บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองนี้ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางเกษตร และภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่เดือนกันยายน พ.ศ.2543 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2546 การทดลองนี้ใช้พันธุ์/สายพันธุ์ข้าวสาลี 3 ชุดและแบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง แต่ละการทดลองเพาะเมล็ดข้าวสาลีบนกระดาษเพาะความงอกที่ชุ่มน้ำใน petri dish ประมาณ 2 วันก่อนนำไปปลูกทดสอบ การทดลองทั้ง 3 การทดลองที่ปลูกทดสอบในกระถางบรรจุทราย (sand culture) ใช้กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 ซ.ม. ลึก 30 ซ.ม. รองก้นกระถางด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรูระบายน้ำ ปลูกถั่วเขียวพันธุ์ Regur ก่อนปลูกข้าวสาลีประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อทดสอบปริมาณธาตุโบรอนที่ตกค้างในทราย (ถ้าทรายขาดโบรอนถั่วเขียวพันธุ์ Regur จะไม่มีใบประกอบชุดแรก (trifoliate)) และสารละลายธาตุอาหารพืชที่ใช้รดร่วมกับระดับโบรอนต่างๆ มีดังนี้ $CoSO_4$ (0.1 µM) Na_2MoO_2 (0.1 µM) $CuSO_4$ (0.2 µM) $ZnSO_4$ (0.5 µM) $MnSO_4$ (2 µM) FeEDTA (10 µM) K_2SO_4 (250 µM) $MgSO_4$ (250 µM) KH_2PO_4 (500 µM) $CaCl_2$ (1,000 µM) (Broughton and Dilworth, 1971) และ KNO_3 (5,000 µM) ส่วนการทดลองที่ปลูกทดสอบในสารละลาย (solution culture) จะใช้สารละลายที่มี $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (2.5 µM) (Webb and Loneragan, 1990) และ $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (500 µM) (Haynes and Robbins, 1948) ร่วมกับระดับโบรอนต่างๆ รายละเอียดพันธุ์/สายพันธุ์ข้าวสาลี และการทดลองมีดังนี้

<u>พันธุ์และสายพันธุ์ข้าวสาลี</u>

ชุดที่ 1 ข้าวสาลีพันธุ์มาตรฐานที่ทราบระดับความทนทานต่อการขาดโบรอนจำนวน 4 พันธุ์/สายพันธุ์ (Rerkasem and Jamjod, 1997b) ได้แก่

1.1 Fang 60 (Efficient; E) ทนต่อการขาดโบรอน

1.2 CMU 88-9 (Moderately Efficient; ME) ทนต่อการขาดโบรอนปานกลาง

1.3 SW 41 (Moderately Inefficient; MI) ไม่ทนต่อการขาดโบรอนปานกลาง

1.4 Bonza (Inefficient; I) ไม่ทนต่อการขาดโบรอน

ชุดที่ 2 ข้าวสาลีพันธุ์มาตรฐานที่ทราบระดับความทนทานต่อโบรอนเป็นพิษ จำนวน 5 พันธุ์/สายพันธุ์ (Chantachume et al., 1995) ได้แก่

2.1 Turkey 1473 (Tolerant; T) ทนต่อการเป็นพิษของโบรอน

2.2 Halberd และ BT-Schomburgk (Moderately Tolerant; MT) ทนต่อการเป็นพิษของโบรอนปานกลาง

2.3 Schomburgk และ Tatiara (Moderately Sensitive; MS) ไม่ทนต่อการเป็นพิษของโบรอนปานกลาง

2.4 Kenya Farmer (Very Sensitive; VS) ไม่ทนต่อการเป็นพิษของโบรอน

ชุดที่ 3 สายพันธุ์ก้าวหน้าจากชุดทดสอบ 18th SAWSN (Semi-Arid Wheat Screening Nursery) จาก CIMMYT จำนวน 191 สายพันธุ์

การทดลองที่ 1 การศึกษาการตอบสนองของพันธุ์ข้าวสาลีต่อการขาดโบรอน

แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองที่ 1.1 การตอบสนองของพันธุ์มาตรฐาน

ทดสอบข้าวสาลีในชุดทดสอบที่ 1 และ 2 จำนวนทั้งหมด 10 พันธุ์ในฤดูปลูกปี 2544/45 โดยปลูกทดสอบในกระถางบรรจุทรายที่ให้สารละลายโบรอน 2 ระดับคือ 0 และ 10 µM B (B0 และ B10) วางแผนการทดลองแบบ CRD 2 ปัจจัย มี 4 ซ้ำ แต่ละกระถางปลูกข้าวสาลี 1 พันธุ์ แต่ละพันธุ์ปลูก 10 ต้น ปลูกจำนวน 4 กระถางต่อพันธุ์ รวมเป็น 40 กระถางในแต่ละระดับของโบรอน (รวมเป็น 80 กระถาง) โดยข้าวสาลีแต่ละพันธุ์หยอด 10 หลุม หลุมละ 2 เมล็ด หลังจากนั้น 7 วัน ถอนแยกให้เหลือหลุมละ 1 ต้น รดสารละลายที่มีธาตุอาหารพืชครบยกเว้นโบรอน (B0) และสารละลายธาตุอาหารพืชที่มีโบรอน 10 µM B (B10) ที่ดัดแปลงจากสูตรธาตุอาหารพืชของ Broughton and Dilworth (1971) ทุกวัน เช้า-เย็น กระถางละ 1 ลิตร เก็บเกี่ยวเมื่อถึงระยะสุกแก่

ข้อมูลที่บันทึก ได้แก่

1. จำนวนหน่อต่อต้น (Tiller plant^{-1})
2. น้ำหนักฟางต่อต้น (Straw yield plant^{-1})

3. อายุการออกรวง (วันหลังปลูก) (Emergence of ear complete)
4. จำนวนรวงต่อต้น (Spikes plant^{-1})
5. จำนวนดอกต่อรวง (Spikelets spike^{-1})
6. จำนวนเมล็ดต่อรวง (Grains spike^{-1})
7. จำนวนเมล็ดต่อดอก (Grains spikelet^{-1})
8. น้ำหนักเมล็ดต่อต้น (Grain weight plant^{-1})
9. น้ำหนัก 100 เมล็ด (Hundred grain weight)
10. ดัชนีการติดเมล็ด (Grain Set Index; GSI) ได้จากเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดจากดอกข้าง 2 ดอกย่อย (basal florets) ของแต่ละดอก (spikelet) บริเวณกลางรวงจำนวน 10 ดอก) (Rerkasem and Loneragan, 1994)

การทดลองที่ 1.2 การตอบสนองของสายพันธุ์ในชุดทดสอบพันธุ์นานาชาติ (18th SAWSN) จาก CIMMYT

ใช้ข้าวสาลีในชุดที่ 3 จำนวน 191 สายพันธุ์ (ใน 18th SAWSN ที่มาจาก CIMMYT มี 190 สายพันธุ์ แต่ไม่งอก 10 พันธุ์) ในฤดูปลูกปี 2543/44 ปลูกทดสอบในกระถางบรรจุทรายโดยให้สารละลายโบรอน 2 ระดับคือ 0 และ 10 µM B (B0 และ B10) แต่ละกระถางปลูกข้าวสาลีในชุดทดสอบ 18th SAWSN 4 พันธุ์ โดยมีข้าวสาลีพันธุ์ Fang 60 และ Bonza เป็นพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานทุกกระถาง และพันธุ์ SW41 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานสลับพันธุ์ทดสอบซ้ำทุกๆ 19 พันธุ์ รวมเป็น 50 กระถางในแต่ละระดับของโบรอน โดยข้าวสาลี (18th SAWSN รวมกับ SW41) แต่ละพันธุ์หยอด 3 หลุม หลุมละ 3 เมล็ด ส่วน Fang 60 และ Bonza หยอด 1 หลุม หลุมละ 3 เมล็ด หลังจากนั้น 7 วัน ถอนแยกข้าวสาลีทุกพันธุ์ให้เหลือหลุมละ 1 ต้น รดสารละลายที่มีธาตุอาหารพืชครบยกเว้นโบรอน (B0) และสารละลายธาตุอาหารพืชที่มีโบรอน (B10) ที่ดัดแปลงจากสูตรธาตุอาหารพืชของ Broughton and Dilworth (1971) ทุกวันเช้า-เย็น กระถางละ 1 ลิตร เก็บเกี่ยวเมื่อถึงระยะสุกแก่ คัดเลือกพันธุ์โดยใช้ดัชนีการติดเมล็ด (ดัชนีการติดเมล็ด (Grain Set Index; GSI))

การทดลองที่ 2 การศึกษาการตอบสนองของพันธุ์ข้าวสาลีต่อการเป็นพิษของโบรอน

แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองที่ 2.1 การตอบสนองของพันธุ์มาตรฐาน แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองที่ 2.1.1 การทดสอบในสารละลาย (solution culture) โดยใช้กระดาษเพาะความงอก

ทดสอบข้าวสาลีในชุดที่ 1 ในกระดาษเพาะความงอก (filter paper) (ปรับปรุงวิธีการจาก Jamjod (1996)) ที่มีสารละลายธาตุอาหารพืชตามสูตรของ Webb and Loneragan (1990) และ Haynes and Robbins (1948) โดยให้สารละลายโบรอนที่มีความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 0, 50, 100 และ 150 mg B L^{-1} (แสดงเป็น B0, B50, B100, B150 ตามลำดับ) วางแผนการทดลองแบบ RCB 2 ปัจจัย มี 3 ซ้ำ

นำเมล็ดที่งอกแล้วมาเพาะในกระดาษเพาะความงอก (ขนาด 25x26 ซ.ม.) pH 5.5-6.0 ที่มีสารละลายโบรอนในระดับต่างๆ เพาะเมล็ด 10 เมล็ดเป็นแถวเดี่ยว 1 แถวกลางกระดาษเพาะแต่ละแผ่น แต่ละเมล็ดห่างกัน 2 ซ.ม (1 แผ่นคือ 1 ซ้ำ รวมเป็น 12 แผ่น) หลังจากนั้นม้วนกระดาษเพาะความงอกแล้วห่อด้วย aluminum foil เพื่อรักษาความชื้นและป้องกันแสง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 18 °C เป็นเวลา 12 วัน โดยให้ม้วนกระดาษวางในแนวตั้ง

ข้อมูลที่บันทึก ได้แก่

1. ความยาวราก (Root) วัด seminal root ที่ยาวที่สุด
2. ความยาวต้นอ่อน (Shoot) วัดตั้งแต่ฐานเมล็ดจนถึงปลาย coleoptile

การทดลองที่ 2.1.2 การทดสอบในสารละลาย (solution culture) โดยวิธี Drip tray method

ทดสอบข้าวสาลีในชุดที่ 1 และ 2 โดยปรับปรุงวิธีการจาก Campbell et al. (1998) (Drip tray method) ในสารละลายที่มีธาตุอาหารพืชตามสูตรของ Webb and Loneragan (1990) และ Haynes and Robbins (1948) ที่มีความเข้มข้นโบรอน 3 ระดับ คือ 0, 100 และ 150 mg B L^{-1} (แสดงเป็น B0, B100, B150 ตามลำดับ) วางแผนการทดลองแบบ RCB 2 ปัจจัย มี 2 ซ้ำ

นำเมล็ดที่เริ่มมีตุ่มรากมาปลูกในแผ่นโฟมที่มีร่องเป็นแถวรองด้วยตาข่ายในกล่องพลาสติก ขนาด 37x23 ซ.ม. ที่มีสารละลายโบรอน ให้ 1 ซ้ำเท่ากับ 1 กล่องพลาสติกต่อ 1 ระดับโบรอน แต่ละซ้ำปลูกแถวละ 5 เมล็ดต่อพันธุ์จนครบทุกพันธุ์ในและแต่ละระดับโบรอน (รวมเป็น 6 กล่องพลาสติก) พร้อมกับให้อ๊อกซิเจนแก่เมล็ดข้าวสาลีโดยใช้เครื่องปั๊มอ๊อกซิเจน ทดลองเป็นเวลา 12 วันที่อุณหภูมิห้อง

ข้อมูลที่บันทึก ได้แก่

1. ความยาวราก วัด seminal root ที่ยาวที่สุด
2. ความยาวต้นอ่อน วัดตั้งแต่ฐานเมล็ดจนถึงปลาย coleoptile
3. จำนวนใบต่อต้น
4. บันทึกอาการ necrosis ในใบที่แก่ที่สุด โดยวัดเป็น necrosis (%) ((ความยาวของอาการ necrosis/ ความยาวใบนั้น) x 100)

การทดลองที่ 2.2 การตอบสนองของสายพันธุ์ในชุดทดสอบพันธุ์นานาชาติ (18th SAWSN) จาก CIMMYT

ทดสอบข้าวสาลีชุดที่ 3 จำนวน 191 สายพันธุ์โดยมี Bonza และ Kenya Farmer เป็นพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานและมี SW 41 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานสลับพันธุ์ทดสอบซ้ำทุกๆ 19 พันธุ์ โดยใช้วิธีที่ปรับปรุงจาก Campbell et al. (1998) (Drip tray method) ปลูกทดสอบในสารละลาย (solution culture) ที่มีธาตุอาหารพืชตามสูตรของ Webb and Loneragan (1990) และ Haynes and Robbins (1948) ที่มีความเข้มข้นโบรอน 3 ระดับ คือ 0, 100 และ 150 mg B L^{-1} (แสดงเป็น B0, B100, B150 ตามลำดับ) วางแผนการทดลองแบบ RCB 2 ปัจจัย มี 2 ซ้ำ

นำเมล็ดที่เริ่มมีตุ่มรากมาปลูกในแผ่นโฟมที่มีร่องเป็นแถวรองด้วยตาข่ายในกล่องพลาสติก ขนาด 37x23 ซ.ม. ที่มีสารละลายโบรอน ให้ 2 ซ้ำเท่ากับ 1 กล่องพลาสติกต่อ 1 ระดับโบรอน แต่ละซ้ำปลูกแถวละ 5 เมล็ดต่อพันธุ์จนครบทุกพันธุ์ รวมเป็น 3 กล่องพลาสติก และปลูก Bonza และ Kenya Farmer ในแต่ละซ้ำ พร้อมกับให้อากาศแก่เมล็ดข้าวสาลีโดยใช้เครื่องปั๊มอากาศ ทดลองเป็นเวลา 12 วันที่อุณหภูมิห้อง

ข้อมูลที่บันทึก ได้แก่

1. ความยาวราก วัด seminal root ที่ยาวที่สุด
2. บันทึกอาการ necrosis ในใบที่แก่ที่สุด โดยวัดเป็น necrosis (%) ((ความยาวของอาการ necrosis/ ความยาวใบนั้น) x 100)

การทดลองที่ 3 การเปรียบเทียบการใช้โบรอนในพันธุ์ข้าวสาลี

แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองที่ 3.1 การเลือกระดับโบรอนเป็นพิษที่เหมาะสม

ทดสอบข้าวสาลีพันธุ์ Fang 60, Bonza และ Turkey 1473 ในกระถางบรรจุทรายที่ให้สารละลายธาตุอาหารพืชและใส่โบรอน 5 ระดับ คือ 10, 50, 100, 150 และ 200 mg B L^{-1} (แสดงเป็น B10, B50, B100, B150, B200 ตามลำดับ) วางแผนการทดลองแบบ CRD 2 ปัจจัยมี 3 ซ้ำแต่ละกระถาง (แต่ละซ้ำ) ปลูกข้าวสาลี 3 พันธุ์ แต่ละพันธุ์ปลูก 5 ต้น ปลูกจำนวน 3 กระถางต่อหนึ่งระดับโบรอน (รวมเป็น 15 กระถาง) โดยข้าวสาลีแต่ละพันธุ์หยอด 10 หลุม หลุมละ 1 เมล็ด หลังจากนั้น 7 วัน ถอนให้เหลือ 5 ต้น รดสารละลายที่มีธาตุอาหารพืชครบดัดแปลงจากสูตรของ Broughton and Dilworth (1971) และมีโบรอนอัตราต่างๆ ทุกวัน เช้า-เย็น กระถางละ 1 ลิตรต่อครั้ง

ข้อมูลที่บันทึก ได้แก่

1. ความยาวราก วัด seminal root ที่ยาวที่สุด
2. ความยาวต้น วัดตั้งแต่โคนต้นถึงยอด
3. น้ำหนักแห้งราก (กรัมต่อต้น)
4. น้ำหนักแห้งต้น (กรัมต่อต้น)

การทดลองที่ 3.2 การเปรียบเทียบการใช้โบรอนในพันธุ์ข้าวสาลี

ทดสอบข้าวสาลีพันธุ์ Fang 60, Bonza และ Turkey 1473 ในกระถางบรรจุทรายที่ให้สารละลายธาตุอาหารพืชและใส่โบรอน 3 ระดับ คือ 0, 10 และ 50 mg B L^{-1} (แสดงเป็น B0, B10, B50 ตามลำดับ) วางแผนการทดลองแบบ CRD 2 ปัจจัยมี 3 ซ้ำ แต่ละกระถางปลูกข้าวสาลี 1 พันธุ์ต่อ 1 กระถาง แต่ละพันธุ์ปลูก 10 ต้น ปลูก 3 ซ้ำต่อพันธุ์รวมเป็น 9 กระถางต่อ 1 ระดับโบรอน (รวมเป็น 27 กระถาง) หยอดกระถางละ 10 หลุม หลุมละ 2 เมล็ด หลังจากนั้น 7 วัน ถอนให้เหลือ 10 ต้น รดสารละลายที่มีธาตุอาหารพืชครบตามสูตรของ Broughton and Dilworth (1971) และมีโบรอนอัตราต่างๆ ทุกวัน เช้า-เย็น กระถางละ 1 ลิตรต่อครั้ง

เก็บตัวอย่างพืชเพื่อนำไปวิเคราะห์โบรอนในเนื้อเยื่อตามวิธีของ Lohse (1982) หลังปลูกได้ 21 และ 35 วัน (แทนด้วย H1 และ H2 ตามลำดับ) โดยปลูกเพื่อนำไปวิเคราะห์โบรอนเมื่ออายุ 21 วัน หลังปลูกจำนวน 27 กระถาง (ตามวิธีปลูกข้างต้น) และปลูกเพื่อเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 (35 วัน) อีก 27 กระถางรวมทั้งหมด 54 กระถาง

ข้อมูลที่บันทึก ได้แก่

1 ความยาวราก วัด seminal root ที่ยาวที่สุด

2 ความยาวต้น วัดตั้งแต่โคนต้นถึงยอด

5. บันทึกอาการ necrosis ในใบ YEB (the Youngest Expanded Blade) และ YEB+1 (the second Youngest Expanded Blade) (Paull et al., 1990) โดยวัดเป็น necrosis (%) ((ความยาวของอาการ necrosis/ ความยาวใบนั้น) x 100) ที่ H1 และH2

3 บันทึกอาการ chlorosis ในใบ YEB และ YEB+1 โดยวัดเป็น chlorosis (%) ((ความยาวของอาการ chlorosis/ ความยาวใบนั้น) x 100) ที่ระยะ H1 และ H2

4 น้ำหนักแห้งราก (กรัมต่อต้น)

5 น้ำหนักแห้งต้น (กรัมต่อต้น)

6 วิเคราะห์ความเข้มข้นโบรอนในเนื้อเยื่อ (Boron concentration; mg B kg^{-1}) และปริมาณโบรอน (Boron content; µg B $plant^{-1}$) ในราก, ส่วนต้นที่เหลือ, ใบ YEB, YEB+1 และ YEB+2

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis Of Variance) ตามแผนการทดลองแบบ CRD และ RCB และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสิ่งทดลองโดยใช้ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99% หาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะโดยหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; r) แบ่งกลุ่มการตอบสนองของพันธุ์ต่อการขาดโบรอนโดยใช้ Frequency distribution (%) และแปลงข้อมูลบางส่วนโดย square root arcsine transformation และ square root transformation