บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ได้ศึกษาการตอบสนองต่อธาตุโบรอนของข้าวบาร์เลย์ลูกผสมชั่วที่ 3 ในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและในระยะสืบพันธุ์ ทดลองที่ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร และภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2544 ถึง เดือนสิงหาคม 2545 มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

สายพันธุ์และการสร้างประชากรลูกผสม

การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ลูกผสมของข้าวบาร์เลย์จากพ่อแม่จำนวน 3 สายพันธุ์ที่มีการตอบสนองต่อการขาดธาตุโบรอนในลักษณะดัชนีการติดเมล็ดแตกต่างกัน ประกอบด้วยสายพันธุ์ BRB 9604 (ทนต่อการขาดธาตุโบรอนมาก (B efficient, E)) สายพันธุ์ BRB 9 (ทนต่อการขาดธาตุโบรอนปานกลาง (Moderate B efficient, ME)) (Jamjod and Rerkasem, 1999) และสายพันธุ์ BCMU 96-9 (อ่อนแอต่อการขาดโบรอน (B inefficient, I)) (ศันสนีย์และคณะ 2543) ปลูกข้าวบาร์เลย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ เพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 3 คู่ผสม เมื่อได้ลูกผสมชั่วที่หนึ่งแล้วนำไปปลูกในสภาพที่โบรอนเพียงพอ เพื่อผลิตลูกผสมชั่วที่ 2 ปลูกลูกผสมชั่วที่ 2 แบบต้นเดี่ยว แล้วเก็บเมล็ดชั่วที่ 3 แยกต้น โดยเมล็ดที่เก็บจากแต่ละต้นถือเป็น 1 family จำนวน family ของลูกผสมชั่วที่ 3 ที่นำมาศึกษามีดังนี้

1. คู่ผสม BRB 9604 (E) x BRB 9 (ME) จำนวน 96 families
2. คู่ผสม BRB 9604 (E) x BCMU 96-9 (I) จำนวน 32 families
3. คู่ผสม BRB 9 (ME) x BCMU 96-9 (I) จำนวน 43 families

วิธีการปลูกทดสอบและการดูแลรักษา

ล้างทรายใส่ในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ลึก 30 เซนติเมตร รองก้นกระถางด้วยถุงพลาสติกที่เจาะรูระบายน้ำ แล้วปลูกถั่วเขียวพันธุ์ Regur เพื่อทดสอบปริมาณธาตุโบรอนที่ตกค้างอยู่ในทรายก่อนปลูกข้าวบาร์เลย์ โดยสังเกตุการเกิดยอดของถั่วเขียวเมื่ออายุ 1 สัปดาห์ ถ้าถั่วเขียวไม่มียอดแสดงว่าทรายมีธาตุโบรอนต่ำพอที่จะใช้ทดลองได้ จากนั้นถอนถั่วเขียวออกและปลูกข้าวบาร์เลย์ซึ่งเพาะเมล็ดให้งอกก่อนย้ายไปปลูก โดยปลูก 10 ต้น/family ปลูก 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

families/กระถาง ปลูกสายพันธุ์พ่อแม่ สายพันธุ์ละ 2 กระถาง แต่ละ family และสายพันธุ์พ่อแม่จะปลูกในโบรอน 2 ระดับ คือ ไม่ใส่โบรอน (B0) และใส่โบรอน 10 μM (B10) ปลูกพันธุ์ BCMU96-9 เป็นพันธุ์ check ไว้ตรงกลาง 1 ต้น หลังปลูกรดด้วยสารละลายธาตุอาหารพืช ประกอบด้วยส่วนผสมของสารที่มีความเข้มข้นดังนี้ คือ $CaCl_2$ 1000 μM, $MgSO_4$ 250 μM, KH_2PO_4 500 μM, FeEDTA 10 μM, K_2SO_4 250 μM, $MnSO_4$ 1 μM, $ZnSO_4$ 0.5 μM,$CuSO_4$ 0.2 μM, $CoSO_4$ 0.1 μM, Na_2MoO_4 0.1 μM (Broughton and Dilworth, 1971) และ KNO_3 5000 μM ซึ่งมีโบรอนในระดับต่างๆ ครั้งละ 1 ลิตร/กระถางทุกเช้าและเย็น และทำการกำจัดแมลงศัตรูพืชเมื่อพบระบาด

การบันทึกข้อมูลและลักษณะที่ทำการศึกษา

บันทึกข้อมูลรายต้นในแต่ละ family และสายพันธุ์พ่อแม่ก่อนการเก็บเกี่ยวโดยบันทึกจำนวนหน่อต่อต้นที่ระยะ 30 วันหลังปลูก และบันทึกอายุวันออกรวงโดยนับตั้งแต่วันปลูกจนถึงระยะดอกบาน (anthesis) ของรวงหลัก หลังเก็บเกี่ยวบันทึกจำนวนหน่อต่อต้นอีกครั้ง วัดความสูงต้น (เซนติเมตร) โดยวัดส่วนที่อยู่เหนือดินจนถึงปลายรวงแต่ไม่รวมหาง จำนวนรวงต่อต้น (spike plant^{-1}) จำนวนช่อดอกย่อยต่อรวง (spikelets plant^{-1}) จำนวนเมล็ดต่อรวง (grain plant^{-1}) และดัชนีการติดเมล็ด (Barley Grain Set Index, BGSI) โดยสามลักษณะหลังบันทึกจาก 2 รวงจากต้นหลักและหน่อแรก ค่า BGSI ของข้าวบาร์เลย์ 2 แถวคำนวณจากเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดจากดอกกลางของแต่ละช่อดอกย่อยบริเวณกลางรวงจำนวน 10 ช่อดอกย่อย (Jamjod and Rerkasem, 1999) ส่วนที่เหลือนำมานวดและแยกชั่งเป็น น้ำหนักเมล็ด (กรัม/ต้น) และน้ำหนักฟาง (กรัม/ต้น)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลจากแต่ละ family ในโบรอนแต่ละระดับนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนภายในประชากร (within family) และเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ ในกรณีที่ สามารถแบ่งกลุ่ม family ได้ตามการตอบสนองของสายพันธุ์พ่อแม่ คำนวณหาจำนวนยีนที่ควบคุมใช้วิธี chi-square และการเปรียบเทียบค่าความแปรปรวน โดยมีรายละเอียดดังนี้

<u>การวิเคราะห์ chi-square</u>

- Families ที่มีค่าเฉลี่ยและค่าความแปรปรวนภายใน Family อยู่ในขอบเขตของพ่อแม่พันธุ์ที่ทนหรือพันธุ์ที่อ่อนแอกว่า จะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของ Homozygous efficient หรือ Homozygous inefficient

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Families ที่มีค่าเฉลี่ยอยู่นอกขอบเขตของพ่อแม่ แต่มีค่าความแปรปรวนภายใน Family อยู่ในขอบเขตของพ่อแม่ จะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของ Homozygous intermediate และ
- Families ที่มีค่าความแปรปรวนภายใน Family สูงกว่าขอบเขตของพ่อแม่ จะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของ Segregating

<u>ค่าควดหมายของจำนวนยีนที่ควบคุมเป็นดังนี้คือ</u>

1. ถ้าลักษณะที่ศึกษาถูกควบคุมด้วยยีนจำนวน 1 คู่ จะมีอัตราส่วนทางพันธุกรรม homozygous efficient (AA) : segregating (Aa) : homozygous inefficient (aa) = 1 : 2 : 1
2. ถ้าลักษณะที่ศึกษาถูกควบคุมด้วยยีนจำนวน 2 คู่ จะมีอัตราส่วนทางพันธุกรรม homozygous efficient (AABB) : homozygous intermedite (AAbb, aaBB) + segregating (A_B_, aaB_, A_bb) : homozygous inefficient (aabb) = 1 : 14 : 1

<u>การเปรียบเทียบความแปรปรวน</u>

เปรียบเทียบค่าความแปรปรวนที่สังเกต (Observed variance) กับค่าความแปรปรวนคาดหมาย (Expected variance) ซึ่ง Expected variance สามารถคำนวณได้ โดยอาศัยสมติฐานดังนี้ (Mather and Jinks อ้างโดย Jamjod (1996))

1. ถ้าลักษณะถูกควบคุมโดยยีนจำนวน 1 คู่

$$V_{F3} = \tfrac{3}{4}d^2 + E$$

2. ถ้าลักษณะถูกควบคุมโดยยีนจำนวน 2 คู่

$$V_{F3} = \tfrac{3}{8}d^2 + E$$

เมื่อ V_{F3} คือ Expected variance ของประชากรชั่วที่ 3

d คือ ระยะห่างระหว่างพ่อแม่ถึง mid-parent

E คือ ค่าความแปรปรวนที่เกิดจากสิ่งแวดล้อม

โดยค่า E หาได้จากสมการดังนี้

$$E = \tfrac{1}{2}(V_{P1} + V_{P2})$$

เมื่อ V_{P1} และ V_{P2} คือ ค่าความแปรปรวนของพ่อ-แม่ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปรียบเทียบค่า Expected variance กับช่วงความเชื่อมั่นของ observed variance (Confidence interval) ของประชากรชั่วที่ 3 ซึ่งคำนวณได้จากดังนี้

$$(V_0 \times df)\,\chi^2_a \leq \text{Confidence interval} \leq (V_0 \times df)\,\chi^2_b$$

เมื่อ V_0 คือ ค่า observed variance ของประชากรชั่วที่ 3

df คือ degree of freedom ที่ n-1

n คือ จำนวน families ที่ปลูกทดสอบในแต่ละคู่ผสม

χ^2_a และ χ^2_b คือ ค่าที่เปิดจากตาราง chi-square ที่ P = 0.95 และ P = 0.05 ตามลำดับ , df = n-1

ถ้าค่า Expected variance อยู่ในช่วงของ Confidence interval แสดงว่ายอมรับตามสมมติฐานนั้น ๆ

ในกรณีที่ไม่สามารถหาจำนวนยีนที่ควบคุมโดยสองวิธีดังกล่าวข้างต้น ใช้วิธีการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยของลักษณะเมื่อปลูกใน B0 เทียบกับ B10 (B0/B10) และความแปรปรวนภายใน family เมื่อปลูกใน B0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved