บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

พืชทดลอง

1 เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ กข. 23 ชนิดสายพันธุ์หลัก (foundation seed) ใช้เป็นชุดควบคุม

2 เมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23 สายพันธุ์ทนแล้งที่คัดเลือกจาก somaclonal variation ของโครงการ " การคัดเลือกข้าวทนแล้งจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ " ในรุ่น R4 ต่อจากพรทิพย์ ชินสงคราม (2539) จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ TC RD 23 2768-13, 2777-01, 2784-11, 2784-07, 2784-08, 2784-10, 2785-05 และ 2797-07

อุปกรณ์

1 อุปกรณ์เพาะเมล็ดและฉถานที่คัดเลือกกล้าข้าว

1.1 Larminar-flow

1.2 ขวดแก้วขนาด 50 และ 100 มิลลิลิตร พร้อมฝา

1.3 ห้องปฏิบัติการซึ่งประกอบด้วย แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ขนาด 40 วัตต์ ของ Philips TL 33 ที่ให้ความเข้มแสงบนชั้น 1500 ลักซ์ ช่วงแสง12 ชั่วโมง และช่วงมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 31-33 องศาเซลเซียส

2 อุปกรณ์และฉถานที่ปลูกข้าวเพื่อเก็บเมล็ด

2.1 กะละมังพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 ซ.ม. สูง 10 ซ.ม.

2.2 แผ่นโฟมหนา 2.5 ซ.ม. ตัดเป็นรูปกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 24 ซ.ม. เจาะช่องกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซ.ม. จำนวน 25 รูกระจายทั่วแผ่นโฟม

2.3 ฟองน้ำตัดจุนต้นกล้าขนาด 1 x 5 x 1 ซ.ม.

2.4 กระถางดินเผาไม่มีรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 ซ.ม.

2.5 ทรายหยาบ

2.6 โรงเรือนมุงหลังคาพลาสติกใส ก่อด้วยอิฐบล็อคสูงจากพื้น 30 ซ.ม. และล้อมด้วยลวดตาข่าย

3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาลและโพรลีน

3.1 Centrifuge
3.2 Spectrophotometer
3.3 Micropipett ขนาด 2-20 ไมโครลิตร
3.4 กรวยกรอง
3.5 Pipett ขนาด 1, 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร
3.6 โกร่งบดยา
3.7 เครื่องกวนสารในหลอดทดลอง (stirrer)
3.8 อ่างน้ำแข็ง (ice bath)
3.9 เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียด
3.10 อ่างน้ำร้อน (water bath)
3.11 และอุปกรณ์ที่จำเป็น

สารเคมี

1. คลอรอกซ์ (NaOCl 5.25%)
2 ปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16
3. PEG 6000 ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
4. Tween 20
5. สารเคมีสำหรับกำจัดโรคและแมลง ได้แก่เบนเลท และ เอ็กโตบี
6 สารเคมีสำหรับเตรียมธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 1991 (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) ดูรายละเอียดภาคผนวก
7 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร

7.1 Anthrone
7.2 Ethanol
7.3 Sulfuric acid
7.4 Glacial acetic acid
7.5 Ninhydrin
7.6 Phosphoric acid
7.7 Sulfosalicylic acid
7.8 Toluene

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาลักษณะทางเกษตรของข้าว กข 23 สายพันธุ์ทนแล้งรุ่น R4 เมื่อเจริญเติบโตในสภาวะปกติ (โดยไม่ผ่านสภาวะแล้ง)

2. การคัดเลือกข้าว กข 23 สายพันธุ์ทนแล้งในระดับต้นกล้าในรุ่น R4, R5 และ R6

3. การศึกษาลักษณะทางเกษตรของข้าว กข 23 สายพันธุ์ทนแล้งรุ่น R4, R5 และ R6 ที่ปลูกโดยผ่าน PEG เป็นเวลา 1 เดือน ในระยะต้นกล้า

4. การเปรียบเทียบการสะสมโพรลีนและน้ำตาลของข้าวสายพันธุ์หลัก และสายพันธุ์ทนแล้ง 4 สายพันธุ์ ที่เจริญเติบโตในสภาวะปกติและสภาวะแล้ง ในรุ่นR4 และ R5

1. การศึกษาลักษณะทางเกษตรของข้าว กข 23 สายพันธุ์ทนแล้งรุ่น R4 เมื่อเจริญเติบโตในสภาวะปกติ (โดยไม่ผ่านสภาวะแล้ง)

1.1 ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดโดยนำเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23 สายพันธุ์หลักและสายพันธุ์ทนแล้งมาฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 40% ผสม Tween 20 จำนวน 3 หยด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเมล็ดด้วยน้ำปลอดเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดที่ปลอดเชื้อมาเพาะบนชั้นแสงที่มีความเข้ม 1500 ลักซ์ 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 31-33 °C เป็นเวลา 7 วัน

1.2 ทำการคัดเลือกกล้าข้าวสายพันธุ์ทนแล้ง โดยนำกล้าอายุ 7 วันที่มีความยาวของยอด 1 เซนติเมตร มาเลี้ยงในขวด 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารละลายธาตุอาหารสูตร WP No.2 แต่ละขวดมีปริมาตรสารละลาย 10 มิลลิลิตร และต้นกล้าจำนวน 20 ต้น จากนั้นนำขวดไปวางไว้บนชั้นแสงที่มีความเข้ม 1500 ลักซ์ 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 31-33 °C จนครบ 1 เดือน

1.3 ย้ายต้นกล้าสายพันธุ์ละ 10 ต้น รวมทั้งสิ้น 90 ต้น มาปลูกบนโฟมที่เจาะรู หุ้มลำต้นด้วยฟองน้ำเพื่อค้ำจุนต้นกล้า ลอยแผ่นโฟมลงในกะละมังพลาสติกที่ใส่สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 สูตรดัดแปลง 1992 ปลูกจนกล้าข้าวสูงประมาณ 30 เซนติเมตร อายุ 2 เดือน จึงย้ายปลูกในโรงเรือนหลังคาพลาสติกโดยปลูกแบบไฮโดรโปรนิคในกระถางดินเผาที่บรรจุทรายหยาบล้างสะอาดเป็นวัสดุปลูกและใส่สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 สูตรดัดแปลง 1992 (ภาคผนวก) 1 ครั้ง และรักษาระดับน้ำให้คงที่จนครบระยะเวลา 7 วัน สลับกับปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16 (1 ช้อนโต๊ะ) 1 ครั้ง และรักษาระดับน้ำให้คงที่จนครบระยะเวลา 7 วันเช่นเดียวกัน

1.4 เก็บผลทางสัณฐานวิทยาคือ อายุการออกดอก ความสูง และการแตกกอ โดยที่เมื่อข้าวช่อแรกโผล่พ้นฐานใบธง 50 % บันทึกเป็นอายุการออกดอก จากนั้นจึงวัดความสูงเฉลี่ยโดยสุ่มเลือกหน่อมา 5 หน่อ แล้ววัดความสูงจากโคนต้นที่โผล่พ้นระดับทรายไปจนถึงใบธง นับจำนวนหน่อต่อกอ และชั่งน้ำหนักเมล็ดหลังจากตากแห้งได้ 1 สัปดาห์ บันทึกเป็นน้ำหนักเมล็ดต่อต้น

2. การคัดเลือกข้าว กข 23 สายพันธุ์ทนแล้งในระดับต้นกล้าในรุ่น R4, R5 และ R6

การคัดเลือกนี้ใช้สายพันธุ์หลักเป็นชุดควบคุม และใช้ PEG6000 เป็นสารจำลองสภาวะแล้งตามวิธีของ พรทิพย์ ชินสงคราม (2539) ในการคัดเลือกแต่ละสายพันธุ์ของทุกรุ่น ใช้กล้าข้าวจำนวน 100 ต้น และชุดควบคุมจำนวน 400 ต้น

2.1 ทำตามวิธีการในข้อ 1.1

2.2 ทำการคัดเลือกกล้าข้าวสายพันธุ์ทนแล้งโดยนำกล้าอายุ 7 วันที่มีความยาวของ coleoptile 1 เซนติเมตร มาเลี้ยงในขวด 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารละลายธาตุอาหารสูตร WP No.2 ผสม PEG 6000 ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร แต่ละขวดมีปริมาตรสารละลาย 10 มิลลิลิตร และต้นกล้าจำนวน 20 ต้น

การคัดเลือกแต่ละครั้งใช้สายพันธุ์ทนแล้งจำนวน 100 ต้น และสายพันธุ์หลัก 400 ต้น ซึ่งสายพันธุ์หลักที่ใช้เป็นพืชควบคุมนั้นจะมีอัตรารอดตายประมาณ 2-6 % (พรทิพย์, 2539) จากนั้นนำขวดไปวางไว้บนชั้นแสงที่มีความเข้ม 1500 ลักซ์ 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 31-33 °C จนครบ 1 เดือน

2.3 ย้ายต้นกล้าที่รอดตายมาปลูกบนโฟมที่เจาะรู แล้วหุ้มลำต้นด้วยฟองน้ำเพื่อค้ำจุนต้นกล้า ลอยแผ่นโฟมลงในกะละมังพลาสติกที่ใส่สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 สูตรดัดแปลง 1992 เป็นเวลา 1 สัปดาห์

2.4 บันทึกต้นที่รอดตายหลังจาก 1 สัปดาห์ เป็นอัตราการรอดตายจริง

3. การศึกษาลักษณะต่างๆ ของข้าว กข 23 สายพันธุ์ทนแล้งรุ่น R4, R5 และ R6 เมื่อเจริญเติบโตผ่านสภาวะแล้ง เป็นเวลา 1 เดือน ในระยะต้นกล้า

3.1 ทำตามวิธีในข้อ 2.1-2.2

3.2 ทำตามวิธีในข้อ 2.3 เพียงแต่ในแต่ละรุ่นใช้กล้าข้าวดังนี้ รุ่น R4 ใช้สายพันธุ์ละ 8 ต้น รวมทั้งสิ้น 72 ต้น รุ่น R5 ใช้สายทนแล้งพันธุ์ละ 10 หรือ 15 ต้น รวม 80 และสายพันธุ์หลักจำนวน 10 ต้น รวมทั้งสิ้น 90 ต้น และในรุ่น R6 ใช้สายพันธุ์ละ 8 ต้น รวมทั้งสิ้น 80 ต้น

3.3 ทำตามวิธีในข้อ 2.4

4. การเปรียบเทียบการสะสมโพรลีนและน้ำตาลของข้าวสายพันธุ์หลัก และสายพันธุ์ทนแล้ง 4 สายพันธุ์ ที่เจริญในสภาวะแล้ง และสภาวะปกติ ในรุ่น R4 และ R5

นำกล้าข้าว กข 23 ชนิดสายพันธุ์หลัก และสายพันธุ์ทนแล้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ TC RD 23 2777-01, TC RD 23 2784-08, TC RD 23 2784-11 และ TC RD 23 2797-07 ในรุ่น R4 ที่ได้มาจากงานวิจัยของ พรทิพย์ ชินสงคราม และรุ่น R5 มาวิเคราะห์ปริมาณสาร โดยให้สภาวะแล้งเช่นเดียวกับวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ทนแล้งในข้อ 1 เพื่อเปรียบเทียบการสะสมน้ำตาลและโพรลีนของข้าวทั้ง 5 สายพันธุ์ในสภาวะปกติและสภาวะแล้งโดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD โดยให้มีการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลและโพรลีนในใบข้าวทุกๆ สัปดาห์ รวมทั้งสิ้นเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 6 ย้ายต้นข้าวออกจากสภาวะแล้งมาอยู่ภายใต้สภาวะปกติ หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและโพรลีน

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (Irigoyen *et al.*, 1992)

4.1.1 บดใบข้าวใบที่ 2-4 หนัก 0.02 กรัมให้ละเอียดในเอธิลแอลกอฮอล์ 95% ปริมาณ 0.4 มิลลิลิตร

4.1.2 ล้างกากที่เหลือในโกรกด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 75% ปริมาณ 0.4 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

4.1.3 นำไปปั่นแยกกากที่ความเร็ว 3500 g เป็นเวลา 10 นาที

4.1.4 นำ supernatant ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย anthrone ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น

4.1.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 625 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer

4.1.6 นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐาน (Standard curve) เพื่อหาปริมาณน้ำตาลในเนื้อเยื่อพืช

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณโพรลีน (Bates *et al.*, 1992)

4.2.1 บดใบข้าวใบที่ 2-4 หนัก 0.02 กรัมให้ละเอียด ล้างกากด้วย 3% sulfosalicylic acid ปริมาณ 3.5 มิลลิลิตร

4.2.2 กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ปริมาณ 1มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 30 มิลลิลิตร

4.2.3 เติม glacial acetic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ acid-ninhydrin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.2.4 หยุดปฏิกิริยาทันทีโดยนำหลอดทดลองไปแช่ใน ice bath นาน 10 นาที

4.2.5 เติม toluene 2 มิลลิลิตร คนสารละลายด้วยเครื่อง vortex นานประมาณ 20 วินาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 2 นาที จนได้สารละลายแยกชั้น โดยชั้นของ chromophore ที่ละลายใน toluene จะให้สีแดงอยู่ในชั้นบน

4.2.6 นำสารละลายชั้นบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer

4.2.7 นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐาน (Standard curve) เพื่อหาปริมาณโพรลีนในเนื้อเยื่อพืช

4.3 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

ในการตรวจหาปริมาณสารที่สะสมในใบข้าวของสายพันธุ์ทนแล้ง 4 สายพันธุ์ ได้มีการวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD (Factorial in Completely Randomized Design) เพื่อหาปริมาณน้ำตาลและโพรลีนที่สะสม จากค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการสะสมสารทั้งสองในข้าวแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้การเปรียบเทียบค่าทางสถิติแบบ LSD (Least Significant Difference) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณการสะสมโพรลีนหรือน้ำตาลในใบข้าวแต่ละสายพันธุ์ เมื่อเจริญเติบโตภายใต้สภาวะแล้งและปกติ นอกจากนี้ยังใช้การเปรียบเทียบค่าทางสถิติแบบ DMRT (Duncan 's New Multiple Range Test) เพื่อเปรียบเทียบการสะสมโพรลีนหรือน้ำตาลในข้าวแต่ละสายพันธุ์เมื่อเจริญเติบโตในสภาวะเดียวกัน (แล้งหรือปกติ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย