บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการทดลองในพื้นที่สถานีวิจัยการเกษตรเขตชลประทาน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือน มิถุนายน 2547 ถึง เดือนมีนาคม 2548

การวางแผนการทดลอง

1. วางแผนการทดลองแบบ split plot in RCB ทำซ้ำ 3 ครั้ง ใช้ข้าวโพดหวานลูกผสม 3 พันธุ์ ซึ่งมียีน *sh2* เป็น main plot และระยะเก็บเกี่ยวหลังออกไหม (วัน) 6 ระยะ เป็น subplot ดังนี้

main plot ประกอบด้วยข้าวโพดหวาน 3 พันธุ์ คือ

1. พันธุ์ ATS5 ของบริษัทผลิตภัณฑ์ข้าวโพดหวาน จำกัด (V1)
2. พันธุ์ HIBRIX10 ของบริษัทแปซิฟิคเมล็ดพันธุ์ จำกัด (V2)
3. พันธุ์ CABARET ของบริษัทข่านต้า จำกัด (V3)

subplot ประกอบด้วยระยะเก็บเกี่ยว 6 ระยะ คือ

1. ระยะเก็บเกี่ยวหลังออกไหม 12 วัน (Tr1)
2. ระยะเก็บเกี่ยวหลังออกไหม 15 วัน (Tr2)
3. ระยะเก็บเกี่ยวหลังออกไหม 18 วัน (Tr3)
4. ระยะเก็บเกี่ยวหลังออกไหม 20 วัน (Tr4)
5. ระยะเก็บเกี่ยวหลังออกไหม 22 วัน (Tr5)
6. ระยะเก็บเกี่ยวหลังออกไหม 24 วัน (Tr6)

ทำการทดลอง 2 ฤดู คือ ฤดูฝน เริ่มปลูกวันที่ 8 มิถุนายน 2547-วันที่ 24 สิงหาคม 2547 และฤดูหนาว เริ่มปลูกวันที่ 23 พฤศจิกายน 2547-วันที่ 2 มีนาคม 2548 พื้นที่ทำการทดลองขนาด 20 x 40 เมตร ต่อ 1 ซ้ำ แบ่งเป็นแปลงทดลองขนาดย่อย 1 x 9 เมตร ปลูก 2 แถว ระยะระหว่างต้นและแถว 30 x 70 เซนติเมตร ระยะห่างระหว่างแปลงย่อย 50 เซนติเมตร แต่ละพันธุ์มีระยะห่างประมาณ 2.5 เมตร ปลูก 1 เมล็ดต่อ 1 หลุม

2. การให้ปุ๋ย ทำการใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง โดยครั้งแรกใส่ปุ๋ยสูตร 16-20-0 อัตรา 30 กิโลกรัมต่อไร่ ทำการหว่านพร้อมไถพรวนก่อนปลูก และเมื่อข้าวโพดหวานมีอายุประมาณ 30 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ในอัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การให้น้ำ ในฤดูฝนข้าวโพดหวานจะได้รับน้ำจากน้ำฝน และให้น้ำหากฝนทิ้งช่วง ส่วนฤดูหนาวจะทำการให้น้ำแบบปล่อยไหลตามร่องระหว่างแถว 5 วันต่อครั้ง

การบันทึกข้อมูล

แบ่งการเก็บข้อมูลออกเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกเป็นข้อมูลพืช ส่วนที่สองเป็นการวิเคราะห์การสะสมปริมาณน้ำตาลและความหวานในเมล็ดข้าวโพดหวาน และส่วนที่สามเป็นข้อมูลภูมิอากาศภายใต้สภาพแวดล้อมในพื้นที่ขณะทำการวิจัย เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์การตอบสนองต่อสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะสภาพภูมิอากาศ ทั้งในด้านการเจริญเติบโตและคุณภาพของข้าวโพดหวาน

1. ข้อมูลพืช ได้แก่

1.1 การพัฒนาการ (phenology) โดยบันทึกตามระยะการเจริญเติบโต ได้แก่ ระยะการงอก (emergence), ระยะออกดอกตัวผู้ 50% (tasselling), ระยะออกไหม 50% (silking) และระยะเก็บเกี่ยว (harvesting)

1.2 ช่วงการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (vegetative growth) ทำการบันทึกตลอดฤดูปลูก ได้แก่ จำนวนใบ ความสูงต้นจนถึงข้อใบธง ด้วยการสุ่มวัดตัวอย่างต้นข้าวโพดหวานพันธุ์ละ 5 ต้นต่อ 1 ซ้ำ ทำการวัดทุกๆ 7 วัน หลังงอก และการสะสมน้ำหนักแห้งของต้นและใบ ด้วยการสุ่มตัวอย่างต้นข้าวโพดหวานพันธุ์ละ 10 ต้นต่อ 1 ซ้ำ เริ่มเก็บเมื่อข้าวโพดหวานมีอายุ 20 วันหลังงอก หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทุกๆ 7 วันจนถึงเก็บเกี่ยว

1.3 ช่วงการเจริญเติบโตทางการแพร่พันธุ์ (reproductive growth) ทำการบันทึกข้อมูล ได้แก่ ความสูงของฝัก ความกว้างและความยาวของฝักบนต้นหลังออกไหม ด้วยการสุ่มวัดต้นข้าวโพดหวานพันธุ์ละ 5 ต้นต่อ 1 ซ้ำ ทำการวัดทุกๆ 3 วันหลังออกไหม และการสะสมน้ำหนักแห้งของต้น ใบ และ ฝัก หลังจากระยะออกไหม ด้วยการสุ่มเก็บตัวอย่างต้นข้าวโพดหวานแต่ละการทดลอง (treatment) จำนวน 5 ต้น

1.4 ลักษณะทางกายภาพของข้าวโพดหวาน ได้แก่ สีของเปลือกและสีของเมล็ดเมื่อฝักมีอายุ 20 วันหลังออกไหม

1.5 องค์ประกอบของผลผลิตและผลผลิต

1.5.1 เก็บเกี่ยวฝักข้าวโพดหวานในแต่ละการทดลอง โดยเก็บเกี่ยวในพื้นที่ 3 ตารางเมตร (1 x 3 เมตร) นำไปชั่งน้ำหนักฝักสดทั้งเปลือก เพื่อคำนวณผลผลิตต่อไร่

1.5.2 ทำการเก็บข้อมูลองค์ประกอบของผลผลิต โดยสุ่มเก็บตัวอย่างข้าวโพดหวานแต่ละการทดลองจำนวน 5 ต้น นำไปหาน้ำหนักสด 100 เมล็ด, จำนวนเมล็ดต่อฝัก, เปอร์เซ็นต์ความชื้น, น้ำหนักสดฝักก่อนปอกเปลือก และหลังปอกเปลือก ความกว้าง และความยาวฝักทั้งก่อนปอกเปลือกและหลังปอกเปลือก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและความหวานในเมล็ดข้าวโพด

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.1.1 เครื่องปั่น (grinder)

2.2.2 หลอดสำหรับ centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร

2.2.3 กระบอกตวง (cylinder)

2.2.4 ไมโครปิเปต (micropipet) ขนาด 1000 ไมโครลิตร

2.2.5 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

2.2.6 water bath

2.2.7 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

2.2.8 spectrophotometer (CE2021 2000 series) CECIL Instrument, England

2.2.9 หลอดทดลอง (test tube)

2.2.10 refractometer (N-1α, Brix 0-32%), Japan

2.2.11 Intertsil® HPLC Column, NH_2 5 µm 4.6 x 150 mm, Shimadzu, Japan

2.2.12 Refractive Index Detector (RID-10A), Shimadzu, Japan

2.2.13 Cellulose Acetate Filter 0.45 µm, Sartorius AG, Germany

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.2.1 ethanol 80%

2.2.2 10% $CuSO_4 5H_2O$

2.2.3 Na_2HPO_4 99%

2.2.4 sodium potassium tartrate (Tetrahydrate) 99%

2.2.5 1 N NaOH

2.2.6 ammonium molybdate 82%

2.2.7 sulphuric acid 95-97%

2.2.8 sodium arsenate 98.5%

2.2.9 D-glucose, BDH Laboratory Supplies Poole, England

2.2.10 acetronitrile (HPLC grade)

2.2.11 glucose, Supelco, USA

2.2.12 fructose, Supelco, USA

2.2.13 sucrose, Supelco, USA

2.2.14 น้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 วิธีการสกัดตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดหวาน

ชั่งตัวอย่างเมล็ดจากฝักข้าวโพดที่เก็บในแต่ละระยะเก็บเกี่ยวจำนวน 1 กรัม โดยสุ่มจากบริเวณกลางฝัก ระยะห่างจากหัวและท้ายฝักประมาณ 5 เซนติเมตร แล้วนำไปสกัดปริมาณน้ำตาลโดยใช้วิธีการของ Juvick and LaBonte (1998) ดังต่อไปนี้

1. นำตัวอย่างเมล็ดสด 1 กรัม บดในโกร่งบดให้ละเอียด แล้วเติม ethanol 80 % ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร

2. เทใส่หลอดทดลองสำหรับ centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอด แล้วนำไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 °c นาน 20 นาที

3. นำไปแยกส่วนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

4. เทส่วนสารละลายใสเก็บไว้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

2.4 วิธีการวิเคราะห์ reducing sugar โดยวิธี Somogyi Nelson's method (วัฒนาลัย, 2536) มีวิธีการดังนี้

1. เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 100, 250, 500, 750 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

2. เตรียมสารละลาย copper reagent (ภาคผนวก ข)

3. เตรียมสารละลาย arsenomolybdate reagent (ภาคผนวก ข)

4. ดูดสารสกัดที่ได้จากข้อ 2.3. จำนวน 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง สำหรับการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานโดยใช้วิธีการเดียวกัน

5. เติม copper reagent 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที

6. ทำให้เย็นลงโดยแช่ในอ่างน้ำ เติม arsenomolybdate reagent 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที จะเห็นเป็นสีเขียว หรือน้ำเงิน ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาล

7. เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

8. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นหรือปริมาณน้ำตาลต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณความเข้มข้นของน้ำตาล

ความเข้มข้นของน้ำตาล = $\frac{X \times D \times F}{FW}$ ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักสด

โดย X = ค่าความเข้มข้น (µg/ml) ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

D = ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ เท่ากับ 2 มิลลิลิตร

F = ปริมาตรที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดด้วย ethanol 80%

FW = น้ำหนักตัวอย่างเมล็ดสดที่นำมาสกัดด้วย ethanol 80%

2.5 การวิเคราะห์น้ำตาลด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2.3 มาทำการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

2.5.1 คอลัมน์สำหรับการแยก (column) ใช้ Intertsil® HPLC Column, NH_2 5 µm 4.6 x 150 mm

2.5.2 ระบบการตรวจวัด (detector) เป็นแบบ Refractive Index Detector, RID

2.5.3 สารละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ใช้ Acetronitrile (ACN):H_2O ในอัตราส่วน 80:20

2.5.4 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ใช้อัตราคงที่ 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที

2.5.5 เตรียมสารละลายมาตรฐาน 250 mg/ml glucose และ fructose และ 25 mg/ml sucrose เพื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

2.5.6 ก่อนทำการฉีดสารละลายตัวอย่าง ทำการกรองด้วย Cellulose Acetate Filter 0.45 µm จากนั้นฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดย automatic injector ใช้เวลาในการวิเคราะห์ผล 15 นาที

2.6 การวิเคราะห์ความหวาน (sweetness)

ทำการวัดความหวานโดยใช้เครื่องมือ refractometer โดยมีวิธีการดังนี้

2.6.1 ทำความสะอาด prism และ daylight plate ด้วยน้ำกลั่น แล้วเช็ดให้แห้ง ระวังอย่าให้เกิดรอยขีดข่วนที่ prism

2.6.2 หยดของเหลวตัวอย่างที่ได้จากเมล็ดข้าวโพดหวานลงบน prism โดยหยดให้เคลือบทั่วบริเวณส่วนผิวของ prism จากนั้นปิดทับด้วย daylight plate

2.6.3 อ่านค่าสเกลความหวานที่ eyepiece และบันทึกค่า แล้วนำค่าที่วัดได้ ซึ่งมีหน่วยเป็น %brix เปรียบเทียบระหว่างพันธุ์และแต่ละระยะการเก็บเกี่ยว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ข้อมูลภูมิอากาศ ทำการเก็บข้อมูลภูมิอากาศรายวัน ได้แก่ ความยาววัน (daylength), ปริมาณของแสงแดด (solar radiation), ข้อมูลอุณหภูมิสูงสุด (maximum temperature) และอุณหภูมิต่ำสุด (minimum temperature) ในพื้นที่สถานีวิจัยการเกษตรเขตชลประทาน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การวิเคราะห์การพัฒนาและการเจริญเติบโต

1.1 ข้อมูลด้านการพัฒนาการ

บันทึกวันที่มีการพัฒนาของข้าวโพดหวานตั้งแต่วันงอก, วันออกดอกตัวผู้ 50%, วันออกไหม 50% และวันเก็บเกี่ยว ในแต่ละการทดลอง แล้วคำนวณค่าอุณหภูมิสะสมที่ข้าวโพดหวานใช้เพื่อการพัฒนาการในแต่ละระยะพัฒนา โดยใช้สมการในการคำนวณตามวิธีของ Tollenaar and Dwyer (1999) ดังนี้

$$GDD = \sum\left[\frac{(T_{max} + T_{min})}{2} - T_{base}\right]$$

โดย T_{max} = daily maximum temperature ($^{\circ}$c)

T_{min} = daily minimum temperature ($^{\circ}$c)

T_{base} = base temperature, sweet corn = 10 $^{\circ}$c (Senshan *et al.*, 1994)

ค่าจากสมการที่ได้มีหน่วยเป็น degree-days การแทนค่าในสมการใช้วิธี "cut-off method" คือ กำหนดให้ค่าอุณหภูมิสูงสุดรายวันมีค่าไม่เกิน 30 $^{\circ}$c ถ้าอุณหภูมิสูงสุดรายวันมีค่ามากกว่า 30 $^{\circ}$c ให้แทนค่าในสมการเท่ากับ 30 (T_{max} = 30) และถ้าอุณหภูมิต่ำสุดรายวันน้อยกว่าค่าอุณหภูมิพื้นฐาน คือ 10 $^{\circ}$c ให้แทนค่าในสมการเท่ากับ 10 (T_{min} = 10)

1.2 ข้อมูลด้านการเจริญเติบโต

วิเคราะห์ข้อมูลทั้งการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ และทางการแพร่พันธุ์ เปรียบเทียบกันระหว่างข้าวโพดหวานทั้ง 3 พันธุ์ ตลอดฤดูปลูก และวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างฤดูปลูก รวมทั้งเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่างพันธุ์และฤดูปลูก โดย Relative growth rate (RGR) ดังสมการ

$$\text{Relative growth rate} = \frac{(LnW2 - LnW1)}{(T2 - T1)}$$

โดย W1 = น้ำหนักแห้ง (กรัม) ที่เวลา T1

W2 = น้ำหนักแห้ง (กรัม) ที่เวลา T2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งในฤดูฝนได้ทำการวิเคราะห์การเจริญเติบโตที่ 20 ถึง 60 วันหลังปลูก สำหรับฤดูหนาววิเคราะห์ที่ 30 ถึง 80 วันหลังปลูก

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบของผลผลิตและผลผลิต

นำข้อมูลผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิตที่ได้ในแต่ละระยะเก็บเกี่ยว มาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) เพื่อหาความแตกต่างของผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิต

3. การวิเคราะห์การสะสมปริมาณน้ำตาลและความหวาน (%brix)

นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำตาลและความหวานในแต่ละระยะการเก็บเกี่ยวมาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติเปรียบเทียบกันระหว่างพันธุ์ และเปรียบเทียบแนวโน้มของการสะสมปริมาณน้ำตาลและความสัมพันธ์กับอุณหภูมิ ปริมาณแสงแดด และความยาววัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved