

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการปลูกถั่วเหลืองเพื่อศึกษาผลกระทบของการขาดน้ำในระหว่างการออกดอกและสร้างฝักต่อการถ่ายเทสารสังเคราะห์และการสร้างผลผลิตในถั่วเหลืองสองชนิดที่สถานีวิจัยและศูนย์ฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนธันวาคม 2551 ถึง เดือนมีนาคม 2552 และเดือนพฤษภาคม 2552 ถึง เดือนกรกฎาคม 2552 โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) จำนวน 4 ซ้ำ

1. วิธีการปลูก

ปลูกถั่วเหลือง 4 พันธุ์ คือ พันธุ์สจ.2 พันธุ์สจ.4 และถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์นมเบอร์75 พันธุ์ AGS292 กำหนดการให้น้ำ 5 วิธีการ ดังนี้

1. Control ให้น้ำตามปกติที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง ถึงระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา

2. ทำการรดน้ำถั่วเหลือง 3 วัน หลังจากที่ยอดถั่วออกดอก แล้วให้น้ำตามปกติจนถึงระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา

3. ทำการรดน้ำถั่วเหลือง 5 วัน หลังจากที่ยอดถั่วออกดอก แล้วให้น้ำตามปกติจนถึงระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา

4. ทำการรดน้ำถั่วเหลือง 7 วัน หลังจากที่ยอดถั่วออกดอก แล้วให้น้ำตามปกติจนถึงระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา

5. ทำการรดน้ำถั่วเหลือง 9 วัน หลังจากที่ยอดถั่วออกดอก แล้วให้น้ำตามปกติจนถึงระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา

เตรียมดินโดยนำดินที่ใช้ในการทดลองมาตากแดดให้แห้ง จากนั้น บรรจุดินลงกระถางขนาด 12 นิ้ว วางกระถางโดยใช้ระยะห่างระหว่างกระถาง 50 เซนติเมตร รดน้ำให้ชุ่มจนดินอืดด้วยน้ำนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ใส่ปลูกคลุมเชื้อไรโซเบียมก่อนนำไปปลูก หยอดเมล็ดจำนวน 4-5 เมล็ดต่อกระถาง เมื่อเมล็ดงอกเป็นต้นกล้าให้ทำการถอนแยกให้เหลือ 2 ต้นต่อกระถางเมื่อเมล็ดงอกเป็นต้นกล้าให้น้ำตามปกติอย่างเพียงพอจนถึงระยะออกดอก จึงงดการให้น้ำตามแผนการทดลอง

2. การปฏิบัติ และการดูแลรักษา

มีการใส่ปุ๋ยแก้ถั่วเหลืองจำนวน 2 ครั้ง ครั้งแรก เมื่อถั่วเหลืองเก็บเมล็ดอายุ 15 วันหลังงอก และถั่วเหลืองฝักสดอายุ 20 วันหลังงอก ใช้ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 (N-P₂O₅-K₂O) อัตรา 50 กิโลกรัม/ไร่ ครั้งที่สอง เมื่อถั่วเหลืองเก็บเมล็ดอายุ 45 วันหลังงอก และถั่วเหลืองฝักสดอายุ 50 วันหลังงอก ใช้ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) อัตรา 25 กิโลกรัม/ไร่ การกำจัดวัชพืชทำโดยใช้แรงงานคนถอนและถางหญ้า การป้องกันโรคและแมลงศัตรูมีการฉีดพ่นยาฆ่าแมลง carbosulfan เมื่อพบว่ามีการระบาด

3. การเก็บตัวอย่าง และการบันทึกข้อมูล

3.1 ลักษณะทางพืชไร่

3.1.1 ความสูง จำนวนข้อต่อต้น จำนวนกิ่งต่อต้น จำนวนดอกต่อต้น และจำนวนฝักต่อต้น

3.1.2 น้ำหนักแห้งใบ ลำต้น ฝัก เมล็ด และราก โดยน้ำหนักแห้งได้จากการนำส่วนต่างๆ อบให้แห้งด้วยตู้อบ (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เก็บข้อมูลทุก 10 วัน หลังงอก และในช่วงที่ทำการรดน้ำเป็นระยะเวลา 3, 5, 7 และ 9 วัน

3.2 ลักษณะทางสรีรวิทยา

3.2.1 ดัชนีพื้นที่ใบ โดยทำการแยกใบออกจากต้นถั่วเหลือง แล้ววัดด้วยเครื่อง leaf area photometer คำนวณค่าดัชนีพื้นที่ใบ (leaf area index; LAI) โดยใช้สูตร

$$LAI = \frac{\text{พื้นที่ใบ}}{\text{พื้นที่ปลูก}}$$

เก็บข้อมูลทุก 10 วัน หลังงอก และในช่วงที่ทำการรดน้ำเป็นระยะเวลา 3, 5, 7 และ 9 วัน

3.2.2 ผลผลิต และองค์ประกอบผลผลิต เก็บข้อมูลเมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยว

ทำการเก็บข้อมูลจำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก แล้วนำไปอบให้แห้งด้วยตู้อบ (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บข้อมูลน้ำหนักผลผลิตต่อต้น น้ำหนักแห้งฝักต่อต้น และน้ำหนัก 100 เมล็ด

3.3 เก็บตัวอย่างดินก่อนปลูกถั่วเหลือง เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติดิน ได้แก่ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัส ปริมาณโพแทสเซียม ปริมาณแคลเซียม การแลกเปลี่ยนประจุบวกในดิน และ องค์ประกอบดิน

3.4 ข้อมูลสภาพภูมิอากาศ ได้แก่ อุณหภูมิสูงสุด-ต่ำสุด ความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด-ต่ำสุด ปริมาณน้ำฝน

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแบบแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยสิ่งทดลองโดยใช้ LSD (Least Significant Difference) ที่ค่าความเชื่อมั่น $p = 0.05$

2. วิเคราะห์หาอัตราการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง โดยใช้สมการ linear regression analysis (Senthong, 1979) เพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตรวม (crop growth rate, CGR) อัตราการเจริญเติบโตของใบ (leaf growth rate, LGR) อัตราการเจริญเติบโตของลำต้น (stem growth rate, SGR) อัตราการเจริญเติบโตของราก (root growth rate, RGR) และอัตราการเจริญเติบโตของฝัก (pod growth rate, PGR)

3. วิเคราะห์หาค่าประสิทธิภาพการของถ่ายเทสารสังเคราะห์ (partitioning coefficient of photosynthate) คำนวณได้จากสูตรของอัตราการเจริญเติบโตในส่วนต่าง ๆ ดังนี้

$$\% \text{ Partitioning Coefficient of photosynthate to leaf} = \frac{\text{LGR}}{\text{CGR}} \times 100$$

$$\% \text{ Partitioning Coefficient of photosynthate to stem} = \frac{\text{SGR}}{\text{CGR}} \times 100$$

$$\% \text{ Partitioning Coefficient of photosynthate to root} = \frac{\text{RGR}}{\text{CGR}} \times 100$$

$$\% \text{ Partitioning Coefficient of photosynthate to pod} = \frac{\text{PGR}}{\text{CGR}} \times 100$$

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

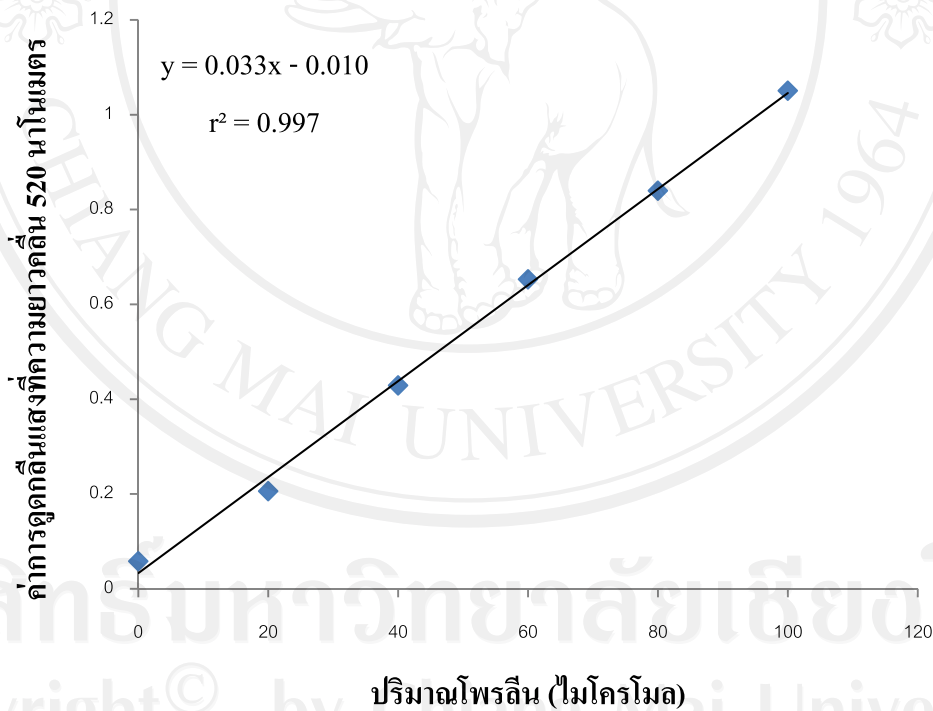
วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในใบตามวิธีของ Bates *et al.* (1973)

4.1 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ชั่งโปรตีน (proline) 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร โดยเติมน้ำกลั่น จะได้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร

4.2 การสร้างกราฟมาตรฐานโพรีลิน

ปีเปตสารละลายโพรีลินมาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 0, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองเติมน้ำกลั่นลงในหลอดแต่ละหลอดให้มีปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 3 มิลลิเมตร ผสมให้เข้ากัน คูณสารละลายมาหลอดละ 1 มิลลิเมตร นำมาทำปฏิกิริยากับกรด ninhydrin (BDH) และกรดอะซิติก อย่างละ 1 มิลลิเมตร ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาโดยนำหลอดทดลองมาแช่ในน้ำเย็น 0 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จึงเติมด้วย toluene ปริมาตร 4 มิลลิเมตร แล้วเขย่าด้วยเครื่อง vortex นาน 15-20 นาที สารละลายแยกออกเป็น 2 ชั้น นำชั้นบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโพรีลินมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 กราฟโพรีลินมาตรฐาน สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโพรีลินในสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จากใบถั่วเหลือง

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณโพรตีนในใบถั่วเหลืองดัดแปลงจากวิธีของ Bates *et al.* (1973) โดยนำใบถั่วเหลืองที่อบแห้งมาบดให้ละเอียด ชั่งมา 0.1 กรัม ใส่หลอดทดลองเติมด้วย sulfosalicylic acid 3 % ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงเพื่อให้เข้ากัน แล้วนำไปด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 คูณสารละลายที่กรองได้มา 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับกรด ninhydrin (BDH) และกรดอะซิติก อย่างละ 1 มิลลิลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาโดยนำหลอดทดลองมาแช่ในน้ำเย็น 0 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จึงเติมด้วย toluene ปริมาตร 4 มิลลิลิตร แล้วเขย่าด้วยเครื่อง vortex นาน 15-20 นาที สารละลายแยกออกเป็น 2 ชั้น นำชั้นบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ toluene เป็น blank นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาอ่านค่าหาปริมาณโพรตีนในสารละลายตัวอย่างใบถั่วเหลืองจากกราฟโพรตีนมาตรฐานแล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณสูตร ดังนี้

$$\text{โพรตีน (ไมโครโมล/กรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{A \times B \times 5}{C \times 115.5}$$

เมื่อ A = ปริมาณโพรตีนจากกราฟมาตรฐาน ($\mu\text{g/ml}$) สมการ $Y = 0.033x - 0.010$

โดยที่ B = ปริมาตร toluene 4 มิลลิลิตร

C = น้ำหนักใบถั่วเหลือง 0.1 กรัม

5 คือ ปริมาตร sulfosalicylic acid 3 % 5 มิลลิลิตร