

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1

ทำการทดลองระหว่างวันที่ 14 ตุลาคม 2533 - 22 มกราคม 2534 ที่ สถานีทดลองเกษตรที่สูงขุนช่างเคี่ยน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งมีความสูง 1200 เมตรจากระดับน้ำทะเล เพื่อวัดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและให้ผลผลิต ในถั่วแดงหลวงพันธุ์หมอกจ้ามกับเชื้อไรโซเบียมที่มีจำหน่ายในตลาด และเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ UMR 1165 ดินที่ใช้ในการทดลองมี pH 7 total N 0.13% available P 47 ppm และ exchangeable K 128 ppm วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block มี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วย 4 ดำรับดังนี้

Control ไม่คลุมเชื้อไรโซเบียมและไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน
N₇₀ ไม่คลุมเชื้อไรโซเบียมแต่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจน (Urea)
อัตรา 70 กก.N/เฮกตาร์ ตรึงเดี่ยวหลังจากปลูกได้
14 วัน

Rhizo_{com} คลุมด้วยเชื้อไรโซเบียมที่มีจำหน่ายในตลาดและไม่ใส่ปุ๋ย
ไนโตรเจน

Rhizo_{UMR 1165} คลุมด้วยเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ UMR 1165 และไม่ใส่
ปุ๋ยไนโตรเจน

ใช้ถั่วแดงหลวงพันธุ์หมอกจ้ามซึ่งเป็นพันธุ์สูง เสริมของโครงการหลวงขนาด
แปลงย่อยกว้าง 3 เมตร ยาว 5 เมตร ระยะปลูก 50 x 25 ซม. ปลูกแบบหยอดหลุม
หลังจากปลูกได้ 14 วัน ทำการถอนแยกให้เหลือ 4 ต้น/หลุม การป้องกันกำจัดวัชพืชใช้
สารเคมีแลสซีโซ่ (อะลาคลอร์) นันหลังจากปลูกพืช เมื่อพบว่ามีแมลงระบาดจะพ่นสารเคมี
อีโซตริน (ไมโนไตรโทฟอส) เพื่อป้องกันและกำจัด การให้น้ำกระทำตามความจำเป็น

การทดลองที่ 2

ทำการทดลองระหว่างวันที่ 1 ธันวาคม 2533 - 19 กุมภาพันธ์ 2534 ที่ สถานีวิจัยเกษตรชลประทาน ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อศึกษาอิทธิพลของปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่าง ๆ ต่อกระบวนการตรึงไนโตรเจนและการให้ผลผลิตในถั่วแดงหลวงพันธุ์หมอกจ๋าม ดินที่ใช้ในการทดลองมี pH 6.2 total N 0.045% available P 71 ppm และ exchangeable K 51 ppm วางแผนการทดลองแบบ Split-plot มี 4 ซ้ำ โดยให้การปลูกข้าวไร่ใช้เบียม 2 ระดับคือ ไม่คลุมข้าวไร่ใช้เบียมกับการคลุมข้าวไร่ใช้เบียมสายพันธุ์ UMR 1899 (อำพรวณ, 2533) เป็น main plot ส่วน sub plot คือการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน (Urea) 6 อัตราที่ระดับ 0 25 45 81 146 และ 262 กก./เฮกตาร์ ตามลำดับ ใส่ปุ๋ยหลังจากปลูกได้ 14 วัน โดยวิธีโรยข้างแถวแล้วกลบ ขนาดแปลงย่อยกว้าง 4.4 เมตร ยาว 6 เมตร ระยะปลูก 40 x 20 ซม. จำนวน 2 - 4 ต้น/หลุม ก่อนปลูกใส่ปุ๋ยโบแตสเชื่อมทุกแปลงย่อยในอัตรา 50 กก. K_2O /เฮกตาร์ โดยวิธีหว่านรองพื้น การดูแลรักษากระทำเหมือนการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 3

ทำการทดลองในกระถางระหว่างวันที่ 22 กรกฎาคม 2534 - 16 กันยายน 2534 ที่เรือนทดลองศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อศึกษาอิทธิพลของปุ๋ยไนโตรเจนระดับต่าง ๆ ต่อกระบวนการตรึงไนโตรเจนในถั่วแดงหลวงพันธุ์หมอกจ๋าม วางแผนการทดลองแบบ Split-plot มี 3 ซ้ำ โดยให้การปลูกข้าวไร่ใช้เบียม 2 ระดับคือ ไม่คลุมข้าวไร่ใช้เบียมกับการคลุมข้าวไร่ใช้เบียมสายพันธุ์ UMR 1899 เป็น main plot ส่วน sub plot คือการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน (NH_4NO_3) 4 อัตราที่ระดับ 0, 2.5, 5, และ 10 mM ตามลำดับ ปลูกถั่วแดงหลวงในกระถางซึ่งกว้าง 30 ซม. สูง 25 ซม. ที่บรรจุด้วยทรายจำนวน 16 กิโลกรัม ที่ผ่านการลวกด้วยน้ำเดือด หลังจากงอกได้ 7 วันทำการถอนแยกให้เหลือ 5 ต้น/กระถาง ใน

แต่ละซ้ำของการทดลองแต่ละตัวรับจะทำการปลูกทั้งหมด 4 กระจ่าง ในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งจะเก็บครั้งละ 1 กระจ่าง

ทุกกระจ่างจะได้รับการรดด้วยสารละลาย 2 ครั้ง/วัน โดยแต่ละครั้งจะได้รับสารละลาย 1 ลิตรที่ประกอบด้วย 1000 μM Ca ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 500 μM P (KH_2PO_4) 10 μM Fe (Fe-citrate) 250 μM Mg ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 250 μM K (K_2SO_4) 1 μM Mn ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 2 μM B 0.5 μM Zn 0.2 μM Cu 0.1 μM Co และ 0.1 μM Mo สำหรับปุ๋ยไนโตรเจนทั้ง 4 ระดับ จะใส่พร้อมกับสารละลายธาตุอาหารดังกล่าว

การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ 1 ตารางเมตร เมื่อถั่วแดงหลวงเจริญถึงระยะ R_2 (ดอกบานเต็มที่) (Fehr et al., 1971) R_4 (ติดฝักเต็มที่) และ R_6 (ติดเมล็ดเต็มที่) สำหรับการทดลองที่ 1 ระยะ V_4 (ใบประกอบชุดที่ 4 คลี่เต็มที่) R_2 R_4 R_6 และ R_7 (แก่ทางสรีรวิทยา) สำหรับการทดลองที่ 2 ส่วนการทดลองที่ 3 เก็บตัวอย่างครั้งละ 1 กระจ่างที่ระยะ V_4 R_2 R_4 และ R_6 เพื่อหาน้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน น้ำหนักแห้งปม ไนโตรเจนทั้งหมดในต้น และองค์ประกอบของ ไนโตรเจน ในน้ำหลอเลี้ยงลำต้น

1. น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน ตัดต้นถั่วแดงหลวง ได้ข้อแรกลง ไปให้ตัดดินมากที่สุดจากพื้นที่ 1 ตารางเมตร นำไปเข้าตูบที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักแห้งส่วนที่อยู่เหนือดินทั้งหมด

2. การเก็บน้ำหลอเลี้ยงลำต้น สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำหลอเลี้ยงลำต้นจากถั่วแดงหลวง 15 - 20 ต้น โดยวิธี Root bleeding (Peoples et al., 1989) ดังนี้

2.1 ตัดต้นถั่วแดงหลวงด้วยกรรไกรที่เหนือผิวดินถัดจากข้อแรกลงไป

2.2 ใช้สายยางที่มีขนาดพอดีกับลำต้นถั่วแดงหลวงยาวประมาณ 3 - 4

เซ็นติเมตรสวมลง ไปตรงต่อถั่วที่ตัดไว้

2.3 ใช้ปิเปตปาสเตอร์ (Pasteur pipette) ดูดน้ำหล่อเลี้ยงลำต้นที่ไหลซึมออกตามแรงดันของรากมาซึ่งอยู่ในสายยางใส่ในหลอดที่มีฝาปิด หนึ่งการเก็บตัวอย่างน้ำหล่อเลี้ยงลำต้นที่ซึ่งอยู่ในสายยางควรจะถูกเก็บภายในเวลาไม่เกิน 30 นาที หลังจากตัดเพราะถ้าปล่อยไว้นานอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีเกิดขึ้นกับสารประกอบในน้ำหล่อเลี้ยงลำต้น

2.4 ตัวอย่างน้ำหล่อเลี้ยงลำต้นที่เก็บได้จะถูกนำไปแช่เย็นไว้ในถังน้ำแข็งทันทีที่เก็บมา แล้วจึงเอาไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10°C เพื่อรอการวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

3. น้ำหนักแห้งปม เก็บปมจากรากแก้วแดงหลวงต้นที่ถูกเก็บตัวอย่างน้ำหล่อเลี้ยงลำต้นเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักแห้ง

4. ไนโตรเจนทั้งหมดในพืช หลังจากชั่งน้ำหนักแห้งส่วนที่อยู่เหนือดินทั้งหมด ตัวอย่างแก้วแดงหลวงจะถูกนำไปบดให้ละเอียดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Micro Kjeldahl

5. ผลผลิต ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตจากพื้นที่ 2 ตารางเมตร สำหรับการทดลองที่ 1 และ 2 เมื่อกว้างหลวงอยู่ในระยะสุกแก่เต็มที่

การวิเคราะห์น้ำหล่อเลี้ยงลำต้นและการหาสัดส่วนไนโตรเจนที่ได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจน

น้ำหล่อเลี้ยงลำต้นที่เก็บได้ในแต่ละครั้งจะถูกนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารประกอบไนโตรเจน ได้แก่ ยูรีโด ไนเตรต และกรดอะมิโน เพื่อนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยูรีโดสัมพัทธ์ (Relative ureide index) ซึ่งเป็นสัดส่วนของไนโตรเจนในรูปของยูรีโดต่อไนโตรเจนที่มีอยู่ในน้ำเลี้ยงลำต้นทั้งหมด (Peoples et al., 1989) คำนวณได้ดังนี้

$$\text{Relative ureide index} = \frac{(4 \times \text{ureide}) \times 100}{(4 \times \text{ureide} + \text{nitrate} + \text{amino acid})}$$

ความเข้มข้นของยูรีโอต์ ไนเตรท และกรดอะมิโนมีหน่วยเป็นไมล สำหรับ ยูรีโอต์ 1 ไมล.เอกล มีไนโตรเจน 4 อะตอม ส่วนไนเตรท และกรดอะมิโน 1 ไมล.เอกล มีไนโตรเจน 1 อะตอม

คำนวณสัดส่วนของไนโตรเจนที่ได้จากกระบวนการตรึงจากเปอร์เซ็นต์ยูรีโอต์ สัมพันธ์ โดยใช้สมการความสัมพันธ์มาตรฐานซึ่งได้มาจากการคิดค่าเฉลี่ยระหว่างองค์ประกอบ ไนโตรเจนในน้ำหล่อเลี้ยงลำต้น และการตรึงไนโตรเจนในถั่วเหลือง ถั่วเขียว (green gram) ถั่วเขียวพิวดำ (black gram) cowpea dry bean และ pigeon pea (Peoples and Herridge, pers. comm.) ดังนี้

$$(P) = 1.48 (X - 4.89)$$

สำหรับช่วงการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบจนถึงระยะสร้างเมล็ด

เมื่อกำหนดให้

(P) = สัดส่วนของไนโตรเจนที่ได้จากกระบวนการตรึง

X = เปอร์เซนต์ยูรีโอต์สัมพันธ์

คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจนในถั่วแดง หลวงตามันตอนต่อไว้

1. คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนสะสมในพืช (total plant nitrogen)

ในแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่างจากน้ำหนักแห้งส่วนที่อยู่เหนือดิน และเปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจนทั้งหมดในพืช

2. คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนสะสมในพืชที่เพิ่มขึ้นในแต่ละช่วงเก็บเกี่ยว

3. หาค่าเฉลี่ยของสัดส่วนไนโตรเจนที่ได้จากกระบวนการตรึงในแต่ละช่วง เก็บเกี่ยว

4. คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้ในแต่ละช่วงเก็บเกี่ยวจาก (2) x

(3)

5. คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้ทั้งหมดตลอดฤดูปลูกจากการสะสม ไนโตรเจนที่ตรึงได้ในแต่ละช่วงเก็บเกี่ยว