

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองทั้งหมดในการศึกษานี้ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางเกษตร และ
ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่เดือนกันยายน พ.ศ. 2543 ถึง
เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2547 โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลอง ในการทดลองที่ 1 และ 2
แช่ข้าวในน้ำไว้ 2 วันหลังจากนั้นนำข้าวห่อผ้าไว้ประมาณ 2 วันก่อนนำไปปลูกทดสอบ ส่วนการ
ทดลองที่ 3.1 และ 3.2 เพาะเมล็ดข้าวบนกระดาษเพาะความงอกที่ชุ่มน้ำใน petri dish ประมาณ
7 วัน หลังจากนั้นนำไปปลูกทดสอบ การทดลองทั้ง 4 การทดลองปลูกทดสอบในทราย (sand
culture) โดยรดด้วยสารละลายธาตุอาหารพืชสูตรของ Kimura B คือ ไนโตรเจน (N) 22 ppm
ฟอสฟอรัส (P) 5.6 ppm โพแทสเซียม (K) 21.4 ppm แคลเซียม (Ca) 14.6 ppm แมกนีเซียม
(Mg) 13.3 ppm (Yoshida *et al.*, 1976) ร่วมกับระดับเหล็กต่างกัน รายละเอียดการทดลองมีดัง
นี้

การทดลองที่ 1 การเปรียบเทียบพันธุ์และสายพันธุ์ข้าว 39 พันธุ์/สายพันธุ์ ภายใต้สภาพ
การขาดธาตุเหล็ก

พันธุ์และสายพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 39 พันธุ์/สายพันธุ์

- | | |
|-----------------|-----------------------|
| 1. แดงหอม | 11. SPT 84051 |
| 2. ชิวลา | 12. PRE 87003-1-3-1-1 |
| 3. ข้าวแดง | 13. ชิวแม่จัน |
| 4. ข้าวเฟี้ยไฮ | 14. บือพะทอ |
| 5. # 024 URN 16 | 15. หอมภูพาน |
| 6. # 052 URN 44 | 16. บือซ่า |
| 7. # 039 URN 31 | 17. เจ้าเหลือง 11 |
| 8. # 027 URN 19 | 18. กข 10 |
| 9. # 015 URN 07 | 19. กข 6 |
| 10. จอนแดง | 20. หอมนางฟ้า |

- | | |
|------------------------|------------------------------|
| 21. กข 27 | 31. เหนียวอุบล 2 |
| 22. เหนียวเมืองปาย | 32. เหนียวสันป่าตอง |
| 23. ดอกพรวัว | 33. ข้าวขาวเปลือกดำ (แม่แดง) |
| 24. กข 15 | 34. แดงขอนแก่น |
| 25. ขาวดอกมะลิ (LR 02) | 35. จะฟูฟู |
| 26. SPTLR 84051 | 36. จะนะแนะะ |
| 27. RD 6D-20G-27 | 37. Basmati 5854 |
| 28. ขาวดอกมะลิ 105 | 38. Madhuka |
| 29. ชัยนาท 1 | 39. Milagrosa |
| 30. หอมพิษณุโลก 1 | |

ในการทดลองนี้เพื่อทดสอบพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบสูง และปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบต่ำ โดยใช้พันธุ์และสายพันธุ์ข้าวไทยทั้งหมด 36 พันธุ์/สายพันธุ์ พันธุ์ข้าวต่างประเทศ 3 พันธุ์ (พันธุ์ที่ 37-39) และใช้พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์ตรวจสอบ ปลุกทดสอบในกระบะทรายโดยปลูกเป็นแถวแถวละหนึ่งพันธุ์ ระยะปลูก 2 x 2 ซ.ม. ในแต่ละกระบะจะปลูกพันธุ์ตรวจสอบทุกกระบะ รดด้วยสารละลายธาตุอาหารสูตรของ Kimura B (Yoshida *et al.*, 1976) ที่ขาดเหล็ก (ความเข้มข้นของเหล็ก 0 ppm) เมื่ออายุได้ 60 วัน เก็บบันทึกข้อมูลปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบอ่อนที่แผ่ขยายเต็มที่แล้ว (YEB: youngest emerged blade) ด้วยเครื่องคลอโรฟิลล์มิเตอร์ (SPAD 502 มีหน่วยเป็น SPAD unit) โดยวัด 3 จุดคือ ปลายใบ กลางใบ และโคนใบ

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลกระทบของทางสรีระต่อประสิทธิภาพการดูดใช้ธาตุเหล็กในพันธุ์ข้าวไทย

เพื่อบ่งชี้กลไกทางสรีระที่ทำให้เกิดความแตกต่างในการดูดใช้ธาตุเหล็กในพันธุ์ข้าวที่ทนและไม่ทนต่อการขาดธาตุเหล็ก วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลสองปัจจัยแบบแผนสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Factorial in Randomized Complete Block Design) ทำการทวนซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้พันธุ์ข้าว 5 พันธุ์ ที่ได้จากการทดลองที่ 1 ได้แก่ พันธุ์หอมภูพาน พันธุ์เจ้าเหลือง 11 พันธุ์หอมพิษณุโลก 1 พันธุ์ กข 10 และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์ตรวจสอบ และให้สารละลายที่มีระดับความเข้มข้นของเหล็ก 2 ระดับ คือ 0 ppm (Fe0) และ 3.5 ppm (Fe3.5) โดยปลูกในกระถางบรรจุทราย ให้กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 ซ.ม. ลึก 30 ซ.ม. รองกันกระถางด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรูระบายน้ำ แต่ละกระถางปลูกข้าวหนึ่งพันธุ์ แต่ละพันธุ์ปลูก 5 ต้น โดยหยอด

เมล็ดข้าวแต่ละพันธุ์ในหลุม 5 หลุม หลุมละ 3 เมล็ด หลังจากนั้น 7 วัน ถอนแยกให้เหลือหลุมละ 1 ต้น รดด้วยสารละลายธาตุอาหารสูตรของ Kimura B (Yoshida *et al.*, 1976) ที่ขาดเหล็ก (Fe0) และสารละลายธาตุอาหารพืชที่มีเหล็ก 3.5 ppm (Fe3.5) ทุกวันเช้า-เย็น กระจายละ 1 ลิตร เก็บข้อมูลที่ 3 ระยะการเจริญเติบโต ได้แก่ ระยะเริ่มสร้างตาดอก (panicle initiation: PI) ระยะตั้งท้อง (booting) และระยะสุกแก่ (maturity)

ข้อมูลที่บันทึก ได้แก่

1. ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบอ่อนที่แผ่ขยายเต็มที่แล้ว (YEB: youngest emerged blade) ด้วยเครื่องคลอโรฟิลล์มิเตอร์ (SPAD 502 มีหน่วยเป็น SPAD unit)
2. จำนวนหน่อต่อต้น (Tiller plant⁻¹)
3. น้ำหนักแห้งต้น (Shoot dry weight plant⁻¹)
4. น้ำหนักราก (Root dry weight plant⁻¹)
5. ผลผลิต (Yield plant⁻¹)
6. ปริมาณความเข้มข้นของเหล็ก (Fe concentration) ในส่วนต่างๆ ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ดังนี้
 - ราก (root)
 - ใบอ่อนที่สุดที่แผ่ขยายเต็มที่ (youngest emerged blade: YEB)
 - ใบ (leaf)
 - ส่วนที่เหลือ (remainders)
 - เมล็ด (seed)
7. ปริมาณธาตุเหล็ก (Fe content) ในส่วนต่างๆ ด้วยวิธีการคำนวณ ดังนี้

(ปริมาณความเข้มข้นของเหล็ก X น้ำหนักแห้ง)/ 1000

 - ราก (root)
 - ใบอ่อนที่สุดที่แผ่ขยายเต็มที่ (youngest emerged blade: YEB)
 - ใบ (leaf)
 - ส่วนที่เหลือ (remainders)
 - เมล็ด (seed)
 - ส่วนเหนือดินทั้งหมด (Whole shoot)

8. สมรรถภาพในการดูดธาตุเหล็ก (Fe uptake efficiency) จากการคำนวณดังนี้

$$\frac{\text{ปริมาณธาตุเหล็กส่วนราก} + \text{ปริมาณธาตุเหล็กส่วนเหนือดินทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักแห้งราก}}$$

น้ำหนักแห้งราก

การทดลองที่ 3 ศึกษากลไกการตอบสนองระดับโมเลกุลต่อสมรรถภาพการดูดใช้ธาตุเหล็กในพันธุ์ข้าวไทย โดยวิธีการวัดทางอ้อม

แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองที่ 3.1 การตอบสนองของพันธุ์ข้าวไทยและข้าวสาลีต่อการปลดปล่อยสารไฟโตไซด์โรเฟอร์ (phytosiderophores)

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลสองปัจจัยแบบแผนสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Complete Randomized Design) ทำการทวนซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้ พันธุ์ข้าว 2 พันธุ์ ที่เลือกจากการทดลองที่ 2 ได้แก่ พันธุ์หอมพิษณุโลก 1 และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสาลี 1 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ฝาง 60 โดยมีการจัดพันธุ์ข้าวและข้าวสาลีตามรูปแบบการปลูกได้ 6 แบบ ดังนี้

- 1: พันธุ์หอมพิษณุโลก 1
- 2: พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105
- 3: พันธุ์ฝาง 60
- 4: พันธุ์หอมพิษณุโลก 1 ปลูกร่วมกับพันธุ์ฝาง 60
- 5: พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ปลูกร่วมกับพันธุ์ฝาง 60
- 6: พันธุ์หอมพิษณุโลก 1 ปลูกร่วมกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

โดยให้สารละลายที่มีระดับความเข้มข้นของเหล็ก 2 ระดับ คือ 0 ppm (Fe0) และ 3.5 ppm (Fe3.5) ปลูกทดสอบในกระบะพลาสติกบรรจุทรายขนาด 32 x 45.5 ซม. รองกันกระบะด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรูระบายน้ำ โดยแต่ละกระบะปลูก 4 แถว ระยะปลูก 8 x 4 ซม. แถวละ 10 หลุม หยอดหลุมละ 3 เมล็ด หลังจากนั้น 7 วัน ถอนแยกให้เหลือหลุมละ 1 ต้น กระบะที่ปลูกสองพันธุ์จะปลูกพันธุ์ละ 2 แถว รดด้วยสารละลายธาตุอาหารสูตรของ Kimura B ที่ขาดเหล็ก (Fe0) และสารละลายที่มีเหล็ก 3.5 ppm (Fe3.5) ทุกวันเช้า-เย็น กระบะละ 1 ลิตร บันทึกข้อมูลเมื่ออายุได้ 30 วัน หลังย้ายปลูก

ข้อมูลที่บันทึก ได้แก่

1. ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบอ่อนที่แผ่ขยายเต็มที่แล้ว (YEB: youngest emerged blade) ด้วยเครื่องคลอโรฟิลล์มิเตอร์ (SPAD 502 มีหน่วยเป็น SPAD unit)
2. จำนวนหน่อต่อต้น (Tiller plant⁻¹)

3. น้ำหนักแห้งต้น (Shoot dry weight plant⁻¹)
4. น้ำหนักราก (Root dry weight plant⁻¹)
5. ปริมาณความเข้มข้นของเหล็ก (Fe concentration) ในส่วนต่างๆ ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ดังนี้
 - ราก (root)
 - ใบอ่อนที่สุดที่แผ่ขยายเต็มที่ (youngest emerged blade: YEB)
 - ส่วนที่เหลือ (remainders)
6. ปริมาณธาตุเหล็ก (Fe content) ในส่วนต่างๆ ดังนี้
(ปริมาณความเข้มข้นของเหล็ก X น้ำหนักแห้ง)/ 1000
 - ราก (root)
 - ใบอ่อนที่สุดที่แผ่ขยายเต็มที่ (youngest emerged blade: YEB)
 - ส่วนที่เหลือ (remainders)
 - ส่วนเหนือดินทั้งหมด (Whole shoot)
7. สมรรถภาพในการดูดธาตุเหล็ก (Fe uptake efficiency) จากการคำนวณดังนี้

$$\frac{\text{ปริมาณธาตุเหล็กส่วนราก} + \text{ปริมาณธาตุเหล็กส่วนเหนือดินทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักแห้งราก}}$$

การทดลองที่ 3.2 การตอบสนองของพันธุ์ข้าวไทยและข้าวสาลีต่อการปลดปล่อยสารไฟโตไซด์โรเฟอร์ (phytosiderophores) ที่อายุ 30 วันหลังย้ายปลูก และที่ระยะเริ่มสร้างตาดอก (panicle initiation: PI)

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลสองปัจจัยแบบแผนสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Factorial in Randomized Complete Block Design) ทำการทวนซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้พันธุ์ข้าว 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์หอมพิษณุโลก 1 และพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวสาลี 1 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ฝาง 60 โดยมีการจัดพันธุ์ข้าวและข้าวสาลีตามรูปแบบการปลูกได้ 5 แบบ ดังนี้

- 1: พันธุ์หอมพิษณุโลก 1
- 2: พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105
- 3: พันธุ์ฝาง 60
- 4: พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ปลูกร่วมกับพันธุ์ฝาง 60
- 5: พันธุ์หอมพิษณุโลก 1 ปลูกร่วมกับพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105

โดยให้สารละลายที่มีระดับความเข้มข้นของเหล็ก 2 ระดับ คือ 0 ppm (Fe0) และ 3.5 ppm (Fe3.5) ปลูกทดสอบในกระถางบรรจุทรายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 ซม. ลึก 30 ซม. รองก้นกระถางด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรูระบายน้ำ โดยปลูกเป็นหลุม กระถางละ 6 หลุม หยอดหลุมละ 3 เมล็ด หลังจากนั้น 7 วัน ถอนแยกให้เหลือหลุมละ 1 ต้น กระถางที่ปลูกสองพันธุ์จะปลูกพันธุ์ละ 3 หลุม รดด้วยสารละลายธาตุอาหารสูตรของ Kimura B ที่ขาดเหล็ก (Fe0) และสารละลายธาตุอาหารพืชที่มีเหล็ก 3.5 ppm (Fe3.5) ทุกวันเช้า-เย็น กระถางละ 1 ลิตร จะบันทึกข้อมูลเมื่ออายุได้ 30 วันหลังย้ายปลูก และที่ระยะเริ่มสร้างตาดอก (panicle initiation: PI) โดยบันทึกข้อมูลเหมือนในการทดลองที่ 3.1

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวที่ทดสอบกับพันธุ์ตรวจสอบโดยวิธี T-test

การทดลองที่ 2 - 3.2 วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบ CRD และ RCB และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองโดยใช้ LSD (Least Significant Difference) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%