บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาความแปรปรวนของการพัฒนาเมล็ดข้าวภายในรวงที่สัมพันธ์กับผลผลิต คุณภาพเมล็ด และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระฟีนอลิค ของข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมือง แบ่งออกเป็น 2 การทดลองได้แก่ การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาระยะพัฒนาการที่สัมพันธ์กับค่าอุณหภูมิสะสม และการพัฒนาเมล็ดข้าวภายในรวง และ การทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับการพัฒนาเมล็ดบนรวงข้าวที่สัมพันธ์ผลผลิต คุณภาพเมล็ด และพลวัตของสารต้านอนุมูลอิสระฟีนอลิค การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลอง ณ แปลงทดลองสถานีวิจัยเกษตรเขตชลประทาน ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และทำการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ ณ ห้องปฏิบัติการทดลอง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีรายละเอียดของแต่ละงานทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาระยะพัฒนาการของข้าวที่สัมพันธ์กับค่าอุณหภูมิสะสม และการพัฒนาเมล็ดข้าวภายในรวง

ทำการปลูกทดลองข้าวเหนียวก่ำ 8 พันธุ์ ได้แก่ สะเมิง 8, MHS1, PGMHS6, PGMHS15 PGMHS16, PGMHS17, ก่ำดอยสะเก็ด และ ข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ No.16815 ในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว ใช้วิธีปลูกแบบหยอดเมล็ด จำนวน 3-5 เมล็ดต่อกระถาง เมื่อเมล็ดงอกทำการถอนทิ้งให้เหลือ 3 ต้นต่อกระถาง เริ่มปลูกเมื่อวันที่ 15 กรกฎาคม 2551

การดูแลรักษา

ทำการแบ่งใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง โดยครั้งแรกใส่ ปุ๋ยสูตร 16-20-0 ในระยะหลังข้าวงอก 25 วัน จำนวน 43 กิโลกรัมต่อไร่ และครั้งที่สองใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ระยะกำเนิดช่อดอก จำนวน 36 กิโลกรัมต่อไร่ การให้น้ำให้ 2 วันครั้ง และในระหว่างการดำเนินการทดลอง มีการดูแลควบคุมป้องกันกำจัดศัตรูพืชตามความเหมาะสม และกำจัดวัชพืชระยะก่อนแตกกอ และระหว่างแตกกอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกข้อมูล

1. ข้อมูลพัฒนาการ

ทำการบันทึกวันที่ และทำการสังเกต ระยะพัฒนาการต่างๆของข้าวทุกพันธุ์ ได้แก่ งอกระยะแตกกอ ระยะแทงรวง และระยะสุกแก่ทางสรีระของแต่ละกระถาง พร้อมหาความสัมพันธ์กับค่าอุณหภูมิสะสม (Growing degree day) หรือ (GDD) รายวัน โดยหาค่าของอุณหภูมิสะสม ซึ่งมีสูตรคำนวนตามที่ Russelle *et al*. (1984) เสนอไว้ดังนี้

$$GDD = \frac{T.max + T.min}{2} - T_{base}$$

เมื่อ T.max = อุณหภูมิสูงสุดประจำวัน

T.min = อุณหภูมิต่ำสุดประจำวัน

T_{base} = อุณหภูมิต่ำสุดที่พืชจะสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ

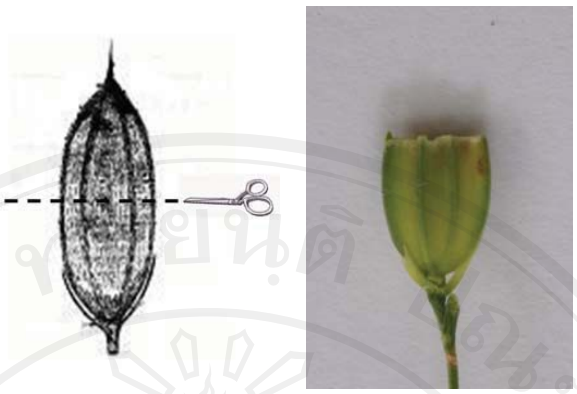
(T_{base} ของข้าว = 8 องศาเซลเซียล)

ในกรณีที่ T.max เกิน 30 องศาเซลเซียล ให้ใช้ค่าอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียล แต่ถ้า T.max น้อยกว่า 30 องศาเซลเซียลให้ใช้ค่า T.max นั้นๆ เมื่อนำค่าความร้อนที่ได้แต่ละวันมารวมกันจะได้ค่าของอุณหภูมิสะสมรวม ($\sum$GDD) โดยข้อมูลอุณหภูมิอากาศที่ต้นข้าวได้รับในแต่ละวันของการทดลองนี้ ได้มาจากสถานีตรวจวัดสภาพอากาศของสถานีตรวจวัดอากาศแปลงทดลองวิจัยการเกษตรเขตชลประทาน ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. การพัฒนาเมล็ด

ทำการสุ่มเลือกรวงข้าวทุกพันธุ์หลังระยะผสมเกสร โดยสุ่มเลือกรวงจำนวน 1 รวง แล้วทำการตัดปลายเมล็ดข้าว เหนือส่วนของเอ็มบริโอ (ภาพที่ 2) ทำการสังเกตพัฒนาการเมล็ด ด้านการสะสมแป้งภายในเมล็ดข้าว โดยการนำเมล็ดข้าวที่ไม่ได้รับการตัดเหนือส่วนของเอ็มบริโอมาถ่ายภาพทุกๆ 2 วัน ทำโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 8 เท่า พร้อมกับสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีที่เป็นองค์ประกอบของสารฟีนอลิคในเมล็ดข้าวจนถึงระยะสุกแก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2 ลักษณะการตัดเมล็ดเหนือส่วนเอ็มบริโอ

การทดลองที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับการพัฒนาเมล็ดภายในรวงข้าวที่สัมพันธ์ผลผลิต คุณภาพเมล็ด และพลวัตของสารต้านอนุมูลอิสระฟีนอลิค

ทำการปลูกข้าวเหนียวก่ำ 8 พันธุ์ ได้แก่สะเมิง 8, MHS1, PGMHS6, PGMHS15, PGMHS 16, PGMHS17, ก่ำดอยสะเก็ด และ ข้าวเหนียวก่ำพันธุ์ No.16815 ในแปลงย่อยขนาด 6 x 4.5 เมตร ระยะปลูก 0.25 x 0.30 เมตร ทำการปลูก 3 เมล็ดต่อหลุม โดยหยอดเมล็ดวันที่ 15 กรกฎาคม 2550

การดูแลรักษา

ทำการแบ่งใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง โดยครั้งแรกใส่ปุ๋ยสูตร 16-20-0 ระยะหลังข้าวงอก 25 วัน ในอัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ และครั้งที่สองใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ระยะกำเนิดช่อดอกในอัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ การจัดการน้ำอาศัยน้ำฝน และในระหว่างการดำเนินการทดลองมีการดูแลควบคุมป้องกันศัตรูพืชตามความเหมาะสม และกำจัดวัชพืชระยะก่อนแตกกอ และระหว่างแตกกอ

การบันทึกข้อมูล

1. ลำดับการพัฒนาเมล็ดบนรวง

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างรวงข้าวจำนวน 1 รวงของแต่ละพันธุ์เริ่มตั้งแต่ระยะออกรวง (heading) จนถึงระยะเก็บเกี่ยว สัปดาห์ละ 2 ครั้ง แล้วนำมาเอ็กซ์เรย์รวงข้าว โดยใช้เครื่องเอ็กซ์เรย์ชิ้นส่วนกระดูกช่วงรังสีต่ำสุด เพื่อดูลำดับการพัฒนาเมล็ดภายในรวง โดยสังเกตลักษณะเมล็ดที่มีการสะสมแป้งบนระแง้ปฐมภูมิและทุติยภูมิภายในรวง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ข้อมูลการเจริญเติบโตและลักษณะทางพืชไร่

2.1 บันทึกน้ำหนักแห้งมวลชีวภาพตามระยะการเจริญเติบโตที่กำหนดไว้ได้แก่ ระยะงอก ระยะแตกกอ ระยะออกรวง และสุกแก่ทางสรีระ โดยทำการสุ่มตัวอย่างข้าวจำนวน 2 กอ ในแต่ระยะดังกล่าวข้างต้น แล้วนำตัวอย่างแยกออกเป็นส่วนๆ ประกอบด้วยลำต้น ใบ และ รวง (ตั้งแต่ระยะตั้งท้อง) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักแห้งมวลชีวภาพตามระยะการเจริญเติบโต และทำการวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตทำโดยการนำข้อมูลน้ำหนักแห้งใบ ต้นและน้ำหนักแห้งของรวง ในแต่ละระยะมาสร้างสมการ 3^{rd} order polynomial (กมลทิพย์, 2551)

$$y = a+bx+cx^2+dx^3$$

เมื่อ y = ค่าน้ำหนักแห้ง

a, b, c, d = ค่าสัมประสิทธิ์

x = จำนวนวันหลังปลูก

จากการแทนค่าในสมการและสังเกตค่าที่ประเมิน จะได้ค่าวันที่ปรากฏการสะสมน้ำหนักแห้งสูงสุดและน้ำหนักแห้งสูงสุด แล้วนำค่าที่ได้มาหาอัตราการสะสมน้ำหนักแห้งเฉลี่ย โดยใช้สมการ

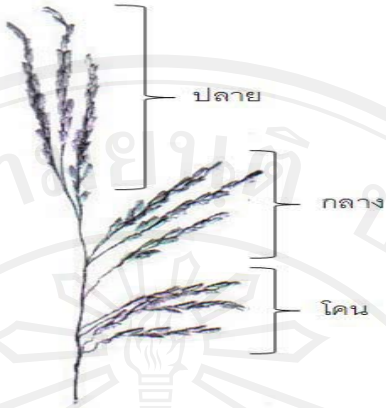
$$\text{อัตราการสะสมน้ำหนักแห้งเฉลี่ย} = \frac{\text{ค่าของน้ำหนักแห้งสูงสุด}}{\text{วันน้ำหนักแห้งสะสมสูงสุด}}$$

2.2 บันทึกความสูงของต้นข้าว โดยวัดจากพื้นดินถึงปลายใบธงที่ระยะเก็บเกี่ยว

2.3 บันทึกปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ใบธงโดยสุ่มใบธงกอละ 1 ใบ จำนวน 5 กอ ที่ระยะออกรวง โดยใช้เครื่องวัดคลอโรฟิลล์ (chlorophyll meter) รุ่น SPAD-502 ยี่ห้อ Minolta ทำการวัด 3 ตำแหน่ง คือส่วนปลายใบ ส่วนกลางใบ และส่วนโคนใบ โดยทำการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ตำแหน่งละ 5 ครั้ง นำค่าที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากวิธีวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยใช้สารเคมีเทียบกับค่าที่วัดได้จากเครื่องวัดคลอโรฟิลล์ในใบพืช (สุทธกานต์, 2546)

2.4 บันทึกข้อมูลความแปรปรวนของการสะสมน้ำหนักแห้งของเมล็ด โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างรวงข้าวจำนวน 3 รวง จากแต่ละพันธุ์ ตั้งแต่ระยะออกรวงจนถึงระยะเก็บเกี่ยว โดยสุ่มเก็บตัวอย่างสัปดาห์ละ 2 ครั้ง แล้วแยกแบ่งตำแหน่งภายในรวง 3 ส่วน คือ รวงปลาย กลางและโคนรวง (ภาพที่ 3) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักแห้งของเมล็ด และนับจำนวนเมล็ดในแต่ละส่วน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่3 การแบ่งตำแหน่งเมล็ดของรวงข้าว

3. คุณภาพเมล็ด

3.1 บันทึกความแข็งของเมล็ดข้าวกล้องโดยสุ่มเมล็ดข้าว ที่ระยะเก็บเกี่ยวจำนวน 10 เมล็ด แล้วทำการวัดความแข็งโดยใช้เครื่องวัดความแข็งเมล็ด

3.2 บันทึกข้อมูลทางกายภาพของเมล็ด ได้แก่ ความกว้าง ความยาว ความหนาโดยใช้เวอร์เนียร์มิเตอร์แบบดิจิตอลวัดจากตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องจำนวน 10 เมล็ด ที่สุ่มระยะเก็บเกี่ยวแล้ว ประเมิณปริมาตร พื้นที่ผิว และความหนาแน่นเมล็ด จากสมการ (Jongkaewwattana, 1990)

$$\text{ปริมาตร} = \frac{4}{3}\pi \text{ x กว้าง x ยาว x หนา}$$

$$\text{พื้นที่ผิว} = 2\pi \text{ x กว้าง x ยาว}$$

$$\text{ความหนาแน่น} = \text{น้ำหนักเมล็ด / ปริมาตร}$$

4. ข้อมูลผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิต

4.1 สุ่มเก็บเกี่ยวตัวอย่างผลผลิตในพื้นที่ 2 ตารางเมตร แล้วนำมานวดทำความสะอาดเมล็ด และชั่งหาน้ำหนักผลผลิต และน้ำหนักฟางแห้ง คำนวณค่าดัชนีเก็บเกี่ยว (Harvest index : HI) จากสมการ

$$\text{HI} = \text{น้ำหนักเมล็ด / น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดินทั้งหมด}$$

4.2 เก็บข้อมูลองค์ประกอบผลผลิต โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างจากข้าวจำนวน 5 กอ แล้วทำการบันทึก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- จำนวนกอ / พื้นที่
- จำนวนต้น / กอ
- จำนวนรวง / กอ
- จำนวนเมล็ด / รวง โดยสุ่มเก็บจากตัวอย่างจำนวน 10 รวง
- จำนวนเมล็ดดี / รวง โดยสุ่มเก็บจากตัวอย่างจำนวน 10 รวง
- จำนวเมล็ดลีบ / รวง โดยสุ่มเก็บจากตัวอย่างจำนวน 10 รวง
- น้ำหนัก 1,000 เมล็ด

5. การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิครวมทั้งหมด

เก็บตัวอย่างรวงข้าวตั้งแต่ระยะรวงโผล่ จนถึงระยะเก็บเกี่ยวสัปดาห์ละ 2 ครั้ง แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิครวมทั้งหมดทันที โดยแบ่งรวงข้าวที่จะทำการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิครวมทั้งหมด ออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ปลายรวง กลางรวง และโคนรวง โดยมีวิธีวิเคราะห์จากวิธีการของ (Singleton and Rossi, 1965) (ภาพที่ 4) มีรายละเอียดดังนี้

1. นำเมล็ดข้าวเหนียวก่ำที่สุ่มเก็บมาตั้งแต่ระยะโผล่รวง จนถึงระยะเก็บเกี่ยวได้มาแยกส่วนของแกลบและเมล็ดออกจากกัน
2. นำเมล็ดข้าวเปลือกที่แยกแกลบและข้าวกล้อง จำนวน 1 กรัม นำมาเติมตัวทำละลายเมธานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที
3. จากนั้นนำไปหาปริมาณ total phenolic compounds โดยนำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลอง และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 3.90 มิลลิลิตร พร้อมเขย่า
4. เติมสารละลาย Folin reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่า และตั้งทิ้งไว้ 8 นาที
5. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนทปริมาตร 300 ไมโครลิตรวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง 30 นาที
6. นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 765 นาโนเมตร รายงานผลการทดลองโดยการทำกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานของแกลลิคแอซิดเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 250 และ 500 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

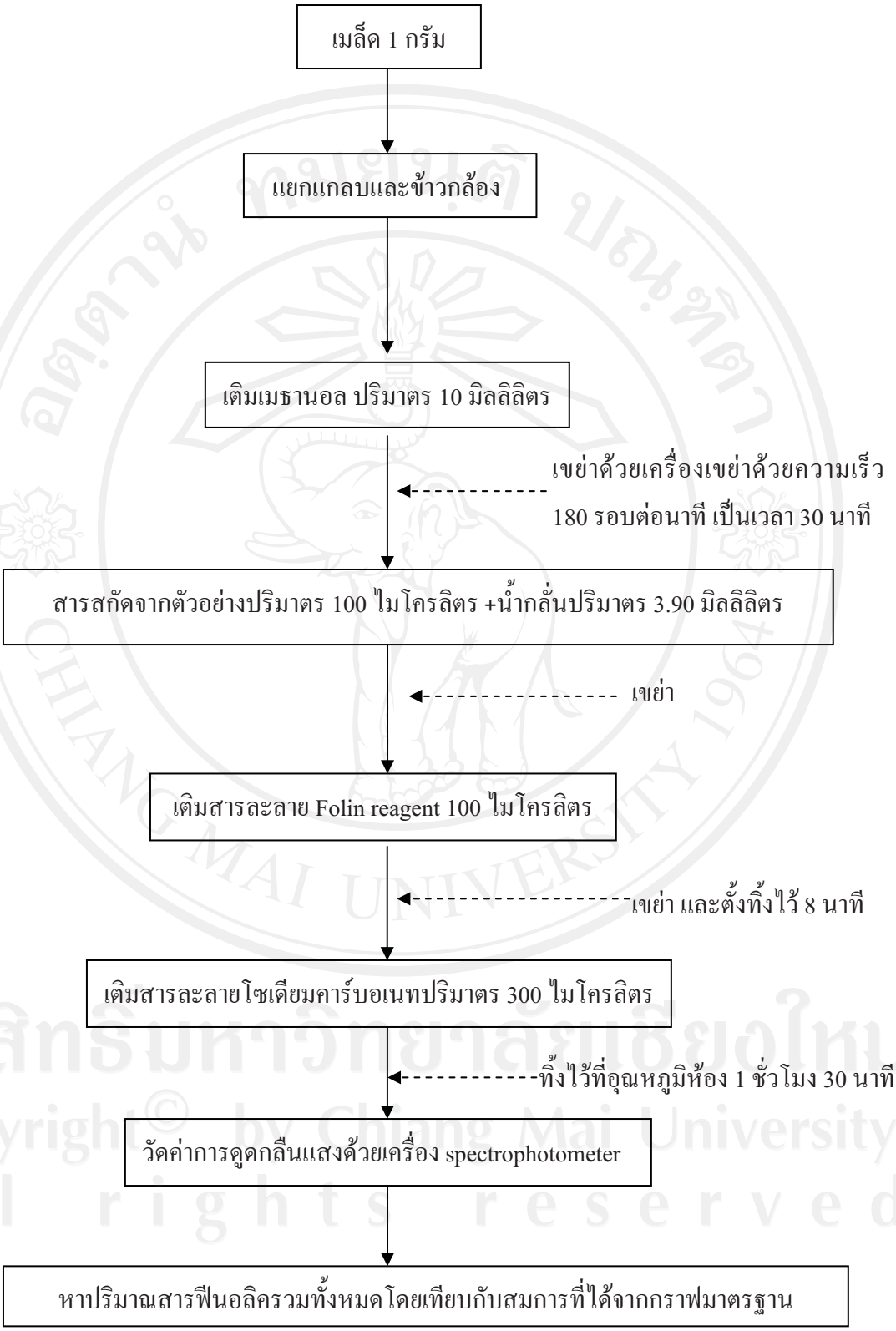
2 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มี Folin Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลายมาตรฐานของ gallic acid ความเข้มข้นต่างๆ ไปวาดกราฟมาตรฐานให้แกนตั้งเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร และแกนนอนเป็นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานหน่วยเป็น ไมโครกรัม / มิลลิลิตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการสกัดหยาบไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดเทียบกับสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเปลี่ยนค่าปริมาณสารฟีนอลิครวมทั้งหมดที่มีหน่วยเป็นมิลลิกรัม / 100 กรัมน้ำหนักสด

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธี โดยวิธีหาค่า LSD (Least Significant Difference) นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ โดยวิธีการวิเคราะห์จากสมการ Regression และ วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของลำดับการพัฒนาเมล็ดข้าวบนรวง ที่สัมพันธ์กับผลผลิตและปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระฟีนอลิคของข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมือง โดยวิธีการวิเคราะห์ Correlation

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4 แผนภาพการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิครวมทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved