บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

งานทดลองแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการทดลองในแปลงทดลองเพื่อการศึกษาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มที่ใช้ปรับปรุงบำรุงดินบนพื้นที่สูงและความจำเป็นในการใช้เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในการปลูกถั่วพุ่มในฤดูกาลถัดไปในแปลงทดลอง และขั้นตอนที่สองเป็นการทดลองในกระถางเพื่อศึกษาความสามารถของสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกเมล็ดในการเกิดปมกับถั่วพุ่มโดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

3.1 การทดลองในแปลงทดลอง

พื้นที่ทดลองมี 2 พื้นที่ ได้แก่ ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะป๊อกและศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย

ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะป๊อก

ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะป๊อกตั้งอยู่ที่หมู่บ้านแม่สะป๊อก หมู่ที่ 5 ตำบลแม่วิน อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ พิกัด E 460328 N 2063495 ลักษณะภูมิอากาศของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะป๊อก จัดอยู่ในประเภทฝนเมืองร้อนเฉพาะฤดู ซึ่งมีทั้งสภาวะอากาศแห้งแล้งและเปียกชื้น พื้นที่นี้ได้รับอิทธิพลของลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ที่พัดเอาความชุ่มชื้นและเมฆฝนเข้ามา ทำให้เกิดฤดูกาลต่างๆ โดยมีฤดูร้อนในช่วงระหว่างเดือนมีนาคม-พฤษภาคม ฤดูฝนในช่วงระหว่างเดือนมิถุนายน-พฤศจิกายน และฤดูหนาวในช่วงระหว่างเดือนธันวาคม-กุมภาพันธ์ มีอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดปี 20 องศาเซลเซียส ในช่วงฤดูหนาวในเดือนธันวาคม อุณหภูมิเฉลี่ยจะอยู่ระหว่าง 15-17 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ย 10-14 องศาเซลเซียส มีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 2,000-2,100 มิลลิเมตรต่อปีโดยมีการกระจายของฝนค่อนข้างสม่ำเสมอตลอด

พื้นที่นี้มีระดับความสูงตั้งแต่ 500-1,300 เมตรจากระดับน้ำทะเลปานกลาง ลักษณะพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นภูเขาและหุบเขาที่มีความลาดชัน ทางทิศตะวันตกของพื้นที่มีความสูงลาดลงมาสู่พื้นที่ต่ำทางทิศตะวันออก พื้นที่ซึ่งมีระดับความสูงในระดับ 900-1,000 เมตรมีประมาณร้อยละ 24.88 ของพื้นที่ ส่วนพื้นที่ซึ่งมีระดับความสูง 800-900 เมตรมีประมาณร้อยละ 24.33 และพื้นที่ที่มีระดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความสูง 700-800 เมตร มีประมาณร้อยละ 17.13 ในแง่ของความลาดชัน พื้นที่ของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะป๊อกส่วนมากมีลักษณะสูงชันถึงสูงชันมาก โดยมีประมาณร้อยละ 25.59 และร้อยละ 25.64 ตามลำดับ สำหรับพื้นที่ราบเรียบถึงค่อนข้างราบเรียบมีประมาณร้อยละ 23.42 ของพื้นที่ทั้งหมด

สำหรับพื้นที่ที่ใช้ในการทดลองเป็นพื้นที่ซึ่งพึ่งได้รับการปรับพื้นที่เป็นขั้นบันไดหน้าดินถูกเกลี่ยออกในระหว่างการปรับพื้นที่ ฉะนั้นดินในแปลงทดลองบนขั้นบันไดซึ่งเป็นดินล่างมีลักษณะเป็นดินเหนียวปนกรวดมีการระบายน้ำไม่ดี และมีคุณสมบัติทางเคมีของดินในแปลงทดลองดังนี้

pH	5.2-5.4	
ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้	117	mg/kg
ปริมาณโซเดียมที่แลกเปลี่ยนได้	196	mg/kg
ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้	345	mg/kg
ปริมาณแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้	73	mg/kg
ปริมาณแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้	452	mg/kg
ปริมาณเหล็กที่สกัดได้	51	mg/kg
ปริมาณทองแดงที่สกัดได้	0.38	mg/kg
ปริมาณสังกะสีที่สกัดได้	3	mg/kg
ปริมาณแมงกานีสที่สกัดได้	17	mg/kg
ปริมาณอลูมินัมที่สกัดได้	0.72	mg/kg
ปริมาณโบรอนที่สกัดได้	0.14	mg/kg
ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (EC)	2.76	dS/m
ค่า CEC	9.32	cmole/kg
ปริมาณอินทรียวัตถุ	1.82	%

ถึงแม้ดินในแปลงทดลอง ณ ศูนย์ฯแม่สะป๊อกเป็นดินกรด มีปริมาณอินทรียวัตถุต่ำแต่ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้และโพแทสเซียมที่สามารถแลกเปลี่ยนได้อยู่ในระดับสูง ดินดังกล่าวมีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่ม 1.26×10^2 เซลล์/กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย

ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย ตั้งอยู่ที่หมู่ 7 บ้านหนองหอยเก่า ตำบลแม่แรม อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ พิกัด E 481674 เมตร N 2092978 เมตร ระวาง 4746 I จากสถิติภูมิอากาศศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย เฉลี่ยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537 – 2543 พบว่าพื้นที่นี้มีอุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ย 32.6 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ย 17.0 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงที่สุดในเดือนเมษายน 36.1 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำที่สุดในเดือนมกราคม 12.0 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนรวม 1,416.8 มิลลิเมตร โดยปริมาณน้ำฝนสูงที่สุดในเดือนสิงหาคม 253 มิลลิเมตรและต่ำที่สุดในเดือนมกราคม 1.4 มิลลิเมตร ปริมาณความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยตลอดปี 86 เปอร์เซ็นต์ เดือนที่มีความชื้นสัมพัทธ์มากที่สุดคือเดือนกันยายน และเดือนตุลาคม 96 เปอร์เซ็นต์ และเดือนที่มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำที่สุดคือเดือนมีนาคม 69 เปอร์เซ็นต์ สภาพภูมิประเทศมีทั้งพื้นที่ซึ่งเป็นที่สูง ภูเขาลูกคลื่นลอนลาดและที่ราบตามหุบเขาและแนวลำห้วย ความสูงของพื้นที่อยู่ระหว่าง 500 – 1,200 เมตรจากระดับน้ำทะเลปานกลาง พื้นที่ของพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอยที่มีความลาดชันในช่วงระหว่างร้อยละ 35 – 50 คิดเป็นร้อยละ 26.40 ของพื้นที่ศูนย์ฯ ส่วนที่มีพื้นที่ที่มีความลาดชันระหว่างร้อยละ 50 – 75 คิดเป็นร้อยละ 22.93 สำหรับพื้นที่ที่มีความลาดชันระหว่างร้อยละ 0 – 2 มีร้อยละ 21.83 ซึ่งเป็นบริเวณที่ราบระหว่างภูเขา หรือที่ราบตามแนวลำห้วย และยังมีพื้นที่ที่มีความลาดชันมากกว่าร้อยละ 75 ประมาณร้อยละ 12 – 20 ของพื้นที่ทั้งหมด

พื้นที่แปลงทดลองเป็นพื้นที่ซึ่งมีการปรับพื้นที่เป็นขั้นบันไดและเป็นพื้นที่ซึ่งศูนย์ฯใช้ในการปลูกผักอินทรีย์มาอย่างต่อเนื่องหลายปี ในแปลงทดลองมีคุณสมบัติทางเคมีดังนี้

pH	7.4-7.6	
ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้	171	mg/kg
ปริมาณโซเดียมที่แลกเปลี่ยนได้	193	mg/kg
ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้	336	mg/kg
ปริมาณแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้	107	mg/kg
ปริมาณแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้	763	mg/kg
ปริมาณเหล็กที่สกัดได้	54	mg/kg
ปริมาณทองแดงที่สกัดได้	0.95	mg/kg
ปริมาณสังกะสีที่สกัดได้	3	mg/kg
ปริมาณแมงกานีสที่สกัดได้	59	mg/kg
ปริมาณอลูมินัมที่สกัดได้	4	mg/kg
ปริมาณโบรอนที่สกัดได้	0.18	mg/kg

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (EC)	1.06	dS/m
ปริมาณอินทรียวัตถุ	5.46	%

จากปริมาณของอินทรียวัตถุในดิน กล่าวได้ว่าดินในแปลงทดลองมีความอุดมสมบูรณ์สูง นอกจากนี้ยังมีปริมาณของฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนที่ได้ ในระดับสูงมาก ก่อนการทดลอง ปริมาณเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มในดิน 2.22 x 10^2 เซลล์/กรัม

การทดลองในแต่ละพื้นที่ประกอบด้วยการทดลองย่อย 2 การทดลองโดยใช้กรรมวิธีการทดลอง แผนการทดลอง และจำนวนซ้ำเหมือนกันทั้งสองพื้นที่

3.1.1 การศึกษาประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มที่ใช้ปรับปรุงบำรุงดินบนพื้นที่สูงในแปลงทดลอง

ในการปลูกถั่วพุ่มครั้งที่ 1 สำหรับการทดลอง ณ ศูนย์ฯแม่สะป๊อกดำเนินการในช่วงปลายเดือนกุมภาพันธุ์ – ปลายเดือนเมษายน พ.ศ. 2551 ซึ่งเป็นช่วงฤดูร้อน โดยใช้แปลงทดลองขนาด 3 x 3 ตารางเมตร ส่วนการทดลอง ณ ศูนย์ฯหนองหอยดำเนินการในช่วงเดือนมิถุนายน – เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2551 และใช้แปลงทดลองขนาด 2 x 4.5 ตารางเมตร ใช้แผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) มี 4 ซ้ำและ 4 กรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว
กรรมวิธีที่ 2	ใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วสายพันธุ์ CP-PHT4
กรรมวิธีที่ 3	ใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วสายพันธุ์ CP-TLA5
กรรมวิธีที่ 4	ใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วสายพันธุ์ CP-NK3

สำหรับเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้ทดลอง เป็นเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลองของจุฑามาศในปีพ.ศ. 2551 ซึ่งมีจำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ CP-PHT4 CP-TLA5 และ CP-NK3 โดยเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มทั้งสามสายพันธุ์มีแหล่งที่มาจากแปลงทดลองของศูนย์ฯพระบาทห้วยต้ม แปลงอโวคาโดของศูนย์ฯทุ่งเลา และศูนย์ฯหนองเขียว ตามลำดับ (อำพรรณ, 2549) และเชื้อทั้ง 3 เป็นเชื้อที่ต่างสายพันธุ์กัน (ฉายกริช, 2551) สำหรับถั่วพุ่มที่ใช้ทดลองเป็นถั่วพุ่มที่กรมพัฒนาที่ดินส่งเสริมให้เกษตรกรใช้ปลูกเพื่อการปรับปรุงดิน การใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วใช้วิธีการคลุกผงเชื้อกับเมล็ดถั่วก่อนปลูก และใช้ gum arabic ความเข้มข้น 30% เป็นสารเชื่อมให้ผงเชื้อเกาะติดเมล็ดได้ดีขึ้น ใส่เชื้อในอัตรา 10^6 เซลล์/เมล็ด ตลอดการทดลองมีการให้น้ำและกำจัดศัตรูพืชตามความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำเป็น ใช้ระยะปลูก 30x30 ซม. ซึ่งเป็นระยะปลูกตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร หยอด 5 เมล็ด/หลุมและถอนแยกให้เหลือต้นถั่ว 3 ต้น/หลุม

เก็บเกี่ยวต้นถั่วที่ระยะ R. 3.5-R. 4 (อายุ 60 วันหลังงอก) โดยใช้พื้นที่เก็บเกี่ยว 2 ตร.ม. เพื่อบันทึกข้อมูลด้านน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดิน น้ำหนักแห้งปม และเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงจากตอราก เพื่อใช้วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำเลี้ยง และประเมินดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์ตามวิธีการที่เสนอแนะโดย Peoples *et al*. (1989) นอกจากนี้ยังวิเคราะห์หาความเข้มข้นของไนโตรเจนในต้นถั่วพุ่ม เพื่อประเมินปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดินอีกด้วย วิธีการวิเคราะห์ไนโตรเจนในตัวอย่างพืชใช้วิธีการย่อยตัวอย่างพืชด้วยกรดย่อย (กรดซัลฟูริกผสมกับผงซีลีเนียม) กรดซาลิไซลิก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้เตาย่อยที่อุณหภูมิ 350 °C (Walinga *et al*.,1989) และวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรเจนในตัวอย่างที่ย่อยแล้วโดยวิธีการพัฒนาสี (indophenol blue method) (Novozamsky *et al*., 1974) สำหรับเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนที่ได้จากการประเมินจากค่าดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์ ตามสมการที่เสนอแนะโดย Heridge and Peoples (2002b) รายละเอียดของการวิเคราะห์ไนโตรเจนในตัวอย่างพืชและการวิเคราะห์น้ำเลี้ยงจากตอรากแสดงไว้ในภาคผนวก ก.

3.1.2 การศึกษาความจำเป็นในการใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในการปลูกถั่วพุ่มในฤดูกาลปลูกที่ 2

การปลูกในฤดูกาลปลูกที่ 2 ของแต่ละพื้นที่ใช้แปลงทดลองเดิมที่ใช้ในการปลูกถั่วในฤดูกาลแรกใช้การทดลองแบบ RCBD มี 4 ซ้ำและ 7 กรรมวิธีทดลองดังนี้

กรรมวิธี	**รายละเอียด**
1) Control	ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว
2) PHT-1	ใส่เชื้อสายพันธุ์ CP-PHT4 ในฤดูกาลปลูกถั่วครั้งแรกและไม่ใส่ซ้ำในการปลูกถั่วฤดูกาลปลูกที่ 2
3) PHT-2	ใส่เชื้อสายพันธุ์ CP-PHT4 ในฤดูกาลปลูกถั่วครั้งแรกและใส่ซ้ำในการปลูกถั่วฤดูกาลปลูกที่ 2
4) TLA-1	ใส่เชื้อสายพันธุ์ CP-TLA5 ในฤดูกาลปลูกถั่วครั้งแรกและไม่ใส่ซ้ำในการปลูกถั่วฤดูกาลปลูกที่ 2
5) TLA-2	ใส่เชื้อสายพันธุ์ CP-TLA5 ในฤดูกาลปลูกถั่วครั้งแรกและใส่ซ้ำในการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปลูกถั่วฤดูกาลปลูกที่ 2

6) NK-1 ใส่เชื้อสายพันธุ์ CP-NK3 ในฤดูกาลปลูกถั่วครั้งแรกและไม่ใส่ซ้ำในการปลูกถั่วฤดูกาลปลูกที่ 2

7) NK-2 ใส่เชื้อสายพันธุ์ CP-NK3 ในฤดูกาลปลูกถั่วครั้งแรกและใส่ซ้ำในการปลูกถั่วฤดูกาลปลูกที่ 2

สำหรับแปลงทดลองในกรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อในฤดูกาลที่ 1 จะถูกแบ่งออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกใช้สำหรับกรรมวิธีที่ไม่ใส่เชื้อซ้ำ และส่วนที่สองใช้สำหรับกรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อซ้ำในการปลูกถั่วพุ่มครั้งที่สอง การปลูกถั่วพุ่มครั้งที่สอง ณ ศูนย์ฯแม่สะป๊อกดำเนินการในช่วงเดือนมิถุนายน – เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2551 ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝน ส่วนการปลูกถั่วพุ่ม ณ ศูนย์ฯหนองหอย ดำเนินการในช่วงปลายเดือนตุลาคม – เดือนธันวาคม พ.ศ. 2551 ซึ่งเป็นช่วงฤดูหนาว ตลอดช่วงการทดลองมีการให้น้ำและกำจัดศัตรูพืชตามความจำเป็น การบันทึกข้อมูลเหมือนกับที่ใช้ในการทดลองการปลูกถั่วครั้งแรก

3.2 การศึกษาความสามารถของสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกเมล็ดในการเกิดปมกับถั่วพุ่ม

ขั้นตอนนี้ใช้การทดลองปลูกถั่วพุ่มในกระถาง เพื่อให้สามารถเก็บปมที่รากถั่วได้อย่างสมบูรณ์ ใช้โรงเรือนของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่เป็นพื้นที่ทดลองใช้ดินจากแปลงทดลองบนพื้นที่สูงของศูนย์ฯแม่สะป๊อก และสถานีฯหนองหอย ที่ใช้ปลูกถั่วพุ่มฤดูกาลปลูกที่ 1 ดินที่เก็บจากพื้นที่ทดลองแต่ละแห่งจะใช้เฉพาะดินบน (ความลึก 0-25 ซม.) และคลุกเคล้าให้เข้ากันดีก่อนใช้ในการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย โดยใช้ดินหนึ่งชนิดต่อการทดลอง แต่ละการทดลองประกอบด้วยขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

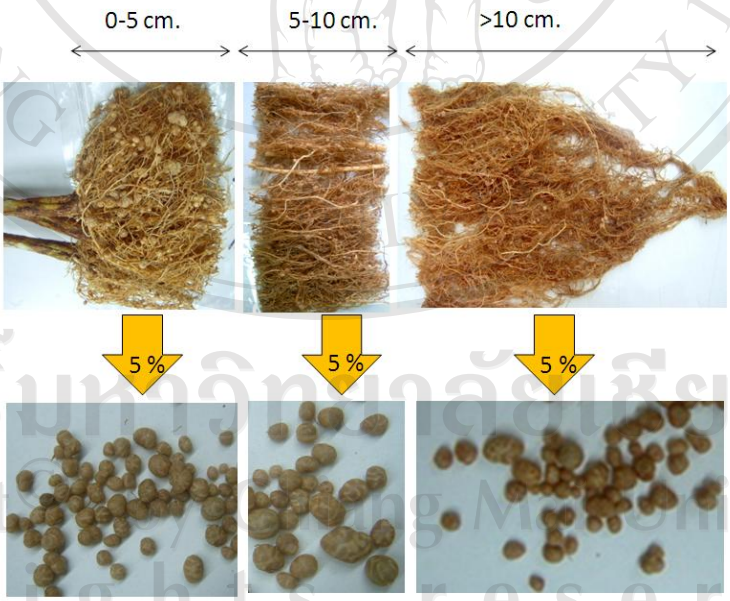
ขั้นตอนที่ 1 เป็นการศึกษาความสามารถของสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกเมล็ดในการเกิดปมกับถั่วพุ่มในฤดูกาลเพาะปลูกครั้งแรก ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) มี4 กรรมวิธีและ 4 ซ้ำดังเช่นที่ระบุไว้ข้อ 3.1.1 แต่ละกรรมวิธีปลูกถั่วพุ่ม 3 ต้น/กระถาง/ซ้ำ สำหรับการปลูกครั้งที่ 1 กรรมวิธีที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วปลูกถั่วพุ่มมีจำนวน 8 กระถางและกรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วปลูกถั่วพุ่มมีจำนวน 12 กระถาง/กรรมวิธี โดย 4 กระถางแรกของทุกกรรมวิธีจะใช้เก็บข้อมูลสำหรับการปลูกถั่ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ครั้งที่ 1 ส่วนที่เหลือใช้ปลูกถั่วครั้งที่ 2 ใช้กระถางขนาดบรรจุดิน 10 กก./กระถาง ในการปลูกถั่วใช้วิธีการจัดการในการใช้เชื้อเหมือนกับที่ใช้ในแปลงทดลอง เมื่อถึงระยะ 45-50 วันหลังปลูก ตัดส่วนเหนือดินออก เก็บปมถั่วในแต่ละกระถางจากทุกกรรมวิธี โดยใช้ต้นถั่วจาก 4 ซ้ำแรกเพื่อใช้เก็บข้อมูลด้านการศึกษาชนิดของเชื้อในปมถั่วด้วยวิธีการทางทางอณูชีววิทยา

ขั้นตอนที่ 2 เป็นการศึกษาความจำเป็นในการใช้เชื้อซ้ำในฤดูกาลปลูกที่ 2 โดยใช้กระถางที่ 5-12 หลังจากเก็บเกี่ยวส่วนเหนือดินออกเช่นเดียวกับต้นถั่วพุ่มในขั้นตอนที่1 นำส่วนเหนือดินที่ได้จากการเก็บเกี่ยวสับให้มีขนาดเล็กลงแล้วนำไปคลุกเคล้ากับดินในกระถางให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 เดือนรดน้ำพอให้ชุ่มอาทิตย์ละครั้งก่อนใช้ในการปลูกถั่วในฤดูกาลที่ 2 ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 4 ซ้ำและ 7 กรรมวิธีดังที่ระบุไว้ในข้อ 3.1.2

ในการปลูกถั่วในกระถางใช้ถั่วพุ่มพันธุ์เดียวกับที่ใช้ในแปลงทดลองและใช้วิธีการใส่เชื้อดังระบุไว้ในข้อ 3.1.1 การปลูกถั่วใช้เมล็ดถั่ว 5 เมล็ด/กระถาง และถอนแยกให้เหลือต้นถั่ว 3 ต้น/กระถาง ปลูกถั่วเป็นเวลา 50 วัน ซึ่งเป็นระยะออกดอก ก่อนการเก็บปมรากถั่วทุกกระถางโดยเก็บทุกปมที่เกิดที่รากถั่วแต่ละกระถาง ตลอดการทดลองมีการให้น้ำและกำจัดศัตรูพืชตามความจำเป็น



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 1 การสุ่มเก็บตัวอย่างปมจากต้นถั่วพุ่มในแต่ละกระถางตามช่วงการเกิดปมบนรากของถั่วพุ่ม

ล้างตัวอย่างปมที่เก็บจากต้นถั่วพุ่มทุกการทดลองให้สะอาดด้วยน้ำประปา ก่อนนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อการศึกษาชนิดของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในปมถั่วพุ่มที่ปลูกในดินแต่ละพื้นที่และในแต่ละกรรมวิธีที่ปลูกยกเว้นกรรมวิธีควบคุม แยกตัวอย่างปมที่เก็บจากต้นถั่วพุ่มในแต่ละการทดลองนั้นตามช่วงการเกิดปมบนรากของถั่วพุ่มโดยแบ่งรากออกเป็น 3 ระยะดังนี้ ความยาวราก 0-5 5-10 และมากกว่า 10 ซม.แสดงไว้ดังรูป 1 การวัดความยาวรากเริ่มต้นจากโคนรากเป็นต้นไป บันทึกจำนวนปมทั้งหมดที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงความยาวราก หลังจากนั้นสุ่มตัวอย่างในแต่ละช่วงร้อยละ 5 เพื่อใช้ในการศึกษาชนิดของเชื้อแบคทีเรียในปมด้วยวิธี REP- และ ERIC-PCR และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดปมที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มทั้ง 3 สายพันธุ์

ในการศึกษาชนิดของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วใช้การสกัด genomic DNA (DNA แม่แบบ) ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่อยู่ในปมถั่วพุ่มโดยใช้วิธีการของ Santasup *et al.* (2000) (ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Harrison *et al*., 1992, Malic *et al*., 1998 และ Landstrom, 1994 อ้างโดย Santasup, 2000) รายละเอียดระบุไว้ในภาคผนวก ก เพิ่มปริมาณ DNA แม่แบบโดยใช้ PCR และ REP consensus primer ต่อไปนี้ REP 1R-1 และ REP I-1 และ ERIC consensus primer ได้แก่ ERIC 1R และ ERIC 2 (de Bruijn, 1992) หลังจากสิ้นสุดกระบวนการ PCR ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จาก REP และ ERIC-PCR ที่เกิดขึ้นด้วย agarose gel electrophoresis ถ่ายภาพเจลเก็บไว้เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ DNA ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้แล้วทำการเปรียบเทียบลายพิมพ์ DNA ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มจากปมกับเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มที่ใช้คลุกเมล็ด (เชื้อบริสุทธิ์) คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดปมที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มทั้ง 3 สายพันธุ์ได้จากจำนวนปมที่เกิดจากเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่ใช้คลุกเมล็ดต่อจำนวนปมที่ใช้วิเคราะห์ทั้งหมด (Santasup *et al*., 2000) ด้วยสูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ ปมที่เกิดจากเชื้อที่ใช้คลุกเมล็ดแต่ละสายพันธุ์} = \frac{\text{จำนวนปมที่เกิดจากเชื้อที่ใช้แต่ละสายพันธุ์}}{\text{จำนวนปมที่ใช้วิเคราะห์ทั้งหมด}} \times 100$$

ทุกการทดลองใช้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย F test และใช้ LSD 0.05 ในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved