บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. พืชทดลอง

1.1 ข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์กข.23 สายพันธุ์หลัก ใช้เป็นต้นเปรียบเทียบ (control)

1.2 ข้าวกข.23สายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจาก somaclonal variation จากโครงการ New Varieties of Rice for Saline and Acid Soil Through Tissue Culture ของ รศ.มนทกานติ วัชราภัย และคัดเลือกต่อในรุ่นลูกหลานอีก 6 ชั่วรุ่นโดยทิพยวรรณ ธนไพศาล (2534) และ ศ.กิตติคุณ ดร.ถาวร วัชราภัย โดยคัดเลือกในสารละลายปุ๋ย WP สูตรดัดแปลง No.2 (Vajrabhaya and Vajrabhaya .1991) ที่เติม NaCl 0.5 % ได้แก่สายพันธุ์

RD23 TC 7	มีอัตราการรอดตายในรุ่นที่5	53.4 %
RD23 TC 95	มีอัตราการรอดตายในรุ่นที่5	31.2 %
RD23 TC 28	มีอัตราการรอดตายในรุ่นที่5	30.1 %
RD23 TC 75	มีอัตราการรอดตายในรุ่นที่5	27.1 %
RD23 TC 4	มีอัตราการรอดตายในรุ่นที่5	20.7%
RD23 TC 110	มีอัตราการรอดตายในรุ่นที่5	19.1 %

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์ปลูกข้าวในภาวะเค็มในสารละลายได้แก่

- กะบะพลาสติก ขนาด 20 x30 x10 เซนติเมตรบรรจุสารละลายได้ 5 ลิตร
- แผ่นโฟมหนา 2.5 เซนติเมตร เจาะช่องกลมจำนวน 25 รู กระจายทั่วแผ่นโฟม
- ฟองน้ำค้ำจุนต้นกล้า ขนาด 1 x 5 x 1 เซนติเมตร
- เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า
- เทอร์โมมิเตอร์

2.2 อุปกรณ์ปลูกข้าวในภาวะแล้งในสารละลายได้แก่

- ขวดแก้วปากกว้างขนาด 100 มิลลิลิตร
- ตู้ laminar-flow
- ห้องเลี้ยงต้นกล้าซึ่งได้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ขนาด 40 วัตต์ ของ Phillps TL ให้ความเข้มแสงบนชั้น 1500 ลักซ์ ช่วงแสง 12 ชั่วโมง ช่วงมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 33-35 ^{o}C
- ห้องเลี้ยงต้นกล้าซึ่งได้แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ขนาด 40 วัตต์ ของ Phillps TL ให้ความเข้มแสงบนชั้น 2800 ลักซ์ ช่วงแสง 12 ชั่วโมง ช่วงมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 27-30 ^{o}C

2.3 อุปกรณ์สำหรับการปลูกต้นกล้าที่คัดเลือกได้เพื่อเก็บเมล็ด

- เครื่องมือและอุปกรณ์การเกษตร ได้แก่ กระถางดินเผาไม่มีรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ทรายหยาบ ปุ๋ยเคมีผสมสูตร 15-15-15 ปุ๋ยยูเรีย 46-0-0 และปุ๋ย WP สูตรดัดแปลง No.2

2.4 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์หาปริมาณ total sugar และโพรลีน

- โกร่งบดยา
- เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียด
- อ่างน้ำร้อน (water bath)
- กระดาษกรองเบอร์ 1
- spectrophotometer
- centrifuge
- เครื่องกวนสารในหลอดทดลอง (Stirrer)
- อ่างน้ำแข็ง (ice bath)
- กรวยกรอง
- pipett แก้วขนาด 5 , 10 และ 20 มิลลิลิตร
- micropipett ขนาด 2-20 ไมโครลิตร

3.สารเคมี

3.1 สารเคมีกำจัดโรคและแมลง

3.2 ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15

3.3 NaCl B.P.1973 ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

3.4 PEG 6000 ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

3.5 คลอรอกซ์ (NaOCl 5.25%)

3.6 สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายปุ๋ย WP สูตรดัดแปลง No.2 1991 (ตารางที่ 1)

3.7 สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณโพรลีน

- glacial acetic acid
- phosphoric acid
- ninhydrin
- sulfosalicylic acid
- toluene

3.9 สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

- ethanol
- anthrone
- H_2SO_4

4. วิธีดำเนินการทดลอง

เนื่องจากโครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยต่อเนื่องมาจากโครงการของ รศ.มนทกานติ วัชราภัย งานวิจัยในส่วนนี้ได้เลือกข้าว กข23สายพันธุ์ทนเค็มจำนวน 6 สายพันธุ์ที่มีอัตราการรอดตายในรุ่นที่ 5 ตั้งแต่ 19.1-53.4 %(เมื่อปลูกในสารละลายปุ๋ย WP สูตรดัดแปลง No.2 ที่เติม NaCl 0.5% ค่าการนำกระแสไฟฟ้า 9 mmho/cm)

โดยการวิจัยในส่วนนี้ได้แบ่งงานวิจัยออกเป็น 3 ส่วนดังนี้

1. ศึกษาผลของ NaCl ที่มีต่ออัตราการรอดตาย ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการ และการเจริญในรุ่นที่ 7 , 8 และ 9

2. ศึกษาผลของ PEG6000 ที่มีต่ออัตราการรอดตาย ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการ และการเจริญในรุ่นที่ 7 , 8 และ 9

3. ศึกษาการสะสมโพรลีนและน้ำตาลรวม เมื่อกล้าข้าวเจริญในภาวะเค็มและแล้ง

ตารางที่ 1.สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารละลายปุ๋ย WP สูตรดัดแปลง No.2

ชื่อสาร	ปริมาณสารที่ใช้	
Macroelements		
Potassium nitrate (KNO_3)	580	มิลลิกรัม
Calcium sulphate ($CaSO_4$)	500	มิลลิกรัม
Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$)	450	มิลลิกรัม
Triple superphosphate ($40\%P_2O_5$)	250	มิลลิกรัม
Ammonium sulphate $(NH_4)_2SO_4$	100	มิลลิกรัม
Microelements		
Na_2EDTA	40	มิลลิกรัม
Ferrous sulfate ($FeSO_4.7H_2O$)	30	มิลลิกรัม
Manganese sulfate ($MnSO_4.H_2O$)	15	มิลลิกรัม
Boric acid (H_3BO_3)	5	มิลลิกรัม
Zinc sulfate ($ZnSO_4.7H_2O$)	1.5	มิลลิกรัม
KI	1.0	มิลลิกรัม
Sodium molybdate ($Na_2MoO.2H_2O$)	0.1	มิลลิกรัม
Copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$)	0.05	มิลลิกรัม
Cobalt chloride ($CoCl_2.6H_2O$)	0.05	มิลลิกรัม
เติมน้ำให้เป็น	1,000	มิลลิลิตร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองที่ 1. ศึกษาผลของ NaCl ต่ออัตราการรอดตาย ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการ และการเจริญในรุ่นที่ 7 ,8 และ 9

1.1 ศึกษาอัตราการรอดตายของข้าวทนเค็มเมื่ออยู่ในภาวะเค็มโดยทดสอบอัตราการรอดตายของข้าว กข. 23 สายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกมาจาก somaclonal variation ที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อของโครงการ New Varieties of Rice for Saline and Acid Soil Through Tissue Culture ที่มีอัตราการรอดตาย 19.1-53.4 % จำนวน 6 สายพันธุ์ในรุ่นที่ 5 มาทดสอบอัตราการรอดตายของข้าวในรุ่นที่ 7,8 และ9 (R7-R9) เมื่ออยู่ในภาวะเค็มที่มีค่าการนำไฟฟ้า 2.5 ,6-7 และ 9-10 mmho/cm ซึ่งมีการทดลองดังนี้

1.1.1 เตรียมสารละลายปุ๋ย WP สูตรดัดแปลง No .2 ที่ไม่เติม NaCl และเติม NaCl 0.3 และ 0.5 %วัดค่าการนำกระแสไฟฟ้าได้ 2.5 ,6 และ9 mmho/cm ที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C

1.1.2 นำเมล็ดข้าวสายพันธุ์ทนเค็มทั้ง 6 สายพันธุ์ และสายพันธุ์หลักมาแช่น้ำอุ่น (50องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและแช่เมล็ดข้าวให้ปริ่มน้ำทิ้งไว้อีก 3 วัน

1.1.3 นำเมล็ดที่เริ่มงอกไปเพาะในกะบะทรายจนกระทั่งได้ต้นกล้าที่มีใบจำนวน 3 ใบซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 10 วัน

1.1.4 นำต้นกล้าจำนวน 25 ต้นย้ายลงปลูกในแผ่นโฟมที่ได้ทำการเจาะรูไว้แล้วยึดต้นกล้าด้วยฟองน้ำ ลอยแผ่นโฟมบนสารละลายปุ๋ยสูตร WP ดัดแปลง No.2 จนกระทั่งกล้าข้าวมีใบ 5 ใบ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 สัปดาห์ (ทดลองจำนวน 4 ซ้ำ)

1.1.5 ย้ายต้นกล้าระยะ 5 ใบมาปลูกในสารละลายปุ๋ย WP สูตรดัดแปลง No.2 ที่ไม่เติม NaCl และเติม NaCl 0.3 และ 0.5 % ที่อุณหภูมิ องศาเซลเซียส ในโรงเรือนที่มีความเข้มแสงที่วัดได้ประมาณ 2,500-5,000

ลักษ์ คอยวัดค่าการนำกระแสไฟฟ้าทุกสัปดาห์ในสารละลายที่มี NaCl โดยกำหนดให้ค่าการนำกระแสไฟฟ้าใน NaCl 0.3% ไม่เกิน 7 mmho/cm และใน NaCl 0.5% ไม่เกิน 10 mmho/cm

1.1.6 บันทึกผลจำนวนต้นที่ตายทุกสัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ คิดอัตราการรอดตายเป็นร้อยละของจำนวนต้นกล้าที่ปลูกทั้งหมดของแต่ละสายพันธุ์ในสารละลายต่างๆ และในรุ่นสุดท้ายคือรุ่นที่ 9 (R9) ได้ทำการทดสอบทางสถิติโดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial experiment in complete randomized design และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan ประกอบด้วย 2 ปัจจัยได้แก่

ปัจจัยที่ 1. ต้นกล้า R9 ดังนี้

- RD 23 TC 4
- RD 23 TC 7
- RD 23 TC 28
- RD 23 TC 75
- RD 23 TC 95
- RD 23 TC 110
- RD 23 สายพันธุ์หลัก

ปัจจัยที่ 2. ระดับความเค็มของ NaCl ในสารละลายธาตุอาหาร 3 ระดับดังนี้คือ

-ระดับความเค็ม 0 ไม่มี NaCl ในสารละลายธาตุอาหาร

-ระดับความเค็ม 0.3 มี NaCl ในสารละลายธาตุอาหาร 0.3%

-ระดับความเค็ม 0.5 มี NaCl ในสารละลายธาตุอาหาร 0.5%

1.1.7 นำต้นที่รอดตายมาปลูกในกระถางทรายเพื่อเก็บเมล็ดสำหรับทำการทดลองรุ่นต่อไป โดยนำต้นที่รอดตายและแข็งแรงจากการคัดเลือกสายพันธุ์ละประมาณ 5 ต้นมาปลูกในทรายในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30 ซม. ในโรงเรือนที่มีตาข่ายกันนกและหนู เติมปุ๋ยเคมีผสมสูตร15-15-15 ประมาณ 5 กรัมต่อกระถางก่อนปลูก 1 วันแล้วเติมปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) ประมาณ 5 กรัมต่อกระถางในระยะข้าวเริ่มแตกกอประมาณ 30-40 วันหลังปลูก หรือประมาณ 30 วันก่อนวันออกดอก รด

ด้วยปุ๋ย WP สูตรดัดแปลง No.2 สลับกับน้ำ ระหว่างการปลูกทำการกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืชที่ระบาด และควบคุมระดับน้ำให้เหนือพื้นดินประมาณ 5 ซม. เมื่อข้าวแก่จัดทำการเก็บรวงแล้วไปอบเพื่อลดความชื้นในเมล็ดข้าวที่อุณหภูมิประมาณ 37 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน เก็บเมล็ดไว้ในห้องเย็นเพื่อรอการนำไปทดสอบในรุ่นถัดไป

1.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการโดยเปรียบเทียบแต่ละลักษณะระหว่างข้าวแต่ละสายพันธุ์ในรุ่นที่9 ที่เจริญผ่านภาวะเค็มกับต้นที่เจริญในภาวะปกติใช้เป็นการทดลองชุดควบคุม

1.2.1 ศึกษาความเป็นพิษของ NaCl ที่ใบข้าว ตั้งแต่สัปดาห์แรกของการย้ายต้นกล้าลงในสารละลายปุ๋ย WP สูตรดัดแปลง No.2 ที่มี NaCl 0.3และ0.5% จนถึงสัปดาห์ที่ 4

1.2.2 ความสูง ความสูงของข้าวเมื่อเจริญอยู่ในภาวะเค็มเปรียบเทียบกับต้นที่เจริญในภาวะปกติ โดยสุ่มเก็บผลสายพันธุ์ละ 5 กอ โดยสุ่มหน่อ 5 หน่อต่อกอ วัดความสูงจากโคนต้นที่โผล่พ้นทรายไปจนถึงใบธง เก็บผลอีกครั้งในระยะออกดอก

1.2.3 พื้นที่ใบ เก็บผลลองระยะเช่นเดียวกับข้อ 1.2.2 ใช้สายพันธุ์ละ 5 กอ โดยสุ่มหน่อ 5 หน่อต่อกอ เก็บผลตั้งแต่ใบที่1-5 โดยนับจากใบล่าง พื้นที่ใบคิดจาก ความกว้าง XความยาวใบXค่าคงตัว ตามวิธีของ Yoshida *et al.*, (1976)

1.2.4 ความยาวรวง โดยวัดจากข้อสุดท้ายจนถึงปลายรวง ในระยะออกดอก

1.3 ศึกษาการเจริญของข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ในข้อ เมื่อเจริญในสารละลายปุ๋ย WP สูตรดัดแปลง No.2 และสารละลายปุ๋ยที่มี NaCl 0.3 และ0.5%

1.3.1 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง เมื่อเจริญอยู่ใน NaCl เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยเปรียบเทียบกับต้นที่เจริญในภาวะปกติ น้ำหนักแห้งหาโดยนำต้นข้าวไปอบที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C เป็นเวลา 5 วัน

1.3.2 การแตกกอ เก็บผล 2 ระยะคือ จำนวนหน่อต่อกอภายหลังการเจริญในภาวะเค็มและจำนวนหน่อต่อกอในวันออกดอกโดยนับจำนวนหน่อที่มีโดยทั้งนี้เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุมที่เจริญในภาวะปกติ

1.3.3 อายุวันออกดอก โดยนับจากวันเริ่มเพาะถึงวันที่ช่อดอกแรกโผล่พ้นฐานใบธง 50 % ของรวง

1.3.4 จำนวนรวงต่อกอ เก็บผลหลังจากวันออกดอกประมาณ 30 วัน โดยนับจำนวนรวงที่มีทั้งหมดในกอ สุ่มนับจำนวน 5 กอต่อสายพันธุ์

1.3.5 จำนวนเมล็ดต่อรวง เก็บผลสายพันธุ์ละ 5 กอ โดยสุ่มเลือกรวงจำนวน 5 รวงต่อ 1 กอ

1.3.6 น้ำหนัก 1,000 เมล็ด โดยสุ่มเลือกเมล็ด 1,000 มาชั่งน้ำหนัก

การทดลองที่ 2. ศึกษาผลของศึกษา PEG 6000 ต่ออัตราการรอดตาย ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการและการเจริญในรุ่นที่ 7 ,8 และ 9

2.1 ศึกษาอัตราการรอดตายของข้าวทนเค็มเมื่ออยู่ในภาวะแล้งที่ชักนำด้วย PEG6000 ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร โดยนำข้าวสายพันธุ์เดียวกับในข้อ 1.1 มาทำการทดสอบอัตราการรอดตายของข้าวในรุ่นที่ 7 , 8 และ 9 (R7-R9) การทดลองชุดควบคุมคือสายพันธุ์เดียวกันที่ปลูกในภาวะปกติ (ไม่มี PEG 6000) ซึ่งมีการทดลองดังนี้

2.1.1 เตรียมสารละลายปุ๋ย WP สูตรดัดแปลง No.2 ที่ไม่เติม PEG6000 และเติม PEG6000 ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร

2.1.2 เพาะเมล็ด โดยนำเมล็ดมาแช่ในคลอรอกซ์ความเข้มข้น 40 % ผสม tween 20 จำนวน 3 หยด ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด จากนั้นล้างออกด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดที่ปลอดเชื้อมาเพาะบนชั้นแสงที่มีความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ ช่วงแสง 12 ชั่วโมง ช่วงมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 33-35 ^{o}C เป็นเวลา 5 วัน ตามวิธีของ พรทิพย์ ชินสงคราม (2539)

2.1.3 นำเมล็ดที่เริ่มงอกอายุประมาณ 5 วัน (ความยาวของ coleoptile ยาวประมาณ 1 ซม.) มาเลี้ยงในขวดขนาด 100 มล.จำนวน 20 ต้นต่อขวด โดยในแต่ละการทดลองของแต่ละสายพันธุ์ใช้ต้นข้าวจำนวน 100 ต้น

2.1.4 บันทึกผลจำนวนต้นที่ตาย ตามวิธีในข้อ 1.1.6 และในรุ่นสุดท้ายคือรุ่นที่ 9 (R9) ได้ทำการทดสอบ ทางสถิติโดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial experiment in complete randomized design และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan ประกอบด้วย 2 ปัจจัยได้แก่

ปัจจัยที่ 1. ต้นกล้า R9 ดังนี้

- RD 23 TC 4
- RD 23 TC 7
- RD 23 TC 28
- RD 23 TC 75
- RD 23 TC 95
- RD 23 TC 110
- RD 23 สายพันธุ์หลัก

ปัจจัยที่2. ความเข้มข้นของ PEG6000 ในสารละลายปุ๋ยสูตร WP ดัดแปลง No.2 ดังนี้คือ

- ความเข้มข้นของ PEG6000 0 กรัมต่อลิตร
- ความเข้มข้นของ PEG6000 150 กรัมต่อลิตร

2.1.5 นำต้นที่รอดตายมาปลูกในกระถางทรายเพื่อเก็บเมล็ด ตามวิธีในข้อ1.1.7

2.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการ โดยศึกษาเปรียบเทียบลักษณะต่างๆ ของข้าวสายพันธุ์ต่างๆดังข้อ 1.1 ที่เจริญในภาวะปกติและในภาวะที่สารละลายธาตุอาหารมี PEG 6000 ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร

2.2.1 ศึกษาผลของ PEG6000 ที่มีต่อใบข้าว ตั้งแต่สัปดาห์แรกของการย้ายต้นกล้าลงในสารละลายละลายปุ๋ยสูตร WP ดัดแปลง No.2 ที่ไม่มี PEG6000 และ มี PEG6000 ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร จนถึงสัปดาห์ที่ 4

2.2.2 ความยาวราก โดยวัดจากจุดกำเนิดรากถึงปลายรากที่ยาวที่สุด เก็บผลทุกสัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ภายหลังย้ายกล้าข้าวที่มีขนาดของ coleoptile ยาว 1เซนติเมตร สุ่มเก็บจากกล้าข้าว 5 ต้นในแต่ละสายพันธุ์ของแต่ละ treatment .

2.2.3 ความสูง ทำตามวิธีในข้อ 1.2.2 โดยเก็บผลการทดลอง 2 ครั้ง คือภายหลังจากการเจริญในภาวะที่ PEG6000 เป็นเวลา 4 สัปดาห์และในระยะออกดอก

2.2.4 พื้นที่ใบ เก็บผล2 ระยะ ดังข้อ 2.2.3 ตามวิธีในข้อ 1.2.3

2.2.5 ความยาวรวง ทำตามวิธีในข้อ 1.2.4

2.3 ศึกษาการเจริญของข้าวสายพันธุ์ต่างๆในข้อ1 เมื่อเจริญในสารละลายปุ๋ย WP สูตรดัดแปลง No.2 และในสารละลายปุ๋ยที่เติม PEG6000 ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร

2.3.1 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง เก็บผลเมื่อเจริญในสารละลายปุ๋ยที่เติม PEG6000 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยมีต้นกล้าที่เจริญในภาวะปกติเป็นการทดลองชุดควบคุม น้ำหนักแห้งทำตามวิธีในข้อ 1.3.1

2.3.2 การแตกกอ ทำตามวิธีในข้อ 1.3.2

2.3.3 อายุวันออกดอก ทำตามวิธีในข้อ 1.3.3

2.3.4 จำนวนรวงต่อกอ ทำตามวิธีในข้อ 1.3.4

2.3.5 จำนวนเมล็ดต่อรวง ทำตามวิธีในข้อ 1.3.5

2.3.6 น้ำหนัก 1,000 เมล็ด ทำตามวิธีในข้อ 1.3.6

การทดลองที่ 3 วิเคราะห์ปริมาณโพรลีน และ น้ำตาล เมื่อต้นกล้าข้าวเจริญในภาวะเค็มและแล้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์

3.1 ศึกษาการสะสมปริมาณโพรลีนและน้ำตาลเมื่อกล้าข้าวอายุ 22 วัน (มีใบ5 ใบ) ที่เจริญในสารละลายปุ๋ย WP สูตรดัดแปลง No.2 ที่ไม่เติม NaCl และ เติม NaCl 0.3 % โดยทำการวัดปริมาณโพรลีนและน้ำตาลในใบทุกสัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3.2 ศึกษาการสะสมปริมาณโพรลีนและน้ำตาลเมื่อกล้าข้าวอายุ 5 วัน (coleoptile ยาว 1 ซม.) ที่เจริญในสารละลายปุ๋ย WP สูตรดัดแปลง No.2 ที่ไม่เติม NaCl และเติม NaCl 0.3%โดยทำการวัดปริมาณโพรลีนและน้ำตาลในใบทุกสัปดาห์เป็นเวลา 2 สัปดาห์

3.3 ศึกษาการสะสมปริมาณและน้ำตาลเมื่อกล้าข้าวอายุ 5 วัน (coleoptile ยาว 1 ซม.) ที่เจริญในสารละลายปุ๋ย WP สูตรดัดแปลง No.2 ที่ไม่เติม PEG6000 และเติม PEG6000 ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร โดยทำการวัดปริมาณโพรลีนและน้ำตาลในใบทุกสัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ภาพที่.1 สภาพการปลูกเลี้ยงต้นข้าว

การวิเคราะห์ปริมาณโพรลีนตามวิธีของ Bate *et al.* (1973)

1 เก็บตัวอย่างโดยใช้ใบที่ 2 จากบนสุด (เก็บใบที่แผ่เต็มที่)โดยวิธีการดังต่อไปนี้

1.1 ชั่งใบข้าว 0.1 กรัม บดให้ละเอียดแล้วเติม 3% sulfosalicylic acid 3 มล.

1.2 นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์1 แล้วดูดสารละลายที่ได้จำนวน 0.5 มล. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 30 มล.

1.3 เติม 0.5 มล. glacial acetic acid และ 0.5 มล. acid ninhydrin* แล้วนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.4 หยุดปฏิกิริยาทันทีโดยการนำหลอดทดลองไปแช่ใน ice bath นานประมาณ 10 นาที

1.5 เติม toluene 2 มล. ผสมสารให้เข้ากับโดยใช้ vortex นาน 15-20 วินาที จนได้สารแยกชั้นตั้งทิ้งไว้ 1-2 นาที

1.6 ดูดสารละลายที่มีสีเหนือผิวของ toluene 2 มล. ใส่ใน spectrophotometer cell

1.7 วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ toluene เป็น blank

1.8 นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตราฐาน (standard curve) เพื่อหาปริมาณโพรลีนในเนื้อเยื่อพืช

.* การเตรียมสารละลาย acid ninhydrin นำ ninhydrin 1.25 กรัมผสมกับ glacial acetic acid 30 มล. และ 6 M phosphoric acid 20 มล. นำไปอุ่นโดยให้ความร้อนประมาณ 80 องศาเซลเซียสจนกระทั่งสารละลายรวมเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บสารละลายไว้ในที่เย็นอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส (สารที่เตรียมได้ต้องใช้ภายใน 24 ชั่วโมง)

การวัดปริมาณน้ำตาลรวมตามวิธีของ Irigoyen *et al*,.(1992) **ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้**

1.1 ชั่งใบข้าว 0.1 กรัม บดให้ละเอียดแล้วเติม 95 % (V/V) ethanol 1 มล. ดูดใส่ในหลอดทดลองขนาด 30 มล.

1.2 ล้างด้วย 70% (V/V) ethanol 1 มล. จำนวน 2 ครั้ง

1.3 นำ soluble ไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,500 g เป็นเวลา 10 นาที

1.4 เก็บ supernatant ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.5 ดูด supernatant มา 0.1 มล. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 30 มล เติม anthrone* 3 มล.

1.6 นำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.7 ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 625 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ anthrone 3 มล. + 95 % ethanol 1 มล. +70 % ethanol 2 ml เป็น blank

1.8 นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตราฐาน (standard curve) เพื่อหา ปริมาณน้ำตาลในเนื้อเยื่อพืช

---

* การเตรียมสารละลาย anthrone นำ anthrone 150 มิลลิกรัม ผสมกับ 72 % (W/W) H_2SO_4 100 มล. คนจนสารละลายรวมเป็นเนื้อเดียวกัน (สารที่เตรียมได้ต้องใช้ภายใน 24 ชั่วโมง)