3.อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองนี้เป็นการทดลองเพื่อศึกษาผลของปัจจัยบางอย่างที่มีอิทธิพลต่อดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์ ซึ่งได้แก่ รูป (form) และอัตราการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์ระหว่างดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างลำต้นแห้งและตัวอย่างน้ำเลี้ยงของถั่วแดงหลวง ตลอดจนสร้างสมการมาตรฐานเพื่อใช้ประเมินการตรึงไนโตรเจนจากดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์ของตัวอย่างลำต้นแห้งการทดลองแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

3.1 การทดลองในกระถาง

ทดลองปลูกถั่วในกระถาง ณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในช่วงเวลาตั้งแต่วันที่ 8 สิงหาคม 2539 ถึง 7 ตุลาคม 2539 โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองตามชนิดของไนโตรเจน คือ การทดลองที่ 1 ใช้ NO_3^--N ในรูปของปุ๋ยโพแทสเซียมไนเตรท ส่วนการทดลองที่ 2 ใช้ NH_4^+-N ในรูปของปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟท แต่ละการทดลองใช้แผนการทดลองแบบ complele randomized desing มี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยถั่ว 3 กระถาง และมีตำรับการทดลองซึ่งประกอบด้วยอัตราการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 6 อัตราดังนี้

ตำรับที่ 1 ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 0 mM
ตำรับที่ 2 ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 2 mM
ตำรับที่ 3 ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 4 mM
ตำรับที่ 4 ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 6 mM
ตำรับที่ 5 ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 8 mM
ตำรับที่ 6 ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 10 mM

ปลูกถั่วแดงหลวงพันธุ์หมอกจ๋าม ในกระถางมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว บรรจุทราย 11 กก./กระถาง โดยใช้เมล็ดถั่ว 6 เมล็ด/กระถาง เมล็ดถั่วที่ปลูกจะได้รับการใส่เชื้อ *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* 2 สายพันธุ์ คือ CLAT 899 และ UMR 1899 และ KN6 ซึ่งเป็น isolate ที่ได้จากเชื้อธรรมชาติ ณ หมู่บ้านแกน้อย โดยใช้เชื้อทั้ง 3 เชื้อผสมกันในอัตรา 1:1:1 และมีปริมาณเชื้อ 8×10^8 cell / กรัม โดยใช้ผงเชื้อไรโซเบียม 8 กรัม/เมล็ด 100 กรัม หรือ 3×10^6 cell/เมล็ด หลังจากถั่วงอก 7 วัน ถอนให้เหลือ 3 ต้น/กระถาง ในช่วงอาทิตย์แรกใช้น้ำประปารดต้นถั่วทุกวัน ๆ ละ 2 ครั้ง เช้าเย็นโดยใช้น้ำครั้งละ 0.5 ลิตร/กระถาง หลังจากนั้นจึงใช้สารละลายตามสูตรของ Broughton and Dillworth, 1970 (อ้างโดย Somasegaran *et al.*, 1982) รดถั่วแทนน้ำ

ประปา โดยจะเพิ่มปุ๋ยไนโตรเจนลงไปในสารละลายตามอัตราต่าง ๆ ที่กำหนดไว้ ในช่วงอาทิตย์ที่ 2 และ 3 โดยที่จะใช้สารละลาย 0.5 ลิตร/กระถาง รดตอนเช้าส่วนตอนเย็นใช้น้ำประปารดตามปรกติ หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณสารละลายที่ใช้รดในช่วงเช้าเป็น 1 ลิตร/กระถาง/วัน ส่วนตอนเย็นยังคงใช้ใช้น้ำประปาเหมือนเดิมจนกระทั่งถึงวันที่เก็บตัวอย่าง ในแต่ละอาทิตย์จะมีการชะล้างทราย 1 ครั้ง เพื่อลดการสะสมของเกลือในกระถาง

3.2 การทดลองในสภาพไร่นา

การทดลองในสภาพไร่นา แบ่งออกเป็น 2 การทดลองโดยใช้พื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินแตกต่างกัน สำหรับการทดลองแรกดำเนินการ ณ สถานีเกษตรหลวงปางดะ ของมูลนิธิโครงการหลวง อำเภอสะเมง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งมีระดับความสูง 720 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล และดินมีความอุดมสมบูรณ์สูง คือ มี pH 6.3 ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้ 106 ppmอินทรีย์วัตถุ 3.64 % โพแตสเซียมที่สามารถแลกเปลี่ยนได้ 619 ppm (ตารางที่ 1) สำหรับการทดลองที่ 2 ดำเนินการ ณ ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแกน้อย อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งมีระดับความสูง 1000 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล และดินเป็นกรดมี pH 5.4 มีความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสต่ำและมีความเข้มข้นของแมงกานีสที่วัดได้ถึง 100 ppm (ตารางที่ 1) การทดลองแรกดำเนินการในช่วงเวลาตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2538 จนถึงเดือน มกราคม 2539 และมีการให้น้ำโดยใช้ระบบ sprinkle ส่วนการทดลองที่ 2 ดำเนินการในช่วงฤดูฝนคือตั้งแต่เดือน พฤษภาคม 2539 จนถึงเดือน กรกฎาคม 2539 โดยใช้การปลูกที่อาศัยน้ำฝน

แต่ละการทดลองใช้แผนการทดลองแบบ randomized complete block design มี 4 ซ้ำ และมีตำรับทดลอง 5 ตำรับดังนี้ ดังนี้

ตำรับที่ 1 ไม่คลุกเชื้อไรโซเบียม และไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน (control)

ตำรับที่ 2 ไม่คลุกเชื้อไรโซเบียมแต่ใส่ปุ๋ยยูเรียในอัตรา 8 กก. N/ไร่

ตำรับที่ 3 คลุกเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ CIAT 899

ตำรับที่ 4 คลุกเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ UMR 1899

ตำรับที่ 5 คลุกเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์พื้นเมือง isolate KN 6

แปลงทดลองมีขนาด 4 x 5 เมตร โดยใช้ระยะปลูก 50 x 25 ซม. ใช้ถั่วแดงหลวงพันธุ์หมอกจำม โดยใช้เมล็ด 6 เมล็ด/หลุม แต่ถอนแยก ให้เหลือ 3 ต้น/หลุม หลังจากปลูกได้ 14 วัน สำหรับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนที่ สถานีเกษตรหลวงปางดะ ใส่เพียงครั้งเดียวในระยะถอนแยก ส่วนที่ ศูนย์

พัฒนาโครงการหลวงแกน้อย ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนโดยการแบ่งใส่ 2 ครั้ง ครั้งละเท่ากันในระยะถอนแยก และระยะ R_1 เนื่องจากดินบนศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแกน้อยมีปริมาณของฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินต่ำ ดังนั้นจึงใส่ปุ๋ยทริปเปอร์ซูเปอร์ฟอสเฟทในอัตรา 9 กก.P_2O_5/ไร่ ในทุกแปลงทดลองอีกด้วย สำหรับการใส่เชื้อไรโซเบียมใช้ผงเชื้อไรโซเบียมซึ่งใช้ผงดินพีทเป็นวัสดุรองรับ (carrier) คลุกเมล็ดก่อนปลูก ในอัตรา 8 กรัม/เมล็ด 100 กรัม ซึ่งเท่ากับการใช้เชื้อไรโซเบียมประมาณ 10^6 cell/เมล็ด โดยในการคลุกเชื้อไรโซเบียม ใช้ gum arabic เข้มข้น 30% เป็นสารเชื่อม (strickenning agent) ให้ผงเชื้อติดกับเมล็ดได้ดี

ตารางที่ 1สมบัติทางเคมีของดินที่สถานีเกษตรหลวงป่างดะและศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแกน้อย

soil properties	unit	Pang Da Station	Kae Noi Station
pH (soil : H_2O : 1:1)		6.30	5.43
available P (Bray no.2)	ppm	106	12
organic matter (Walkley Blah)	%	3.64	4.00
exchangeable K (NH_4OAc 1N,pH7)	ppm	619	178
extractable Ca (NH_4OAc 1N,pH7)	ppm	1285	375
extractable Mg (NH_4OAc 1N,pH7)	ppm	166	50
extractable Fe (DTPA extraction)	ppm	44	45
extractable Cu (DTPA extraction)	ppm	6	3
extractable Mn (DTPA extraction)	ppm	25	100
extractable Zn (DTPA extraction)	ppm	0.85	0.50

3.3 การเก็บข้อมูล

3.31 <u>การทดลองในกระถาง</u>

เมื่อถั่วแดงหลวงมีอายุประมาณ 30, 37, 45,และ 60 วันหลังปลูก ซึ่งเป็นระยะ V_4 , R_1 , R_4 และ R_6 ตามลำดับ เก็บตัวอย่างต้นถั่วตำรับละ 3 กระถางต่อซ้ำ เพื่อบันทึกข้อมูลด้านน้ำหนักแห้งและการสะสมไนโตรเจนของส่วนที่อยู่เหนือดิน และ สัดส่วนขององค์ประกอบของสารประกอบไนโตรเจนที่มีอยู่ในน้ำเลี้ยงและในเนื้อเยื่อของลำต้นแห้ง สำหรับข้อมูลด้านน้ำหนักแห้งของปมในการทดลองที่ใช้ปุ๋ย KNO_3 มีการเก็บข้อมูลที่ระยะ V_4 ส่วนการทดลองที่ใช้ปุ๋ย $(NH_4)_2SO_4$ มีการเก็บข้อมูลที่ระยะ V_4 และ R_1 วิธีการเก็บข้อมูลมีดังนี้

ก. น้ำหนักแห้งของส่วนที่อยู่เหนือดิน

ตัดต้นถั่วแดงหลวงใต้ข้อแรกลงไปให้ชิดดินมากที่สุดด้วยกรรไกร แล้วนำมาแยกส่วนใบและลำต้น นำไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 70^0 C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาชั่งน้ำหนักแห้งของแต่ละส่วนน้ำหนักรวมคือ น้ำหนักแห้งของส่วนที่อยู่เหนือดินทั้งหมด

ข. การเก็บและการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำเลี้ยง

หลังจากตัดต้นถั่วเพื่อเก็บตัวอย่างส่วนที่อยู่เหนือดินแล้ว ใช้สายยางที่มีขนาดพอดีกับตอราก สวมใส่ตอรากถั่วทุกต้นในแต่ละตำรับและเก็บรวบรวมตัวอย่างน้ำเลี้ยงที่สะสมอยู่ในสายยาง โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มล. ที่ทำด้วยพลาสติกและมีเข็มเสียบติดอยู่ดูดน้ำเลี้ยงขึ้นมาเก็บไว้ในหลอดแก้ว ภายในระยะเวลาอย่างช้าที่สุด 30 นาที หลังจากตัดต้นถั่วและป้องกันการเปลี่ยนแปลงสภาพของตัวอย่างน้ำเลี้ยงโดยใส่ ethanol 95% ลงไปในตัวอย่างแต่ละตัวอย่างในอัตราส่วนของน้ำเลี้ยงกับ ethanol ประมาณ 1:1 และเก็บหลอดแก้วที่มีตัวอย่างน้ำเลี้ยงในกระติกน้ำแข็ง ในช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง หลังจากนั้นจึงนำเข้าเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -4^0C เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สัดส่วนของ ureide-N amino-N และ NO_3^--N ด้วยวิธีการของ People *et al.* (1989) ต่อไป

ค. การวิเคราะห์สัดส่วนของสารประกอบไนโตรเจนในตัวอย่างเนื้อเยื่อของลำต้นแห้ง

หลังจากชั่งน้ำหนักของลำต้นที่อบแห้งแล้ว นำตัวอย่างลำต้นแห้งไปบดด้วยเครื่องบดตัวอย่างพืชให้ละเอียด แล้วนำไปวิเคราะห์หา ureide-N และ NO_3^--N ตามวิธีการของ People *et al.*(1989)

ง. การสะสมไนโตรเจนของส่วนที่อยู่เหนือดิน

หลังจากการชั่งน้ำหนักแห้งของส่วนใบ และลำต้นแห้งแล้ว นำแต่ละส่วนไปบดด้วยเครื่องบดตัวอย่างพืช แบ่งตัวอย่างแต่ละส่วนที่บดแล้วโดยการชั่งน้ำหนักแต่ละส่วนให้ได้สัดส่วนเดียวกับสัดส่วนของน้ำหนักแห้งที่ชั่งได้ในตอนแรก ผสมตัวอย่างทั้ง 2 ส่วนให้เข้ากันอย่างดี หลังจากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี microkjedahl (Bergersen, 1990)

จ. น้ำหนักแห้งของปม

ขุดรากถั่วทุกต้นในแต่ละตำรับและแต่ละซ้ำ โดยใช้พลั่วขุดล้างรากด้วยน้ำก๊อก แกะปมออกจากรากและนำปมที่ได้เข้าอบแห้งที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง

3.32 <u>การทดลองในสภาพไร่นา</u>

ในระยะ V_4 R_1 R_4 และ R_6 เก็บตัวอย่างต้นถั่วจากแปลงทดลองแต่ละแปลงโดยใช้พื้นที่ 1 ตารางเมตร/แปลง เพื่อเก็บข้อมูลด้านน้ำหนักแห้งและการสะสมไนโตรเจนของส่วนที่อยู่เหนือดิน องค์ประกอบของไนโตรเจนในน้ำเลี้ยงและในเนื้อเยื่อลำต้นแห้ง ด้วยวิธีการดังเช่นที่ใช้ในการทดลองในกระถาง สำหรับข้อมูลด้านน้ำหนักแห้งของปม ที่สถาณีเกษตรหลวงปางดะเก็บที่ระยะ V_4 และ R_1 ส่วนที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแกน้อย เก็บที่ระยะ V_4 R_1 และ R_4

3.33 <u>การประเมินปริมาณและเปอร์เซนต์ไนโตรเจนที่ได้จากการตรึง</u>

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของไนโตรเจนในเนื้อเยื่อของลำต้นและในน้ำเลี้ยง คำนวนดัชนียูรีไอด์สัมพัทธ์ หรือเปอร์เซนต์ของไนโตรเจนในรูปของสารประกอบยูริไอด์ (Herridge,1984)ดังนี้

$$\text{ดัชนียูรีไอด์สัมพัทธ์ของน้ำเลี้ยง(\%)} = \frac{4 \times \text{ureide}^*}{4 \times \text{ureide}^* + \text{amino}^* + \text{nitrate}^*} \times 100$$

$$\text{ดัชนียูรีไอด์สัมพัทธ์ของเนื้อเยื่อ(\%)} = \frac{4 \times \text{ureide}^*}{4 \times \text{ureide}^* + \text{nitrate}^*} \times 100$$

* ureide, amino และ nitrate N มีหน่วยเป็น mole

สำหรับปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงประเมินผลจากสมการของ Hansen et al.(1993)ดังนี้

ระยะ V_4 Y=0.940X-25.162

ระยะ R_1-R_5 Y=0.877X-2.327

ระยะ R_6 Y=0.789X-4.927

เมื่อ X=% ไนโตรเจนที่ได้จากการตรึงไนโตรเจน

Y= ดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์ของน้ำเลี้ยง (relative ureide index,RUI)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University