

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

การใช้ไม้ยืนต้นตระกูลถั่วโตเร็วที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศสำหรับโครงการฟื้นฟูป่าไม้ในสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) ประกอบด้วย การทดลองย่อย 3 การทดลอง ได้แก่ ศึกษาการเจริญเติบโต (growth) เปรียบเทียบการติดปมราก และความแปรปรวนของการเจริญเติบโต (growth variation) ของไม้ยืนต้นตระกูลถั่วโตเร็ว 3 ชนิดที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศในภาคสนาม ศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากไอโซเลทที่แยกได้จากปมรากไม้ยืนต้นตระกูลถั่วในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ และการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อไรโซเบียมต่อการเจริญเติบโตไม้ตระกูลถั่วยืนต้นที่ปลูกในกระถางบรรจุดิน ซึ่งรายละเอียดวิธีการทดลองของแต่ละการทดลองย่อยมีดังนี้

3.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาการเจริญเติบโต (growth) และความแปรปรวน ของการเจริญเติบโต (growth variation) ของไม้ยืนต้นตระกูลถั่ว 3 ชนิดโตเร็วที่ ตรึงไนโตรเจนจากอากาศ

3.1.1 การทดลองที่ 1.1 การศึกษาทดลองเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของไม้ยืนต้นตระกูลถั่วโตเร็ว 3 ชนิดที่ตรึงไนโตรเจน

3.1.1.1 ลักษณะการทดลอง

เป็นการทดลองในแปลงทดลอง

3.1.1.2 สถานที่ทดลอง

แปลงทดลองหมวดดินและปุ๋ย ภาควิชาทรัพยากรที่ดินและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.1.1.3 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ระหว่างเดือน พฤษภาคม 2547 ถึงเดือน มิถุนายน 2548

3.1.1.4 แผนการทดลอง

ในการศึกษาโดยใช้แผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) มี 4 ซ้ำ โดยมีไม้ยืนต้นตระกูลถั่วทั้ง 3 ชนิดเป็นซ้ำรับทดลองคือ

- 1) กระถินเทพา (*Acacia mangium*)
- 2) กระถินณรงค์ (*Acacia auriculiformis*)
- 3) กระถินยักษ์ (*Leucaena leucocephala*)

3.1.1.5 ขั้นตอนการศึกษา

- 1) ทำการศึกษาในแปลงทดลองที่เป็นชุดดินยโสธร (Yt) มีการเตรียมดินโดยการไถตะคากดินให้แห้ง และกำจัดวัชพืชทิ้งไว้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงทำการไถแปรและไถพรวนอีก 2 ครั้ง ทำการยกแปลงย่อยขนาด 3×5 เมตร เว้นระยะห่างระหว่างแปลงย่อยในแต่ละซ้ำ 1 เมตร และระหว่างซ้ำห่างกัน 1 เมตร โดยการเปิดร่องให้มีระยะระหว่างแถว 50 ซม.
- 2) นำเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการทำลายระยะพักตัวของเมล็ด โดยการลวกน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วผึ่งลมให้แห้งก่อนนำไปปลูกและโรยปุ๋ยมูลสัตว์ที่ก้นหลุมเพื่อป้องกันอันตรายจากแมลงแล้วตามด้วยการหยอดเมล็ด 8 เมล็ดต่อหลุม
- 3) ทำการปลูกซ่อมหลุมที่ไม่งอก หลังปลูก 1 สัปดาห์ เมื่อกระถินได้อายุ 14 วัน ทำการพรวนดิน กำจัดวัชพืช และถอนแยกให้เหลือหลุมละ 1 ต้น
- 4) ดูแลรักษาด้วยการกำจัดวัชพืช และรดน้ำให้มีความชื้นในช่วงฤดูแล้ง

3.1.1.6 การเก็บข้อมูล

การเก็บข้อมูลทุกเดือน เป็นเวลา 11 เดือน โดยการสุ่มวัดการเจริญเติบโตแปลงย่อยละ 3 ต้น แล้วหาค่าเฉลี่ย ข้อมูลที่เก็บประกอบด้วย ความสูง เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น ตรวจสอบการติดปมราก น้ำหนักสดต้น และน้ำหนักแห้งต้น โดย 5 เดือนแรกมีการเก็บข้อมูลเป็นรายเดือนหลังจากนั้นมีการเก็บข้อมูลเว้นเดือนในเดือนที่ 7, 9 และ 11 เดือน

3.1.1.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของข้อมูลตามแผนการทดลองแบบ RCBD และ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่ารับทดลองโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูล MSTAT-C ของ Michigan State University (สุนันทา และคณะ, 2538)

3.1.2 การทดลองที่ 1.2 การศึกษาความแปรปรวนของการเจริญเติบโตของไม้ยืนต้นตระกูลถั่ว 3 ชนิดที่อายุ 11 เดือน

3.1.2.1 ลักษณะการทดลอง

เป็นการทดลองในแปลงทดลอง

3.1.2.2 สถานที่ทดลอง

แปลงทดลองหมวดดินและปุ๋ย ภาควิชาทรัพยากรที่ดินและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.1.2.3 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ระหว่างเดือน พฤษภาคม 2547 ถึงเดือน มิถุนายน 2548

3.1.2.4 แผนการทดลอง

ในการศึกษาโดยใช้แผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) มี 4 ซ้ำ โดยมีไม้ยืนต้นตระกูลถั่วทั้ง 3 ชนิดเป็นคำรับทดลองคือ

- 1) กระจินเทพา (*Acacia mangium*)
- 2) กระจินณรงค์ (*Acacia auriculiformis*)
- 3) กระจินยักษ์ (*Leucaena leucocephala*)

3.1.2.5 ขั้นตอนการศึกษา

การศึกษานี้ดำเนินการกับพืชที่ปลูกในแปลงทดลองที่ 1.1 โดยตรวจสอบข้อมูลการเจริญเติบโตของพืชขนาดใหญ่เฉลี่ยจากพืชจำนวน 3 ต้น และการเจริญเติบโตของพืชขนาดเล็กจำนวน 3 ต้นจากแต่ละ 1 แปลงย่อยจำนวน 4 ซ้ำ โดยดำเนินการในเดือนที่ 11 เท่านั้น

3.1.2.6 การเก็บข้อมูล

การเก็บข้อมูลที่อายุ 11 เดือน ข้อมูลที่เก็บประกอบด้วย ความสูง เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นตรวจสอบการติดปมราก น้ำหนักสดต้น และ น้ำหนักแห้งต้น

3.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากไอโซเลทที่แยกได้จากปมรากไม้ยืนต้นตระกูลถั่วในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ

3.2.1 ลักษณะการทดลอง

เป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ

3.2.2 สถานที่ทดลอง

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางดิน ภาควิชาทรัพยากรที่ดินและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.2.3 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ระหว่างเดือน กันยายน ถึงเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2547

3.2.4 แผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) มี 3 ซ้ำ 12 คำรับทดลอง ประกอบด้วยคำรับควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อไรโซเบียมไม่ใส่ไนโตรเจนกับไม่ใส่เชื้อไรโซเบียมแต่ใส่ไนโตรเจนในระดับความเข้มข้น 70 ppm. และคำรับทดลองที่ใส่เชื้อไรโซเบียม โดยใช้เชื้อ

บริสุทธิ์ที่แยกจากปนรากกระดินเทา และ กระดินรกรวม 20 ไอโซเลท ซึ่งทดสอบในพีช 2 ชนิดดังรายละเอียดต่อไปนี้

กระดินเทา

- คำรับควบคุม

- 1) ไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม ไม่ใส่ไนโตรเจน
- 2) ไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม ใส่ไนโตรเจนในรูปของ KNO_3 ให้มีความเข้มข้น 70 ppm-N

- คำรับที่ใส่เชื้อไรโซเบียม

- 3) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 1
- 4) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 2
- 5) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 3
- 6) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 4
- 7) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 5
- 8) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 6
- 9) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 7
- 10) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 8
- 11) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 9
- 12) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 10

กระดินรกรวม

- คำรับควบคุม

- 1) ไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม ไม่ใส่ไนโตรเจน
- 2) ไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม ใส่ไนโตรเจนในรูปของ KNO_3 ให้มีความเข้มข้น 70 ppm-N

- คำรับที่ใส่เชื้อไรโซเบียม

- 3) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 1
- 4) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 2
- 5) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 3
- 6) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 4
- 7) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 5
- 8) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 6
- 9) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 7
- 10) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 8

11) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 9

12) ใส่เชื้อไรโซเบียม ไอโซเลทที่ 10

3.2.5 ขั้นตอนการศึกษา

1) ทำการสุ่มเก็บปมจากรากของกระถินเทพาและกระถินณรงค์ในพื้นที่อำเภอด่านทรายทอง นครหลวงเวียงจันทน์ และ อำเภอบ่อลิคำไซ ในประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว นำรากกระถินเทพาและกระถินณรงค์ที่มีปมติดอยู่ด้วยมาล้างเอาดินออก แล้วคัดเลือกปมที่สมบูรณ์จากจุดที่เก็บ 25 จุด ๆ ละ 50 ปม มาใส่ในขวดที่มีฝาปิดแล้วนำขวดที่ใส่ปมแช่ในภาชนะบรรจุน้ำแข็ง พร้อมทั้งจะขนย้ายมายังห้องปฏิบัติการ

2) เมื่อถึงห้องปฏิบัติการทำการล้างปมให้สะอาดด้วยน้ำอีกครึ่งหนึ่ง ทำการกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนภายนอกปม (surface sterilization) โดยแช่ปมในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 % นาน 10 วินาที จากนั้นแช่ปมใน chlorox 10 % นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อ (sterilization) อีก 6 ครั้ง

3) ทำการแยกเชื้อออกจากปม โดยนำปมที่สมบูรณ์และผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 20 ปมมาใส่ลงในหลอดทดลองที่ใส่น้ำปลอดเชื้อประมาณ 0.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 ปมบดปมจนละเอียดภายในหลอดทดลอง แล้วใช้ loop ปลอดเชื้อ แตะเชื้อไป streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Yeast Mannitol Agar; YMA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสไว้ประมาณ 1-2 สัปดาห์ จะปรากฏ โคโลนิกลมนูนสีขาวปนชมพู ไม่ติดสีแดงของ congo red ใช้ loop แตะโคโลนีเดี่ยว ๆ มา streak บนอาหาร YMA บ่มเลี้ยงไว้หลาย ๆ ครั้งจนแน่ใจว่าไม่มีเชื้อโคปปลอมปน แล้วจึงใช้ loop แตะโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่บริสุทธิ์ใน plate เดียวกันมา streak ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ (slant agar tubes) บ่มไว้ 5-10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง โดยเชื้อจากหนึ่งปมที่อยู่ในหลอดเลี้ยงเชื้อหนึ่งหลอดจะถือว่าเป็นเชื้อหนึ่งไอโซเลท

4) นำเชื้อที่ได้ไปทำการทดสอบโดยทำการทดสอบในต้นกล้าที่ปลอดเชื้อ การเพาะกล้าที่ปลอดเชื้อ (Sterile seedling) มีวิธีการคือ ในเบื้องต้นคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ที่สมบูรณ์ของกระถินทั้ง 2 ชนิดมาทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดยใช้วิธีเช่นเดียวกันกับการกำจัดเชื้อที่ผิวปมแต่ใช้เวลาในการแช่เมล็ดใน chlorox 10 % 2 นาที และ แช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำสุดท้ายของการล้างนาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้เมล็ดพันธุ์ปราศจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ จึงถ่ายเมล็ดโดยวิธี aseptic technique ลงในจานเพาะเมล็ด Sterile petri plate ที่มีอาหารวุ้น (Water agar) 1 % แล้วนำจานเพาะเมล็ดไปบ่มไว้ที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส จนกว่ากล้าพืชมีรากยาวประมาณ 1.0-1.5 ซม. จากนั้นทำการย้ายกล้าไปเลี้ยงในหลอดเพาะเลี้ยงพืชซึ่งบรรจุอาหารวุ้นที่ปราศจากไนโตรเจน (N-free medium) สูตรของ CSIRO Cunningham lab. Brisbane, Australia ในหลอดทดลองขนาด 2.3 มม. X 150 มม. นำหลอดที่บรรจุอาหารวุ้นที่ปราศจากไนโตรเจน (N-free medium) หุ้มปากหลอดด้วย aluminum foil แล้วนำ

ชุดหลอดเลี้ยงพืชไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ตั้งอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (ความดัน 15 ปอนด์) เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำออกมาพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมงก่อนเคลื่อนย้ายไปปลูก ทำการย้ายกล้าไปเลี้ยงในหลอดเพาะเลี้ยงพืชหลอดละ 1 ต้นโดยทำการเจาะรูอลูมิเนียมฟอยด์ที่ปิดปากหลอด และแห่รากพืชเข้าไปในหลอดโดยให้ตะอาหารวุ้นภายในหลอด โดยมีวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ enclosed plant tubes (Vincent, 1970) จากนั้นนำชุดหลอดเลี้ยงพืชทั้งหมดไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงพืช (Growth room) ที่มีระบบควบคุมแสงและอุณหภูมิอัตโนมัติ ที่ 25 องศาเซลเซียส ปรับช่วงแสงเป็น 14 ชั่วโมง และ ให้มืด 10 ชั่วโมง (14/10 ชั่วโมง) สลับกันในแต่ละวัน ใส่ไอโซเลทของเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเหลว (Yeast Mannitol Broth: YMB) เป็นเวลา 15 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนมีความหนาแน่นของเชื้อประมาณ 10^8 - 10^9 เซลล์/มิลลิลิตร ทั้ง 10 ไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงกล้ากระถินเทพา และกระถินณรงค์ ได้ 15 วัน โดยใช้อัตรา 2 มิลลิลิตร ต่อหลอด และทำการทดสอบ 3 ซ้ำต่อไอโซเลท เพาะเลี้ยงต้นกล้าต่อไปอีก 45 วัน จึงทำการตรวจสอบการติดปมที่รากของกระถินทั้ง 2 ชนิดนี้

3.2.6 การเก็บข้อมูล

เมื่อต้นกล้าของกระถินเทพาและกระถินณรงค์อายุได้ 60 วัน จึงทำการเก็บข้อมูล ความสูง จำนวนปม น้ำหนักสดต้น และน้ำหนักแห้งต้นคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้สูงที่สุด จากปมรากของกระถินเทพาและกระถินณรงค์อย่างละ 1 สายพันธุ์เพื่อใช้ในการทดลองที่ 3 ต่อไป

3.2.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของข้อมูลตามแผนการทดลองแบบ CRD และ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่ารับทดลองโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูล MSTAT-C ของ Michigan State University (สุนันทา และคณะ, 2538)

3.3 การทดลองที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อไรโซเบียมต่อการเจริญเติบโตของไม้ยืนต้นตระกูลถั่วที่ปลูกในกระถางบรรจุดิน

3.3.1 ลักษณะการทดลอง

เป็นการทดลองในระดับเรือนทดลอง

3.3.2 สถานที่ทดลอง

หมวดดินและปุ๋ย ภาควิชาทรัพยากรที่ดินและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.3.3 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ระหว่างเดือน มิถุนายน ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2548

3.3.4 แผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มีทั้งหมด 3 ซ้ำ ประกอบด้วยการทดลองดังต่อไปนี้

- 1) ชุดดิน $Y_t - N/-R$
- 2) ชุดดิน $Y_t + N/-R$
- 3) ชุดดิน $Y_t - N/+R$
- 4) ชุดดิน $N_g - N/-R$
- 5) ชุดดิน $N_g + N/-R$
- 6) ชุดดิน $N_g - N/+R$

หมายเหตุ Y_t = ชุดดินยโสธร

N_g = ชุดดินน้ำพอง

$-N/-R$ = ไม่ใส่ในโตรเจน ไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม

$+N/-R$ = ใส่ในโตรเจน 12 กิโลกรัมในโตรเจนต่อไร่ ไม่ใส่เชื้อไรโซเบียม

$-N/+R$ = ไม่ใส่ในโตรเจน ใส่เชื้อไรโซเบียมไอโซเลทที่ 6 ที่แยกได้จาก

ปมรากกระถินเทพา ใส่เชื้อไรโซเบียมไอโซเลทที่ 3 ที่แยกได้จากปมรากกระถินณรงค์

3.3.5 ขั้นตอนการศึกษา

1) นำเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพในหลอดเลี้ยงพืช (งานทดลองที่ 2) และมีประสิทธิภาพสูง 2 อันดับแรก (1 อันดับแรกจากกระถินเทพา และอีก 1 อันดับแรกจากกระถินณรงค์) มาทำการเพาะเลี้ยงในหลอดที่บรรจุอาหารเหลว (ตารางภาคผนวกที่ 1) ที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ซึ่งมีความหนาแน่นของเชื้อประมาณ 10^8 - 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2) ทำการเก็บตัวอย่างชุดดินยโสธร (Yasothon series: Y_t) และชุดดินน้ำพอง (Nampong Series: N_g) ในระหว่างที่ทำการเพาะเลี้ยงขยายเชื้อไรโซเบียมในห้องปฏิบัติการ โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างชุดดินยโสธร และชุดดินน้ำพองที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร ทำการย่อยดินเก็บเศษหญ้าและรากพืช รวมทั้งก้อนกรวดและหินออกทิ้ง นำดินมาผึ่งลมให้แห้ง (air dry soil) แล้วร่อนดินผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิเมตร ชั่งดินใส่ในกระถาง กระถางละ 8 กิโลกรัม ทุกกระถางจะใส่ปุ๋ยสูตร 0-46-0 เป็นปุ๋ยรองพื้นอัตรา 7.2 กิโลกรัมต่อไร่

3) การเตรียมเชื้อไรโซเบียม นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ผ่านการพิสูจน์แล้วว่าเป็นเชื้อไรโซเบียมทั้ง 2 สายพันธุ์ (1 สายพันธุ์จากกระดินเทา และ 1 สายพันธุ์จากกระดินรงค์) มาเลี้ยงในอาหารเหลว (Yeast Mannitol Broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรบรรจุในหลอดทดลองขนาด 15×150 มิลลิเมตร โดยใช้ loop ที่ปลอดเชื้อ ถ่ายเชื้อจาก slant สู่อาหารเหลว ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ 10 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเตรียมกล้ากระดินเทา และ กระดินรงค์

4) การปลูกพืช นำเมล็ดกระดินเทาและเมล็ดกระดินรงค์ที่ผ่านการทำลายการพักตัวของเมล็ดด้วยน้ำร้อน 85 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำมาผึ่งลมให้แห้งแล้วนำไปปลูกในกระถางทดลอง กระถางละ 5 เมล็ด ทำการรดน้ำ เมื่อดันพืชงอกได้ประมาณ 14 วัน แล้วทำการถอนแยกให้เหลือจำนวน 2 ต้น / กระถาง

5) การใส่เชื้อไรโซเบียม (Inoculation) เมื่อดันพืชมีอายุประมาณ 2 สัปดาห์ ทำการใส่เชื้อไรโซเบียมประสิทธิภาพสูง (ใช้เชื้อสายพันธุ์ที่ดีที่สุดที่คัดได้จากผลการทดลองที่ 2 สำหรับพืชแต่ละตัว) ดำเนินการโดยใช้เชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวมีความเข้มข้นจะมีประชากรไรโซเบียมประมาณ 10^8 - 10^9 เซลล์/มล. โดยใช้ sterile pipette ดูดเชื้อประมาณ 5 มล. ใส่ให้ต้นพืชแต่ละชนิดตามดำรับการทดลองที่กำหนดไว้

3.3.6 การเก็บข้อมูล

ทำการเก็บข้อมูลต้นพืชที่อายุ 1 เดือน 2 เดือน 3 เดือน และ 4 เดือน โดยเก็บข้อมูลดังความสูง เส้นผ่านศูนย์กลาง จำนวนปมราก น้ำหนักสดต้น และ น้ำหนักแห้งต้น

3.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแต่ละชุด (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ CRD และ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่ารับทดลองโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูล MSTAT-C ของ Michigan State University (สุนันทา และ คณะ, 2538)