ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์คุณสมบัติของดินและพืช

การวิเคราะห์คุณสมบัติของพืช

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total-N) โดยวิธี Colorimetry method (Novozamsky *et al.*,1974)

1. การเตรียมสาร

1. 10 M NaOH (ละลาย NaOH 200 g ในน้ำกลั่น 500 มล.)
2. Salicylic acid 110 g ใน 10 M NaOH 105 มล. (เตรียมก่อนใช้งาน)
3. Na_2HPO_4 buffer pH 12.3
4. 4% (W/V) EDTA
5. Sodium Hypochlorite 1 M ใน 0.1 M NaOH นำมาเจือจาง 20 มล. ในน้ำ 100 มล. (ก่อนใช้งาน)
6. Nitroprusside 50 mg (0.050 g) ในน้ำ 100 มล. (เตรียมก่อนใช้งาน)

Solution I: (2) 50 มล. + (6) 100 มล. + (4) 5 มล.

Solution II: (3) 200 มล. + (6) 100 มล. + (5) 50 มล.

7. สารละลายมาตรฐาน $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 2500 มล./ลิตร

ละลาย $(NH_4)_2SO_4$ 11.793 g ในน้ำ 1 L (2500 มล./ลิตร)

2. วิธีการวิเคราะห์

1. เจือจางสารละลายมาตรฐาน $(NH_4)_2SO_4$ ให้มีความเข้มข้น 1, 2.5 , 5.0 , 7.5 , 10.0 , 12.5 และ 15.0 มล./ลิตร ด้วยน้ำกลั่นในหลอดทดลอง
2. ปิเปตสารละลาย extracts ลงในหลอดทดลอง 0.2 มล.
3. เติมสารละลาย Solution I จำนวน 3 มล. และ Solution II จำนวน 5 มล. ตามลำดับ
4. ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์นาน 2 ชม.
5. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 *n*m
6. เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับสารละลายมาตรฐานซึ่งมีความเข้มข้นในช่วงตั้งแต่ 0-15 µgN./ml. แล้วคำนวณปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในตัวอย่างจากสมการ

$$\% N = \frac{A \times V \times \text{dilution factor}}{10^6 \times W}$$

เมื่อ A : ความเข้มข้นของN ที่ได้จากการย่อยตัวอย่างของตัวอย่างเมื่อเปรียบกับสารละลายมาตรฐาน (μgN/ml)

V : ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการย่อย (มล.)

W : น้ำหนักตัวอย่างพืชที่นำมาย่อย (กรัม)

Measurement of Nitrogen fixation by leguminous

Determination of Allantoin

(Young and Conway, 1942)

Reagent:

1. NaOH (0.5 M)
2. Phenylhydrazin hydrochloride (0.33%) (to be made fresh on each day of analysis and store in a brown bottle)
3. Potassium ferricyanide (0.833%) (to be made fresh on each day of analysis and store in a brown bottle)
4. HCl (0.65 M)
5. HCl (10 M) strored at $0^{\circ}C$
6. Allantoin standard (1.0 μ mole/mL)

   Dilute stock for peppering standard curve

   1) 10 *n* mole/mL
   2) 20 *n* mole/mL
   3) 30 *n* mole/mL
   4) 40 *n* mole/mL
   5) 50 *n* mole/mL

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Note: Always includes 2.5 mL distilled water blank with standard during analysis. A full set of standards should be run through (0-125 *n* mole; take 2.5 mL from each dilute stock) to check linearity of response.

Procedure:

1. Pipette 0.05-0.10 mL of sap sample into each test tube and dilute to 2.5 mL with distilled water.
2. Add 0.5 mL of 0.5 M NaOH.
3. Mix and place tubes in boiling water bath for 10-15 min.
4. Remove tubes and allow to cool to room temperature, then add 0.5 mL of 0.65 M Hcl and 0.5 mL of 0.33% phenylhydrazine hydrochloride to each tube.
5. Place tubes in boiling water bath for 2-4 min.
6. Cool tubes immediately in ice bath for 15 min. (The rapidity of cooling is an important factor in technique, rapid cooling increased the intensity of the final color and lower temperatures also increase the color intensity.)
7. After removed tubes from ice bath, add 2 mL of 10 N HCl (chilled to 0^{o}C) then 0.5 mL of potassium ferricyanide. (mix immediately after each addition of potassium ferricyanide)
8. Stand at room temperature for 10 minutes there is a 8-15% fading of color intensity, therefore the measurement of sample should be finished within 20 min)

Determination of Amino acids with Ninhydrin

(Yemm and Cocking, 1955) [An adaptation of the method by Herridge, 1984]

Reagents:

1. Citrate buffer pH5 (citric acid 16.8% w/v, NaOH 6.4% w/v)
2. Ninhydrin reagent Zninhydrin 0.96% (w/v), ascorbic acid 0.033% (w/v) in 2-methoxyethanol)
3. Ethanol 60% (v/v)
4. Asparagine standard (2.5 µ mole/mL)

   Dilute stock for peppering standard curve

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1) 50 *n* mole/mL
2) 100 *n* mole/mL
3) 150 *n* mole/mL
4) 200 *n* mole/mL
5) 250 *n* mole/mL

Note: Always includes 0.5 mL distilled water blank with standard during analysis. A full set of standards should be run through (0-125 *n* mole, take 0.5 mL from each dilute stock) to check linearity of response.

Procedure:

1. Pipette 0.05 mL of sap sample into each test tube and dilute to 0.5 mL with distilled water.
2. Add 0.5 mL of citrate buffer.
3. Add 1.2 mL of ninhydrin reagent and mix well.
4. Place tubes in boiling water bath for 25 min.
5. Remove from boiling water bath and cool to room temperature then add 3 mL of 60% ethanol.
6. Measure the absorbance at 570 nm.

Determination of Nitrate(Cataldo *et al,* 1975)

Reagents:

1. 2 N NaOH
2. 5% (w/v) Salicylic acid in concentrated H_2SO_4 (SA- H_2SO_4) (5 g of salicylic acid in 100 mL of con. H_2SO_4, make fresh at least once each week and store in a brown bottle)
3. Nitrate atandard (25 µmole KNO_3 / mL)

   Dilute stock for peppering standard curve

   1) 2.50 µmole KNO_3 / mL
   2) 5.00 µmole KNO_3 / mL
   3) 7.50 µmole KNO_3 / mL
   4) 10.0 µmole KNO_3 / mL

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Note: Always includes 0.05 mL distilled water blank with standard during analysis. A full set of standards should be run through (0-0.5 µmole, take 0.05 mL from each dilute stock) to check linearity of response.

Procedure:

1. Pipette 0.05 ml of sap sample into test tube.
2. Add 0.2 mL of 5% SA- H_2SO_4 to sap sample and mix well.
3. Stand at room temperature for 20 min, then add 4.75 mL of 2N NaOH into tubes slowly (to raise the pH above 12).
4. Cool to room temperature and measured the absorbance at 410 nm.

Relative ureide index

$$\text{Relativeureide index}(\%) = \frac{\text{UreideN}}{\text{Totalsap N}} \times 100$$

Since one ureide molecule contains 4 N-atom, ureide N is calculates as 4 x ureide molar concentration. Total sap N is estimated as 4 x ureide + amino acid + nitrate.

The relative ureide index can be calculated as:

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Descriptors of stage of development of the crop cowpea (Fehr et al., 1971)

Stage	Description
V(n)	Vegetative phases of growth, with (n) denoting the number of nodes on the main stem
R1	Early flowering
R2	Late flowering
R3	Early pod-fill; very small pods
R4–5	Mid pod-fill; larger pods with beans starting to develop
R6	Late pod-fill; pods containing full-sized green beans
R7	Physiological maturity; pods yellowing and about 50% leaves yellow
R8	Harvest maturity; pods brown

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวก 1 Analysis of variance ของความสูงที่ระยะ V6 V9 และ R2ของถั่วพุ่มที่ปลูกในดินที่ไม่ได้ใส่ปูนสำหรับการทดลองในกระถาง

SOV	df	MS		
		ความสูงV6	ความสูงV9	ความสูงR2
ซ้ำ	3	10.7786	27.6667	12.8750
เชื้อ	7	12.3382*	10.6429	14.3393
error	21	4.9572	8.3810	8.7560

หมายเหตุ : * = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางภาคผนวก 2 Analysis of variance ของน้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน น้ำหนักแห้งปมถั่ว และค่า SPAD ของถั่วพุ่มที่ปลูกในดินที่ไม่ได้ใส่ปูนสำหรับการทดลองในกระถาง

SOV	df	MS		
		น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน	น้ำหนักแห้งปมถั่ว	SPAD
ซ้ำ	3	0.94099	0.02959	12.2971
เชื้อ	7	1.50356	0.05467*	9.8298
error	21	1.43068	0.01616	7.9180

หมายเหตุ : * = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก 3 Analysis of variance ของดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์(%) % N ที่ได้จากการตรึงN N uptake(มก.N/ต้น) และ Nที่ได้จากการตรึง(มก.N/ต้น) ของถั่วพุ่มที่ปลูกในดินที่ไม่ได้ใส่ปูนสำหรับการทดลองในกระถาง

SOV	df	MS			
		ดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์ (%)	%N ที่ได้จากการตรึง N	N uptake (มก.N/ต้น)	Nที่ได้จากการตรึง (มก.N/ต้น)
ซ้ำ	3	73.720	131.058	1432.98	2315.25
เชื้อ	7	265.338*	471.712*	5412.47*	4224.75*
error	21	54.591	97.051	1107.76	729.02

หมายเหตุ : * = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางภาคผนวก 4 Analysis of variance ของความสูงที่ระยะ V6 V9 และ R2ของถั่วพุ่มที่ปลูกในดินที่ใส่ปูนสำหรับการทดลองในกระถาง

SOV	df	MS		
		ความสูงV6	ความสูงV9	ความสูงR2
ซ้ำ	3	38.6146	50.3646	13.9479
เชื้อ	7	3.1563	2.6741	5.4241
error	21	4.5729	7.0789	15.2336

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก 5 Analysis of varianceของน้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน น้ำหนักแห้งปมถั่ว และค่า SPAD ของถั่วพุ่มที่ปลูกในดินที่ใส่ปูนสำหรับการทดลองในกระถาง

SOV	df	MS		
		น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน	น้ำหนักแห้งปมถั่ว	SPAD
ซ้ำ	3	10.1405	0.02683	10.9575
เชื้อ	7	2.9195	0.03243	19.4054
error	21	4.7669	0.01814	11.6436

ตารางภาคผนวก 6 Analysis of variance ของดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์(%) %N ที่ได้จากการตรึงN N uptake(มก.N/ต้น) และ Nที่ได้จากการตรึง(มก.N/ต้น) ของถั่วพุ่มที่ปลูกในดินที่ใส่ปูนสำหรับการทดลองในกระถาง

SOV	df	MS			
		ดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์ (%)	%N ที่ได้จากการตรึง N	N uptake (มก.N/ต้น)	Nที่ได้จากการตรึง (มก.N/ต้น)
ซ้ำ	3	281.218	304.030	5760.70	1014.3
เชื้อ	7	758.279*	820.017*	4589.65	10978.6*
error	21	189.541	204.998	3219.89	3209.7

หมายเหตุ : * = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก 7 Analysis of variance ของน้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน น้ำหนักแห้งปมถั่ว และดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์(%)ของถั่วพุ่มที่ระยะ V9 สำหรับการทดลองในแปลงทดลอง

SOV	df	MS		
		น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน	น้ำหนักแห้งปมถั่ว	ดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์ (%)
ซ้ำ	3	6000.70	0.00297	474.552
เชื้อ	3	1698.08	0.00963*	83.243
error	9	940.13	0.00201	45.148

หมายเหตุ : * = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางภาคผนวก 8 Analysis of variance ของ%N ที่ได้จากการตรึง N N uptake(มก.N/ต้น) และ N ที่ได้จากการตรึง(มก.N/ต้น)ของถั่วพุ่มที่ระยะ V9 สำหรับการทดลองในแปลงทดลอง

SOV	df	MS		
		%N ที่ได้จากการตรึง N	N uptake(มก.N/ต้น)	Nที่ได้จากการตรึง(มก.N/ต้น)
ซ้ำ	3	843.648	19.0423	0.57449
เชื้อ	3	147.987	1.0064	3.90884
error	9	80.264	1.6486	1.04173

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก 9 Analysis of variance ของน้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน น้ำหนักแห้งปมถั่ว และดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์ (%)ของถั่วพุ่มที่ระยะ R3.5 สำหรับการทดลองในแปลงทดลอง

SOV	df	MS		
		น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน	น้ำหนักแห้งปมถั่ว	ดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์ (%)
ซ้ำ	3	26529.9	0.00142	18.8707
เชื้อ	3	992.1	0.00084	75.8601*
error	9	3777.5	0.00075	12.9590

หมายเหตุ : * = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางภาคผนวก 10 Analysis of variance ของ%N ที่ได้จากการตรึง N N uptake(มก.N/ต้น) และNที่ได้จากการตรึง(มก.N/ต้น) ของถั่วพุ่มที่ระยะ R3.5 สำหรับการทดลองในแปลงทดลอง

SOV	df	MS		
		%N ที่ได้จากการตรึง N	N uptake(มก.N/ต้น)	Nที่ได้จากการตรึง(มก.N/ต้น)
ซ้ำ	3	33.567	17.0952	12.4786
เชื้อ	3	134.814*	0.9530	4.6738
error	9	23.011	4.3567	4.6958

หมายเหตุ : * = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก 11 Analysis of variance ผลผลิตผักสด น้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดิน และการสะสม N ของผักคะน้าในระยะเก็บเกี่ยว

SOV	df	MS		
		น้ำหนักสด	น้ำหนักแห้ง	N
ซ้ำ	3	2736028	23164.0	17.8546
เชื้อ	5	763369	6460.5	14.9368
error	15	1113110	9422.4	12.8790

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวจุฑามาศ ปูริยะ
วัน เดือน ปี เกิด	23 มิถุนายน 2524
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนส่วนบุญโญปถัมภ์ ลำพูน ปีการศึกษา พ.ศ. 2541
	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา พ.ศ. 2545

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved