บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 การวางแผนการทดลอง

การทดลองที่ 1 วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ หาระดับความเข้มข้นของยูเรีย ได้แก่ 0.2, 0.4, 0.6 gN และเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานที่ไม่ได้เคลือบสาร การทดลองที่ 2 วางแผนการทดลองแบบ 17 × 4 Factorial in CRD ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ กรรมวิธีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เมล็ดพันธุ์ที่ไม่ได้เคลือบสาร เมล็ดพันธุ์ที่เคลือบยูเรียเพียงอย่างเดียว 4 ระดับ และเมล็ดพันธุ์เคลือบด้วยยูเรียระดับต่างๆ ร่วมกับพอลิเอธิลีนไกลคอล ปัจจัยที่สอง คือ ระยะเวลาการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์นาน 0, 2, 4 และ 6 เดือน ทั้งหมด 17 กรรมวิธี โดยมีกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานที่ไม่ได้เคลือบสาร		
กรรมวิธีที่ 2	เมล็ดที่เคลือบยูเรีย 0.1 gN		
กรรมวิธีที่ 3	เมล็ดที่เคลือบยูเรีย 0.2 gN		
กรรมวิธีที่ 4	เมล็ดที่เคลือบยูเรีย 0.3 gN		
กรรมวิธีที่ 5	เมล็ดที่เคลือบยูเรีย 0.4 gN		
กรรมวิธีที่ 6	เมล็ดที่เคลือบยูเรีย 0.1 gN + 3% PEG 6000 (W/W)	อุณหภูมิในการเตรียมสาร	40°C
กรรมวิธีที่ 7	เมล็ดที่เคลือบยูเรีย 0.1 gN + 3% PEG 6000 (W/W)	”	60°C
กรรมวิธีที่ 8	เมล็ดที่เคลือบยูเรีย 0.1 gN + 3% PEG 6000 (W/W)	”	80°C
กรรมวิธีที่ 9	เมล็ดที่เคลือบยูเรีย 0.2 gN + 3% PEG 6000 (W/W)	”	40°C
กรรมวิธีที่ 10	เมล็ดที่เคลือบยูเรีย 0.2 gN + 3% PEG 6000 (W/W)	”	60°C
กรรมวิธีที่ 11	เมล็ดที่เคลือบยูเรีย 0.2 gN + 3% PEG 6000 (W/W)	”	80°C
กรรมวิธีที่ 12	เมล็ดที่เคลือบยูเรีย 0.3 gN + 3% PEG 6000 (W/W)	”	40°C
กรรมวิธีที่ 13	เมล็ดที่เคลือบยูเรีย 0.3 gN + 3% PEG 6000 (W/W)	”	60°C
กรรมวิธีที่ 14	เมล็ดที่เคลือบยูเรีย 0.3 gN + 3% PEG 6000 (W/W)	”	80°C
กรรมวิธีที่ 15	เมล็ดที่เคลือบยูเรีย 0.4 gN + 3% PEG 6000 (W/W)	”	40°C
กรรมวิธีที่ 16	เมล็ดที่เคลือบยูเรีย 0.4 gN + 3% PEG 6000 (W/W)	”	60°C
กรรมวิธีที่ 17	เมล็ดที่เคลือบยูเรีย 0.4 gN +3% PEG 6000 (W/W)	”	80°C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเมล็ดพันธุ์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.3 การเตรียมวัตถุดิบ

เมล็ดพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง คือ เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์ชูการ์แม็กซ์ ของบริษัทซินเจนทาซีดท์ จำกัด โดยทำการตรวจสอบค่าเปอร์เซ็นต์ความงอกเบื้องต้นของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานก่อนทำการทดลอง

สารเคลือบเมล็ดที่ใช้ คือ ยูเรีย ความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 gN และพอลิเอธิลีนไกลคอล 3% PEG 6000 (W/W) ใช้อุณหภูมิที่ให้ความร้อนในการเตรียมสาร 3 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิ 40, 60 และ 80°C เนื่องจากอุณหภูมิจะส่งผลให้พันธะเคมีของพอลิเมอร์แตกหัก ส่งผลให้สายโซ่โมเลกุลขยับตัวง่ายเมื่อได้รับความร้อน สามารถหลอมและไหลได้เมื่อได้รับความร้อน เกิดการรวมตัวเป็นสารประกอบใหม่ได้ จึงเลือกใช้อุณหภูมิเพื่อให้ความร้อนในการเตรียมสารผสมดังกล่าว โดยใช้อัตราสารเคลือบเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน 10 มิลลิลิตรต่อเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน 1 กิโลกรัม

ทำการเคลือบเมล็ดพันธุ์โดย พักเมล็ดทิ้งไว้เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำเมล็ดไปเก็บรักษาในภาชนะปิดสนิท และสุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานที่เคลือบมาทดสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์หลังจากเก็บรักษา ในเดือนที่ 0, 2, 4 และ 6

3.4 การทดสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์

3.4.1 ทดสอบเบื้องต้นของต้นกล้าข้าวโพดหวานที่เคลือบด้วยยูเรีย

ทดสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์เบื้องต้นของต้นกล้าข้าวโพดหวาน โดยวัดเปอร์เซ็นต์ความงอก จำแนกเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าที่งอกผิดปกติ และการจำแนกความแข็งแรงของต้นกล้า ในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานที่ไม่ได้เคลือบสาร และเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานที่เคลือบด้วยยูเรียความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 0.2, 0.4 และ 0.6 gN

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2 ทดสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์ (Germination test)

ทดสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์ตามวิธีการมาตรฐานของสมาคมผู้ตรวจสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (ISTA, 2006) โดยวิธี Between Paper นำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานมาทำการเพาะระหว่างกระดาษชื้นในกระดาษสำหรับเพาะเมล็ด ทำจำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 50 เมล็ด จากนั้นนำไปไว้ในตู้เพาะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจนับความงอกในวันที่ 4 และวันสุดท้ายในวันที่ 7 หลังเพาะ คำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอกโดยประเมินผลต้นที่ปกติ (normal seedling) และตรวจต้นที่ผิดปกติ (abnormal seedling) ที่เกิดขึ้น

3.4.3. ทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์

3.4.3.1 การวัดดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์ (Germination Index) (AOSA, 2009)

การวัดดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์ เป็นการประเมินความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ที่อาศัยความเร็วในการงอก (speed of germination) ของต้นกล้าเป็นเกณฑ์ โดยสามารถทำควบคู่ไปกับการทดสอบความงอกมาตรฐานได้ ทำการตรวจนับต้นกล้าที่งอกปกติทุกวันจนครบกำหนด 7 วัน จึงนำผลการตรวจนับความงอกมาคำนวณหาค่าดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์จากสมการ

$$\text{ดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์} = \text{ผลรวมของ}\left[\frac{\text{จำนวนต้นกล้าที่งอกปกติ}}{\text{จำนวนวันหลังเพาะ}}\right]$$

3.4.3.2 วัดอัตราการเจริญเติบโตของยอดอ่อนและรากอ่อน (Shoot and Root Growth Rate)

นำเมล็ดพันธุ์มาทำการเพาะโดยวางเรียงให้เป็นแถวยาวตามความยาวของกระดาษ จำนวน 20 เมล็ด ให้แถวห่างจากขอบด้านบนกระดาษ 5 เซนติเมตร ปิดทับด้วยกระดาษเพาะและม้วนเช่นเดียวกับความงอกมาตรฐาน เมื่อครบกำหนดของการทดสอบความงอก นำเมล็ดพันธุ์ที่เพาะมาประเมินผลโดยวัดความยาวของส่วนที่งอกเป็นรากและลำต้น (เซนติเมตร/ต้น/ 5 วัน) แล้วหาค่าเฉลี่ย ดังนี้ (AOSA, 2009)

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตของยอดอ่อน} = \frac{\text{ผลรวมความยาวของยอดอ่อน}}{\text{จำนวนเมล็ดพันธุ์ที่เพาะ}}$$

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตของรากอ่อน} = \frac{\text{ผลรวมความยาวของรากอ่อน}}{\text{จำนวนเมล็ดพันธุ์ที่เพาะ}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.3.3 วัดอัตราการเจริญของต้นกล้า (Seedling Growth Rate, SGR)

นำเมล็ดพันธุ์ที่พอกมาทดสอบด้วยวิธีความงอกมาตรฐาน โดยนำเมล็ดไปเพาะระหว่างกระดาษชื้นในกระดาษสำหรับเพาะเมล็ดทำจำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 50 เมล็ด จากนั้นนำไปไว้ในตู้เพาะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องให้แสงเมื่อครบกำหนด 7 วัน นำเมล็ดออกมาตรวจนับความงอก นำต้นกล้าที่ปกติมาตัดเอาเฉพาะส่วนยอดกับส่วนรากอ่อน บรรจุลงถุงกระดาษ นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและรากอ่อน แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง (กรัม/ต้น/ 7 วัน) แล้วคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าจากสูตรต่อไปนี้ (AOSA, 2002)

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตของกล้าต้น} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและรากอ่อน}}{\text{จำนวนต้นกล้าปกติ}}$$

3.4.3.4 การจำแนกความแข็งแรงของต้นกล้า (Seedling Vigor Classification)

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบความงอกมาตรฐาน และทำการแบ่งกลุ่มหรือจำแนกต้นกล้าปกติของต้นอ่อนข้าวโพดหวานเมื่อครบกำหนด 7 วัน แบ่งเป็นต้นกล้าที่มีความแข็งแรงมาก ต้นกล้าแข็งแรงปานกลาง และต้นกล้าที่อ่อนแอ โดยใช้เกณฑ์ในการวัดผล คือ ความยาวยอดอ่อนของต้นกล้า ดังนี้

1. ต้นกล้าที่มีความแข็งแรงมาก คือ มีความยาวของยอดอ่อนมากกว่า 14 เซนติเมตร
2. ต้นกล้าที่มีความแข็งแรงปานกลาง คือ มีความยาวของยอดอ่อนมากกว่า 12-14 เซนติเมตร
3. ต้นกล้าที่อ่อนแอ คือ มีความยาวของยอดอ่อนน้อยกว่า 12 เซนติเมตร

หลังจากนั้นนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ของต้นกล้าแต่ละกลุ่ม โดยเทียบกับจำนวนต้นกล้าปกติทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 หาความชื้นของเมล็ดพันธุ์ โดยวิธี Hot Air Oven

ทำการตรวจสอบความชื้นของเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีอบด้วยลมร้อน (Hot Air Oven method) ตามกฎการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์สากล (ISTA, 2006) โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน ปริมาณ 5 กรัมต่อตัวอย่าง ในแต่ละกรรมวิธีมาบด แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักเมล็ดก่อนและหลังอบ และคำนวณหาความชื้นของเมล็ดพันธุ์เป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักสด ดังสมการ

$$\text{Moisture content} = \frac{M_2 - M_3}{M_2 - M_1} \times 100$$

โดย M_1 คือ น้ำหนักของภาชนะอบและฝาปิด (กรัม)

M_2 คือ น้ำหนักของภาชนะอบ ฝาปิด และเมล็ดก่อนอบ (กรัม)

M_3 คือ น้ำหนักของภาชนะอบ ฝาปิด และเมล็ดหลังอบ (กรัม)

3.5 การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน โดยวิธี Kjeldahl method

วิธีนี้วิเคราะห์โดยนำตัวอย่างพืชมาย่อยสลายด้วยกรด H_2SO_4 โดยใช้สารตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้น เพื่อเปลี่ยนสารประกอบอินทรีย์ในโตรเจนเป็น $(NH_4)_2 SO_4$ จากนั้นจึงวิเคราะห์ NH_4^+ ที่เกิดขึ้น สารตัวเร่งที่ใช้ได้แก่ $K_2 SO_4$ และ Se หรือสารสำเร็จรูปอัดเม็ด (Jackson, 1967) ปริมาณหรือความเข้มข้นของ NH_4^+ ในสารละลายที่ย่อยได้วิเคราะห์โดยวิธีการกลั่นแล้วไทเทรต

วิธีวิเคราะห์

1.การย่อยสลาย (digestion)

1.1 ชั่งพืชที่อบและบดละเอียดแล้ว 0.5 กรัม (ผ่านการอบที่ 65-70 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง) บนกระดาษกรองและห่อใส่ใน Kjeldahl flask ขนาด 800 mL หรือหลอกย่อย digestion tube ขนาด 250 mL เติมสารสำเร็จรูปอัดเม็ดจำนวน 2 เม็ด

1.2 เติมกรด H_2SO_4 ความเข้มข้น 20 mL ลงใน Kjeldahl flask หรือ 15 mL ลงในหลอดแก้ว

1.3 ทำ blank และตัวอย่างอ้างอิง (reference sample) โดยวิธีเดียวกัน

1.4 นำไปย่อยใน Kjeldahl distillation apparatus เปิดเตาหมุนเบอร์ 2 ใช้อุณหภูมิประมาณ 400 °C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.5 จนได้สารละลายใสใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำบริสุทธิ์ประมาณ 400 mL

2. การกลั่น (distillation)

2.1 เครื่อง Kjeldahl : ใส่สาละลายกรดบอริก 50 mL ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 mL หยด Mixed indicator 4-5 หยด นำไปวางรองรับ distillate จากเครื่องกลั่นโดยให้ปลายหลอดแก้วจุ่มอยู่ในสารละลายบอริก แล้วนำ Kjeldahl flask ที่มีสารละลายตัวอย่าง (ข้อ 1.5) มาเติมสารละลายเกล็ดโซดาไฟ (1:1) จำนวน 50 mL ทำการกลั่น ประมาณ 1 ชั่วโมง จนได้ปริมาตร 250 mL แล้วนำไปไทเทรต

2.2 เครื่องกลั่นสำหรับ block : ใส่สารละลายกรดบอริก 25 mL ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 mL หยด Mixed indicator 4-5 หยด ในทำนองเดียวกันในหลอดแก้วที่มีสารละลายตัวอย่าง (ข้อ 1.5) มาเติมสารละลายด่าง (NaOH 40%) ปริมาตรประมาณ 50 mL จากเครื่องทำการกลั่นจนได้ปริมาตร 150 mL ใช้เวลาประมาณ 7-10 นาที แล้วนำไปไทเทรต

3. การไทเทรต (titration)

3.1 ไทเทรตของเหลวที่กลั่นได้ด้วยกรดเกลือมาตรฐาน

3.2 สีของน้ำยาจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง (purple) คือ จุด end point

3.3 ไทเทรต blank ในทำนองเดียวกัน

การคำนวณ

$$\%N = \frac{(a - b)c \times 1.401}{g}$$

โดย

a คือ ปริมาตรของกรดที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง

b คือ ปริมาตรของกรดที่ใช้ในการไทเทรต blank

c คือ ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ (molar)

g คือ น้ำหนักแห้งของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (g)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6 การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ส่องดูโครงสร้างของสารเคลือบเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน

Scanning Electron Microscope (SEM) เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่มีกำลังขยายสูงสุดประมาณ 10 นาโนเมตร การสร้างภาพเพื่อที่จะดูด้วยเครื่อง SEM นี้ไม่จำเป็นที่ตัวอย่างจะต้องมีขนาดบาง การสร้างภาพทำได้โดยการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่สะท้อนจากพื้นผิวหน้าของตัวอย่างที่ทำการสำรวจ ซึ่งภาพที่ได้จากเครื่อง SEM นี้จะเป็นภาพลักษณะของ 3 มิติ ดังนั้นเครื่อง SEM จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาสัณฐานและรายละเอียดของลักษณะพื้นผิวของตัวอย่าง เช่น ลักษณะพื้นผิวด้านนอกของเนื้อเยื่อและเซลล์ หน้าตัดของโลหะและวัสดุ เป็นต้น (ดนัย, 2547) ทำการทดลองโดยใช้เครื่อง SEM ส่องดูโครงสร้างของสารเคลือบเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน ที่ยังไม่ได้ทำการเก็บรักษาและเมื่อทำการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดไว้นาน 6 เดือน โดยดูลักษณะพื้นผิวด้านนอกของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน ที่กำลังขยาย X250 และ X2000

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีโดยวิธีหาค่า Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับนัยสำคัญ $P \leq 0.05$ โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SX8 (Analytical Softeare, USA) และวิเคราะห์ความเป็นสหสัมพันธ์ระหว่างวิธีการทดสอบคุณภาพต่างๆ ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน โดยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved