

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

สถานที่และระยะเวลาทดลอง

การทดลองที่ 1 ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษ์ศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การทดลองที่ 2 ทำการทดลองในกระถาง ณ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การทดลองที่ 3 ทำการทดลองที่สถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหิยะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การศึกษาทดลองกระทำต่อเนื่องกัน 3 ฤดูปลูก (2 ปี) เริ่มตั้งแต่เดือน เมษายน 2543 ถึงเดือน พฤษภาคม 2545

แผนการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาถึงผลกระทบของสารกำจัดวัชพืชต่อเชื้อแบคทีเรียปมรากแก้วในอาหารเลี้ยงเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design มี 4 ซ้ำ และ 4 กรรมวิธีการทดลองในแต่ละซ้ำมีกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่สารกำจัดวัชพืชในอาหารเลี้ยงเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 ใส่สารกำจัดวัชพืช imazethapyr

กรรมวิธีที่ 3 ใส่สารกำจัดวัชพืช oxyfluorfen

กรรมวิธีที่ 4 ใส่สารกำจัดวัชพืช sulfentrazone

ก่อนการใส่สารกำจัดวัชพืชแต่ละชนิด นำสารกำจัดวัชพืชแต่ละชนิดมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นดังนี้ 0.67 % , 0.20 % และ 0.60 % ตามลำดับ หลังจากนั้นนำมากรองด้วย membrane filter ที่มีขนาดช่องว่าง 0.2 ไมโครเมตร เพื่อให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์และทำการใส่สารกำจัดวัชพืชดังกล่าวแต่ละชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในอัตรา 2.05 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร หลังจากใส่เชื้อแล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปเขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และหาปริมาณเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การบันทึกข้อมูล

หาปริมาณเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีที่ 1 และ 2 ด้วยวิธี drop plate ส่วนกรรมวิธีที่ 3 และ 4 ใช้วิธี most propable number (Somasegaran and Hober , 1985) และนับปริมาณเชื้อไรโซเบียมที่มีในอาหาร YMB ก่อนทำการใส่สารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนออกทั้ง 3 ชนิด และทุก 3 วัน รวม 10 ครั้ง หลังการใส่สารกำจัดวัชพืช นำผลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองที่ 2 การศึกษาถึงผลกระทบของสารกำจัดวัชพืชต่อเชื้อแบคทีเรียปมรากแก้วที่มีในดินตามธรรมชาติและเชื้อที่คลุกเมล็ดก่อนปลูก โดยจัดกรรมวิธีการทดลองแบบ Factorial และใช้แผนการทดลองแบบ Randomized complete design block ทำการทดลอง 4 ซ้ำ และมี 2 ปัจจัย ได้แก่

ปัจจัยที่ 1 การใช้เชื้อไรโซเบียม ซึ่งมี 2 กรรมวิธี คือ การใช้และการไม่ใช้ผงเชื้อไรโซเบียม คลุกเมล็ดแก้วเหลืองก่อนปลูก

ปัจจัยที่ 2 คือการใช้สารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก ซึ่งมี 4 กรรมวิธี คือ control ซึ่งไม่ใช้สารกำจัดวัชพืช ส่วนอีก 3 กรรมวิธีมี การใช้สารกำจัดวัชพืช 3 ชนิด ได้แก่ imazethapyr อัตรา 20 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ oxyfluorfen อัตรา 40 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ และ sulfentrazone อัตรา 240 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่

สำหรับอัตราการฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืชแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นอัตราแนะนำสำหรับเกษตรกร และใช้ผงเชื้อ *Bradyrhizobium japonicum* สายพันธุ์ THA7 ซึ่งอยู่ในรูปผงเชื้อที่ใช้ผงดินพีทเป็นวัสดุเสริม และมีเชื้อไม่ต่ำกว่า 10^8 เซลล์ต่อกรัม คลุกเมล็ดก่อนปลูก โดยใช้สารละลาย gum acacia เป็นสารเสริม และใส่เชื้อในอัตรา 10^6 เซลล์ต่อเมล็ด ใช้แก้วเหลือง 5 เมล็ดต่อกระถาง เมื่อแก้วเหลืองอายุ 10 วันหลังปลูก ถอนแยกให้เหลือ 3 ต้น ต่อกระถาง จากนั้นทำการดูแลรักษาตามความเหมาะสม

การบันทึกข้อมูล

1. ข้อมูลดิน คุณสมบัติของดินที่ใช้ปลูกแก้วเหลืองในกระถางก่อนปลูกดังนี้ คือ pH ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ ปริมาณโปแตสเซียมที่สามารถแลกเปลี่ยนได้ และหาปริมาณเชื้อไรโซเบียมที่มีในดินตามธรรมชาติ

2. ข้อมูลด้านพืช บันทึกความสูงของแก้วเหลืองภายหลังการฉีดพ่นด้วย สารกำจัดวัชพืชทุก ๆ 3 วัน จนถึงระยะออกดอก และบันทึกน้ำหนักแห้งของแก้วเหลืองส่วนเหนือดิน จำนวนปมและน้ำหนักแห้งของปมแก้วเหลืองต่อต้น ตลอดจนการประเมินการตรึงไนโตรเจนโดยการวิเคราะห์สัดส่วนยูรีโอต์ในโตรเจนในน้ำเลี้ยงจากตอราก(Herridge , 1984)

การทดลองที่ 3 การศึกษาถึงผลกระทบของสารกำจัดวัชพืชต่อแก้วเหลืองและต่อเชื้อแบคทีเรียภายใต้สภาพไร่นา โดยวางแผนการทดลองแบบ Split plot design ทำการทดลอง 4 ซ้ำ มีการใส่เชื้อไรโซเบียม 2 ระดับ คือ ไม่ใส่และใส่เชื้อไรโซเบียม ในอัตรา 10^6 เซลล์ต่อเมล็ด เป็น main plot ส่วนกรรมวิธีการทดลองใน sub plot คือ การใช้สารกำจัดวัชพืช 7 กรรมวิธีดังต่อไปนี้

- | | | |
|----------------|----|-----------------------|
| 1. imazethapyr | 20 | กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ |
| 2. imazethapyr | 40 | กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ |

3. oxyfluorfen	40	กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่
4. oxyfluorfen	80	กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่
5. sulfentrazone	240	กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่
6. sulfentrazone	240	กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่
7. ไม่ใช้สารกำจัดวัชพืช		

เชื้อไรโซเบียม ที่ใช้ปลูกเชื้อคือ *Bradyrhizobium japonicum* สายพันธุ์ THA7 ซึ่งอยู่ในรูปผงพืชและมีคุณสมบัติและวิธีการปลูกเมล็ดดังระบุในการทดลองที่ 2 ซึ่งมีขนาดแปลง (plot size) 4 x 6 เมตร ใช้ระยะปลูก 25 x 30 เซนติเมตร หลังปลูก 2 วัน ใช้เครื่องพ่นแบบสะพายหลัง (knapsack sprayer) พ่นด้วยปริมาณน้ำ 80 ลิตรต่อไร่ ใช้หัวพ่นรูปพัด (flat fan) ตามกรรมวิธีต่างๆ ทุกระดับ เมื่อถั่วเหลืองอายุ 10 วัน ทำการถอนแยกให้เหลือ 3 ต้นต่อ 1 หลุม ตลอดการทดลองมีการให้น้ำและป้องกันกำจัดศัตรูพืชตามความเหมาะสม

การบันทึกข้อมูล

1. ข้อมูลดิน เก็บตัวอย่างดินในแปลงทดลองก่อนปลูก แบบ composite sample เพื่อวิเคราะห์หา pH ปริมาณอินทรีย์วัตถุดิน ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้ โบตาสเซียมที่สามารถแลกเปลี่ยนได้ และปริมาณของไรโซเบียมที่มีอยู่ในดินตามธรรมชาติ

2. ข้อมูลด้านวัชพืช

2.1 ประเมินประสิทธิภาพ (Efficacy) ของสารกำจัดวัชพืช ทั้ง 3 ชนิด ภายหลังจากฉีดพ่น 15 และ 30 วัน โดยพิจารณาจากลักษณะที่ปรากฏบนวัชพืช คือ การเจริญเติบโตและอาการเป็นพิษอื่นๆ หรือตายของวัชพืช ได้แก่ ใบไหม้ ใบงอ ใบหงิก และอาการผิดปกติอื่นๆ หรือตายของวัชพืช และให้คะแนนเป็นเปอร์เซ็นต์โดยสายตาดังนี้ (ตรีนัย, 2538)

0	เปอร์เซ็นต์	=	ไม่สามารถควบคุมได้
1-40	เปอร์เซ็นต์	=	ควบคุมได้เล็กน้อย
41-60	เปอร์เซ็นต์	=	ควบคุมได้ปานกลาง
61-80	เปอร์เซ็นต์	=	ควบคุมได้ดี
81-100	เปอร์เซ็นต์	=	ควบคุมได้อย่างสมบูรณ์

2.2 ความหนาแน่นและน้ำหนักแห้งของวัชพืช เก็บตัวอย่างวัชพืชจากพื้นที่ 0.5 x 0.5 ตารางเมตร หลังการฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืชทั้ง 3 ชนิด แล้ว 30 วัน เพื่อนำมาทำการแยกประเภทของวัชพืชออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ ใบแคบ ใบกว้าง และวัชพืชตระกูลถั่ว และบันทึกข้อมูลด้านความหนาแน่นของวัชพืช โดยวิธีการหาน้ำหนักแห้งของวัชพืชของวัชพืชแต่ละประเภท

3. ข้อมูลด้านพืช

3.1 บันทึกความสูงของต้นถั่วเหลืองและให้คะแนนความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชต่อถั่วเหลือง โดยเปรียบเทียบความสมบูรณ์ และลักษณะต่างๆ ของใบและต้นถั่วเหลือง เทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ใช้สารกำจัดวัชพืช จากการสังเกตด้วยตาทุกๆ 7 วัน และให้คะแนนเปอร์เซ็นต์โดยสายตาดังนี้ (ตริยชัย, 2538)

0	เปอร์เซ็นต์	=	ไม่แสดงอาการเป็นพิษ
1-40	เปอร์เซ็นต์	=	แสดงอาการเป็นพิษเล็กน้อย
41-60	เปอร์เซ็นต์	=	แสดงอาการเป็นพิษปานกลาง
61-80	เปอร์เซ็นต์	=	แสดงอาการเป็นพิษรุนแรง
81-100	เปอร์เซ็นต์	=	พืชปลูกตาย

3.2 ทำการเก็บตัวอย่าง เมื่อถั่วเหลืองมีการเจริญเติบโตที่ระยะ V4 R2 และ R6 แล้วนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาสิ่งต่อไปนี้

3.2.1 น้ำหนักแห้งและการสะสมไนโตรเจนของส่วนที่อยู่เหนือดิน และน้ำหนักแห้งส่วนใต้ดิน โดยเก็บตัวอย่างต้นถั่วเหลือง แล้วนำตัวอย่างมาแยกเป็นส่วนของ ใบ ลำต้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้ง แล้วนำแต่ละส่วนไปบด ก่อนวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน โดยวิธี micro-Kjeldahl

3.2.2 จำนวนปม และน้ำหนักแห้งปม ทำการเก็บตัวอย่าง รากและปม ในพื้นที่ 0.5 ตร.ม. โดยขุดรากของต้นถั่วเหลืองแต่ละต้นหรือแต่ละหลุมปลูก ด้วยความระมัดระวัง เพื่อให้ปมอยู่ติดกับรากมากที่สุด แล้วใช้น้ำล้างดินที่ติดอยู่กับรากให้ออก หลังจากนั้นจึงแกะปมที่ลักษณะเป็น effective nodule คือมีความต่ง สีออกชมพูหรือแดง และปมที่แยกออกจากราก นำราก และปม เข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักแห้ง

3.2.3 น้ำหล่อเลี้ยงลำต้น (xylem sap) การศึกษาครั้งนี้ ทำการวัดการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลือง ด้วยวิธียูรีโดเทคนิค (Ureide technique) (Peoples *et al.*, 1989) โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำหล่อเลี้ยงลำต้น ที่ส่งขึ้นจากรากด้วยวิธี root bleeding โดยตัดต้นถั่วเหลืองเหนือพื้นดิน ถัดจากข้อแรกลงไป ใช้หลอดยางที่มีความยืดหยุ่นสวมตรงตอกิ่งที่ตัดไว้ แล้วใช้หลอดดูด (Pasteur Pipette) ดูดน้ำหล่อเลี้ยงที่ไหลซึมมาไว้ในหลอดขนาดเล็กปิดฝา แล้วแช่ในภาชนะที่มีน้ำแข็งก่อนไปเก็บที่อุณหภูมิ -15 °C เพื่อรอการวิเคราะห์หาปริมาณของยูรีโด (allantoin และ allantoinic acid) ด้วยวิธีของ Young and Conway (1942) ปริมาณไนเตรท โดยวิธี salicylic acid technique (Cataldo *et al.*, 1975) และปริมาณกรดอะมิโน โดยวิธีของ Yemm and Cocking (1955) และนำค่าที่ได้ไปหาเปอร์เซ็นต์ยูรีโดสัมพัทธ์ (relative ureide, RU) จากสูตร

$$RU (\%) = [4 \times a / (4a + b + c)] \times 100$$

RU (%) = Relative ureide (%)

a = ความเข้มข้น (molar) ของ Ureide โดย 1 โมเลกุลของ

Ureide มีไนโตรเจน = 4 อะตอม

b = ความเข้มข้น (molar) ของ amino acid

c = ความเข้มข้น (molar) ของ Nitrate

จากค่ายูริโอไซด์สัมพันธ์ นำไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนที่ตรึงได้ [P fix (%)] จากสมการมาตรฐานดังต่อไปนี้ (Peoples *et al.* , 1989)

$P \text{ fix } (\%) = 1.2 (Ru - 4.8)$ สำหรับระยะการเจริญทางลำต้นและใบจนถึงระยะติดฝัก

$P \text{ fix } (\%) = 1.5 (Ru - 21.3)$ สำหรับระยะการเจริญตั้งแต่ติดฝักเป็นต้นไป

RU เป็นค่าเฉลี่ยระหว่างวันเก็บตัวอย่าง

3.3 เก็บตัวอย่างพืชจากพื้นที่เก็บเกี่ยว 4 x 4 ตารางเมตรเพื่อหาองค์ประกอบผลผลิต และผลผลิตพื้นที่ต่อไร่