

### บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### 3.1 เมล็ดพันธุ์ข้าว

เมล็ดพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษานี้มีจำนวน 53 พันธุ์ ประกอบด้วยเมล็ดพันธุ์ข้าวไร่พื้นเมืองของมูลนิธิโครงการหลวงจำนวน 50 พันธุ์ ที่เก็บรวบรวมจากเกษตรกรภายในศูนย์พัฒนาโครงการหลวงและสถานที่ต่างๆ และใช้เมล็ดพันธุ์ข้าวนาจำนวน 3 พันธุ์ ดังแสดงในตาราง 1

**ตาราง 1** ชื่อพันธุ์ แหล่งที่มาและประเภทของพันธุ์ข้าวทั้ง 53 พันธุ์ที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	แหล่งที่มา					ประเภทของข้าว
		ศูนย์พัฒนาฯ/ สถานที่	หมู่บ้าน	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด	
1	นิกอ	แกน้อย	ห้วยถ้ำ	เมืองนะ	เขียงดาว	เชียงใหม่	ข้าวไร่
2	เร่าสุหยา	แกน้อย	แกน้อย	เมืองนะ	เขียงดาว	เชียงใหม่	ข้าวไร่
3	จอหอมยา	แกน้อย	หนองวัวแดง	เมืองนะ	เขียงดาว	เชียงใหม่	ข้าวไร่
4	ข้าวขาวปางอู้ง	ปางอู้ง	ปางอู้ง	-	แม่แจ่ม	เชียงใหม่	ข้าวไร่
5	ปางอู้งเมล็ดคลาย	ปางอู้ง	ปางอู้ง	-	แม่แจ่ม	เชียงใหม่	ข้าวไร่
6	ข้าวขาวแม่ลาน้อย	แม่ลาน้อย	บ้านคง	ห้วยห้อม	แม่ลาน้อย	แม่ฮ่องสอน	ข้าวไร่
7	บือคอกแพ	แม่ลาน้อย	บ้านคง	ห้วยห้อม	แม่ลาน้อย	แม่ฮ่องสอน	ข้าวไร่
8	บือหมือ	แม่ลาน้อย	บ้านคง	ห้วยห้อม	แม่ลาน้อย	แม่ฮ่องสอน	ข้าวไร่
9	ข้าวขาวแม่หลอด	แม่หลอด	แม่หลอดเหนือ	สบเปิง	แม่แตง	เชียงใหม่	ข้าวไร่
10	ป้อมือ	วัดจันทร์	บ้านเด่น	วัดจันทร์	แม่แจ่ม	เชียงใหม่	ข้าวไร่
11	บือพะโต๊ะ	สะโจ๊ะ	คอกสะโจ๊ะ	ศรีคอนมูล	เขียงแสน	เขียงราย	ข้าวไร่
12	ข้าวขาวสะโจ๊ะ	สะโจ๊ะ	คอกสะโจ๊ะ	ศรีคอนมูล	เขียงแสน	เขียงราย	ข้าวไร่
13	จ่านอนี่	หนองเขียว	หนองเขียว	เมืองนะ	เขียงดาว	เชียงใหม่	ข้าวไร่
14	จะกูดิ	หนองเขียว	หนองเขียว	เมืองนะ	เขียงดาว	เชียงใหม่	ข้าวไร่
15	จ่านอนะ	หนองเขียว	หนองเขียว	เมืองนะ	เขียงดาว	เชียงใหม่	ข้าวไร่
16	แฮตุ	หนองเขียว	ใหม่สามัคคี	ปิงโค้ง	เขียงดาว	เชียงใหม่	ข้าวไร่
17	ข้าวม้าห้า	หนองเขียว	ใหม่สามัคคีอาป่า	เมืองนะ	เขียงดาว	เชียงใหม่	ข้าวไร่
18	ฮ้าผะแซ	หนองเขียว	ใหม่สามัคคีอาป่า	เมืองนะ	เขียงดาว	เชียงใหม่	ข้าวไร่
19	ข้าวขาวห้วยน้ำริน	ห้วยน้ำริน	ห้วยน้ำริน	แม่เจดีย์ใหม่	เวียงป่าเป้า	เขียงราย	ข้าวไร่
20	เบนด้า	ห้วยแล้ง	ห้วยแล้ง	ท่าข้าม	เวียงแก่น	เขียงราย	ข้าวไร่
21	ลาซอแดง	ห้วยแล้ง	ห้วยแล้ง	ท่าข้าม	เวียงแก่น	เขียงราย	ข้าวไร่
22	จ้าวขาว	สถานีทดลองข้าวแม่ฮ่องสอน		สบป่อง	ปางมะผ้า	แม่ฮ่องสอน	ข้าวไร่

## ตาราง 1 (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	แหล่งที่มา				ประเภทของข้าว
		ศูนย์พัฒนา/สถานที่	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด	
23	ขาวยาว	สถานีทดลองข้าวแม่ฮ่องสอน	สบป่อง	ปางมะผ้า	แม่ฮ่องสอน	ข้าวไร่
24	เจ้าลิซอ	สถานีทดลองข้าวแม่ฮ่องสอน	สบป่อง	ปางมะผ้า	แม่ฮ่องสอน	ข้าวไร่
25	ข้าวแม่	สถานีทดลองข้าวแม่ฮ่องสอน	สบป่อง	ปางมะผ้า	แม่ฮ่องสอน	ข้าวไร่
26	จำแอ้	สถานีทดลองข้าวแม่ฮ่องสอน	สบป่อง	ปางมะผ้า	แม่ฮ่องสอน	ข้าวไร่
27	จีดำ	สถานีทดลองข้าวแม่ฮ่องสอน	สบป่อง	ปางมะผ้า	แม่ฮ่องสอน	ข้าวไร่
28	อะร้อย	สถานีทดลองข้าวแม่ฮ่องสอน	สบป่อง	ปางมะผ้า	แม่ฮ่องสอน	ข้าวไร่
29	ข้าวเหนียวอีป้อแผ	สถานีทดลองข้าวแม่ฮ่องสอน	สบป่อง	ปางมะผ้า	แม่ฮ่องสอน	ข้าวไร่
30	ข้าวขาวมีอวา	สถานีทดลองข้าวแม่ฮ่องสอน	สบป่อง	ปางมะผ้า	แม่ฮ่องสอน	ข้าวไร่
31	หลวงพระบาง 1	แขวงหลวงพระบาง ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว				ข้าวไร่
32	หลวงพระบาง 2	แขวงหลวงพระบาง ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว				ข้าวไร่
33	หลวงพระบาง 3	แขวงหลวงพระบาง ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว				ข้าวไร่
34	หลวงพระบาง 4	แขวงหลวงพระบาง ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว				ข้าวไร่
35	หลวงพระบาง 5	แขวงหลวงพระบาง ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว				ข้าวไร่
36	หลวงพระบาง 6	แขวงหลวงพระบาง ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว				ข้าวไร่
37	หลวงพระบาง 7	แขวงหลวงพระบาง ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว				ข้าวไร่
38	หลวงพระบาง 8	แขวงหลวงพระบาง ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว				ข้าวไร่
39	หลวงพระบาง 9	แขวงหลวงพระบาง ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว				ข้าวไร่
40	หลวงพระบาง 10	แขวงหลวงพระบาง ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว				ข้าวไร่
41	หลวงพระบาง 11	แขวงหลวงพระบาง ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว				ข้าวไร่
42	หลวงพระบาง 12	แขวงหลวงพระบาง ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว				ข้าวไร่
43	หลวงพระบาง 13	แขวงหลวงพระบาง ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว				ข้าวไร่
44	หลวงพระบาง 14	แขวงหลวงพระบาง ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว				ข้าวไร่
45	หลวงพระบาง 15	แขวงหลวงพระบาง ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว				ข้าวไร่
46	หลวงพระบาง 16	แขวงหลวงพระบาง ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว				ข้าวไร่
47	SPT91029-PMP-3-2-1	สถานีทดลองข้าวแม่ฮ่องสอน	สบป่อง	ปางมะผ้า	แม่ฮ่องสอน	ข้าวไร่
48	SPT91029-PMP-3-10-1	สถานีทดลองข้าวแม่ฮ่องสอน	สบป่อง	ปางมะผ้า	แม่ฮ่องสอน	ข้าวไร่
49	SPTUR84032-PMP-6-3-2	สถานีทดลองข้าวแม่ฮ่องสอน	สบป่อง	ปางมะผ้า	แม่ฮ่องสอน	ข้าวไร่
50	SPT88004-SMG9-2-1-1	สถานีทดลองข้าวแม่ฮ่องสอน	สบป่อง	ปางมะผ้า	แม่ฮ่องสอน	ข้าวไร่
51	กข 6	ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่				ข้าวนา
52	กข 15	ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่				ข้าวนา
53	ขาวคอกมะลิ 105	ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่				ข้าวนา

หมายเหตุ: หมายเลข 47- 53 ใช้เป็นพันธุ์ตรวจสอบมาตรฐาน รวม 7 พันธุ์/สายพันธุ์

### 3.2 วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและวัดความแตกต่างของชนิดกรดอะมิโนจำเป็นในข้าวทั้ง 53 พันธุ์

นำเมล็ดข้าวไร่พันธุ์พื้นเมือง 50 พันธุ์และเมล็ดพันธุ์ข้าวนา 3 พันธุ์ มาปลูกทดลองในกระถางดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ปลูกแบบหยอดเมล็ด จำนวน 1 ต้นต่อหลุม 4 ต้นต่อกระถาง ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0 หลังปลูก 30 วันและปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ใส่ช่วงก่อนข้าวออกดอก การให้น้ำและกำจัดวัชพืชกระทำตามความเหมาะสม โดยทดลองที่แปลงทดลองของภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในช่วงระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนธันวาคม 2548 แล้วบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาที่ใช้ในการประเมินตามวิธีของ IRRI-IBPGR (1980) โดยเก็บตัวอย่างเมล็ดทุกต้นแล้วทำการสุมตัวอย่างเมล็ดในแต่ละพันธุ์ เพื่อนำไปสกัดหาชนิดของกรดอะมิโนจำเป็น 8 ชนิดโดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Thin layer chromatography (TLC) ทำ 2 ซ้ำ ในสารละลาย 2 solution คือ

T1. Phenol : water ในอัตราส่วน 75 กรัม : 25 กรัม (3:1 w/w)

T2. Phenol : water : acetic acid ในอัตราส่วน 75 กรัม : 25 กรัม : 5 มิลลิลิตร

การทดลองที่ 2. การตอบสนองของพันธุ์ข้าวในการสร้างกรดอะมิโนจำเป็นต่อระดับปุ๋ยไนโตรเจน

จากการทดลองที่ 1 ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่มีจำนวนชนิดของกรดอะมิโนจำเป็นมาก 4 พันธุ์ และมีจำนวนชนิดของกรดอะมิโนจำเป็นน้อย 1 พันธุ์ รวม 5 พันธุ์ มาปลูกทดลองในกระถางดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ในช่วงระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนธันวาคม 2549 วางแผนการทดลองแบบ Split plot design in RCB จำนวน 3 ซ้ำ โดยกำหนดระดับปุ๋ยไนโตรเจน 3 ระดับ คือ 0, 5 และ 10 kg N/ha (0, 3.535, และ 7.070 กรัมต่อกระถาง) เป็น main plot ใช้ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) และพันธุ์ข้าวที่คัดเลือก 5 พันธุ์ เป็น sup plot ทำการใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ช่วงต้นข้าวมีอายุประมาณ 30 วันหลังปลูกและครั้งที่ 2 ช่วงก่อนข้าวออกดอก ส่วนการให้น้ำและกำจัดวัชพืชกระทำตามความเหมาะสม แล้วนำเมล็ดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะมิโนโดยใช้เครื่อง spectrophotometer วัดจากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารละลายกรดอะมิโนมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของพันธุ์ข้าวกับระดับปุ๋ยไนโตรเจนที่มีผลต่อปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นในเมล็ดข้าว

### 3.3 การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของข้าวไร่ ได้แก่

1.1 ข้อมูลลักษณะของเมล็ดข้าว ได้แก่ สีเปลือกเมล็ด สีเยื่อหุ้มเมล็ด ชนิดข้าวสาร (หาชนิดแป้งในเมล็ดโดยการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน;  $KI/I_2$  อัตรา 1 กรัม: น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) น้ำหนัก 1000 เมล็ด ความกว้าง ความยาว ความหนาของเมล็ดข้าวเปลือกและรูปร่างของเมล็ดข้าวเปลือก

1.2 ข้อมูลทางคุณภาพจำนวน 12 ลักษณะ ได้แก่ ทรงกอ สีแผ่นใบ สีกาบใบ สีลั่นใบ สีหูใบ สีข้อ สีข้อต่อใบ สีปล้อง สียอดเกสรตัวเมีย สียอดดอก สีกลีบรองดอก และหางข้าว

1.3 ข้อมูลทางปริมาณจำนวน 7 ลักษณะ ได้แก่ ความสูงที่ระยะเก็บเกี่ยว (เซนติเมตร) ความกว้างและความยาวของใบ (เซนติเมตร) จำนวนระแง่ต่อรวง จำนวนเมล็ดต่อรวง เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี และผลผลิต

2. บันทึกข้อมูลการวิเคราะห์ชนิดของกรดอะมิโน ดังนี้

2.1 บันทึกระยะทางของสารละลายเป็นเซนติเมตร

2.2 บันทึกระยะทางของ spot ตัวอย่างทั้ง 53 ตัวอย่าง

2.3 หาค่า  $R_f$  value โดยคำนวณจาก

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางของจุดศูนย์กลาง spot จากจุดเริ่มต้นจนถึงจุดสุดท้าย}}{\text{ระยะทางของตัวทำละลายจากจุดเริ่มต้นจนถึง solvent front}}$$

2.4 เปรียบเทียบกับ  $R_f$  ของ standard amino acid

2.5 เปรียบเทียบสีของ spot ของ standard amino acid กับ spot ของสารละลายตัวอย่าง

2.6 บันทึกค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างโดยเทียบกับกรดอะมิโนมาตรฐาน

### 3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของข้าวไร่แต่ละตัวอย่างพันธุ์ นำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (C.V., %) ส่วนปริมาณของกรดอะมิโนจำเป็นที่คำนวณได้ในแต่ละตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD (Least Significant Difference)