บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ดำเนินการทดลองที่ ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร และภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2543 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2545 การศึกษาประกอบด้วย 3 การทดลอง ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

การทดลองที่ 1 ทดสอบพันธุ์เบื้องต้นเพื่อแยกระดับความทนทานต่อการขาดโบรอน

<u>การเตรียมเมล็ดพันธุ์</u>

ใช้สายพันธุ์ถั่วเขียวผิวมัน (*Vigna radiata*) จำนวน 70 สายพันธุ์ และ ถั่วเขียวผิวดำ (*Vigna mungo*) จำนวน 16 สายพันธุ์ เมล็ดพันธุ์ที่ใช้ได้รับการอนุเคราะห์จาก ศ. ดร. เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่และ ศ. ดร. พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นำสายพันธุ์ถั่วเขียวทั้งหมดมาปลูกขยายเมล็ดที่แปลงทดลองของศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อถึงระยะสุกแก่เก็บเมล็ดแยกแต่ละสายพันธุ์เพื่อนำไปหาความเข้มข้นของโบรอนในเมล็ดและนำมาทดสอบดังวิธีต่อไปนี้

<u>วิธีการทดสอบ</u>

นำเมล็ดที่ทราบความเข้มข้นของโบรอนของแต่ละสายพันธุ์ปลูกทดลองใน sand culture โดยใช้ทรายแม่น้ำที่ล้างแล้วบรรจุในถังคอนกรีตขนาด กว้าง 45 ซ.ม. ยาว 65 ซ.ม. ลึก 35 ซ.ม. รองก้นด้วยพลาสติก ปลูกถั่วเขียวสายพันธุ์ละแถวโดยใช้ระยะระหว่างหลุม 5 ซ.ม. ระยะระหว่างแถว 5 ซ.ม. ปลูกแถวละ 8 หลุมปลูกหลุมละ 3 เมล็ด โดยใช้ถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ กำแพงแสน 1 ซึ่งค่อนข้างทนทานต่อการขาดโบรอน (Rerkasem 1990) และ ถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ Regur ซึ่งอ่อนแอต่อการขาดโบรอน (Predisripipat, 1988) เป็นพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐาน หนึ่งถังคอนกรีตจะมี 12 แถวในถังคอนกรีตทุกใบจะปลูกถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ Regur และถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ กำแพงแสน 1 พันธุ์ละแถว หลังปลูกรดด้วยสารละลายที่มีธาตุอาหารจำเป็นประกอบด้วย $CaCl_2$ 1000 μM, $MgSO_4$ 250 μM, KH_2PO_4 500 μM, FeEDTA 10 μM, K_2SO_4 250 μM, $MnSO_4$ 1 μM, $ZnSO_4$ 0.5 μM, $ZnSO_4$ 0.5 μM, $CuSO_4$ 0.2 μM, $CoSO_4$ 0.4 μM, Na2MoO_4 0.1 μM (Broughton and Dilworth ,1971) และให้ KNO_3 5 mM โดยไม่ให้โบรอนในสารละลาย

การบันทึกข้อมูล

- ก่อนปลูกในทรายวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโบรอนในเมล็ดโดยวิธี Azomethine-H (Lohse, 1982)
- เมื่อถั่วเขียวอายุได้ 3 สัปดาห์ตรวจนับจำนวนต้นอ่อนที่งอกและต้นอ่อนที่ผิดปกติ ให้คะแนนความสมบูรณ์ของต้นอ่อนทีละต้นภายในแต่ละแถวโดยมีหลักเกณฑ์ดังนี้

อาการที่ปรากฏ	คะแนน
เกิดอาการ necrosis ที่เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดจนต้นแห้งตายเมื่อถึงวันตรวจนับ	1
แตกใบจริงคู่แรกได้แล้วหยุดพัฒนาหรือใบประกอบชุดแรกไหม้ไปก่อนที่จะคลี่กางเต็มที่	2
แตกใบประกอบชุดแรกได้แต่ใบประกอบชุดแรกมีขนาดเล็กชิดและม้วนงอ	3
แตกใบประกอบชุดแรกได้มีขนาดปกติแต่มีอาการม้วนงอ	4
แตกยอดเป็นพุ่มแจ้	5
แตกใบประกอบชุดที่ 2 ได้แต่มีอาการม้วนงอ	6
แตกใบประกอบชุดที่ 3 ได้แต่ใบประกอบม้วนงอ	7
ต้นปกติ	8

จากนั้นนำคะแนนของทุกต้นภายในแถวเดียวกันมาหาค่าเฉลี่ยเป็นคะแนนของแต่ละแถวซึ่งเป็นคะแนนของแต่ละสายพันธุ์

จากการทดลองที่ 1 ได้คัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเขียวที่มีความแตกต่างในการตอบสนองต่อการขาดโบรอนมาชนิดละ 3 สายพันธุ์ ได้แก่

ถั่วเขียวผิวดำ

1. พันธุ์ M1 (ทนทาน)
2. พันธุ์ Regur (อ่อนแอ)
3. สายพันธุ์ CPI79563 (อ่อนแอ)

ถั่วเขียวผิวมัน

4. พันธุ์กำแพงแสน 1 (KPS1: ค่อนข้างทนทาน)
5. สายพันธุ์ VC2755 (ค่อนข้างทนทาน)
6. สายพันธุ์ VC1163 (ค่อนข้างอ่อนแอ)

นำไปทดสอบการตอบสนองในสภาพแปลงทดลองและ sand culture ในการทดลองที่ 2 และ 3 ดังนี้

การทดลองที่ 2 การตอบสนองต่อระดับโบรอนในแปลงทดลองของถั่วเขียวผิวดำและถั่วเขียวผิวมันที่มีระดับความทนทานต่อการขาดโบรอนแตกต่างกัน

ได้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย มีรายละเอียดดังนี้

การทดลองที่ 2.1

วางแผนการทดลองแบบ Split plot จำนวน 4 ซ้ำ main plot คือระดับโบรอน 4 ระดับคือ ใส่ปูนขาว 320 กก./ไร่ (BL) เพื่อเพิ่มความรุนแรงของการขาดโบรอน (เบญจวรรณ และศันสนีย์, 2532) ไม่ใส่ปูนขาวและโบรอน (B0) ใส่โบรอนในรูปบอแรกซ์ ในอัตรา 0.16 กก./ไร่ (B1) และใส่บอแรกซ์ในอัตรา 1.6 กก./ไร่ (B2) sub plot คือสายพันธุ์ถั่วเขียวผิวดำและถั่วเขียวผิวมัน 6 สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 1 ประกอบด้วย ถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ M1 ถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ Regur ถั่วเขียวผิวดำสายพันธุ์ CPI 79563 ถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ KPS1 ถั่วเขียวผิวมันสายพันธุ์ VC2755 และ ถั่วเขียวผิวมันสายพันธุ์ VC1163 แต่ละหน่วยการทดลองปลูกในแปลงขนาดกว้าง 1 เมตร ยาว 4 เมตร ใช้ระยะระหว่างแถว 25 เซนติเมตร ระยะระหว่างหลุม 25 เซนติเมตร ปลูก หลุมละ 3 เมล็ด หลังปลูกฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก เมื่อถึงระยะสุกแก่ เก็บเกี่ยวในพื้นที่ 1 $ม^2$ สุ่มเก็บ จำนวน 10 ต้น เพื่อตรวจนับ

- จำนวนข้อต่อต้น
- จำนวนข้อฝักต่อต้น
- จำนวนฝักต่อต้น
- จำนวนเมล็ดต่อฝัก
- น้ำหนัก 1000 เมล็ด
- ผลเมล็ดผลิตต่อไร่
- ความเข้มข้นของโบรอนในเมล็ด โดยวิธี Azomethine-H (Lohse, 1982)

การทดลองที่ 2.2 ทดสอบการงอกของเมล็ดที่เก็บจากแปลงที่ได้รับปูนและบอแรกซ์ในอัตราที่แตกต่างกัน

นำเมล็ดที่ได้จากการทดลอง 2.1 มาทดสอบการงอกภายใต้สภาพการขาดโบรอน (B0) เปรียบเทียบกับการได้รับโบรอนพอเพียง (B10) ใน Sand culture โดยปลูกเมล็ดถั่วเขียวในตะกร้าพลาสติกขนาด กว้าง 30 ซ.ม. ยาว 40 ซ.ม. ลึก 12 ซ.ม. รองก้นตะกร้าด้วยถุงพลาสติกเจาะรูบรรจุด้วยทรายแม่น้ำที่ล้างแล้วก่อนปลูกคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไรโซเบียม ใช้ระยะปลูก 3 x 3 ซ.ม. หนึ่งตะกร้ามี 6 หน่วยการทดลอง หนึ่งหน่วยการทดลองมี 4 แถวแถวละ 5 หลุม ปลูกหลุมละ 2 เมล็ด

หลังปลูกรดด้วยสารละลายที่มีธาตุอาหารจำเป็นตามสูตรของ Broughton and Dilworth (1971) ยกเว้นโบรอนที่ให้ในระดับต่างๆกัน

ใช้เมล็ดถั่วเขียวผิวดำและถั่วเขียวผิวมันที่เก็บเกี่ยวจาก การทดลองที่ 2.1 จัดการทดลองแบบ Factorial 3 ปัจจัย 2 ซ้ำ ปัจจัยแรกคือระดับโบรอนที่ให้ในสารละลาย 2 ระดับคือ

ไม่ให้โบรอนในสารละลาย (B0)

ให้โบรอนในสารละลาย 10 μM (B10)

ปัจจัยที่สองคือแหล่งที่มาของเมล็ด 4 แหล่งจาก การทดลองที่ 2.1 ประกอบด้วย

เมล็ดที่เก็บเกี่ยวจาก แปลงที่ใส่ปูนขาวในอัตรา 320 กก./ไร่ (SBL)

เมล็ดที่เก็บเกี่ยวจากแปลงที่ไม่ใส่ปูนขาวหรือบอแรกซ์ (SB0)

เมล็ดที่เก็บเกี่ยวจากแปลงที่ให้โบรอนในรูปบอแรกซ์ในอัตรา 0.16 กก./ไร่ (SB1) และ

เมล็ดที่เก็บเกี่ยวจากแปลงที่ใส่บอแรกซ์ในอัตรา 1.6 กก./ไร่ (SB2)

ปัจจัยที่สามคือสายพันธุ์ถั่วเขียวผิวดำและถั่วเขียวผิวมัน 6 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับการทดลอง 2.1

เมื่อถั่วเขียวอายุได้ 18 วันเก็บเกี่ยวแต่ละหน่วยทดลอง นำมาตรวจนับ เปอร์เซ็นต์ความงอก และ เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อนผิดปกติ

การทดลองที่ 3 การตอบสนองต่อระดับโบรอนใน sand culture ของถั่วเขียวผิวดำและถั่วเขียวผิวมันที่มีระดับความทนทานต่อการขาดโบรอนแตกต่างกัน

ทดลองที่ภาควิชาพืชไร่คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ใช้กระถางดินเผาเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 ซ.ม. ลึก 30 ซ.ม. รองกระถางด้วยถุงพลาสติกเจาะรูและบรรจุทรายแม่น้ำที่ล้างแล้วก่อนทำการทดลองทบสอบระดับโบรอนในทรายโดยปลูกถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ Regur ลงในแต่ละกระถางรดด้วยน้ำประปาหากกระถางไหนถั่วเขียวพันธุ์ Regur แสดงอาการขาดโบรอนโดยชะงักการเจริญเติบโตหลังจากใบจริงคู่แรกคลี่กางเต็มที่แสดงว่าระดับโบรอนต่ำพอจะใช้ทดลองได้ หลังจากนั้นถอนต้นถั่วที่ใช้ทดสอบทรายออก แล้วปลูกถั่วเขียวหกเมล็ดต่อกระถางโดยวิธีหยอดเมล็ด แล้วปลูกเชื้อไรโซเบียมโดยใส่ผงเชื้อลงไปโดยตรงในหลุมปลูก (ใช้เชื้อไรโซเบียมสำหรับถั่วเขียวจากกองปฐพีวิยา กรมวิชาการเกษตร) หลังงอกรดด้วยสารละลายที่ให้ธาตุอาหารจำเป็นครบทุกธาตุตามสูตรของ Broughton and Dilworth (1971) ยกเว้น โบรอนที่ให้ในระดับที่แตกต่างกัน และไม่ให้ไนโตรเจนในสารละลาย เมื่ออายุ 15 วันถอนแยกเหลือกระถางละ 3 ต้น วัดความเข้มข้นของโบรอนในเนื้อเยื่อพืชโดยวิธี Azomethine-H (Lohse, 1982)

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองที่ 3.1 ทดสอบการตอบสนองต่อระดับโบรอนของถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ Regur (พันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐาน)

ปลูกวันที่ 13 มิถุนายน 2544 ปลูกถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ Regur ในอัตรา 5 เมล็ดต่อกระถางโดยไม่ถอนแยกสิ่งทดลองคือระดับโบรอนที่ให้ในสารละลาย 8 ระดับ ประกอบด้วย ไม่ให้โบรอน (B0) ให้โบรอนในสารละลาย 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 10 และ 20 μM (B0.1, B0.5, B1, B1.5, B2, B10 และ B20 ตามลำดับ) ปลูกระดับละ 4 ซ้ำ ปลูก 2 ชุดสำหรับการเก็บเกี่ยวสองครั้ง รวมแล้วแต่ละระดับโบรอนจะมี 8 กระถาง

<u>การเก็บตัวอย่างและบันทึกข้อมูล</u>

แบ่งเก็บตัวอย่างเป็นสองครั้ง

- ครั้งแรกเก็บเกี่ยวที่ระยะ R3 เพื่อบันทึกข้อมูล น้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดิน น้ำหนักแห้งราก น้ำหนักแห้งปม และความเข้มข้นของโบรอนใน Youngest Fully Expended Leaf (YFEL)
- เก็บตัวอย่างครั้งที่สองที่ระยะสุกแก่ เพื่อบันทึกข้อมูล ผลผลิตเมล็ด จำนวนฝักต่อกระถาง จำนวนเมล็ดต่อฝัก น้ำหนัก 1000 เมล็ด น้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดิน และความเข้มข้นของโบรอนในเมล็ด

การทดลองที่ 3.2 ทดสอบการตอบสนองต่อระดับ โบรอนของถั่วเขียวผิวดำและถั่วเขียวผิวมัน 6 สายพันธุ์

ปลูกวันที่ 22 ตุลาคม 2544 จัดการทดลองแบบ Factorial 2 ปัจจัย 3 ซ้ำ ปัจจัยแรกคือระดับโบรอนประกอบด้วย ไม่ให้โบรอนในสารละลาย (B0) ให้โบรอนในสารละลาย 0.5 μM B (B0.5), 3 μM B (B3) และ 5 μM B (B5) ปัจจัยที่สองคือสายพันธุ์ถั่วเขียวผิวดำและถั่วเขียวผิวมัน 6 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 ปลูกถั่วเขียว 3 ต้นต่อกระถางให้หนึ่งกระถางเป็นหนึ่งหน่วยการทดลอง

<u>การเก็บตัวอย่างและบันทึกข้อมูล</u>

แบ่งเก็บตัวอย่างเป็นสองครั้ง

-ครั้งแรกเก็บเกี่ยวที่ระยะ R3 เพื่อบันทึกข้อมูล น้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดินน้ำหนักแห้งราก น้ำหนักแห้งปม และความเข้มข้นของโบรอนใน Youngest Fully Expended Leaf (YFEL)

-เก็บตัวอย่างครั้งที่สองที่ระยะสุกแก่ เพื่อบันทึกข้อมูล ผลผลิตเมล็ด จำนวนฝักต่อกระถาง จำนวนเมล็ดต่อฝัก น้ำหนัก1000เมล็ด น้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดิน น้ำหนักแห้งราก น้ำหนักแห้งปม และความเข้มข้นของโบรอนในเมล็ด

การทดลองที่ 3.3 ทดสอบความงอกของเมล็ดที่เก็บจากทรีทเม้นต์ที่ให้โบรอนต่างกัน

ปลูกเมล็ดถั่วเขียวในตะกร้าพลาสติกขนาด กว้าง 30 ซ.ม. ยาว 40 ซ.ม. ลึก 12 ซ.ม. รองก้นตะกร้าด้วยถุงพลาสติกเจาะรูบรรจุด้วยทรายแม่น้ำที่ล้างแล้วก่อนปลูกคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไรโซเบียม ใช้ระยะปลูก 3 x 3 ซ.ม. หนึ่งตะกร้ามี 6 หน่วยการทดลอง หนึ่งหน่วยการทดลองมี 4 แถวแถวละ 5 หลุม ปลูกหลุมละ 1 เมล็ด หลังปลูกรดด้วยสารละลายที่มีธาตุอาหารจำเป็นครบตามสูตรของ Broughton and Dilworth (1971) ยกเว้นโบรอนที่ให้ในระดับที่แตกต่างกัน

ใช้เมล็ดถั่วเขียวผิวมันและถั่วเขียวผิวดำที่เก็บเกี่ยวจากการทดลองที่ 3.2 จัดการทดลองแบบ Factorial 3 ปัจจัย 2 ซ้ำ

ปัจจัยแรกคือ ระดับโบรอน 2 ระดับคือ

ไม่ให้โบรอนในสารละลาย (B0) และ

ให้โบรอนในสารละลาย 10 μM (B10)

ปัจจัยที่สองคือที่มาของเมล็ด 4 แหล่งที่มาจาก การทดลองที่ 3.2 ประกอบด้วย

เมล็ดที่เก็บจากทรีทเม้นต์ที่ไม่ให้โบรอน (SB0)

เมล็ดที่เก็บจาก ทรีทเม้นต์ที่ให้โบรอน 0.5 μM (SB0.5)

เมล็ดที่เก็บจากทรีทเม้นต์ที่ให้โบรอน 3 μM (SB3) และ

เมล็ดที่เก็บจากทรีทเม้นต์ที่ให้โบรอน 5 μM (SB5)

ปัจจัยที่สามคือสายพันธุ์ ถั่วเขียวผิวดำและถั่วเขียวผิวมัน 5 สายพันธุ์ (เนื่องจากสายพันธุ์ CPI79563 ไม่สามารถเก็บเมล็ดจากทรีทเม้นต์ที่ไม่ให้โบรอนจึงตัดออกไปแยกวิเคราะห์ต่างหาก)

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

-เมื่อถั่วเขียวอายุได้ 10 วันบันทึก เปอร์เซ็นต์ความงอก เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อนผิดปกติ

-เมื่อถั่วเขียวอายุได้ 18 วันเก็บเกี่ยวเพื่อบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อนผิดปกติ

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้แต่ละลักษณะจะนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะโดยหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient)