๆ เช่น AVRDC ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท TARC และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มาทำการคัดเลือกในถังซีเมนต์ขนาด $75 \times 75 \times 50$ ซม. บรรจุด้วยดิน ผสมกับขี้เถ้าแกลบให้มี pH ดินผสม 6.8 และผสมขี้เถ้าโพดบดลงไปประมาณ 2% แล้วใส่ไรโซเบียมสายพันธุ์ผสมที่มีประสิทธิภาพสูงที่ได้จากการคัดเลือกในตอนแรก 1 ทำการปลูกถั่วเขียว 1 สายพันธุ์ต่อถังๆ ละ 12 หลุม ทำการบันทึกข้อมูลที่เป็นองค์ประกอบของการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี acetylene reduction ปริมาณไนโตรเจนในดินและวัดการตรึงไนโตรเจนโดยไอโซโทป ^{15}N โดยวิธี ^{15}N natural abundance

การประเมินการตรึงไนโตรเจนถั่วเขียวพันธุ์คัดเลือกในสภาพไร่

ก. การหาพืชอ้างอิง

ทำการทดลองที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาทในเดือนกุมภาพันธ์ 2534 โดยใช้พืชที่ไม่ตรึงไนโตรเจน 3 ชนิด คือ ข้าวฟ่างพันธุ์ชัยนาท 60 ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 และ ข้าวไร้พันธุ์ UPL และใช้ถั่วเขียวที่ตรึงไนโตรเจนสูง 2 พันธุ์ คือ VC 2786 A, VC 4000-7 ทำการวางแผนงานทดลองแบบ randomized complete block ทำ 4 ซ้ำ ใช้เทคนิค ^{15}N natural abundance ทำการวัดการตรึงไนโตรเจน

ข. การคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวที่ตรึงไนโตรเจนสูง

ทำการทดลองที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาทในเดือนกรกฎาคม 2534 โดยใช้ถั่วเขียว 13 พันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกมาแล้ว และใช้ข้าวโพดนครสวรรค์ 1 และ ข้าวฟ่างพันธุ์ชัยนาท 60 ซึ่งพบว่าเป็นพืชอ้างอิงที่ดี ทำการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 2 ระดับ คือ 0 และ 3 กิโลกรัมต่อไร่ วางแผนงานวิจัยแบบ randomized complete block มี 4 ซ้ำ ทำการเก็บข้อมูล น้ำหนัก ต้นแห้ง ผลผลิตเมล็ด ปริมาณไนโตรเจนในดินและเมล็ด และวัดการตรึงไนโตรเจนที่ได้ทั้งหมดโดยวิธี ^{15}N natural abundance

ผล

การคัดเลือกเชื้อไรโซเบียม

จากการคัดเลือกไรโซเบียม 30 สายพันธุ์กับถั่วเขียว 4 พันธุ์ หนึ่งในสามของสายพันธุ์ไรโซเบียมมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงกับถั่วเขียวพันธุ์ VC 1973A สายพันธุ์ที่ได้ผลผลิตต้นสูงคือ TAL 441, USDA 3267, NC 56.2, TA 420, TAL 425, THA 302, THA 304, CB 756 และ USDA 3188 (Table 1) การเกิดปมและการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี acetylene reduction ให้ผลในการทำนองเดียวกัน ในถั่วเขียวพันธุ์ 2786A พบว่าไรโซเบียมที่ใช้มีเพียง 50% ที่เข้าได้กับถั่วพันธุ์นี้ และทำให้การตรึงไนโตรเจนสูง คือ CB 756, USDA 3188, THA 305, THA 307, TAL 425, TAL 209 และ THA 304 (Table 1) ในขณะที่พันธุ์ VC 1560D พบไรโซเบียม ถึง 25 พันธุ์จาก 30 สายพันธุ์ มีการตรึงไนโตรเจนสูงกับถั่วเขียวพันธุ์นี้ แสดงให้เห็นว่าไรโซเบียมและพันธุ์ถั่วมีความสัมพันธ์และมีความเฉพาะซึ่งกันและกันในการตรึงไนโตรเจนร่วมกัน ซึ่งจะมียากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับพันธุ์ถั่วนั้นๆ

เป็นที่น่าสังเกตว่าถั่วเขียวลูกผสมระหว่าง VC 2768A/1560D มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าพันธุ์พ่อและแม่ ประมาณ 50% ของสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงกับพันธุ์ลูกผสมเหมือนกับพันธุ์แม่ VC 2768A สายพันธุ์ไรโซเบียมที่ตรึงไนโตรเจนสูงสุดกับพันธุ์ลูกผสมเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงกับพันธุ์พ่อและแม่ (Table 1)

จากการหาความสัมพันธ์ระหว่างการตรึงไนโตรเจน น้ำหนักปม %N และไนโตรเจนทั้งหมดพบว่า สหสัมพันธ์สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2) และพบว่าไรโซเบียมสายพันธุ์ TAL 442 ไม่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนกับถั่วเขียวทุกๆ พันธุ์

ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเขียวที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน

จากการศึกษาเบื้องต้นของการตรึงไนโตรเจนของถั่วเขียวจำนวน 72 พันธุ์จาก 423 สายพันธุ์ ทำการวัด

การตรึงไนโตรเจนโดยวิธี ^{15}N เมื่ออายุ 33 วัน พบว่าถั่วเขียวมีความแตกต่างกันในด้านการตรึงไนโตรเจนบางพันธุ์มีความสามารถในการใช้ไนโตรเจนในอากาศสูง แต่บางพันธุ์ส่วนใหญ่ได้ไนโตรเจนจากดิน และพันธุ์ที่มีไนโตรเจนในต้นสูงส่วนใหญ่ได้ไนโตรเจนจากดิน (Figure 1) จุดประสงค์ของการศึกษานี้ก็เพื่อที่จะหาพันธุ์ถั่วเขียวที่ให้ไนโตรเจนและผลผลิตสูง ซึ่งได้มาจากการตรึงไนโตรเจนในอากาศ

ในถั่วเขียวทั้งหมด 423 สายพันธุ์ พบว่ามีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนที่แตกต่างกัน เช่น จำนวนปมรากต่อต้น ถั่วเขียวสายพันธุ์ต่างกันจะมีการสร้างปมรากที่แตกต่างกันมาก อยู่ในช่วงตั้งแต่ 11-338 ปมรากต่อต้น แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ถั่วเขียวที่ต่างกันนั้นจะยอมรับให้เชื้อไรโซเบียมเข้าสร้างปมรากที่แตกต่างกัน บางสายพันธุ์ เช่น VC 1776 สร้างปมรากเป็นจำนวนสูงถึง 334 ปมต่อต้น ในขณะที่สายพันธุ์ UT 7814 สร้างปมรากเพียงแค่ว่า 11 ปมต่อต้นเท่านั้น สำหรับพันธุ์ กพส 1 และ มอ 1 นั้นสร้างปมรากต่อต้น 37 และ 130 ปมตามลำดับ (Table 3) จึงสามารถกล่าวได้ว่าพันธุกรรมของถั่วเขียวเป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการสร้างปมรากต่อต้นเพราะในการทดลองนั้นได้ให้ปัจจัยของเชื้อไรโซเบียมและสิ่งแวดล้อมที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด ผลของการคัดเลือกไม่ปรากฏว่า มีสายพันธุ์ถั่วเขียวที่ไม่มีปมรากเลย และเมื่อพิจารณาถึงน้ำหนักแห้งของปมรากต่อต้น ซึ่งจะบอกถึงขนาดของปมรากได้ด้วย พบว่าถั่วเขียวบางสายพันธุ์มีปมรากขนาดค่อนข้างใหญ่บางสายพันธุ์มีปมรากขนาดเล็ก บางสายพันธุ์มีปมรากต่อต้นจำนวนมากแต่มีขนาดปมรากเล็ก เช่น พันธุ์ VC 3192 เป็นต้นการที่ถั่วเขียวสร้างปมรากที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่และมีจำนวนปมรากมากนั้นน่าจะเป็นข้อดีไม่เพียงเฉพาะต่อการตรึงไนโตรเจนเท่านั้น แต่จะทั้งหรือเหลือซากปมรากและรากถั่วเขียวซึ่งเป็นแหล่งสะสมของธาตุไนโตรเจนไว้ในดิน ย่อมเป็นการยกระดับความอุดมสมบูรณ์ของดินและอินทรีย์วัตถุในดินอย่างมาก จึงเป็นเหตุผลอีกข้อหนึ่งที่กล่าวว่า พืชตระกูลถั่วนั้นช่วยรักษาสภาพของพื้นที่ปลูกพืชให้ดีและเหมาะสมอยู่เสมอ แต่อย่างไรก็ตาม การคัดเลือกถั่วเขียวที่มีจำนวนปมราก

Table 1 Screening of *Bradyrhizobium sp.* (cowpea group) strains for high N₂ fixation in mungbean lines.

Strains	VC 1973 A			VC 2768 A			VC 1560 D			VC 2768 A/1560 D		
	Shoot DWT (g/pl)	Nod. DWT (mg/pl)	ARA μ mole C ₂ H ₄ /pl/hr	Shoot DWT (g/pl)	Nod. DWT (mg/pl)	ARA μ mole C ₂ H ₄ /pl/hr	Shoot DWT (g/pl)	Nod. DWT (mg/pl)	ARA μ mole C ₂ H ₄ /pl/hr	Shoot DWT (g/pl)	Nod. DWT (mg/pl)	ARA μ mole C ₂ H ₄ /pl/hr
TAL 209	1.45 c-h	137 ab	2.55 ab	1.75 a-d	145 ab	7.22 a-d	3.08 a-d	127 a-d	5.47 a	2.72 d-g	260 a-c	20.13 a-h
TAL 420	2.50 a-c	142 ab	5.76 a	1.47 a-f	108 b-f	3.57 c-f	3.26 ab	124 a-e	2.86 a-d	4.34 a-e	319 a-d	32.92 a-d
TAL 425	2.47 a-c	101 a-f	3.25 ab	1.79 a-d	99 b-g	6.36 a-e	3.12 a-d	107 b-e	2.36 a-d	4.41 a-e	293 a-d	29.14 a-g
TAL 441	2.59 a	117 a-c	2.12 ab	1.45 a-f	110 b-f	6.80 a-e	3.41 ab	149 a-d	1.84 cd	4.09 b-e	390 ab	19.26 a-h
TAL 442	0.50 jk	51 d-g	1.48 ab	0.32 jk	41 g-i	1.19 e-f	1.01 fg	63 d	1.80 cd	0.37 i	17 g-h	0.90 hg
TAL 1000	1.20 h-k	56 e-g	3.21 ab	1.15 c-i	95 b-h	9.40 a-c	2.50 a-e	132 a-d	2.84 a-d	4.05 b-f	236 b-f	38.63 ab
TAL 1127	1.77 a-g	71 c-f	3.68 ab	1.43 b-g	104 b-g	5.90 a-f	2.73 a-e	129 a-d	2.14 b-d	4.75 a-d	302 a-d	31.67 a-e
THA 201	1.85 a-g	87 b-f	6.06 a	1.07 c-j	85 b-h	7.50 a-d	3.46 ab	160 ab	3.22 a-d	4.17 b-e	359 a-c	41.09 a
THA 202	1.23 h-k	62 c-g	4.44 ab	0.83 f-k	51 e-i	5.46 b-f	2.67 a-e	99 c-e	4.27 a-c	5.23 a-c	307 a-d	36.95 a-c
THA 205	1.70 a-g	64 c-g	3.57 ab	1.40 b-g	58 d-i	7.54 a-d	3.22 ab	126 a-d	2.00 c-d	4.53 a-e	260 a-e	36.24 a-c
THA 302	2.16 a-f	107 a-e	3.75 ab	1.69 a-e	115 a-e	5.40 b-f	3.38 ab	141 a-d	1.80 c-d	5.39 a-c	351 a-c	27.66 a-h
THA 304	2.30 a-d	85 b-f	2.50 ab	1.95 ab	109 b-f	4.40 b-f	3.57 ab	111 a-e	2.50 a-d	5.00 a-c	364 a-c	29.22 a-f
THA 305	1.54 b-h	87 b-f	0.98 ab	1.82 a-c	98 b-h	4.92 b-f	3.36 ab	135 a-d	1.84 cd	5.13 a-e	362 a-c	22.22 a-h
THA 307	1.58 a-g	101 a-f	2.29 ab	1.55 a-f	128 a-c	2.49 d-f	2.47 a-e	136 a-d	3.04 a-d	4.45 a-e	404 ab	23.31 a-h
THA 308	1.99 a-f	91 b-f	3.52 ab	1.61 a-f	107 b-g	6.44 a-e	3.19 ab	159 a-c	4.77 a-c	4.52 a-e	389 ab	36.49 a-c
THA 309	1.24 e-k	48 e-g	2.61 ab	1.39 b-h	88 b-h	5.90 a-f	3.17 a-c	161 ab	5.40 ab	0.42 i	6 h	0.70 h
NC 3.1	1.47 b-h	88 b-f	1.87 ab	1.39 b-h	106 b-g	7.38 a-d	2.43 b-e	109 b-e	4.93 a-c	0.66 hi	79 e-h	9.42 c-h
NC 7.1	0.83 i-k	43 fg	1.15 ab	1.01 d-j	74 c-h	5.36 b-f	1.99 c-f	93 de	4.49 a-c	0.54 i	20 gh	2.41 f-h
NC 56.2	2.33 a-d	160 a	3.35 ab	0.84 f-k	74 c-h	7.83 a-d	2.53 a-e	111 a-e	3.57 a-c	0.76 h-i	49 f-h	2.93 f-h
NC 70.1	1.35 d-j	97 a-f	3.67 ab	1.05 c-j	76 c-h	9.68 ab	1.93 d-f	119 a-e	3.78 a-c	0.75 g-i	64 f-h	5.72 d-h
NC 83.2	1.22 h-k	101 a-f	2.21 ab	0.65 g-k	47 j-i	3.18 d-f	2.42 b-e	107 b-e	2.70 a-d	0.60 hi	43 f-h	4.48 e-h
NC 92	2.32 a-d	104 a-f	4.73 ab	1.46 a-f	95 b-h	5.03 b-f	3.09 a-e	111 a-e	3.04 a-d	5.89 ab	294 a-d	35.55 a-c
NC 146.1	2.20 a-f	102 a-f	5.26 a	1.81 a-c	93 b-h	7.23 a-d	3.41 ab	138 a-d	3.25 a-d	6.23 a	371 ab	37.64 a-c
USDA 3188	2.32 a-d	118 a-c	3.54 ab	1.95 a-d	179 a	1.67 a	3.11 a-d	116 a-e	2.45 a-d	3.81 c-f	279 a-d	20.39 a-h
USDA 3267	2.51 ab	111 a-e	1.73 ab	1.61 a-f	135 a-c	3.98 b-f	3.65 a	145 a-d	3.44 a-c	5.07 a-c	448 a	16.72 a-h
T-1	1.57 a-g	87 b-f	4.31 ab	1.33 b-h	98 b-h	5.64 b-f	2.90 a-d	119 a-e	3.86 a-c	2.89 d-f	170 c-h	12.68 b-h
PRC 008	1.57 a-g	101 a-f	2.40 ab	1.27 b-h	117 a-d	7.00 a-e	2.59 a-e	170 a	2.60 a-d	6.91 b-f	331 a-d	14.81 a-h
CB 756 eff	2.20 a-f	115 a-c	2.88 ab	2.22 a	111 b-f	3.57 e-f	3.55 ab	165 ab	3.07 a-d	5.63 a-c	363 a-d	37.11 a-c
32-H-1	1.90 a-f	96 a-f	3.25 ab	1.17 b-j	93 b-h	3.37 d-f	2.64 a-e	124 a-d	4.84 a-c	2.65 e-h	211 b-g	16.82 a-h
176-A-22	1.32 a-j	79 b-f	4.05 ab	0.93 e-j	100 b-g	4.17 b-f	2.80 a-e	151 a-d	5.51 a-c	2.01 f-i	145 d-h	9.71 c-h
CONTROL	0.21 k	0 g	0.00 c	0.13 k	0 i	0.00 f	0.25 g	0 e	0.00 d	0.37 i	0 h	0.00 h

Values within a column followed by the same letters are not statistically different at the 0.05 level

Table 2 Correlation among N_2 fixation components at flowering and pod initial development stages (VC 2768 A/1560 D).

Index	Nodule no (/plant)	Nodule wt (mg/plant)	ARA (μ mole C_2H_4 plant/hr)	N (%)	Total N (mg / plant)
Shoot dry weight (g/plant)	.71**	.86**	.63**	.72**	.97**
Nodule number (number plant)		.75**	.47**	.61**	.73**
Nodule weight (mg/plant)			.70**	.64**	.81**
ARA (μ mole C_2H_4 /plant/hr)				.58**	.63**
% N					.82**
Total N (mg/plant)					-

** Significant at the 1% level

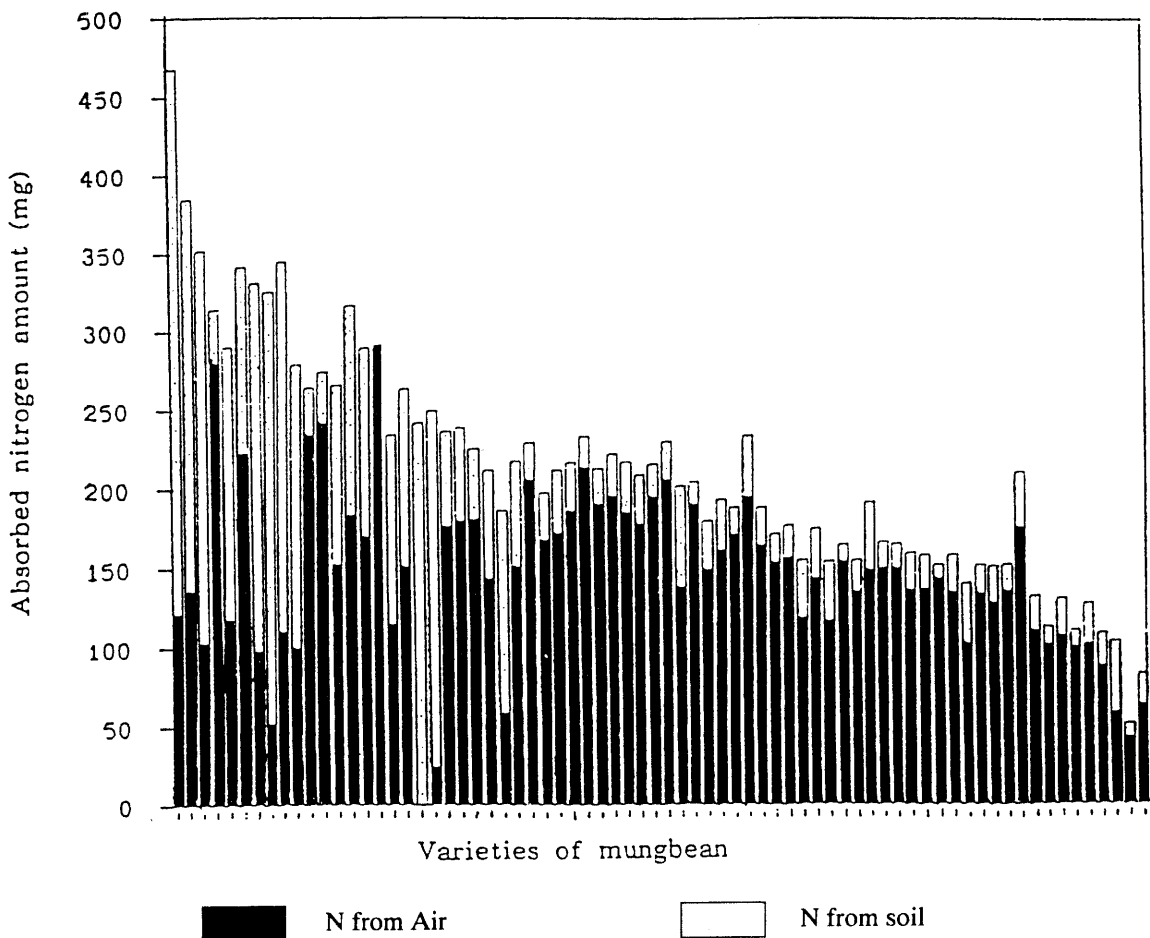


Figure 1 Absorbed nitrogen sources in each mungbean varieties.

Table 3 Nitrogen fixing components in some mungbean lines.

Mungbean lines	Nodule no/plant	Nodule wt (g/plant)	ARA (μ mole C_2H_4 /plant/hr)	Plant DWT (g/plant)	N (%)	Total N (mg/plant)
VC 1948	249	0.322	11.39	5.48	2.61	143
VC 1776	334	0.212	9.36	5.79	3.77	218
VC 3182	140	0.201	8.90	7.08	1.25	89
VC 1830	168	0.137	8.71	4.01	2.60	104
VC 1693	145	0.206	8.14	5.60	2.65	148
VC 2335	246	0.289	8.13	7.54	2.71	204
KPS 1	37	0.025	1.79	8.51	4.05	345
PSU 1	130	0.052	0.82	10.10	4.63	468
UT 7814	11	0.004	0.14	6.80	3.40	231

และน้ำหนักแห้งปมรากต่อต้นมากนั้น จะต้องศึกษาถึงองค์ประกอบการตรึงไนโตรเจนอื่นๆ อีกเช่น กิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจิเนสของปมรากในการตรึงไนโตรเจนเป็นสำคัญด้วย

วิธีที่สะดวกและประหยัดเวลา ค่าใช้จ่ายในการตรวจวัดกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของปมรากคือ Acetylene Reduction Assay (ARA) ปมรากของถั่วเขียวสายพันธุ์ต่างกัณนั้นมีกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจิเนสที่ต่างกันตั้งแต่ 0.05-11.39 μ mole C_2H_4 /ต้น/ชม. ถั่วเขียวสายพันธุ์ VC 1948 นั้นมีกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจิเนสของปมรากสูงที่สุดคือ 11.39 μ mole C_2H_4 /ต้น/ชม. ในขณะที่พันธุ์ กพส 1 และ มอ 1 มีปริมาณเพียง 1.79 และ 0.82 μ mole C_2H_4 /ต้น/ชม. ตามลำดับเท่านั้น พืชพันธุ์แนะนำของทางราชการส่วนมาก นักปรับปรุงพันธุ์และนักสรีระวิทยาทางพืช ได้เน้นปรับปรุงและคัดเลือกให้ได้พันธุ์ที่มีผลผลิตสูงและตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจน จึงเข้าใจว่าเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความสามารถทางด้านการตรึงไนโตรเจนร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ดินนั้นมีความน้อยขำงต่ำ หรือพันธุกรรมการตรึงไนโตรเจนของพืชบางสายพันธุ์อาจถูกคัดทิ้งไปในระหว่างขั้นตอนของการปรับปรุงพันธุ์นั้นๆ ก็ได้

องค์ประกอบที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งที่ใช้ในการพิจารณาศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนคือน้ำหนักแห้งของต้นถั่ว ถั่วเขียวสายพันธุ์ที่มีการสร้างน้ำหนักแห้งต่อต้นในช่วงเวลาก่อนการออกดอกได้ค่อนข้างมากและ

รวดเร็ว นั้น น่าจะเป็นถั่วสายพันธุ์ที่มีการสร้างปมรากและมีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนได้สูงในระยะแรกของการเจริญเติบโต ถั่วเขียวหลายสายพันธุ์มีลักษณะดังกล่าว เช่น F7 VC 2768 A/1560 D line 2, VC 3890A, VC 1482C และ VC 1776 เป็นต้น สายพันธุ์เหล่านี้นอกจากจะมีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงแล้วยังมีอายุเก็บเกี่ยวที่สั้นอีกด้วย จึงถูกคัดเลือกเพื่อใช้เป็นพ่อพันธุ์สำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวเพื่อเพิ่มศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน

สำหรับผลของการวิเคราะห์หาธาตุไอโซโทปไนโตรเจน ^{15}N ในต้นถั่วเขียวด้วยวิธี ^{15}N natural abundance technique นั้นพบว่า แหล่งธาตุไนโตรเจนที่ถั่วเขียวใช้ในการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตนั้นได้มาจากการตรึงไนโตรเจนมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ถั่วเขียวสายพันธุ์ VC 2754A, VC 2755A, VC 2768B, F7 VC 2768 A/1560 D line 2 และ UT 7807 มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนที่สูงมาก เพราะค่าสัดส่วนระหว่างปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในต้น (contribution nitrogen %) มีค่าสูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Table 4) ซึ่งสายพันธุ์ถั่วเขียวเหล่านี้ถ้าหากปลูกในสภาพไร่ในอัตราปลูกแนะนำของทางราชการ 64,000 ต้นต่อไร่ และยังมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูงใกล้เคียงกับการทดลองครั้งนี้ จะสามารถตรึงไนโตรเจนต่อพื้นที่ปลูก 1 ไร่ได้ 16.0-19.2 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ ภายหลังจากการปลูกเพียง 33

วันเท่านั้น นับได้ว่าการปลูกถั่วเขียวมีประโยชน์อย่างมากสำหรับการบำรุงดิน เพราะปริมาณไนโตรเจนที่ได้รับการตรึงนั้นมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำมาก ประหยัดเงินซื้อปุ๋ยไนโตรเจนได้ไร่ละหลายร้อยบาทการจะใส่ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนลงไปดินในรูปของปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตหรือยูเรียเพื่อให้ได้เนื้อปุ๋ยไนโตรเจน 16-20 กิโลกรัมต่อไร่ นั้นจำเป็นต้องใส่ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตมากกว่า 100 กิโลกรัม และปุ๋ยยูเรียมากกว่า 50 กิโลกรัมต่อไร่ (ปกติพืชจะใช้ N ได้ไม่เกิน 50%) ซึ่งคิดเป็นมูลค่าปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตประมาณ 300 บาท และปุ๋ยยูเรีย 235 บาท ดังนั้นสายพันธุ์ถั่วเขียวที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนจึงสามารถลดต้นทุนการผลิตโดยเฉพาะต้นทุนของปุ๋ยไนโตรเจนซึ่งไม่รวมค่าขนส่ง และค่าแรงงานในการใส่ปุ๋ยได้ถึง 235-300 บาทต่อไร่ (เศรษฐา และคณะ, 2533 ก)

การศึกษาศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนตลอดช่วงระยะการเจริญเติบโตของถั่วเขียว

ถั่วเขียวจะเริ่มตรึงไนโตรเจนภายหลังจากการงอกประมาณ 16 วัน ปริมาณการตรึงไนโตรเจนจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งถั่วเขียวอยู่ในช่วงระยะดอกบานและพัฒนฝักก่อน 30-37 วันหลังงอก ซึ่งอัตราการตรึงไนโตรเจนจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในแบบทวีคูณ เมื่อถั่วเขียวอายุได้ 41-45 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่ถั่วเขียวกำลังพัฒนาฝักและเมล็ดนั้น ถั่วจะมีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงที่สุด หลังจากนั้นปริมาณการตรึงไนโตรเจนจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อเข้าสู่ช่วงที่เมล็ดสุกแก่และช่วงการเก็บเกี่ยว ผลของ

การวัดศักยภาพการตรึงไนโตรเจนโดยวิธี acetylene reduction assay และ ^{15}N natural abundance technique มีความสอดคล้องกัน (Figure 2) ดังนั้นการศึกษาศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของสายพันธุ์ถั่วเขียวนั้นควรจะเก็บเกี่ยวตรวจวัดเมื่อถั่วเขียวอยู่ในช่วงที่กำลังพัฒนาฝักและเมล็ดอายุประมาณ 41-45 วันภายหลังงอก

การประเมินผลของการตรึงไนโตรเจนในไร่ของถั่วเขียว

ก. การคัดเลือกพืชอ้างอิง (reference crop)

ในการวัดการตรึงไนโตรเจนโดยวิธีการใช้ไอโซโทป ^{15}N มีความจำเป็นอย่างยิ่งจะต้องหาพืช reference (คือ พืชที่ไม่ตรึงไนโตรเจน) ที่เหมาะสมซึ่งพืชนี้จะต้องเป็นพืชที่ไม่ตรึงไนโตรเจนและจะต้องมีรูปแบบการดูดธาตุอาหารในดิน อายุเก็บเกี่ยวและระบบรากใกล้เคียงกับถั่วที่ต้องการวัดการตรึงไนโตรเจน (Wagner and Sapata, 1982) ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ใช้พืช 3 ชนิดคือ ข้าว

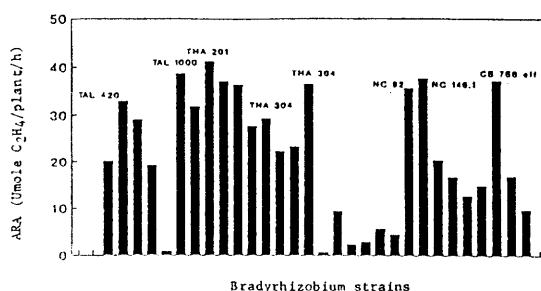


Figure 2 Effect of Bradyrhizobium strains on N_2 fixation (ARA) in mungbean.

Total 4 Nitrogen fixing ability in some mungbean lines.

Mungbean lines (mg / plant)	Plant DWT	Nodule No (/plant) (g/plant)	ARA (μ mole C_2H_4)	N Contr. (%)	N (%)	Total (ng/plant)	Nf air (mg/plant)	Nf soil (mg/plant)
VC 2768 A/1560 D	9.01	95	0.07	95.0	3.48	313.5	299.8	13.7
VC 2755 A	7.56	110	0.42	98.1	3.85	291.1	286.2	4.9
VC 2764 B	7.98	83	0.56	94.3	3.43	273.7	258.0	15.7
UT 7807	9.66	64	0.44	90.0	2.98	287.9	259.0	28.9
KPS 1	8.51	37	1.79	34.2	4.05	344.7	117.7	227.0
PSU 1	10.10	130	0.82	27.9	4.63	467.6	130.3	337.3
VC 1178/1560 D	8.97	164	0.11	43.6	3.23	289.6	126.3	163.5

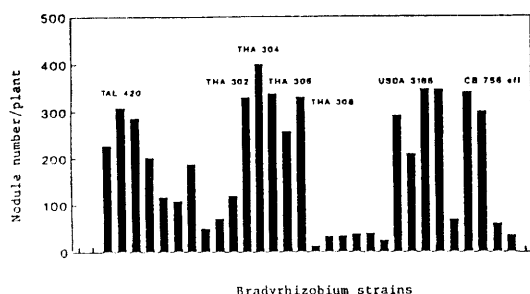


Figure 3 Effect of Bradyrhizobium strains on nodulation in mungbean.

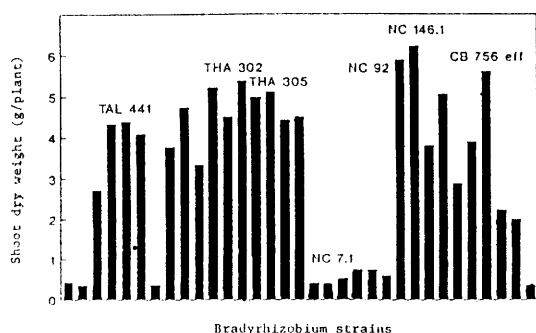


Figure 4 Effect of Bradyrhizobium strains on mungbean biomass.

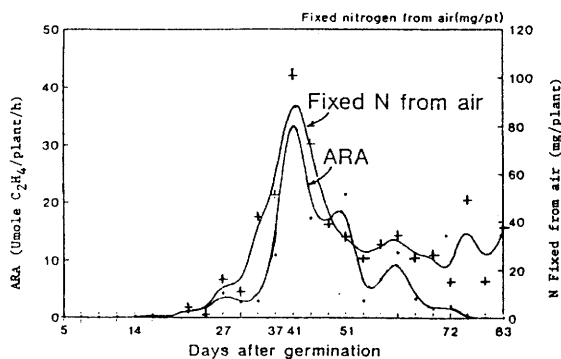


Figure 5 Nitrogen fixation patterns of VC 4000-7.

ฟางพันธุ์ชนาท 60 ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 และข้าวไร่ พบว่าค่า ^{15}N ของข้าวโพดสูงกว่าของข้าวฟางและข้าว ทั้งนี้เป็นเพราะมี ^{15}N สะสมอยู่ในเมล็ดข้าวโพดสูง และเมื่ออายุมากขึ้นค่า ^{15}N ของข้าวโพดและข้าวลดลงเรื่อยๆ แต่ข้าวฟางจะคงที่ (Figure 6) การลดลงของค่า ^{15}N แสดงว่าอาจจะมีการตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้นกับข้าวโพดและข้าว โดยจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนกลุ่มอื่นๆ ดังนั้น

ข้าวฟางจึงนับว่าเป็นพืชที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นพืชอ้างอิงเพื่อใช้วัดการตรึงไนโตรเจนในถั่วเขียว ปทุม และคณะ (2529) พบว่าพืชอ้างอิงที่เหมาะสม สำหรับถั่วเหลืองได้แก่ ถั่วเหลืองพันธุ์ที่ไม่สร้างปม และ ข้าวโพดสามารถใช้ได้

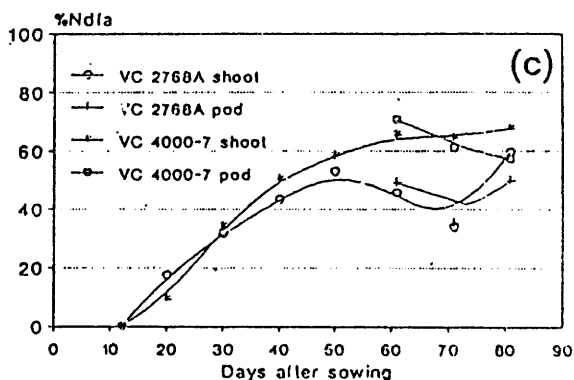
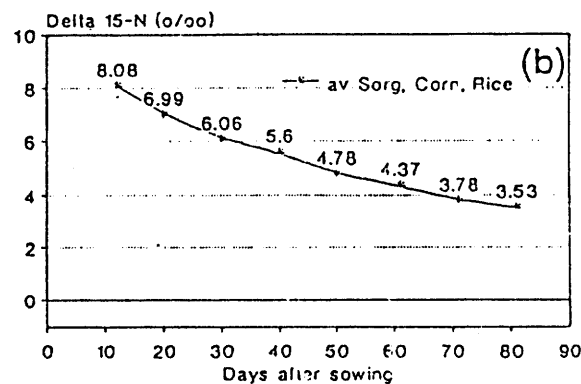
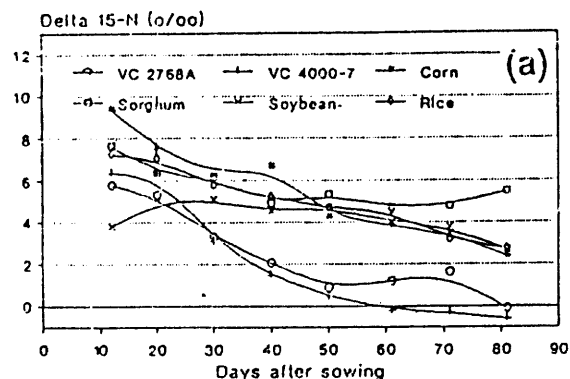


Figure 6 (a) Seasonal change in $\delta^{15}\text{N}$ of mungbean varieties and reference crops, (b) Seasonal change in $\delta^{15}\text{N}$ of 3 reference crops, (c) %Ndfa of the two mungbean varieties.

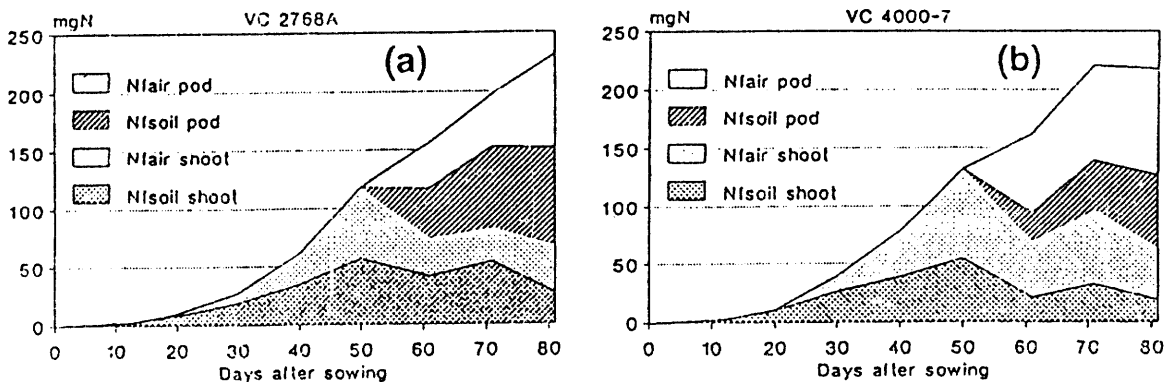


Figure 7 Nitrogen source of the two mungbean varieties a) VC 2768A and (b) VC 4000-7. Data was expressed as average value of 4 replications.

ในบางท้องที่ และการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ถั่วเขียวพันธุ์ VC 2768A และ VC 4000-7 เป็นตัววัด พบว่าพันธุ์ VC 4000-7 มีการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าและตรึงได้ประมาณ 70% (Figure 7)

ข. การวัดการตรึงไนโตรเจนในถั่วเขียวพันธุ์ต่างๆ

จากการวัดการตรึงไนโตรเจนในถั่วเขียว 13 พันธุ์ โดยวิธี ^{15}N ในการวัดครั้งแรกเมื่ออายุ 29 วัน พบว่าถั่วเขียวทุกพันธุ์มีการตรึงไนโตรเจนต่ำมาก และมีบางสายพันธุ์ที่มีการตรึงไนโตรเจนได้พอสมควร การใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 3 กิโลกรัมต่อไร่ไม่มีผลทำให้การตรึงไนโตรเจนลดลง และมีบางพันธุ์ F 2716 พบว่าปุ๋ยไนโตรเจนสามารถกระตุ้นให้ถั่วตรึงไนโตรเจนสูงขึ้นในระยะแรก และเมื่อถั่วมีอายุ 65 วัน ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน 3 กิโลกรัมและไม่ใส่ ในด้านปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้จากอากาศและน้ำหนักแห้งของต้นในอายุต่างๆ กัน ตลอดจนผลผลิต (Table 5, 6) และพบว่าถั่วเขียวได้รับไนโตรเจนจากอากาศโดยการตรึงไนโตรเจน ถึง 62% (Table 5)

วิจารณ์

การตรึงไนโตรเจนของถั่วเขียวนั้นเป็นขบวนการที่เกิดขึ้นเนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *Bradyrhizobium* sp. กลุ่ม cowpea อยู่ร่วมแบบพึ่งพาอาศัยกับปมรากถั่วเขียว ดังนั้น

ขบวนการตรึงไนโตรเจนที่ซับซ้อนนี้จึงมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกันทั้งระหว่างพืช เชื้อไรโซเบียมและสภาพแวดล้อม ซึ่งเป็นการยากที่จะกล่าวถึงสิ่งไหนเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดแม้ว่า Lawn and Bushy (1982) จะกล่าวว่า พืชเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญไม่ว่าจะเป็นส่วนของรากหรือส่วนของลำต้น แต่ในสภาพที่เป็นจริง ขบวนการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยนั้น (symbiosis) จะเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพก็ต่อเมื่อปัจจัยทุกอย่างมีความเหมาะสมที่สุด ผลของการคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเขียวที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ทำให้ทราบว่าถั่วเขียวต่างสายพันธุ์กันมีความสามารถในการตรึง และมีองค์ประกอบของขบวนการตรึงไนโตรเจนตลอดจนการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ให้ผลในทำนองเดียวกับการทดลองของ zary *et al.*, (1978); Miller *et al.*, (1987) ที่รายงานว่าองค์ประกอบในการตรึงไนโตรเจนถั่วเขียว ที่มีความแตกต่างกัน จะมีความแตกต่างกันในทางพันธุกรรมซึ่งลักษณะต่างๆ เหล่านี้ถูกควบคุมโดยพันธุกรรมความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์เชื้อไรโซเบียมกับศักยภาพการตรึงของถั่วเขียว จากผลของการทดลองทำให้ทราบว่าไม่มีความจำเพาะระหว่างสายพันธุ์ไรโซเบียมกับสายพันธุ์ถั่วเขียวบางพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อไรโซเบียม กลุ่ม cowpea ส่วนใหญ่สามารถเข้าสร้างปมรากและตรึงไนโตรเจนร่วมกับถั่วเขียวได้ค่อนข้างดี ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิตทั้งสอง Philipps and Turber

(1985) กล่าวว่า การสร้างพันธุ์ถั่วขึ้นมาสักพันธุ์หนึ่ง โดยสามารถสร้างปรมาณกับเชื้อไรโซเบียมได้หลายสายพันธุ์ และทำให้ถั่วมีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้นย่อมดีกว่าพันธุ์ถั่วที่สร้างปรมาณแบบจำเพาะกับเชื้อไรโซเบียมที่คัดเลือกกว่าเป็นสายพันธุ์ที่ดีเพียงสายพันธุ์เดียว เพราะการปลูกถั่วในสภาพไรที่มีเชื้อไรโซเบียมดั้งเดิมอยู่บ้างแล้วนั้น บางครั้งการใส่เชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ที่คัดเลือกกว่าก็ไม่ได้ประสบผลสำเร็จเพราะ ไม่สามารถแข่งกับเชื้อเดิมเพื่อเข้าสร้างปม เชื้อไรโซเบียมกลุ่ม cowpea ที่คัดเลือกจากแหล่งปลูกถั่วในประเทศไทย (THA) สามารถตรึงไนโตรเจนร่วมกับถั่วเขียวได้ดีกว่าสายพันธุ์ที่นำมาจากฮาวาย (TAL) และนอร์ธแคโรไลนา (NC) สาเหตุหนึ่งที่สมควรอ้างถึงก็คือประเทศไทยได้มีการปลูกถั่วเขียวเพื่อใช้ในการบริโภคมาหลายร้อยปีแล้ว ดังนั้นการปรับตัว

และการมีวิวัฒนาการของเชื้อไรโซเบียมที่มีอยู่ในดินตามแหล่งปลูกดังกล่าวจึงน่าจะดีกว่าสายพันธุ์ที่นำมาจากต่างประเทศ ถั่วเขียวสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงนั้นสามารถตรึงไนโตรเจนได้ถึง 16.0-19.2 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ (เสริมฐา และคณะ, 2533 ก.) ซึ่งอยู่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับการรายงานของ Firth *et al.*, (1973) ว่า ถั่วเขียวที่ปลูกในระบบการปลูกพืชหมุนเวียนในประเทศไทยสามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงถึง 9.6-17.8 กิโลกรัม ไนโตรเจนต่อไร่ ทำนองเดียวกับ Morton *et al.*, (1982); Sinha (1976) ได้คาดคะเนปริมาณไนโตรเจนที่ถั่วเขียวได้รับจากการตรึงไนโตรเจนว่าอยู่ในช่วง 50-100 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อเฮกตาร์ต่อฤดูปลูกถั่วเขียว ถั่วเขียวและพืชตระกูลถั่วในประเทศไทยนั้นได้รับธาตุไนโตรเจนจากขบวนการตรึงไนโตรเจนเป็นส่วนใหญ่ (Murakami

Table 5 $\delta^{15}\text{N}$ and Ndfa of mungbean lines grown in field with and without application of N fertilizers.

Varieties	N (kg/ha)	$\delta^{15}\text{N}$ (29 days) (%)	Ndfa (29 days) (%)	$\delta^{15}\text{N}$ (64 days) (%)	Ndfa (64 days) (%)
VC 2768 A	0	5.065	2.25	1.100	55.86
	20	4.327	4.62	1.126	57.62
F7 VC 2768/1560	0	4.747	3.85	1.475	47.02
	20	2.865	15.77	0.690	59.37
VC 1973 A	0	5.335	2.75	1.870	43.14
	20	4.867	2.07	1.430	49.42
VC 1628 A	0	5.050	0.90	0.615	58.25
	20	3.875	3.92	1.787	45.92
VC 1560 D	0	5.110	7.12	0.277	62.57
	20	4.522	8.10	0.870	56.12
F7 PAGASA/1567	0	4.700	5.42	0.730	57.87
	20	4.220	5.40	1.375	50.97
UT 1	0	6.782	0.00	1.260	50.27
	20	4.565	3.85	2.685	37.80
KPS 2	0	4.467	6.70	0.967	54.05
	20	3.077	9.70	1.430	49.57
CN 60	0	5.105	1.40	1.625	45.57
	20	4.490	2.75	1.867	44.57
VC 4025-1	0	5.295	5.67	1.525	46.77
	20	6.127	0.00	2.310	40.67
VC 4025-2	0	5.232	0.00	1.682	44.22
	20	5.150	0.00	2.005	41.60
VC 4025-2	0	5.788	0.00	1.380	49.07
	20	5.160	0.00	1.547	50.05
VC 4000-2	0	4.852	5.52	1.267	50.85
	20	4.065	0.07	1.282	53.70

et al, 1990; Yoneyama *et al* 1990)

ผลของการศึกษาถึงการพัฒนาองค์ประกอบการตรึงไนโตรเจนและศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของถั่วเขียวนั้นทำให้ทราบว่าถั่วเขียวมีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนสูงสุดในช่วงของการพัฒนาฝักและเมล็ด ซึ่งถั่วเขียวมีอายุได้ 41-45 วันภายหลังออก ช่วงดังกล่าวถั่วเขียวบางสายพันธุ์กำลังมีดอกบานเต็มที่ และพัฒนาฝักอ่อน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Miller and Fernandez (1987) การพัฒนาปมรากและกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของปมรากยังมีความสัมพันธ์กับสารอาหารที่ได้รับจากขบวนการสังเคราะห์แสงอีกด้วย (Chen and Sung, 1982)

ช่วงเวลาภายในวันหนึ่งๆ ก็มีผลต่อการตรึงไนโตรเจนของถั่วเขียวไม่ว่าจะเป็นพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงหรือต่ำจะมีรูปแบบของการตรึงไนโตรเจนที่คล้ายกันคือ พันธุ์ถั่วเขียวทั้งสองกลุ่มมีกิจกรรมของเอ็นไซม์ไนโตรจิเนสสูงสุดเมื่อเวลา 12.00 น. กิจกรรมการตรึงไนโตรเจนจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 12.00-16.00 น. ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ขบวนการสังเคราะห์แสงมีผลโดยตรงต่อกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของถั่วเขียว (Zary and Miller, 1979) ดังนั้นการศึกษาถึงศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของถั่วเขียวจึงควรอยู่ในช่วงที่ถั่วเขียวมีการพัฒนาฝักและเมล็ด จะต้องเป็นช่วงเวลา 11.00-13.00 น. ของแต่ละ

Table 6 Growth parameters and yield of field grown mungbean varieties.

Varieties	N (kg/ha)	Shoot DWT (29 D) (g/0.5 m ²)	Shoot DWT (64 D) (g/0.5 m ²)	Pod DWT (64 D) (g/0.5 m ²)	Seed yield (kg/rai)
VC 2768 A (PSU 1)	0	3.69	18.71	12.97	-
	20	3.92	17.54	14.03	140
F7 VC 2768/1560	0	4.18	17.56	12.48	-
	20	4.57	14.27	12.44	171
VC 1973 A	0	3.88	15.46	12.77	-
	20	3.94	15.52	11.27	165
VC 1628 A	0	4.36	13.55	10.35	-
	20	5.28	20.88	16.05	177
VC 1560 D	0	4.02	11.65	11.76	-
	20	4.18	14.91	14.58	100
F7 PAGASA/1560	0	3.54	16.34	14.31	-
	20	3.94	24.35	10.36	149
UT 1	0	4.10	16.79	15.61	-
	20	3.08	16.45	12.68	172
KPS 2	0	4.08	16.39	14.70	-
	20	4.52	13.14	10.99	127
CN 60	0	5.63	12.04	11.04	-
	20	5.04	12.56	12.72	146
VC 4025-1	0	4.12	14.08	9.80	-
	20	3.77	10.37	9.29	174
VC 4025-2	0	4.63	16.07	13.99	-
	20	3.88	16.16	12.09	144
VC 4025-3	0	4.17	15.98	15.21	-
	20	4.18	11.56	9.21	171
VC 4000-2	0	3.96	14.35	11.90	-
	20	5.06	20.07	15.70	121
F-Test	0	NS	NS	NS	NS
C.V. (%)		35.8	37.0	31.4	38.2

วันด้วย (Miller and Fernandez, 1987)

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวเพื่อเพิ่มศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนนั้นจะต้องคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่ดี เพราะการผสมพันธุ์ระหว่างถั่วเขียวสายพันธุ์พ่อซึ่งมีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงกับสายพันธุ์แม่ที่มีผลผลิตสูง เป็นผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงในเรื่องของสารพันธุกรรมหรือยีนของถั่วเขียวสายพันธุ์ลูกผสม ซึ่งถ้าหากสามารถสร้างสายพันธุ์ถั่วเขียวได้ดังวัตถุประสงค์ดังกล่าว จำเป็นจะต้องมีความรู้ความเข้าใจทางด้านพันธุกรรมทางด้านอื่นๆ อีกมาก เพราะขณะนี้รู้แต่เพียงว่าการสร้างปมรากและการตรึงไนโตรเจนของพืชตระกูลถั่วถูกควบคุมด้วยยีนของถั่วไม่ต่ำกว่า 10 ตำแหน่ง (Hall and La Rue, 1976) ปฏิกริยาของยีนแสดงออกมาในแบบบวกสะสม (additive genetic variance) อัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะจำนวนปมรากและกิจกรรมการตรึงไนโตรเจน มีค่าอยู่ในเกณฑ์สูง (Fernandez and Miller, 1985; Miller and Fernandez, 1987) เป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่สามารถชี้ให้ทราบถึงความก้าวหน้าหรือโอกาสของความเป็นไปได้ที่จะปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวเพื่อเพิ่มศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน

สรุป

ถั่วเขียวสายพันธุ์ต่างกันจะมีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ไม่เพียงแต่จะมีองค์ประกอบของขบวนการตรึงไนโตรเจนที่ต่างกันเท่านั้น การเจริญเติบโตของถั่วเขียวก็ต่างกันด้วยสายพันธุ์เชื้อไรโซเบียมในกลุ่มของ cowpea ส่วนใหญ่สามารถตรึงไนโตรเจนร่วมกับถั่วเขียวได้ดี ศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของถั่วเขียวจึงขึ้นอยู่กับความหลากหลายทางพันธุกรรมของทั้งถั่วเขียวและเชื้อไรโซเบียม ถั่วเขียวจะมีกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนสูงสุด เมื่ออยู่ในช่วงที่กำลังพัฒนาและเมื่อดูดการผสมพันธุ์ถั่วเขียวเพื่อเพิ่มศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนให้สูงขึ้นด้วยวิธี hand pollination หรือ conventional breeding เป็นการสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรม โอกาสที่จะได้สายพันธุ์ถั่วเขียวที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน

สูง ตลอดจนมีผลผลิตสูง ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ปกติแล้วเกษตรกรจะถือว่าถั่วเขียวเป็นพืชรองจึงมักไม่ใส่ใจกับการที่สามารถคัดพันธุ์ถั่วเขียวให้มีความสามารถในการหาปุ๋ยได้เองโดยได้จากขบวนการตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้มากที่สุด จึงนับว่ามีประโยชน์มาก เพราะจะทำให้เกษตรกรปลูกถั่วได้ผลผลิตที่สูงขึ้น และเมื่อนำมาปลูกในระบบการปลูกพืชจะทำให้พืชอื่นๆ ไม่กระทบกระเทือนเพราะถั่วเขียวพันธุ์ปรับปรุงจะไม่ใช่ไนโตรเจนในดินและในทางตรงกันข้ามก็สามารถช่วยเพิ่มไนโตรเจนในดินได้อีกด้วย ดังนั้น นักปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวควรเน้นในการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนให้แก่ถั่วด้วย

เอกสารอ้างอิง

- ปทุม สนิทวงศ์ ณ อยุธยา, จันทนา ศิริไพบุลย์, จริยา ประศาสน์ศรีสุภาพ, พรพิมล ชัยวรรณคุปต์, จิตรา คล้ายมนต์, อำไพ ศัตร์แสง, ชลุด ธารรัตพันธ์ และชัยโรจน์ วงศ์วิวัฒน์ชัย. 2529. การคัดเลือกพืชบางชนิดที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจน จากอากาศเพื่อใช้เป็นพืชมาตรฐาน ในการศึกษาปริมาณการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลือง ว. วิชาการเกษตร กษ. 4: 99-105.
- เศรษฐา ศิริพิณฑ์, พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, นันทกร บุญเกิด, สมศักดิ์ วังใน, โตชิฟูมิ มูรากามิ และ ปรีชา วดีศิริศักดิ์. 2533 ก. การคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเขียวที่มีศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนสูง, หน้า 279-288. ในรายงานผลการวิจัยสาขาพืช การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 28. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน. กรุงเทพฯ.
- เศรษฐา ศิริพิณฑ์, พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, นันทกร บุญเกิด, สมศักดิ์ วังใน และ โตชิฟูมิ มูรากามิ. 2533 ข. การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวเพื่อเพิ่มศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนสูง, หน้า 27-33. ในการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 7 เรื่อง พันธุศาสตร์เพื่อการพัฒนาคุณภาพชีวิต สมาคม พันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ขอนแก่น.

- Boonkerd, N., D.F. Weber and D.F. Bezdicsek. 1978. Influence of *Rhizobium Japonicum* strains and inoculation methods on soybeans grown in rhizobia populated soil. *Agron. J.* 70: 547-549.
- Chen, C.L. and F.J.M. Sung. 1982. Effect of source-sink manipulations on nitrogen fixation in mungbean. *Field Crops Res.* 5: 225-231.
- Fernandez, G.C.J. and J.C. Miller, Jr. 1985. Estimation of heritability by parent-offspring regression. *Theor. Appl. Genet.* 70: 650-654.
- Firth, P.H. Thitipoca, S. Suthpradit, R. Wetselaar and D.F. Berch. 1973. Nitrogen balance in the Central Plain of Thailand. *soil Biol. Biochem.* 5: 41-46.
- Graham, P.H. 1982. Plant factors affecting symbiotic nitrogen fixation in legumes, pp. 27-37. In : P.H. Graham and S.C. Harris (eds.). *BNF-Technology for Tropical Agriculture*, Cali, Columbia, CIAT.
- Herridge, D.F. 1982. Relative abundance of ureides and nitrate in plant tissues of soybean as a quantitative assay of nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 70: 1-6.
- Herridge, D.F., F.J. Bergersen and M.B. Peoples. 1990. Measurement of nitrogen fixation by soybean in the field using the ureide and natural ^{15}N abundance method. *Plant Physiol.* 93: 708-716.
- Holl, F.B. and T.A. La Rue. 1976. Host genetic and nitrogen fixation. pp. 156-163. In: L.D. Hell (ed.). *World soybean Research*. Interstate Printers 2 Publishers. Chicago, USA
- Lawn, R.J. and H.V.A. Bushy. 1982. Effect of root, Shoot and *Rhizobium* strain on nitrogen fixation in four Asiatic *Vigna* species. *new Phytol.* 92: 425-434.
- McClure, P.R. and G.C.J. Fernandez. 1987. Selecting and breeding for enhance N_2 fixation in mungbean. pp. 111-123. In: S. Shanmugasundaram and B.T. Mclean (eds.). *Mungbean :Proceeding of the Second International Symposium*. AVRDC, Shan-hua, Taiwan.
- Morton, J.R., R.E. Smith and J.M. Poehlman. 1982. The Mungbean. Department of Agronomy and Soils Science, University of Puerto Rico, Mayaguez, Puerto Rico. 136
- Murakami, T., S. Siripin; P. Wadisirisuk; N. Boonkerd; T. Yoneyama; T. Yokoyama and H. Imai. 1990. Determination of nitrogen fixing ability of mungbean by ^{15}N Natural Abundance Method. Paper presented in National Seminar & Workshop on Improving Food and Agricultural Production with Nuclear and Related Technology. December, 17-19, 1990, Chiang Mai-Phucome Hotel, Chiang Mai.
- Munns, D.N. 1968. Nodulation of *Medicago sativa* in Solution culture. I. Acid sensitive step. *Plant and Soil* 28: 129-146.
- Philipps, D.A. and L.R. Turber. 1985. Genetic improvement of symbiotic nitrogen fixation in legumes. pp. 11-18. In: H.J. Evans, P.I. Bottomley and W.E. Newton. (eds.). *Nitrogen Fixation Research Progress*. Martinus Nijhoff Publisher, USA.
- Rennie, R.J., Rennie, D.A. and M. Fried. 1978. Concepts of ^{15}N usage in dinitrogen fixation studies. pp. 107-133. In: *Isotopes in Biological Dinitrogen Fixation*. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Sinha, S.K. 1976. *Food Legumes, Distribution, Adaptability and Biology of Yield*. F.A.O., Rome 257 p.
- Wagner, G.H. and F. Zapata. 1982. Field evaluation of reference crops in the study of nitrogen fixation by legumes using isotopes techniques. *Agron. J.* 74: 607-612.
- Yoneyama, T., T. Murakami, N. Boonkerd, P. Wadisirisuk, S. Siripin and K. Kouno. 1990. Natural ^{15}N abundance in shrub and tree legumes, casuarina and

- non N₂ Fixation plants in Thailand. Plant and soil 128: 287-292.
- Zary, K.W. and J.C. Miller, Jr. 1979. N₂ fixation patterns in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Walp). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105: 669-701.
- Zary, K.W., J.C. Miller, Jr., R.W. Weaver and L.W. Barner. 1978. Intraspecific variability of nitrogen fixation in southern pea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) J. Amer. Soc. Hort. Sci. 103: 806-808.