บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษานี้ประกอบด้วยการทดลอง 3 ชุด โดยการทดลอง ชุดที่ 1 เป็นการหาวิธีประเมินความแตกต่างในการเจริญเติบโตของต้นอ่อน ของข้าววัชพืชและข้าวปลูก สำหรับการทดลองชุดที่ 2 เป็นการประเมินลักษณะความยาว coleoptile ในประชากรข้าววัชพืช และการทดลอง ชุดที่ 3 เป็นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะความยาวต้นอ่อนของข้าววัชพืชและลักษณะต่างๆ ในลูกผสม โดยได้ ทดลองที่สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2550 ถึง กุมภาพันธ์ 2552

การทดลองชุดที่ 1 การหาวิธีประเมินความแตกต่างในการเจริญเติบโตของต้นอ่อน

<u>พันธุกรรม</u>

ใช้ตัวอย่างข้าววัชพืชชนิดไม่มีหาง จำนวน 3 ประชากร โดยเก็บตัวอย่าง จากแปลงเกษตรกรที่ อ.ลำลูกกา จ.ปทุมธานี คลอง 10 จ.ปทุมธานี และ อ.บางเลน จ. นครปฐม และข้าวปลูกจำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่พันธุ์สุพรรณบุรี 1 และ ชัยนาท 1

<u>การทดสอบในกระดาษเพาะความงอก</u>

เพาะตัวอย่างเมล็ดข้าวบนกระดาษเพาะเมล็ดชุบน้ำจนชุ่มวางในกล่องพลาสติกกลมมีฝาปิด ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 ซม สูง 15 ซม ปลูก พันธุ์ละ 10 เมล็ด จัดการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำทั้งหมด 5 ซ้ำ ทดลอง 2 ชุด โดยชุดแรกวัดความยาวต้นอ่อนหลังเพาะที่อายุ 7 วัน 14 วัน และ 21 วัน ส่วนที่ 2 วัดความยาว coleoptile ความยาวต้นอ่อน (จากโคนต้นถึงปลายใบ) และความยาวราก (จากโคนต้นถึงปลายราก) ที่ 14 วันหลังเพาะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การทดสอบในทราย</u>

ปลูกตัวอย่างเมล็ดข้าวในกระบะขนาด 45 x 80 ซม^3 ที่บรรจุทรายเรียบร้อยแล้ว โดยปลูก ที่ความลึก 1, 2, 3 และ 5 ซม พันธุ์ ละ 15 เมล็ด จัดปัจจัยการทดลองพันธุ์และความลึกแบบ Factorial Design in CRD ทำทั้งหมด 4 ซ้ำ วัดความยาวต้นอ่อนหลังเพาะที่อายุ 14 วัน หลังจากนั้น คัดเลือก

ตัวอย่างข้าววัชพืชที่ให้ความแตกต่างจากข้าวปลูกสูงสุด จากระดับความลึก 3 เซนติเมตร แล้วย้ายปลูกตัวอย่างข้าววัชพืชและข้าวปลูก ในกระถางบรรจุดิน ดูแลรักษาจัดการตามวิธีปกติ วัดความสูงและนับจำนวนหน่อทุกสัปดาห์จนถึงระยะออกดอก

<u>การทดสอบในวุ้น</u>

เพาะตัวอย่างเมล็ดในกระดาษกรองชุบน้ำจนชุ่มใน Petri dishes นาน 48 ชั่วโมง แล้วเลือกเมล็ดที่เริ่มงอกวางในกล่องพลาสติกมีฝาปิดขนาด 9 x 14 x 7 ซม^3 ที่บรรจุวุ้นเข้มข้น 5 % (w/v) จำนวน 100 มิลลิลิตร หลัง จากนั้นหุ้มกล่องพลาสติกที่วางเมล็ดเรียบร้อยแล้ว ด้วยอลูมีเนี่ยมฟอยล์ เพื่อให้มีสภาพเหมือนการงอกจากใต้ผิวดิน ในสภาพไม่มีแสง จัดการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำทั้งหมด 4 ซ้ำ วัดความยาว coleoptile ที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วันหลังงอก (ภาพ 3.1)

การทดลองชุดที่ 2 การประเมินลักษณะความความยาว coleoptile ในข้าววัชพืช

<u>พันธุกรรม</u>

ใช้ข้าววัชพืชจำนวน 86 ประชากร โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ที่มีการระบาดของข้าววัชพืชทั้งในเขตจังหวัดภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ตาราง 3.1) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.จรรยา มณีโชติ กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนา การอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และข้าวปลูกจำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 1 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.1 แหล่งที่มาของประชากรข้าววัชพืชที่นำมาทดสอบ

แหล่งที่มาของประชากรข้าววัชพืช	จำนวนประชากร
ภาคกลาง	
• จ.สุพรรณบุรี	34
• จ.กาญจนบุรี	6
• จ.ปทุมธานี	2
• จ.นครปฐม	9
• จ.อยุธยา	4
• จ.สระบุรี	8
• จ.ฉะเชิงเทรา	1
• กรุงเทพมหานคร	2
ภาคเหนือ-ภาคเหนือตอนล่าง	
• จ.พิษณุโลก	5
• จ.พิจิตร	2
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	
• จ.กาฬสินธ์	8
• จ.อุบลราชธานี	5
รวม	86

<u>วิธีการทดลอง</u>

ก่อนปลูกสุ่มเมล็ดข้าววัชพืชและข้าวปลูก ตัวอย่างละ 10 เมล็ด เพื่อวัดความกว้าง ความยาว และความหนา รวมทั้งบันทึกลักษณะการมีหาง สีเปลือ ก สีเยื่อหุ้มเมล็ด และ อัตราการงอก อีกส่วนนำมาปลูกทดสอบ บนวุ้น ตามวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1 ปลูกทดสอบตัวอย่างละ 10 เมล็ด ในกล่องพลาสติกขนาด 17 x 25 x 10 ซม^3 บรรจุวุ้นที่ความเข้มข้น 5 % (w/v) จำนวน 450 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ โดย 1 กล่องวางตัวอย่างเมล็ดข้าวได้จำนวน 15 ตัวอย่าง มีระยะห่างระหว่างแถว 1 ซม และระยะระหว่างเมล็ด 0.5 ซม แต่ละกล่องจะรวมข้าวปลูกพันธุ์เปรียบเทียบจำนวน 2 พันธุ์คือพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 1 ปลูกทดสอบร่วมด้วย ดังนั้นแต่ละกล่องจะปลูกข้าววัชพืช 13 แถวและข้าวปลูก 2 แถว หลังเพาะ 5 วัน วัดความยาว coleoptile (จากเมล็ดถึงปลาย coleoptile) ทุกต้น และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้าววัชพืชกับข้าวปลูกพันธุ์ตรวจสอบโดยใช้ วิธี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Least Significant Difference (LSD) และหาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเมล็ดกับความยาว coleoptile โดยใช้ simple correlation coefficient (r) และวัดความยาว coleoptile ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี1 ในสภาพมีการปนของข้าววัชพืช 0 25 50 75 เปอร์เซ็นต์ และข้าววัชพืช 100 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบบนวุ้นตามวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1 โดยใช้ข้าววัชพืช 4 ประชากร แบ่งทดสอบเป็น 4 คู่ ในกล่องพลาสติกขนาด 17 x 25 x 10 ซม^3 บรรจุวุ้นที่ความเข้มข้น 5 % (w/v) จำนวน 450 มิลลิลิตร โดย 1 กล่องวางข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี1 ที่ปลอมปนด้วยข้าววัชพืช 1 คู่ คู่ละ 3 ซ้ำละ 20 เมล็ด หาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การทดลองชุดที่ 3 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมที่ควบคุมความยาว coleoptile ของข้าววัชพืช

<u>การสร้างลูกผสมชั่วต่างๆ</u>

จากงานทดลองที่ 2 ได้คัดเลือกต้นข้าววัชพืชที่มีความยาว coleoptile สูงสุดจำนวน 2 ประชากร คือข้าววัชพืชประชากร WD1 จาก อ.บางเลน จ. นครปฐม และ WD2 จาก จ.สุพรรณบุรี ย้ายปลูกในกระถางเพื่อ ขยายปริมาณเมล็ดและใช้เป็นพันธุ์พ่อ ในการสร้างลูกผสม เมื่อถึงระยะออกดอก ผสมพันธุ์ระหว่างข้าววัชพืชกับข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ส่วนรวงที่เหลือคุลมรวงด้วยถุงไข (glassine bag) เพื่อเก็บเมล็ดไว้ใช้ทดสอบ เมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวได้ลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 2 คู่ผสมคือ

1. สุพรรณบุรี 1 x WD 1
2. สุพรรณบุรี 1 x WD 2

เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกนำไปปลูกเพื่อสร้างเมล็ดชั่วที่ 2 จนถึงชั่วที่ 3 อีกส่วนนำไปปลูกทดสอบเปรียบเทียบกับพ่อแม่ เมล็ดที่ปลูกขยายในทุกชั่วเก็บเมล็ดแยกต้น หลังเก็บเกี่ยวนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบในฤดูถัดไป ก่อนปลูกเพาะเมล็ดให้เริ่มงอกในระยะเท่ากัน

<u>วิธีการทดลอง</u>

3.1 ลูกผสมชั่วที่ 1

ทดสอบวัดความยาวของ coleoptile เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ปลูกในวุ้นที่ความเข้มข้น 5% (w/v)จำนวน 450 มิลลิลิตรในกล่องพลาสติกขนาด 17 x 25 x 10 ซม^{3}ใช้ประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 คู่ผสมละ 5 เมล็ด พร้อมกับ พันธุ์พ่อแม่ 10 เมล็ด วางบนวุ้น มีระยะห่าง ระหว่างแถว 1 ซม และระหว่างเมล็ด 1 ซม โดยในแต่ละกล่องจะสุ่มวางแถวลูกผสมชั่วที่ 1 และพันธุ์พ่อแม่ โดย วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 2 ซ้ำ วัดความยาว coleoptile ที่ 5 วันหลังเพาะ หลังจากนั้นย้ายปลูกแต่ละต้นในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซนติเมตร ลึก 30 เซนติเมตร เมื่อถึงระยะออกรวงบันทึกจำนวนวันออกดอก เมื่อถึงระยะสุกแก่ วัดความสูงโดยวัดตั้งแต่ผิวดินไปจนถึงคอรวง วัดความยาวรวง นับจำนวนรวงต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อรวง จำนวนเมล็ดดีต่อรวง และชั่งน้ำหนัก 100 เมล็ด เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.2 ลูกผสมชั่วที่ 2

ทดสอบวัดลักษณะความยาวของ coleoptile เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ใช้ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 คู่ละ 300 เมล็ดและพันธุ์พ่อแม่ 60 เมล็ด ในกล่องพลาสติกขนาด 17 x 25 x 10 ซม^3 บรรจุวุ้นที่ความเข้มข้น 5 % (w/v) จำนวน 450 มิลลิลิตร เพาะเมล็ดให้งอกใน Petri dishes นาน 48 ชั่วโมง แต่ละตัวอย่างเลือกเมล็ดที่เริ่มงอกและมีขนาดเท่ากัน วางบนวุ้น มีระยะห่างระหว่างแถว 0.5 ซม และระหว่างเมล็ด 0.5 ซม โดยในแต่ละกล่องจะวางพันธุ์พ่อแม่บริเวณ ซ้าย ขวา และตรงกลางกล่อง วัดความยาว coleoptile ที่ 5 วันหลังงอก ย้ายลงปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ลึก 30 เซนติเมตร โดยปลูกในกระถางๆ ละ 10 ต้น แต่ละต้นบันทึกจำนวนวันออกดอก เมื่อถึงระยะสุกแก่ วัดความสูงโดยวัดตั้งแต่ผิวดินไปจนถึงคอรวง ความยาวต้นอ่อน นับจำนวนรวงต่อต้น เปอร์เซ็นการร่วงของเมล็ด และสีเยื่อหุ้มเมล็ด นำแต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์ผลหาค่าเฉลี่ย (mean) ค่าความแปรปรวน (variance) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (sd) และหาความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละลักษณะในประชากร ทดสอบการกระจายตัวของความยาว coleoptile ในลูกผสมโดยวิธี chi-square test (χ^2 test) ในการทดสอบการกระจายตัวของลักษณะต่างๆ ในลูกผสมชั่วที่ 2 อาศัยสมมุติฐานดังนี้

1. ถ้าลักษณะที่ศึกษาถูกควบคุมด้วยยีน 1 คู่ ให้การแสดงออกเหมือนพ่อและแม่ถูกควบคุมด้วย homozygous recessive (aa) และ homozygous dominance (AA)

1.1 มีการกระทำของยีน (gene action) เป็นแบบข่มสมบูรณ์ (complete dominance)
อัตราส่วนของ phenotype = 3 : 1

1.2 มีการกระทำของยีน (gene action) เป็นแบบข่มไม่สมบูรณ์ (incomplete dominace)
อัตราส่วนของ phenotype = 1 : 2 : 1

2. ถ้าลักษณะที่ศึกษาถูกควบคุมด้วยยีน 2 คู่ ยีนแต่ละคู่แสดงผลอย่างอิสระต่อกันโดยให้การแสดงออกเหมือนพ่อและแม่ถูกควบคุมด้วย homozygous recessive (aabb) และ homozygous dominance (AABB)

2.1 มีการกระทำของยีน (gene action) เป็นแบบข่มสมบูรณ์ (complete dominance)
อัตราส่วนของ phenotype = 15 : 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 มีการกระทำของยีน (gene action) เป็นแบบข่มไม่สมบูรณ์ (incomplete dominace)

อัตราส่วนของ phenotype = 1 : 14 : 1

2.3 ลูกผสมชั่วที่ 3

ทดสอบวัดลักษณะความยาวของ coleoptile เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ใช้ประชากรลูกผสม ที่เก็บมาจากลูกผสมชั่วที่ 2 โดยเมล็ดที่เก็บมาจากแต่ละต้นถือว่าเป็น 1 family โดยปลูก family ละ 1 แถว แถวละ 24 เมล็ด และพันธุ์พ่อแม่ 24 เมล็ด ทดสอบลูกผสมชั่วที่ 3 ของคู่ผสมที่ 1 ระหว่าง SPR1 x WD1 จำนวน 137 family และ คู่ผสมที่ 2 ระหว่าง SPR1 x WD2 จำนวน 131 family ปลูกในกล่องพลาสติกขนาด 17 x 25 x 10 ซม^3 บรรจุวุ้นที่ความเข้มข้น 5 % (w/v) จำนวน 450 มิลลิลิตรเพาะเมล็ดให้งอกใน Petri dishes นาน 48 ชั่วโมง แต่ละตัวอย่างเลือกเมล็ดที่เริ่มงอกและมีขนาดเท่ากัน วางบนวุ้น มีระยะห่างระหว่างแถว 0.5 ซม และระหว่างเมล็ด 0.5 ซม โดยในแต่ละกล่องจะวางพันธุ์พ่อแม่บริเวณ ซ้าย ขวา และตรงกลางกล่อง วัดความยาว coleoptile ที่ 5 วันหลังงอก นำข้อมูลแต่ละ family มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ค่าความแปรปรวน (variance) ภายในประชากร และเปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่ เพื่อแบ่งกลุ่มแต่ละ family ตามค่าเฉลี่ยและค่าความแปรปรวนความยาวต้นอ่อนของสายพันธุ์พ่อแม่ คำนวณหาจำนวนยีนที่ควบคุมใช้วิธี chi-square test (χ^2 test) โดยรายละเอียดดังนี้

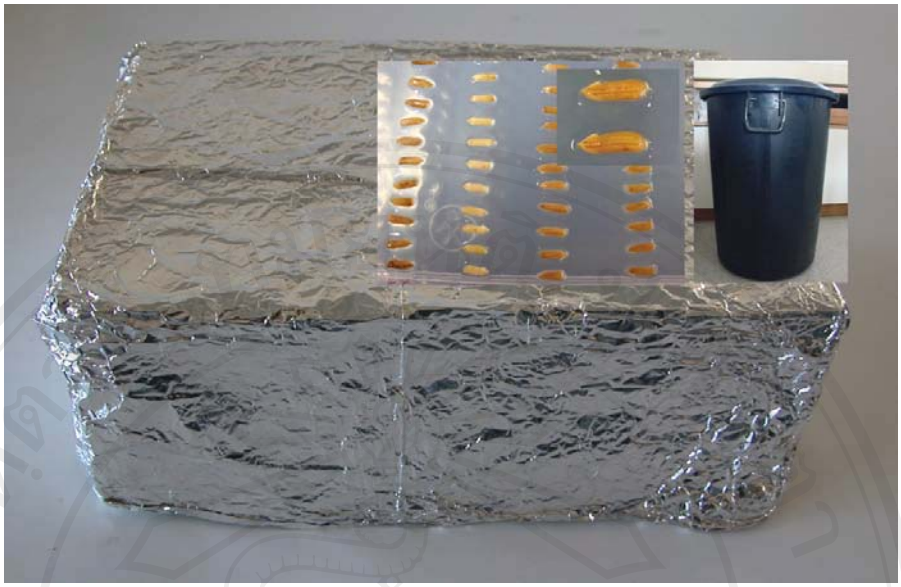
การวิเคราะห์ chi-square

- Family ที่มีค่าเฉลี่ยและค่าความแปรปรวนภายใน family อยู่ภายในขอบเขตของพ่อแม่พันธุ์ที่มีความยาว coleoptile ที่ยาวหรือสั้นกว่า จะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของ homozygous weedy rice type หรือ homozygous crop rice type
- ต้นที่มีค่าความแปรปรวนภายใน family สูงกว่าขอบเขตของพ่อแม่ จะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของ segregating

ค่าคาดหมายของจำนวนยีนที่ควบคุมเป็นดังนี้คือ

1. ถ้าลักษณะที่ศึกษาถูกควบคุมด้วยยีนจำนวน 1 คู่ จะมีอัตราส่วนทางพันธุกรรม homozygous weedy rice type (AA) : segregating (Aa) : homozygous crop rice type = 1 : 2 : 1
2. ถ้าลักษณะที่ศึกษาถูกควบคุมด้วยยีนจำนวน 2 คู่ จะมีอัตราส่วนทางพันธุกรรม homozygous weedy rice type (AABB) : homozygous intermediate (AAbb,aaBB) + segregating (A_B_,aaB_,A_bb) : homozygous crop rice type (aabb) = 1 : 14 : 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.1 วิธีการทดสอบเพาะเมล็ดบนวุ้นในที่มืด

ภาพ 3.2 coleoptile หลังจากเพาะเมล็ดบนวุ้นในที่มืด 5 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved