อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาความดีเด่นของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ประกอบด้วย งานวิจัย 2 การทดลองด้วยกัน การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาความดีเด่นของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ปลูกในสภาพนา และการทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาขยายพันธุ์ข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งแต่ละการทดลองได้แบ่งขั้นตอนการปฏิบัติงานดังมีรายละเอียดดังนี้คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาความดีเด่นของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1

ได้ทดลองปลูกข้าวพันธุ์พ่อและแม่ จำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่พันธุ์ RD 1, RD 7, RD 25, Basmati 370 และ Pokkali ผสมพันธุ์เพื่อสร้างเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 10 คู่ผสม โดยวิธีผสมพันธุ์แบบพบกันหมด (diallel cross) แต่ไม่มีการผสมกลับ (reciprocal) การสร้างเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 นี้ ได้ปลูกทดลองที่เรือนเพาะชำ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนมิถุนายน ถึงเดือนพฤศจิกายน 2528

การทดสอบหาคุณสมบัติความดีเด่นของพันธุ์ข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ในสภาพนา ได้ทดลองปลูกที่แปลงทดลองของสถานีทดลองข้าวพาน อำเภอพาน จังหวัดเชียงราย ช่วงฤดูปลูกข้าวนาปี ระหว่างเดือนกรกฎาคม ถึง เดือนธันวาคม 2529 โดยทดลองปลูกข้าวพันธุ์พ่อและแม่ จำนวน 5 พันธุ์ ร่วมกับ ข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 10 คู่ผสม วางแผนการทดลองปลูกแบบ Randomized Complete Block จำนวน 3 ซ้ำ พันธุ์พ่อและแม่และคู่ผสมชั่วที่ 1 ปลูกสายพันธุ์ละ 3 แถว ๆ ยาว 3.0 เมตร กอหนึ่งปลูก 1 ต้น ระยะระหว่างกอและระหว่างแถวห่าง 25 ซม. ก่อนปักดำหนึ่งวันใส่ปุ๋ย $N-P_2O_5-K_2O$ อัตรา 6-6-6 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อข้าวเริ่มตั้งท้องใส่ปุ๋ยแอมมอเนียมซัลเฟต (20% N) อัตรา 30 กิโลกรัมต่อไร่อีกครั้งหนึ่ง การป้องกันแมลงหนอนกอ และแมลงศัตรูพืชอื่น ๆ ได้ห่านสาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คาร์โบฟูราน อัตรา 4.0 กิโลกรัมต่อไร่ จำนวน 2 ครั้ง หลังปักดำ

ลักษณะต่าง ๆ ที่ได้ศึกษาและบันทึกมีดังนี้ คือ

1. อายุเก็บเกี่ยว (วัน)
2. ความสูงของลำต้น (ซม.)
3. ความสามารถในการแตกกอ (จำนวนหน่อต่อต้น)
4. จำนวนรวงต่อต้น
5. จำนวนเมล็ดต่อรวง
6. น้ำหนัก 1,000 เมล็ด (กรัม)
7. ดัชนีการเก็บเกี่ยว
8. ผลผลิตต่อต้น (กรัม)

<u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

1. การศึกษาความดีเด่นในลูกผสมชั่วที่ 1

ความดีเด่นของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{Heterosis (\%)} = \frac{(F_1 - MP)}{MP} \times 100$$

$$\text{Heterosis (\%)} = \frac{(F_1 - BP)}{BP} \times 100$$

โดยที่ F_1 MP และ BP เป็นค่าเฉลี่ยของลูกผสมชั่วที่ 1 ค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ (mid-parent) และค่าเฉลี่ยของพ่อหรือแม่ที่ดีกว่า (better parent) ตามลำดับ (Gwayali <u>et al</u> 1968)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การวิเคราะห์ความสามารถในการรวมตัว (Combining ability)

2.1 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ (Statistical analysis)

วิเคราะห์ผลการทดลองแบบ Randomized Complete Block มี Model คือ

$$X_{ij} = U + V_i + b_j + e_{ij}$$

โดยที่

U = ค่าเฉลี่ยของประชากร

V_i = อิทธิพลของ genetype i

b_j = อิทธิพลของ block j

e_{ij} = ความคลาดเคลื่อนโดยสุ่ม

ใน Model I (Fixed Model)(Griffing 1956) โดยแสดงรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Analysis of Variance and Expected Mean Square (EMS) ของการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

Source	df	MS	EMS
block	b-1	Mb	$\sigma^2_e + bcK^2(b)$
genotype	a-1	Mv	$\sigma^2_e + acK^2(v)$
error	(b-1)(a-1)	Me	σ^2_e

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 การวิเคราะห์ผลทางพันธุกรรม (Genetical analysis)

วิเคราะห์หาความสามารถในการรวมตัว (Combining ability analysis) โดยใช้วิธีของ Griffing (1956) Method 4 Model I โดยมี Mathematical model ดังนี้คือ

$$X_{ij} = U + g_i + g_j + S_{ij} + \frac{1}{bc}\sum_k \sum_l e_{ijkl}$$

โดยที่ i, j = 1.....p = จำนวนพ่อแม่ (parent)

k = 1.....b = จำนวนซ้ำ (block)

l = 1.....c = จำนวนต้นต่อแปลง

U = ค่าเฉลี่ยของประชากร

g_i, g_j = อิทธิพลของ g.c.a. (general combining ability) ของพันธุ์พ่อแม่ i หรือ j

S_{ij} = อิทธิพลของ s.c.a. (specific combining ability) ของการผสมระหว่างพันธุ์ i กับ พันธุ์ j

e_{ijkl} = อิทธิพลของสภาพแวดล้อมต่อค่าสังเกต ijkl

และได้แสดงการวิเคราะห์ค่า variance และค่า EMS ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 Analysis of Variance and Expected Mean Square (EMS) of combining ability analysis, Method 4 Model I. (Griffing 1956)

Source	df	Sum of Square	Mean Square	EMS
General combining ability	p-1	S_g	M_g	$\sigma^2 + (p-2)\frac{1}{p-1}\sum_i g^2_i$
Specific combining ability	p(p-3)/2	S_s	M_s	$\sigma^2 + \frac{2}{p(p-3)}\sum_i\sum_j S^2_{ij}$
error	m	S_e	M_e	σ^2

โดย

$$S_g = \frac{1}{p-1}\sum_i X^2_i - \frac{4}{p(p-2)} X^2..$$

$$S_s = \sum_i \sum_j X^2_{ij} - \frac{1}{p-2}\sum X^2_i + \frac{2}{(p-1)(p-2)} X^2..$$

$$Me' = Me/b$$

การทดสอบ F-test ของการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการรวมตัวได้ทำดังนี้

การทดสอบ g.c.a. effect ใช้ $F_{(p-1),m} = Mg/Me'$

การทดสอบ s.c.a. effect ใช้ $F_{p(p-3)/2,m} = Ms/Me'$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่าของอิทธิพลต่าง ๆ ทำการประมาณดังนี้

$$\hat{U} = \frac{2}{p(p-1)} X..,$$

$$\hat{g}_i = \frac{1}{p(p-2)} (pX_i. - 2X..)$$

$$\hat{S}_{ij} = x^2_{ij} - \frac{1}{p-2} (X_i. + X_{.j}) + \frac{2}{(p-1)(p-2)} X..$$

ค่าความแปรปรวนของอิทธิพลต่าง ๆ และความแปรปรวนของความแตกต่างระหว่างอิทธิพลต่าง ๆ ได้ประมาณค่า ดังนี้

$$\text{var}(\hat{U}) = \frac{2}{p(p-1)} \hat{\sigma}^2$$

$$\text{var}(\hat{g}_i) = \frac{(p-1)}{p(p-2)} \hat{\sigma}^2$$

$$\text{var}(\hat{S}_{ij}) = \frac{p-3}{p-1} \hat{\sigma}^2 \quad (i \neq j)$$

$$\text{var}(\hat{g}_i - \hat{g}_j) = \frac{2}{p-2} \hat{\sigma}^2 \quad (i \neq j)$$

$$\text{var}(\hat{S}_{ij} - \hat{S}_{ik}) = \frac{2(p-3)}{p-2} \hat{\sigma}^2 \quad (i \neq j, k : j \neq k)$$

$$\text{var}(\hat{S}_{ij} - \hat{S}_{kl}) = \frac{2(p-4)}{p-2} \hat{\sigma}^2 \quad (i \neq j, k.l; j \neq k; l \ (k \neq l)$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะและผลผลิต

ใช้การวิเคราะห์แบบสหสัมพันธ์เส้นตรงของ 2 ลักษณะ (simple linear correlation) ของคู่ผสมชั่วที่ 1 โดยวิธีการของ Steel and Torrie (1960)

<u>การทดลองที่ 2</u> การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวลูกผสมเพื่อขยายพันธุ์เป็นต้นกล้า

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์เป็นต้นกล้าลูกผสมชั่วที่ 1 ได้วางแผนการทดลองออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> เป็นการศึกษาเบื้องต้นทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 10 คู่ผสม โดยใช้สูตรของ Linsmaier and Skoog (1965) (LS) ที่ประกอบด้วยสาร sucrose 4.0% วุ้น 1.0% และฮอร์โมน 2,4-D ที่มีอัตราความเข้มข้น 5 ระดับ ได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส โดยนำเมล็ดข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 แต่ละคู่ผสม ทำความสะอาดเมล็ดโดยวิธีล้างใน ethanolความเข้มข้น 70% เป็นระยะเวลา 3 นาที หลังจากนั้นได้แกะเปลือกหุ้มเมล็ดข้าวออกแล้วผ่านฆ่าเชื้อโรคที่ติดมากับเมล็ดด้วยน้ำสารเคมีคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 20% เป็นระยะเวลา 30 นาที อีกครั้งหนึ่ง หลังจากนี้ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จึงนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร LS เป็นระยะเวลา 15 วัน หลังจากนั้นได้ทำการแยกและนำแคลลัสที่ได้รับการขยายแล้วนี้ไปเลี้ยงในสูตรอาหาร LS อีกครั้งหนึ่ง เพื่อชักนำให้เกิดต้นใหม่ของข้าว สูตรอาหาร LS ที่ใช้ระยะช่วงหลังนี้จะไม่มีส่วนประกอบของฮอร์โมนอื่นใดเพิ่มเติมเข้าไป

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design แต่ละคู่ผสมทำ 2 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนที่ 2 จากผลการทดลองศึกษาเบื้องต้นของขั้นตอนที่ 1 ทำให้ทราบว่าสูตรอาหาร Linsmaier and Skoog ที่ประกอบด้วย 2,4-D อัตราความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร นั้น จะเหมาะสมและสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นข้าวใหม่ของข้าวลูกผสมได้ จึงได้วางแผนการทดลองเพิ่มเติมโดยได้ทดลองใช้ฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ เพิ่มลงในสูตรอาหาร LS ทั้งในช่วงระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส และช่วงหลังจากเกิด embryogenic callus (E-callus) แล้ว โดยได้มีการเตรียมทดลองสูตรอาหาร 2 สูตร ดังมีรายละเอียดดังนี้ คือ

สูตรที่ 1 สูตรอาหารของ LS. ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร Tryptophan ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design จำนวน 5 ซ้ำต่อ 1 คู่ผสม นำเมล็ดที่ได้ผ่านขั้นตอนทำความสะอาดเพื่อให้ปลอดเชื้อราติดมากับเมล็ดแล้ว ใส่ในหลอดเลี้ยงเนื้อเยื่อ นำไปไว้ในที่มืดเป็นระยะเวลานาน 6 สัปดาห์ หลังจากนั้นได้แยกและย้าย embryogenic callus ที่ได้นำไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมทุก 4 สัปดาห์ต่อครั้ง ทำติดต่อกัน 2-3 ครั้งต่อเนื่องกันไป

สูตรที่ 2 เป็นสูตรอาหาร LS. เช่นเดียวกัน ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร Kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design จำนวน 5 ซ้ำ ต่อ 1 คู่ผสม นำเมล็ดที่เพาะบนสูตรอาหารเก็บไว้ในที่มืดเป็นระยะเวลานาน 6 สัปดาห์ เมื่อ embryogenic callus เกิดขึ้นแล้ว ได้แยกและย้ายนำไปเลี้ยงในสูตรอาหาร LS. ใหม่ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร Kinetin 0.4 มิลลิกรัม/ลิตร ทำการย้าย embryogenic callus ในอาหารสูตรใหม่นี้ทุก 4 สัปดาห์ต่อครั้งเป็นระยะเวลา 2-3 ครั้งติดต่อกันไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อได้ embryogenic callus ที่ขยายได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากสูตรอาหาร LS ทั้ง 2 สูตรแล้ว ได้นำ embryogenic callus นี้ไปเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารของ Murashige and Skoog (1965) (MS) เพื่อชักนำให้เกิดต้นข้าวใหม่ของข้าว ซึ่งสูตรอาหาร Murashige and Skoog (1965) นี้ จะประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้นของแสงสว่าง 1,600 lux ช่วงเวลาที่มีแสง 8 ชั่วโมงสลับกับช่วงมืด 16 ชั่วโมง

การบันทึกผล ได้บันทึกเป็นค่าสังเกตการเกิดแคลลัสของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของแต่ละคู่ผสม และของสูตรอาหารแต่ละสูตรดังนี้ คือ

0 = ไม่เกิดแคลลัสหรือต้นกล้าข้าว

X = เกิดแคลลัสเพียงเล็กน้อย

XX = เกิดแคลลัสระดับปานกลาง

XXX = เกิดแคลลัสมาก

การทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวลูกผสมของการทดลองที่ 2 นี้ ได้ทดลองที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ช่วงระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ ถึง เดือนพฤศจิกายน 2529

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved