

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ดำเนินการทดลองที่ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางเกษตร และภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2546 ถึง เดือนเมษายน พ.ศ. 2548 การศึกษาประกอบด้วย การทดลองหลัก 2 การทดลอง ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

**การทดลองที่ 1 ความหลากหลายของปริมาณธาตุหลักภายในและระหว่างพันธุ์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย**

##### 3.1. เมล็ดพันธุ์ข้าว

ใช้เมล็ดพันธุ์ข้าวพื้นเมือง (ข้าวไรที่สูง) รวบรวมจากเกษตรกรหมู่บ้านห้วยทิวชะ ตำบลสบเมย อำเภอสบเมย จังหวัดเชียงใหม่ ( $17^{\circ}51' N$  และ  $97^{\circ} 54' E$ ) รวม 66 ตัวอย่างเชื้อพันธุ์ มี 17 ชื่อพันธุ์ โดยมีพันธุ์ที่มีตัวอย่างเชื้อพันธุ์ชื่อเดียวกันที่มาจากเกษตรกรต่างครัวเรือนมากกว่า 1 ตัวอย่าง จำนวน 10 พันธุ์ และมีตัวอย่างเชื้อพันธุ์ เพียงพันธุ์ละ 1 ตัวอย่างจำนวน 7พันธุ์ โดยมีสัญลักษณ์ของตัวอย่างเชื้อพันธุ์ข้าวและจำนวนตัวอย่างเชื้อพันธุ์ดังตารางที่ 3.1

โดยแบ่งเมล็ดออกเป็น 3 ส่วนดังนี้

1. สำหรับประเมินปริมาณธาตุหลักโดยการชั่งมลิ
2. สำหรับวัดปริมาณธาตุหลักโดยวิธีเคมีวิเคราะห์
3. สำหรับปลูกเพื่อจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม

ตารางที่ 3.1 สัญลักษณ์ตัวอย่างเชื้อพันธุ์ข้าวของแต่ละเกษตรกรจำนวน 17 ชื่อพันธุ์ รวม 66 ตัวอย่างเชื้อพันธุ์ จากหมู่บ้านทิวะ ตำบลสบเมย อำเภอสบเมย จังหวัดแม่ฮ่องสอน

พันธุ์ที่	ชื่อพันธุ์		จำนวนตัวอย่างเชื้อพันธุ์	สัญลักษณ์
	ภาษาไทย	ภาษาอังกฤษ		
1	บือหม้อดาบ้อง	Bue Mue Ta Bong	7	BMTA
2	บือบ้าง	Bue Bang	10	BB
3	บือโกล	Bue Goal	5	BGO
4	บือกั่ว	Bue Gua	7	BGU
5	บือปอลอ	Bue Paw Low	4	BPL
6	บือไทแล	Bue Tho Lae	3	BTL
7	บือกี้	Bue Kee	2	BK
8	ปะอ้ายคูเพ่	Pa Ai Ku Pae	15	PAKP
9	ปะอ้ายชาย	Pa Ai Chai	2	PAC
10	ปะอ้ายโกล	Pa Ai Goal	4	PAG
11	บือโพล	Bue Pho Lae	1	BPOL
12	บือแซะ	Bue Sae	1	BS
13	บือคูคู	Bue Khu Koo	1	BKK
14	บือชู	Bue Chu	1	BC
15	บือกะซังเม	Bue Ka Chang Mae	1	BKCM
16	ปะอ้ายกีก้าย	Pa Ai Kee Kai	1	PAKK
17	ปะอ้ายแซะ	Pa Ai Sae	1	PAS

3.2. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดที่ได้จากเกษตรกร

3.2.1 การประเมินโดยใช้วิธีทางคุณภาพโดยการย้อมสี

วิธีการประเมินปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดโดยใช้วิธีการย้อมสีเพิร์ล พรัสเซียนบลู (Perls' Prussian blue) เตรียมเมล็ดโดยการแกะเมล็ดด้วยมือเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของธาตุเหล็กที่อาจติดมาจากการใช้เครื่องสีข้าวหรืออุปกรณ์อื่น ๆ หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวกล้องซึ่งเป็นเมล็ดข้าวที่แกะเปลือกออกด้วยมือ ตัวอย่างเชื้อพันธุ์ละ 20 เมล็ด แล้วแช่ในน้ำกลั่นในขวดแก้วปิดฝาประมาณ 4-5

ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดข้าวออกมาจากขวดโดยใช้ปากคีบพลาสติกคีบออกมาวางไว้ในจานแก้วหรือพลาสติก หลังจากนั้นผ่าครึ่งเมล็ดตามยาวด้วยมีดโกนที่เคลือบเทฟลอน (teflon knife) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของธาตุเหล็ก หยดสารละลายใช้สำหรับย้อมสี (เตรียมจาก 2% HCl ผสมกับ 2%  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ) ที่ไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น 2 นาที (สารละลายสำหรับใช้ในการย้อมสีนี้ต้องใช้ทันทีหลังจากที่เตรียม ไม่สามารถเก็บไว้ได้นาน) บันทึกการติดสีย้อมของเมล็ดข้าวแต่ละเมล็ดดังนี้ ติดสีเข้ม (+++), ปานกลาง (++) , ต่ำ (+) และไม่ติดสี (0) โดยทำการบันทึกการติดสีย้อมภายใต้กล้องสตอริโอ (Prom-u-thai *et al.*, 2003)

### 3.2.2 การประเมินโดยวิธีการทางปริมาณโดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

นำเมล็ดข้าวอีกชุดหนึ่งซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกับที่ทำมาทำการย้อมสีข้างต้นมาวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดด้วยวิธีการทางเคมี โดยใช้วิธีการ dry-ashing และอ่านค่าปริมาณธาตุเหล็กโดยใช้เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometry, AA (Delhaize *et al.*, 1984) โดยนำเมล็ดข้าวกล้องที่แกะเปลือกออกด้วยมือ ใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องที่อบแล้วประมาณตัวอย่างละ 1 กรัมใส่ใน crucible โดยทำซ้ำตัวอย่างละ 2 ครั้ง แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 535 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ให้ซีเถ้าเป็นสีเทา-น้ำตาล แล้วทิ้งไว้ให้เย็น นำตัวอย่างที่ได้มาย่อยด้วยสารละลายผสมของ HCL:deionize water อัตรา 1:1 ปริมาณ 2 มิลลิลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง แล้วล้างด้วย deionize water นำ crucible วางบน hot pan ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างสารละลายตัวอย่างที่ได้ใส่ในหลอดทดลองด้วย deionize water ปรับปริมาตร ให้ได้ 10 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 นำสารละลายที่กรองได้ไปอ่านผลปริมาณธาตุเหล็กด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometry (Delhaize *et al.*, 1984) นำค่าที่อ่านได้ไปคำนวณค่าความเข้มข้นของธาตุเหล็กในเมล็ด โดยคำนวณกลับจากน้ำหนักที่ชั่งก่อนเผา และปริมาตรที่ปรับเป็น 10 มิลลิลิตร ดังสูตร

$$Fe \text{ (mg/kg)} = \frac{10(ml)}{Wt(g)} \times \text{Absorbance (mg/kg)}$$

โดย 10 = ปริมาตรของสารละลายในแต่ละหลอดทดลอง (ml)

Wt = น้ำหนักของตัวอย่างเมล็ดข้าวในแต่ละ crucible (g)

Absorbance = ค่าการดูดซับอะตอมของธาตุเหล็กที่อ่านได้จาก Atomic

Absorption Spectrophotometry (mg/kg)

### 3.2.3 การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเมล็ดจากเกษตรกรที่คัดเลือกตัวอย่างที่มีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดสูง จำนวน 6 ตัวอย่าง เชื้อพันธุ์ 3 ชื่อพันธุ์ (ป้อบ้าง ป้อกั่ว และป้อกี้) โดยปลูกในแปลงทดลองภาควิชาพืชไร่ คณะ

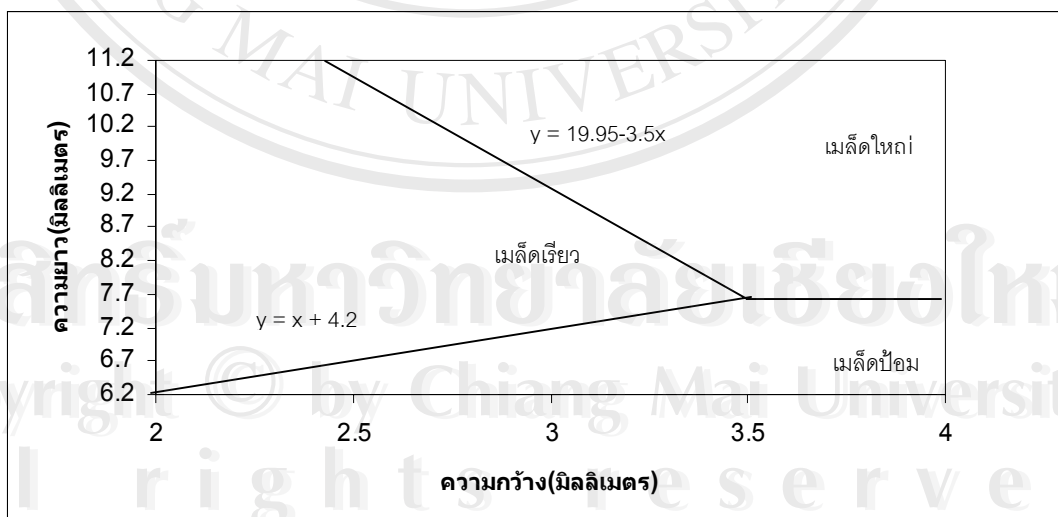
เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปลูกเมล็ดแต่ละตัวอย่างแบบหยอดเมล็ด 1 ต้นต่อหลุม 40 ต้น ต่อแปลง บันทึกลักษณะแยกแต่ละต้น 20 ต้น

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาที่ใช้ในการประเมิน (IRRI-IBPRG, 1980) แบ่งเป็น ลักษณะทางคุณภาพจำนวน 9 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะทรงกอ สีแผ่นใบ สีกาบใบ สีหูใบ สีลิ้นใบ สีข้อ สีปล้อง สีกลีบรองดอก และสียอดดอก

ลักษณะทางปริมาณจำนวน 3 ลักษณะ ได้แก่ อายุออกดอก (วันหลังงอก) ความสูงที่ระยะเก็บเกี่ยว (เซนติเมตร) และจำนวนหน่อต่อต้น

### 3.2.4 การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยอาศัยลักษณะเมล็ด

นำเมล็ดที่ได้จากการปลูกคัดเลือกตัวอย่างที่มีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดสูง จำนวน 6 ตัวอย่างเชื้อพันธุ์ 3 ชื่อพันธุ์ (บือบ้าง บือกัวะ และบือกั) ปลูกตัวอย่างละ 40 ต้น บันทึกลักษณะของ สีเปลือก สีเชื้อหุ้มเมล็ด และเก็บตัวอย่างเมล็ดเพื่อวัด ความกว้างของเมล็ดข้าวเปลือก ความยาวของเมล็ดข้าวเปลือก ความหนาของข้าวเปลือก จำนวนต้นละ 5 เมล็ด โดยจัดจำแนกรูปร่างของข้าวเปลือกตามวิธีการของ Matsuo (1952) อ้างโดย Watabe (1967); ป่าน (2539) กำหนดให้ความยาวของเมล็ดข้าวเปลือกอยู่ในเกณฑ์ และความกว้างของเมล็ดอยู่ในเกณฑ์ สร้างเส้น  $y = 19.95 - 3.5x$  และเส้น  $y = x + 4.2$  แล้วสร้างเส้นออกจากจุดตัดของเส้นทั้งสองขนานไปกับแกนแนวนอน เส้นทั้งสามจะแบ่งพื้นที่เป็นสามส่วน ได้แก่ เมล็ดเรียวยาว (slender type) เมล็ดใหญ่ (large type) และเมล็ดป้อม (round type) (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 การจัดรูปร่างเมล็ดตามวิธีการของ Matsuo อ้างโดย Watabe (1967) และป่าน (2539)

### 3.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

#### ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ด

ปริมาณธาตุเหล็กที่ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมีแต่ละตัวอย่างนำมาคำนวณหา ค่าเฉลี่ย (mean) ค่าขอบเขตข้อมูล (range) ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (se) ค่าสหสัมพันธ์ (correlation) ของการติดสีข้อมกับปริมาณธาตุเหล็ก โดยที่

แกน Y = ผลรวมของเปอร์เซ็นต์การติดสีในเมล็ดที่ระดับการติดสีต่าง ๆ

คำนวณได้จากสูตร

$$= \sum \left[ \frac{\%intensity(a)}{100} * a \right] + \left[ \frac{\%intensity(b)}{100} * b \right] + \left[ \frac{\%intensity(c)}{100} * c \right]$$

โดย  $a$  = ระดับการติดสีข้อมสีเข้ม (+++ = 3)

$b$  = ระดับการติดสีข้อมปานกลาง (++ = 2)

$c$  = ระดับการติดสีข้อมต่ำ (+ = 1)

แกน X = ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้อง (mgFe/kg)

#### ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะเมล็ด

ลักษณะต่าง ๆ ของข้าวพื้นเมืองแต่ละตัวอย่างนำมาคำนวณหา ค่าเฉลี่ย (mean) ค่าขอบเขตข้อมูล (range) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (sd) ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (cv,%) การพิจารณาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลักษณะทางคุณภาพใช้ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon's index ( $H'$ ) โดยคำนวณจากสูตร (Shannon and weaver, 1949 อ้างโดย Power and McSorley, 2000)

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

โดย  $s$  = จำนวนชนิดที่พบ

$p_i$  = สัดส่วนของชนิดนั้นต่อจำนวนทั้งหมด

ในการพิจารณาหากพบว่าค่า  $H' = 0$  หมายถึง ไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม และค่า  $H'$  สูงหมายถึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

**การทดลองที่ 2 การสะสมปริมาณธาตุเหล็กในระหว่างการพัฒนาการของเมล็ดข้าวในข้าวที่มีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดสูงและต่ำต่างกัน**

### 3.3 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลสองปัจจัยแบบแผนสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Factorial in Randomized Complete Block Design) ทำการทวนซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้ข้าว 4 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ IR68144 (พันธุ์ปรับปรุงจากศูนย์วิจัยข้าวนานาชาติและมีธาตุเหล็กในเมล็ดสูง) พันธุ์ CMU122 (พันธุ์พื้นเมืองของไทยและมีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดสูง) พันธุ์เหนียวอุบล 2 (ข้าวไทยพันธุ์ใหม่และมีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดต่ำ) และพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (ข้าวพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกและมีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดต่ำ) และให้สารละลายที่มีระดับความเข้มข้นของเหล็ก 2 ระดับ คือ 2 ppm (Fe2) และ 7 ppm (Fe7) โดยปลูกในกระถางบรรจุทราย ใช้กระถางบรรจุทราย ใช้กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 ซม. ลึก 30 ซม. รองก้นกระถางด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรูระบายน้ำ แต่ละกระถางปลูกข้าวหนึ่งพันธุ์ แต่ละพันธุ์ปลูก 4 ต้น โดยเฉพาะเมล็ดให้เป็นดินอ่อน ประมาณ 7 วัน แล้วจึงย้ายปลูก รดด้วยสารละลายธาตุอาหารสูตรของ Yoshida et al (1976) ที่มีเหล็กในระดับต่ำ (Fe2) และสารละลายธาตุอาหารที่มีเหล็กในระดับสูง (Fe7) ทุกวันเช้า-เย็น กระถางละ 1 ลิตร การเก็บตัวอย่างเมล็ดโดยเริ่มเก็บเมล็ดจำนวน 3 ระยะ ได้แก่ ระยะ 10, 20, 30 วันหลังจากผสมเกสร (day after anthesis) ของข้าวแต่ละพันธุ์ เก็บตัวอย่างน้ำหนักแห้ง ราก ต้น ใบ และใบธง ทั้ง 3 ระยะของข้าวแต่ละพันธุ์ นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์การสะสมของปริมาณธาตุเหล็กแต่ละส่วนในข้าวแต่ละพันธุ์ โดยวิธีการเคมีวิเคราะห์ (เหมือนข้อ 3.2.2)

### 3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างพันธุ์โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองโดยใช้ LSD (Least Significant Difference) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%