บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ ทำการศึกษาการปลูกข้าวในฤดูนาปี ในช่วงเดือน สิงหาคม-มีนาคม 2551 ประกอบด้วย 2 การทดลอง ดังนี้ การทดลองที่ 1 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระยะพัฒนาการของใบข้าวที่สัมพันธ์กับค่าอุณหภูมิสะสม (Growing Degree Day : GDD) การทดลองที่ 2 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะพัฒนาการ และการเจริญเติบโตต่อผลผลิตและคุณภาพเมล็ดของพันธุ์ข้าวเหนียวก่ำพื้นเมือง และวิเคราะห์พลวัตของปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (Total phenolics) ในใบ ต้น เมล็ด ของแต่ละระยะการเจริญเติบโต เพื่อสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ เพื่อจำลองพลวัตการเจริญเติบโตและปริมาณสารประกอบฟีนอลิคดังแสดงรายละเอียดของแต่ละการทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ค่าอุณหภูมิสะสมใช้ในการปรากฏใบหนึ่งใบ

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลอง ณ บริเวณเรือนกระจก (18^{o} 47′ 40″N, 98^{o} 57′ 38.4″E) ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยทำการปลูกทดลองข้าวเหนียวก่ำพื้นเมือง 12 สายพันธุ์ ได้แก่ สะเมิง 1 สะเมิง 2 สะเมิง 4 สะเมิง 7 สะเมิง 8 PGMHS 3 PGMHS 7 PGMHS 11 PGMHS 12 PGMHS 13 PGMHS 15 และPGMHS 17 ในกระถางดินเผาเจาะรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว ใช้วิธีปลูกแบบหยอดเมล็ด โดยใช้ 3-5 เมล็ดต่อพันธุ์ต่อกระถางแล้วทำการถอนออกให้เหลือ 3 ต้นต่อกระถาง

การดูแลรักษา

ทำการใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง ครั้งแรกใส่ปุ๋ยสูตร 16-20-0 ในระยะหลังข้าวงอก 25 วัน อัตรา 43 กิโลกรัมต่อไร่ และครั้งที่ 2 ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 อัตรา 36 กิโลกรัมต่อไร่ การให้น้ำให้สองวันต่อครั้ง ในการดำเนินการทดลองมีการควบคุมป้องกันศัตรูพืชตามความเหมาะสมและกำจัดวัชพืชโดยวิธีกลตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงระยะออกรวง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกข้อมูล

ข้อมูลพัฒนาการ

ทำการบันทึกวันที่มีระยะพัฒนาการของใบตั้งแต่ระยะต้นกล้า จนถึงระยะออกรวง โดยสังเกตตั้งแต่ใบเริ่มงอก (สังเกตจากปลายใบเริ่มโผล่) จนถึงใบแผ่สมบรูณ์ และทำการสังเกตระยะพัฒนาการของข้าว ได้แก่ ระยะต้นกล้า ระยะแตกกอ ระยะกำเนิดช่อดอก ระยะตั้งท้อง และระยะออกรวงพร้อมหาความสัมพันธ์กับค่าอุณหภูมิสะสม

สำหรับค่าของอุณหภูมิสะสมรายวัน (GDD) ใช้สูตรคำนวณตามที่ 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 องศาเซลเซียส)

ในกรณีที่ T.max เกิน 30 องศาเซลเซียส ให้ใช้ค่าอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส แต่ถ้า T.max น้อยกว่า 30 องศาเซลเซียส ให้ใช้ค่า T.max นั้นๆ โดยข้อมูลอุณหภูมิอากาศที่ต้นข้าวได้รับในแต่ละวัน ของการทดลองนี้ได้มาจากการตรวจวัดสภาพอากาศของสถานีตรวจวัดอากาศแปลงทดลองวิจัยการเกษตรเขตชลประทานศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การทดลองที่ 2 ศึกษาระยะพัฒนาการเจริญเติบโตของข้าวเหนียวก่ำพื้นเมืองที่สัมพันธ์กับระยะพัฒนาการการเจริญเติบโตกับผลผลิตและพลวัตของสารต้านอนุมูลอิสระ

ทำการปลูกข้าวเหนียวก่ำพื้นเมือง 12 พันธุ์ ได้แก่ สะเมิง 1 สะเมิง 2 สะเมิง 4 สะเมิง 7 สะเมิง 8 PGMHS 3 PGMHS 7 PGMHS 11 PGMHS 12 PGMHS 13 PGMHS 15 และPGMHS 17 โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design 3 ซ้ำ ขึ้นแปลงปลูกโดยการคุมพลาสติกบนแปลงเพื่อควบคุมวัชพืช โดยมีความกว้าง 1.30x2.50 เมตร ระยะปลูก 0.25 x 0.25 เมตร หยอด 3-5 เมล็ดต่อหลุม ได้ทำการทดลอง ณ แปลงสถานีวิจัยเกษตรเขตชลประทาน ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ทำการปลูกในวันที่ 3 สิงหาคม 2551

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การดูแลรักษา

ทำการแบ่งใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง โดยครั้งแรกใส่ ปุ๋ยสูตร 16-20-0 ใส่ระยะหลังข้าวงอก 25 วัน อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ และครั้งที่สองใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ใส่ในระยะกำเนิดช่อดอก อัตรา 10 กิโลกรัมต่อไร่ การให้น้ำจากน้ำฝนและในระหว่างการดำเนินการทดลองมีการดูแลควบคุมและการป้องกันศัตรูพืชตามความเหมาะสมและกำจัดวัชพืชระยะต้นกล้า ระยะแตกกอ และระยะแตกกอสูงสุด

1. การบันทึกข้อมูล

1.1 ระยะพัฒนาการ ทำการบันทึกข้อมูลพัฒนาการเหมือนการทดลองที่ 1 ซึ่งประกอบไปด้วย ระยะการเจริญเติบโตในช่วงต่างๆ ได้แก่ ระยะต้นกล้า ระยะเริ่มแตกกอ ระยะกำเนิดช่อดอก ระยะตั้งท้อง ระยะออกรวง ระยะสุกแก่ โดยสังเกตข้าวในแปลงทดลองที่มีการพัฒนาการถึง 80% จากทุกซ้ำ

1.2 บันทึกน้ำหนักแห้งมวลชีวภาพตามระยะการเจริญเติบโตที่กำหนดไว้ได้แก่ ระยะต้นกล้า ระยะเริ่มแตกกอ ระยะกำเนิดช่อดอก ระยะตั้งท้อง ระยะออกรวง ระยะสุกแก่ โดยทำการสุ่มตัวอย่างข้าวจำนวน 2 กอต่อพันธุ์ ในแต่ระยะดังกล่าวข้างต้นแล้วนำตัวอย่างแยกออกเป็นส่วนๆประกอบด้วยลำต้น ใบ และรวง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 78 ชั่วโมง นำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักแห้งมวลชีวภาพตามระยะการเจริญเติบโต พร้อมกับบันทึกความสูงของต้นข้าว โดยวัดความสูงจากพื้นดินถึงใบธง

1.3 การวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโต

การวิเคราะห์ข้อมูลการเจริญเติบโตทำโดยการนำข้อมูลน้ำหนักแห้งใบ ต้นและน้ำหนักแห้งรวมแต่ละระยะเพื่อสร้างสมการ 3^{rd} order polynomial

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

เมื่อ y = ค่าน้ำหนักแห้ง

a, b, c, d = ค่าสัมประสิทธิ์

x = จำนวนวันหลังปลูก

จากการแทนค่าในสมการและสังเกตค่าที่ประเมิน จะได้ค่าวันที่ปรากฏการสะสมน้ำหนักแห้งสูงสุด และน้ำหนักแห้งสูงสุด แล้วนำค่าที่ได้มาหาอัตราการสะสมน้ำหนักแห้งเฉลี่ย โดยใช้สมการ

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

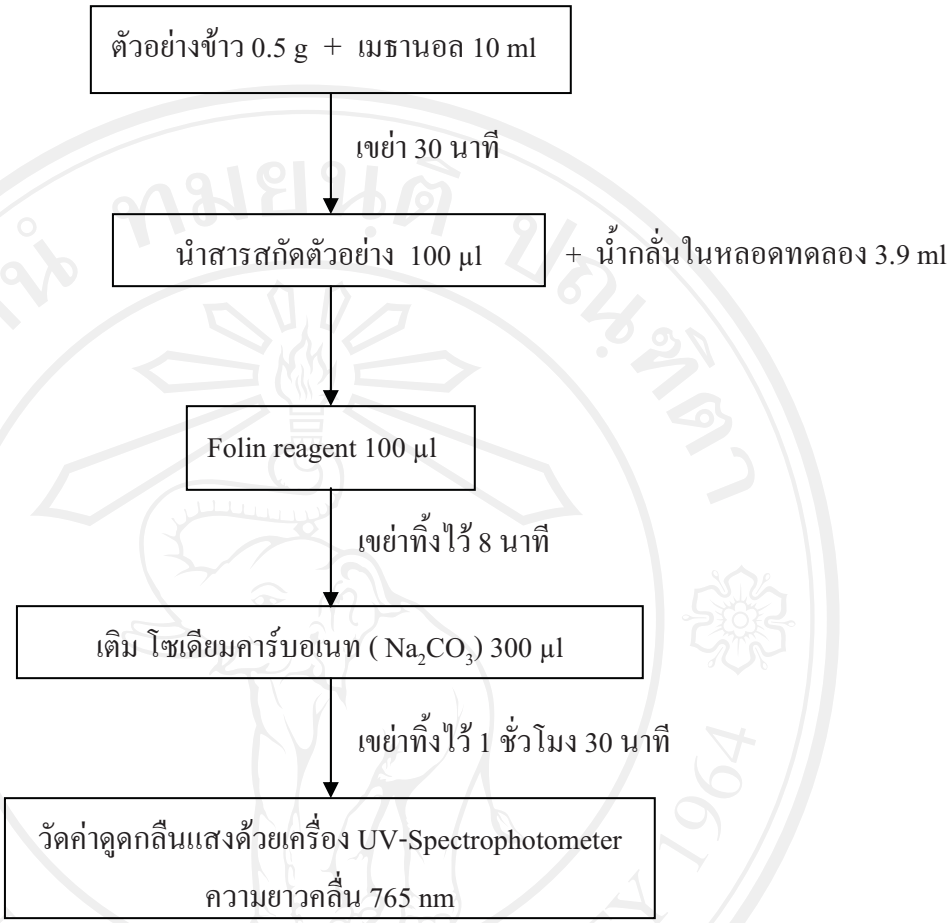
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4 ศึกษาพลวัตของสารต้านอนุมูลอิสระของข้าวก่ำตามระยะการเจริญเติบโต ซึ่งประกอบไปด้วยช่วงระยะต่างๆ ได้แก่ ระยะต้นกล้า ระยะเริ่มแตกกอ ระยะกำเนิดช่อดอก ระยะตั้งท้อง ระยะออกรวง ระยะสุกแก่ โดยทำการเก็บตัวอย่างของข้าวเหนียวก่ำพื้นเมือง จำนวน 2 กอต่อพันธุ์ เพื่อนำไปหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิค ที่ทำการดัดแปลงมาจากกรรมวิธีของ Singleton and Rossi (1965) มีวิธีดังนี้

โดยนำต้น ใบ และเมล็ดข้าวเหนียวก่ำที่สุ่มเก็บมาหั่นให้ละเอียดจากนั้นทำการชั่งตัวอย่างจำนวน 0.50 กรัม นำต้น ใบ และเมล็ดข้าวที่ชั่งน้ำหนักแล้ว มาเติมตัวทำละลาย คือเมธานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที นำไปหาปริมาณ total phenolic compounds โดยนำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 3.90 มิลลิลิตร พร้อมเขย่า เติมสารละลาย Folin's reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 8 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนท ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ได้จากการนำโซเดียมคาร์บอเนท 100 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 400 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนช่วยในการละลาย เมื่อสารละลายใส นำไปตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนเติมผงโซเดี่ยมคาร์บอเนท ลงไปเล็กน้อย จากนั้นนำไปเติมลงใน volume metric flask ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน และวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 1 ชั่วโมง 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ultraviolet- visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยสารละลาย blank หมายถึง สารละลายที่ไม่มีตัวอย่างที่ต้องการวัด ในที่นี้ blank คือสารละลายที่ใช้สกัด คือ เมธานอลก็ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แทนสารสกัดจากใบและเมล็ดข้าวเหนียวก่ำ (ภาพที่ 1)

รายงานผลการทดลอง โดยการทำกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานของ gallic acid เข้มข้น 0, 50, 100, 150, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มี Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับข้างต้น นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลายของ gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ไปสร้างกราฟมาตรฐานให้แกนตั้งเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร และแกนนอนเป็นความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน หน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการสกัดหยาบไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดโดยเทียบกับสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมสมมูลย์ของแกลลิกแอซิด ต่อ มิลลิลิตรของสารสกัดเมธานอล ต่อ 1 กรัมของข้าว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 1 แสดงแผนภาพกระบวนการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในข้าวเหนียวก่ำพื้นเมือง

2.ข้อมูลทางสรีรวิทยาของพืช

ทำการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบธงที่ระยะออกรวง จำนวน 5 กอ กอละ 1 ใบ วัดหาค่าคลอโรฟิลล์ 3 ตำแหน่ง คือส่วนปลายใบ ส่วนกลางใบ และส่วนโคนใบ โดยทำการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ตำแหน่งละ 5 จุดโดยใช้เครื่องวัดคลอโรฟิลล์ในใบพืช (chlorophyll meter) รุ่น SPAD 502 ยี่ห้อ Minolta นำค่าที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวิธีวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์โดยสารเคมีตามสมการ Y = -28.9525+1.917749X (สุทธากานต์, 2546)

โดย y = ค่าปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบข้าวที่ได้จากสมการ

x = ค่าที่วัดได้จาก chlorophyll meter

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.บันทึกคุณภาพเมล็ดข้าวกล้อง

3.1 บันทึกความแข็งของเมล็ดข้าวกล้องโดยสุ่มเมล็ดข้าวจากแต่ละพันธุ์ที่ระยะเก็บเกี่ยว จำนวน 10 เมล็ด แล้วทำการวัดความแข็งเมล็ด

3.2 ทำการบันทึกข้อมูลทางกายภาพของเมล็ด ได้แก่ ความกว้าง ความยาว ความหนา โดยใช้เวอร์เนียร์ วัดจากตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องจำนวน 10 เมล็ดที่สุ่มระยะเก็บเกี่ยวแล้วประเมินปริมาตรพื้นที่ผิว และความหนาแน่นเมล็ด (Jongkaewwattana,1990)

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

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

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

4.ข้อมูลผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิต

- สุ่มเก็บเกี่ยวตัวอย่างผลผลิตในพื้นที่ 2 ตารางเมตร นับจำนวนกอต่อพื้นที่ แล้วนวด ทำความสะอาดเมล็ดและหาน้ำหนักผลผลิตและน้ำหนักฟางแห้ง และวัดความชื้นเมล็ดขณะเก็บเกี่ยว

คำนวณค่าดัชนีเก็บเกี่ยว (Harvest index: HI) จากสมการ

$$HI = \frac{\text{น้ำหนักผลผลิต}}{\text{น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดินทั้งหมด}}$$

- เก็บข้อมูลองค์ประกอบผลผลิตโดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างจากข้าวจำนวน 5 กอจากแต่ละพันธุ์ แล้วทำการ

1. นับจำนวนหน่อต่อกอ
2. นับจำนวนรวงต่อกอ
3. นับจำนวนเมล็ดต่อรวง โดยสุ่มจากตัวอย่าง จำนวน 10 รวง
4. นับจำนวนเมล็ดดีต่อรวง จำนวน 10 รวง
5. น้ำหนัก 1,000 เมล็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยวิธีAnalysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีโดยวิธีหาค่า LSD (Least Significant Difference) นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ โดยวิธีการวิเคราะห์จากสมการ Regression และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ Correlation analysis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved