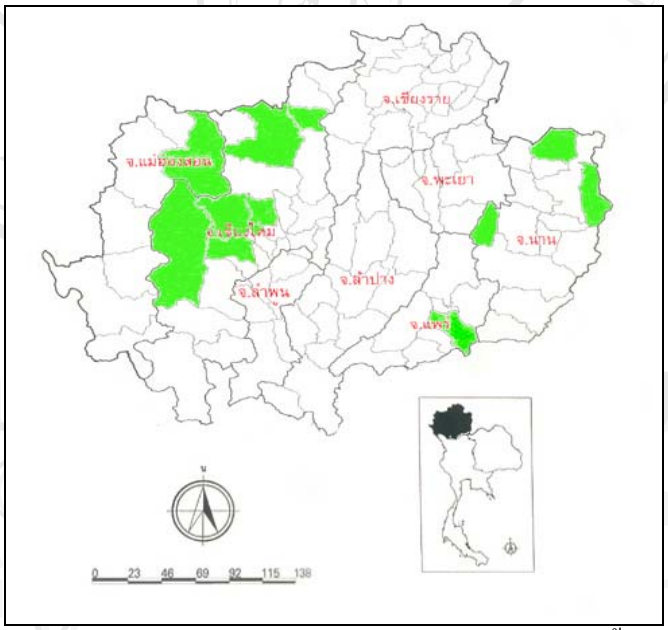
บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษานี้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 เป็นการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรข้าวพื้นเมืองพันธุ์เหมยนอง และการทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาการตอบสนองของการเข้าทำลายของแมลงบั่วและผลผลิตต่อสภาพแวดล้อมในแต่ละพื้นที่ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

3.1 การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรข้าว

3.1.1 เมล็ดจากเกษตร

การศึกษานี้ใช้เมล็ดพันธุ์ข้าวพื้นเมืองพันธุ์เหมยนอง ซึ่งเก็บจากยุ้งฉางของเกษตรกรจำนวน 83 ตัวอย่าง โดยรวบรวมจากจังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน น่านและแพร่ (ภาพ 3.1.1 และตาราง 3.1.1)



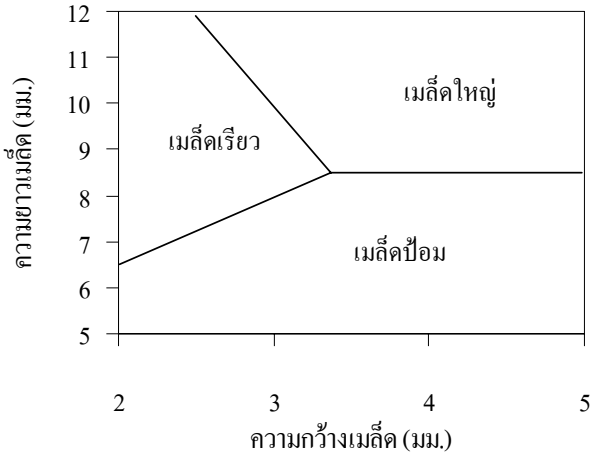
ภาพ 3.1.1 แผนที่แสดงแหล่งที่ได้รวมรวมเมล็ดพันธุ์ของประชากรข้าวพื้นเมืองพันธุ์เหมยนองในภาคเหนือของประเทศไทย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.1.1 แหล่งที่มาของเมล็ดข้าวเหมยนองจาก 9 แหล่งที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางสัณฐาณวิทยา

ลำดับที่	แหล่งที่มาของข้าวเหมยนอง*	จำนวนตัวอย่าง	ชื่อในงานทดลอง
1	อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่	9	MW
2	อำเภอเม่ริม จังหวัดเชียงใหม่	2	MR
3	อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่	18	CHD
4	อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่	8	CPG
5	อำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่	32	MCH
6	อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่	1	SM
7	อำเภอปาย จังหวัดแม่ฮ่องสอน	2	PAI
8	จังหวัดน่าน	7	NAN
9	เหมยนอง 62M (พันธุ์ปรับปรุง) จาก ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ จังหวัดแพร่	1	MN 62M
รวม		83	

* รายละเอียดของตัวอย่างข้าวและแหล่งที่มาดูภาคผนวก 1-3



ภาพ 3.1.2 วิธีประเมินประเภทของเมล็ด โดยใช้สัดส่วนขนาดเมล็ดตามวิธีของ Matsuo (1952)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สุ่มตัวอย่างข้าวจากเกษตรกรเพื่อประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตัวอย่างละ 100 เมล็ด นำมาวัดขนาดและประเภทของเมล็ด โดยวัดจากสัดส่วนความยาวและความกว้างเมล็ดตามวิธีของ Matsuo (1952) อ้างโดย Oka (1988) (ภาพ 3.1.2) บันทึกสีเปลือก และแกะเปลือกเพื่อบันทึกสีเยื่อหุ้มเมล็ด จากนั้นนำเมล็ดข้าวไปสีและขัดขาว เพื่อประเมินการปนของข้าวเจ้า (โดยทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน) และวัดความอ่อนนุ่มของข้าวจากการสลายตัวในด่างโดยทดสอบด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ตามวิธีของ งามชื่น (2545)

3.1.2 การทดสอบรุ่นลูก (progeny test)

สุ่มประชากรข้าวแต่ละตัวอย่างไปปลูกทดสอบในรุ่นลูก ปลูกตัวอย่างละ 20 ต้น โดยปลูกตัวอย่างข้าวทั้งหมดในกระถางดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร เมื่อต้นข้าวถึงระยะแตกกอเก็บตัวอย่างใบอ่อนของแต่ละตัวอย่างแยกต้นจากตัวอย่างที่ปลูกในกระถางเพื่อนำไปวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลต่อไป แล้วบันทึกข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา (IRRI-IBPRG, 1980) โดยวัดทั้ง 20 ต้น ในระยะต่างๆ (ภาพ 3.1.3) ดังนี้

ระยะแตกกอ บันทึกลักษณะของ สีแผ่นใบ สีกาบใบ สีลิ้นใบ สีหูใบ

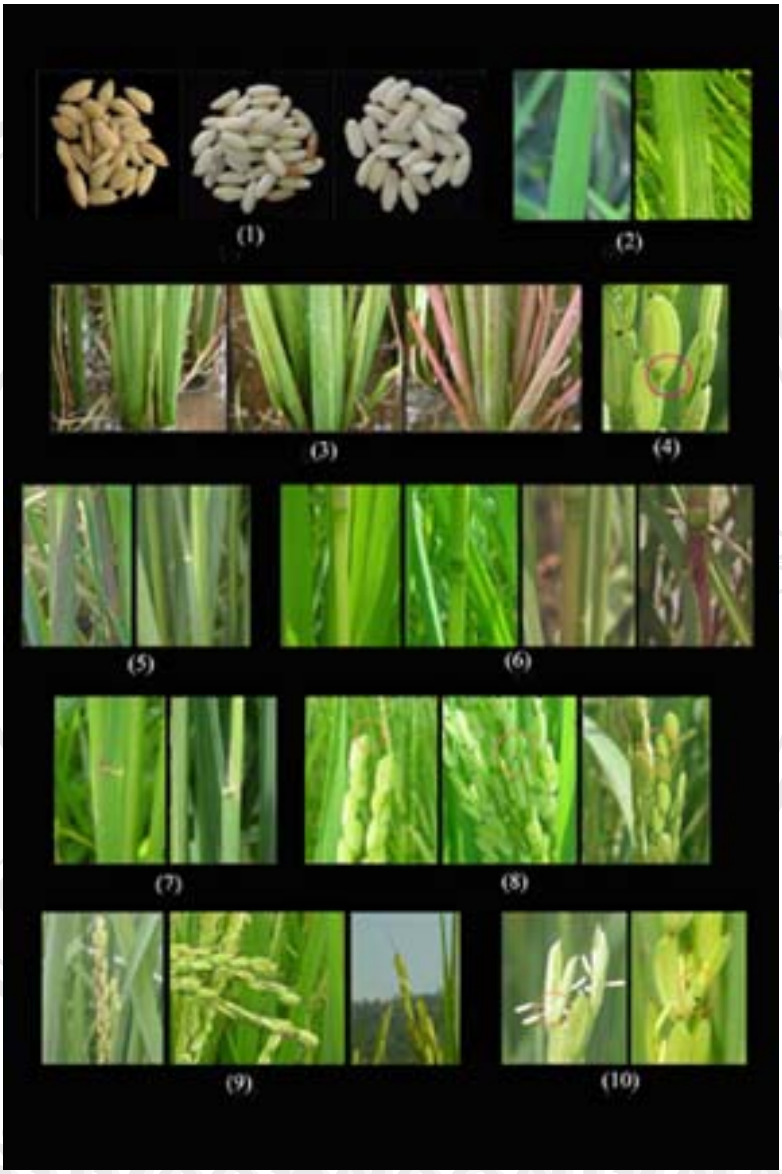
ระยะออกดอก บันทึกลักษณะของทรงกอ สีข้อ สีปล้อง สีกลีบรองดอก สียอดเกสรตัวเมีย สียอดดอก การมีหาง และวันออกดอก

ระยะเก็บเกี่ยว บันทึกวันเก็บเกี่ยว ความสูงของต้น

ระยะหลังเก็บเกี่ยว วัดความกว้างเมล็ด ความยาวเมล็ด รูปร่างเมล็ด และบันทึกสีเปลือกและ สีเยื่อหุ้มเมล็ด โดยสุ่มวัดต้นละ 5 เมล็ด

ตัวอย่างใบจะถูกเก็บไว้ในซิลิกาเจลเพื่อเก็บเป็นตัวอย่างแห้งและรักษาสภาพดีเอ็นเอไว้ สุ่มตัวอย่างจากประชากร ประชากรละ 1-3 ตัวอย่าง (ตาราง 3.1.2) รวมทั้งหมด 18 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 10 ต้น นำตัวอย่างใบที่แห้งไปบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วจึงนำไปสกัด DNA โดยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) นำ DNA ที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยอาศัยเทคนิค microsatellite markers ใช้ microsatellite locus 5 ตำแหน่ง (ตาราง 3.1.3) นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ไปตรวจสอบด้วย 10% polyacrylamide gel electrophoresis นำเจลที่ได้ย้อมด้วยสาร ethidium bromide เพื่อนำไปดูการเกิดลายพิมพ์ DNA ภายใต้แสงยูวีของเครื่อง UV transilluminator แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล จากนั้นนำมาถ่ายลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาให้คะแนนการเกิดแถบดีเอ็นเอตำแหน่งที่น้ำหนักโมเลกุลเดียวกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.1.3 ตัวอย่างภาพของลักษณะคุณภาพที่ใช้ในการประเมิน

(1) = สีเปลือกและสีเยื่อหุ้มเมล็ด (2) = สีแผ่นใบ (3) = ทรงกอ

(4) = สีกลีบรองดอก (5) = สีกาบใบ (6) = สีข้อและปล้อง

(7) = สีหูและลิ้นใบ (8) = สียอดดอก (9) = การมีหางของเมล็ด

(10) = สีเกสรตัวเมีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.1.2 ข้าวเหมยนอง 18 ตัวอย่างจาก 9 แหล่งที่ใช้ในการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุล

ลำดับที่	แหล่งที่มาของข้าวเหมยนอง*	จำนวนตัวอย่าง	ชื่อตัวอย่างในงานทดลอง
1	อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่	2	MW
2	อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่	2	MR
3	อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่	2	CHD
4	อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่	2	CPG
5	อำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่	3	MCH
6	อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่	1	SM
7	อำเภอปาย จังหวัดแม่ฮ่องสอน	2	PAI
8	จังหวัดน่าน	3	NAN
9	เหมยนอง 62M (พันธุ์ปรับปรุง) จากศูนย์วิจัยข้าวแพร่ จังหวัดแพร่	1	MN 62M
รวม		18	

ตาราง 3.1.3 Microsatellite makers 5 ตำแหน่งที่ใช้ในประเมินความหลากหลายข้าวเหมยนองในระดับโมเลกุล

Primers	Chro	Repeat Motif	Forward Primer	Reverse Primer	Anneal Temp.
RM1	1	(AG)26	5'..GCGAAAACACAATGCAAAAA..3'	5'..GCGTTGGTTGGACCTGAC..3'	55 °C
RM149	8	(AT)10	5'..GCTGACCAACGAACCTAGGCCG..3'	5'..GTTGGAAGCCTTTCCTCGTAACACG..3'	55 °C
RM167	11	(GA)16	5'..GATCCAGCGTGAGGAACACGT..3'	5'..AGTCCGACCACAAGGTGCGTTGTC..3'	55 °C
RM211	2	(TC)3A(TC)18	5'..CCGATCTCATCAACCAACTG..3'	5'..CTTCACGAGGATCTCAAAGG..3'	55 °C
RM219	9	(CT)17	5'..CGTCGGATGATGTAAAGCCT..3'	5'..CATATCGGCATTCGCCTG..3'	55 °C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ลักษณะทางคุณภาพ ประเมินความหลากหลายภายในประชากรและระหว่างประชากรโดยนำลักษณะทางคุณภาพที่ศึกษาทั้งหมด 14 ลักษณะไปแบ่งกลุ่มตามชนิดลักษณะที่พบแตกต่างกันไป และประเมินความหลากหลายภายในตัวอย่างโดยใช้ค่าความหลากหลาย Shannon-Weaver index ในการวิเคราะห์ความหลากหลาย โดยคำนวณจากสูตร (Shannon and Weaver, 1949 อ้างโดย Coffey, 2002)

$$H' = -\sum_{i=1}^{S} pi \ln pi$$

โดยที่ S = จำนวนชนิดความแตกต่างที่พบในลักษณะที่บันทึก

pi = สัดส่วนของชนิดนั้นต่อจำนวนทั้งหมด

การพิจารณาความหลากหลายนี้ หากพบว่า ค่า H' เท่ากับศูนย์ แสดงว่าทุกต้นในตัวอย่างเหมือนกันหมด และเมื่อค่า H' มีค่าสูงขึ้นแสดงว่ามีความหลากหลายสูงขึ้น

2. ลักษณะทางปริมาณ นำไปคำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (sd) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV, %)

3. ลักษณะทางโมเลกุล พิจารณาโดยนำภาพถ่ายลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาให้คะแนนการเกิดแถบดีเอ็นเอที่น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เดียวกัน โดย 0 หมายถึง ไม่มีแถบและ 1 หมายถึง ปรากฏแถบ แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่าง โดยวิธี cluster analysis ด้วยโปรแกรม POPGENE 32 (Population Genetic Analysis) (Yeh *et al*., 1999) คำนวณค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (genetic distance) (Nei, 1972) และนำค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมที่ได้มาสร้าง dendrogram โดยวิธีการ UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Aritmetic Average) ด้วยโปรแกรม MEGA 2 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis, Version 2) (Kumar, 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2. การประเมินความต้านทานแมลงบั่วและการให้ผลผลิตของสายพันธุ์ข้าวเหมยนองพันธุ์พื้นเมืองในพื้นที่ต่าง ๆ

3.2.1 ประชากรข้าว

ใช้ข้าวพื้นเมืองพันธุ์เหมยนองที่เก็บจากต่างท้องถิ่น 7 ตัวอย่าง ได้แก่

1. ต.เมืองคอง อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
2. อ.ปาย จ.แม่ฮ่องสอน
3. อ. แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่
4. อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่
5. อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ ประชากรที่ 1
6. อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ ประชากรที่ 2
7. อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ ประชากรที่ 3

ใช้ข้าวพันธุ์ปรับปรุงที่ต้านทานแมลงบั่ว (เหมยนอง 62M ซึ่งเป็นพันธุ์คัดเลือกของทางราชการ) และพันธุ์ข้าวปรับปรุงที่ไม่ต้านทานแมลงบั่ว (สันป่าตอง 1 และ กข 6) เป็นพันธุ์ตรวจสอบมาตรฐาน

3.2.2 วิธีการทดลอง

การทดลองนี้ปลูกทดสอบในพื้นที่ต่าง ๆ 2 ฤดูปลูก คือ ในปี 2547 และ ปี 2548 ดังนี้

ในปี 2547 ปลูกทดสอบ 3 พื้นที่ ได้แก่

1. บ้านแม่มูต อ.แม่วิน อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่
2. บ้านนาเรือน ต.ท่าผา อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่
3. บ้านแม่มิงค์ ต.ช่างเคิ่ง อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่

และในปี 2548 ปลูกทดสอบ 5 พื้นที่ ได้แก่

1. บ้านแม่มูต อ.แม่วิน อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่
2. บ้านนาเรือน ต.ท่าผา อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่
3. บ้านแม่มิงค์ ต.ช่างเคิ่ง อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่
4. บ้านหลวง ต.เมืองคอง อ.เชียงดาว จ. เชียงใหม่
5. ชุมชนสมัครสรรพการ ต.แม่สอด อ.แม่สอด จ.ตาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.3 วิธีการปลูกและการบำรุงรักษา

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวทุกตัวอย่างไปหว่านกล้า เมื่อต้นกล้ามีอายุประมาณ 30-45 วัน นำต้นกล้าไปปักดำในแปลงยาว 7.5 เมตร กว้าง 2.5 เมตร ระยะปลูกระหว่างแถว 25 เซนติเมตร และระหว่างหลุม 25 เซนติเมตร โดยในปีแรกปลูกตัวอย่างละ 1 ซ้ำ และปีที่สองวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block ปลูกจำนวน 2 ซ้ำต่อตัวอย่าง

การให้ปุ๋ย ใส่ปุ๋ยสูตร 16-20-0 ในระยะ 30 วันหลังปักดำ และไม่มีการใช้สารเคมีในการกำจัดแมลง

ตาราง 3.2.1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของพื้นที่ 5 แห่งที่ใช้ในการปลูกทดสอบผลผลิตข้าวเหมยนอง

พื้นที่	ลักษณะการปลูกข้าว	ความสูงจากระดับน้ำทะเล (เมตร)	ความชื้น
1. บ้านแม่มูต ต.แม่วิน อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่	ปลูกข้าวเหมยนองทุกปี	400	สูง
2. บ้านนาเรือน ต.ท่าผา อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่	ปลูกข้าวเหมยนองสลับกับข้าวปรับปรุง (กข 6 หรือ สันป่าตอง1)	550	ปานกลาง
3. บ้านแม่มิงค์ ต.ช่างเคิ่ง อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่	ปลูกข้าวเหมยนองทุกปี	630	สูง
4. บ้านหลวง ต.เมืองคอง อ.เชียงดาว จ. เชียงใหม่	ปลูกข้าวเหมยนองสลับกับข้าวปรับปรุง (กข 6 หรือ สันป่าตอง1)	700	สูง
5. ชุมชนสมัครสรรพการ ต.แม่สอด อ.แม่สอด จ.ตาก	ปลูกข้าวหอมมะลิ 105 ทุกปี	230	ต่ำ

3.2.4 การบันทึกข้อมูล

- นับจำนวนหลอดบั่ว และจำนวนหน่อทั้งหมด เพื่อนำไปหาเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของแมลงบั่ว ในระยะ 30 60 และ 80 วันหลังการปักดำ (จำนวน 20 ต้น/ซ้ำ)

- ผลผลิตของข้าว (กก./ไร่) (พื้นที่เก็บเกี่ยว 1 ตารางเมตร/แปลง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของแมลงบั่วสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\{(Ti / Tt) \times (Hi / Ht)\} \times 100$$

โดยที่ Ti = จำนวนหน่อที่พบหลอดบั่วของแต่ละกอ

Tt = จำนวนหน่อทั้งหมดของแต่ละกอ

Hi = จำนวนกอที่พบหลอดบั่ว

Ht = จำนวนกอทั้งหมด

ในปีแรก นำเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของแมลงบั่วและผลผลิตมาหาค่า Maen และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (se) เพื่อเปรียบเทียบในแต่ละพื้นที่ ส่วนข้อมูลของปีที่สองนำ เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของแมลงบั่ว และผลผลิตวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) หาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) (Steel and Terrie, 1960)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved