บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ทดลองที่แปลงทดลองสาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และแปลงเกษตรกร บ้านทุ่งหลวง ต.แม่วิน อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ ระหว่างเดือนพฤษภาคม 2557 ถึง มีนาคม 2559

การทดลองที่ 1 การประเมินลักษณะประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างข้าวก่ำพื้นเมืองจากที่สูง 7 พันธุ์กับข้าวพันธุ์ปรับปรุงสมัยใหม่ปทุมธานี 1 และสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 2

<u>สายพันธุ์พ่อแม่</u>

ใช้พันธุ์ข้าวทั้งหมด 8 สายพันธุ์ โดยพันธุ์พ่อเป็นพันธุ์ปรับปรุงสมัยใหม่ จำนวน 1 พันธุ์ คือ ปทุมธานี 1 (Pathumthani 1; PTT1) และพันธุ์แม่เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่รวบรวมมาจากเกษตรกรพื้นที่สูง 3 จังหวัด โดยกลุ่มวิจัยทรัพยากรพันธุกรรมธาตุอาหารพืชที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (CMUPN*lab*) ซึ่งเป็นข้าวก่ำที่มีค่าแอนโทไซยานินสูงทั้งหมด 7 พันธุ์ คือ ปิอิชู 037 (Bi ei su 037; BES037), ปิอิซู 057 (Bi ei su 057; BES057), ข้าวลืมผัว (Kao Luem Pua; KLP), ชิหน่อนะ (Chi Nor Na; CNN), ข้าวต่ำ (Kao Tum; KT), จานู่แนะแนะ (Ja Nu Nae; JNN) และเดวมาโอ๋นะ (Deaw Ma Oh Na; DMON) (ตารางที่ 3.1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.1 แหล่งที่มาของพันธุ์พ่อแม่ ที่ใช้ในงานทดลอง

No.	ชื่อพันธุ์	แหล่งที่มา	ชนิดข้าว	ประเภทข้าว	ปริมาณแอนโทไซยานิน(mg/100g)
1	ปิอิชู (BES037)	บ้านประตูเมือง ต. แม่วิน อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่	เหนียว	ข้าวไร่	166.4
2	ปิอิชู (BES057)	บ้านประตูเมือง ต. แม่วิน อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่	เหนียว	ข้าวไร่	115.1
3	ข้าวลืมผัว (KLP)	บ้านปางคำน้อย ต. ปางมะผ้า อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน	เจ้า	ข้าวไร่	113.0
4	ชิหน่อนะ (CNN)	บ้านจำโบ่ ต. ปางมะผ้า อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน	เหนียว	ข้าวไร่	109.9
5	ข้าวต่ำ (KT)	บ้านไทยพัฒนา ต. ม่วงยาย อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย	เจ้า	ข้าวนา	108.1
6	จานู่แนะ (JNN)	บ้านหนองตอง ต. สบป่อง อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน	เหนียว	ข้าวไร่	93.9
7	เดวมาโอ๋นะ (DMON)	บ้านแสนเจริญ ต. วาวี อ.แม่สรวย จ.เชียงราย	เหนียว	ข้าวไร่	91.0
8	ปทุมธานี 1 (PTT1)	ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี จ.ปทุมธานี	เจ้า	ข้าวนา	0.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสร้างลูกผสมชั่วที่ 1

ปลูกในกระถางในเรือนทดลอง ณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ช่วงเดือนกรกฎาคม – ธันวาคม 2557 โดยนำเมล็ดข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ปลูกพันธุ์ละ 3 กระถาง กระถางละ 5 ต้น 1 ต้นต่อหลุม เว้นช่วงเวลาของการปลูกทุกๆ 10 วัน ทั้งหมด 5 ครั้ง (planting date) เพื่อให้ข้าวมีระยะออกดอกที่ใกล้เคียงกัน ผสมพันธุ์โดยให้พันธุ์พื้นเมืองเป็นพันธุ์แม่และปทุมธานีเป็นพันธุ์พ่อให้ได้ทั้งหมด 7 คู่ผสม รวมทั้งหมด 7 ชุด ได้แก่

ชุดที่ 1 BES037 × PTT1
ชุดที่ 2 BES057 × PTT1
ชุดที่ 3 KLP × PTT1
ชุดที่ 4 CNN × PTT1
ชุดที่ 5 KT × PTT1
ชุดที่ 6 JNN × PTT1
ชุดที่ 7 DMON × PTT1

เมื่อถึงระยะสุกแก่เก็บเมล็ดแยกต้นของแต่ละคู่ผสม นำเมล็ดที่ได้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การประเมินลักษณะของลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างข้าวก่ำ 7 พันธุ์กับข้าวปทุมธานี 1 (PTT1)

วิธีการทดลอง

ปลูกข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 และพันธุ์พ่อแม่ ในกระถางในโรงเรือนทดลองระหว่างเดือนมกราคม–พฤษภาคม 2558 ปลูกลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่ พันธุ์ละ 3 กระถาง วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ โดยเพาะเมล็ดใน petri-dishes เมื่ออายุ 10 วัน ย้ายปลูกในกระถางบรรจุดิน กระถางละ 5 ต้น 1 ต้นต่อหลุม เมื่ออายุ 20 วันหลังย้ายปลูก ให้ปุ๋ยรองพื้นสูตร 15-15-15 อัตรา 25 กก./ไร่ จากนั้นเมื่อต้นข้าวอายุประมาณ 60 วัน ให้ปุ๋ยสูตร 46-0-0 อัตรา 10 กก./ไร่ ประเมินและบันทึกลักษณะทางสัณฐานและสรีระ 3 ระยะ คือ ระยะแตกกอ ออกดอก และสุกแก่ โดยเก็บข้อมูลลูกผสมชั่วที่ 1 ทุกต้น เปรียบเทียบพันธุ์พ่อแม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกข้อมูล

ระยะแตกกอ บันทึกทุกต้น ลักษณะทรงกอ สีแผ่นใบ สีกาบใบ สีหูใบ สีเขี้ยวใบ สีข้อ สีปล้อง

ระยะออกดอก บันทึกทุกต้น วันออกดอก จำนวนหน่อต่อกอ ลักษณะสียอดดอก สียอดเกสรตัวเมีย ความยาวเกสรตัวผู้ การยื่นโผล่ของเกสรตัวเมีย และการมีหางที่เมล็ด

ระยะสุกแก่ เก็บเกี่ยวเมล็ดแยกต้น บันทึกทุกต้น บันทึกสีเปลือกเมล็ดและสีเยื่อหุ้มเมล็ด

สุ่มตัวอย่างแบ่งเมล็ดไว้เป็น 3 ส่วน ส่วนแรกนำไปปลูกวัดการกระจายตัวทางพันธุกรรมในลูกผสมชั่วที่ 2 ส่วนที่สองนำมาประเมินลักษณะของสีของเปลือก สีเยื่อหุ้มเมล็ด (Maeda *et al*., 2014) วัดค่าการดูดกลืนแสงของเมล็ด โดยดัดแปลงมาจากวิธี pH differential method ตามวิธีของ (Giusti *et al*., 2001) และส่วนที่สามทดสอบการเป็นชนิดข้าวเจ้าหรือข้าวเหนียวด้วยวิธีทดสอบการติดสีสารละลายไอโอดีน potassium iodine (KI(I)) โดยแป้งที่ย้อมติดสีน้ำเงินแสดงว่าเป็นข้าวเจ้า และสีน้ำตาลแสดงว่าเป็นข้าวเหนียว

การวัดค่าดูดกลืนแสงของเมล็ด

เมล็ดข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 และพันธุ์พ่อแม่ของทุกคู่ผสม แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก จำนวนคู่ผสมละ 10 เมล็ด นำมาใส่หลอดทดลองแล้วเติมน้ำ 1 ml. นำไปต้มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พร้อมกับการเขย่าเป็นเวลา 30 นาที ในเครื่อง shaking water bath เมื่อครบเวลาที่กำหนด หยดตัวอย่างที่ได้ใส่ลง Microplate 96 wells plate นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในเครื่อง Microplate Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 nm.

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ในลักษณะจำนวนวันออกดอก ความสูงต้น จำนวนหน่อต่อต้น น้ำหนักเมล็ดต่อต้น และค่าการดูดกลืนแสง เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของลูกผสมชั่วที่ 1 และพันธุ์พ่อแม่ โดยใช้วิธี Least Significant Difference (LSD)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การทดลองที่ 2</u> การประเมินการกระจายตัวลูกผสมชั่วที่ 2 ปลูกในสภาพแวดล้อมแตกต่างกัน

คัดเลือกลูกผสมชั่วที่ 1 มาศึกษา 1 คู่ผสม คือ คู่ที่ 1 BES037 × PTT1 เก็บเมล็ดจากการผสมตัวเองของลูกผสมชั่วที่ 1 เพาะเมล็ดพันธุ์ลูกผสมและพันธุ์พ่อแม่เพื่อเป็นพันธุ์เปรียบเทียบ ช่วงเดือนกรกฎาคม – ธันวาคม 2558 เพาะปลูกในฤดูนาปีโดยปลูกในกระถาง เพาะเมล็ดลูกผสมทั้งหมด 265 ต้น และพันธุ์พ่อแม่ พันธุ์ละ 5 ต้น ในตะกร้าบรรจุดินเพาะต้นกล้า เมื่อต้นกล้าเริ่มการแตกกอหรือประมาณ 20 – 25 วันหลังเพาะเมล็ด แบ่งแยกต้นกล้าที่เป็นพันธุกรรมชนิดเดียวกันเป็นสองส่วนแล้วปลูกลงกระถางบรรจุดิน เมื่อต้นกล้าแข็งแรงหรือประมาณ 7 วันหลังแบ่งแยก นำต้นกล้าในกระถางทั้งสองชุดไปจัดวางทั้งไว้ 2 สถานที่ปลูก คือ ในที่ลุ่มปลูกที่แปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (CMU) ระดับความสูง 328 เมตร และในที่สูงปลูกที่แปลงทดสอบของเกษตรกร บ้านทุ่งหลวง ต.แม่วิน อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ (TL) ระดับความสูง 978 เมตร เมื่อถึงระยะหลังปลูก 20 วัน ให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 25 กก./ไร่ จากนั้นเมื่อต้นข้าวอายุประมาณ 60 วัน ให้ปุ๋ยสูตร 46-0-0 อัตรา 10 กก./ไร่

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

บันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานของลูกผสมชั่วที่ 2 ที่มีพันธุกรรมเดียวกันทั้งสองแหล่งปลูกเปรียบเทียบพันธุ์พ่อแม่ เมื่อถึงระยะสุกแก่เก็บเกี่ยวเมล็ดแยกต้นของทุกๆ ต้น แบ่งเมล็ดไว้สามส่วน ส่วนแรกบันทึกสีเปลือก สีเยื่อหุ้มเมล็ดจำนวน 10 เมล็ดต่อต้น และแกะเปลือกเมล็ดด้วยมือ คัดเลือกเมล็ดจากต้นที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีม่วงทั้งหมด 100 ต้น โดยนำเมล็ดข้าวกล้อง 1 กรัม นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีวิเคราะห์ทางเคมีหาปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าว เปรียบเทียบทั้ง 2 สถานที่ปลูก ส่วนที่สองวัดขนาดเมล็ดข้าวเปลือก และทดสอบการเป็นชนิดข้าวเจ้าหรือข้าวเหนียวด้วยวิธีทดสอบการติดสีสารละลายไอโอดีน ทดสอบความอ่อนนุ่ม ส่วนที่สามคัดเลือกและนำไปปลูกต่อในลูกผสมชั่วที่ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานินของเมล็ดข้าวโดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี</u>

แกะเปลือกหุ้มเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 2 และ พันธุ์แม่ เพื่อให้ได้ข้าวกล้อง 1 กรัมต่อต้น การสกัดโดยใช้ methanol 70 % แล้วจึงนำไปวัดโดยวิธี pH differential method ตามวิธีของ Abdel-Aal และ Hucl (1999)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ประเมินการกระจายตัวโดยการจัดกลุ่ม ทดสอบการกระจายตัวของ สีแผ่นใบ สีกาบใบ สีลิ้นใบ สียอดดอก สีเยื่อหุ้มเมล็ด และการมีหางของเมล็ดในลูกผสมชั่วที่ 2 โดยใช้ chi-square test (χ^2 test)

วิเคราะห์การกระจายทางพันธุกรรมของปริมาณแอนโทไซยานินในลูกผสมชั่วที่ 2 ของทั้ง 2 พื้นที่ปลูก และนำปริมาณแอนโทไซยานินของเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 2 เปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่ คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ช่วงของการกระจายตัว (range) และสัมประสิทธิ์ของการแปรปรวน (coefficient of variation)

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินของเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 2 ทั้งสองพื้นที่ปลูก และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเมล็ดต่อต้นกับปริมาณแอนโทไซยานินของลูกผสมชั่วที่ 2 จากทั้ง 2 พื้นที่ปลูก เปรียบเทียบพันธุ์พ่อแม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved