

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ทดลองที่ห้องปฏิบัติการกลาง และสาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และ  
ทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2551  
ถึง เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2554 แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

#### การทดลองที่ 1 ประเมินการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงในกระบวนการสร้างผลผลิตระหว่างพันธุ์ข้าว

วางแผนการทดลองแบบ Factorial 2 ปัจจัยในแผนการทดลองแบบ completely  
randomized design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ ปัจจัยแรกคืออุณหภูมิ โดยกำหนดวันปลูกต่างกัน 6 วัน  
ปลูก แต่ละชุดห่างกัน 15 วัน ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2551 ถึงมกราคม พ.ศ. 2552 เพื่อให้ต้น  
ข้าวออกดอกในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเมษายน พ.ศ. 2552 ซึ่งเป็นช่วงที่มีอุณหภูมิสูงแตกต่างกัน  
ปัจจัยที่สองคือพันธุ์ข้าว โดยใช้ข้าวพันธุ์สมัยใหม่ 3 พันธุ์ คือ พันธุ์ชัยนาท 1 พันธุ์สุพรรณบุรี 1 และ  
พันธุ์สันป่าตอง 1 เพาะเมล็ดบนกระดาษเพาะ เมื่อดันกล้าอายุได้ 7 วัน ย้ายปลูกลงในถังพลาสติก  
ดำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ที่บรรจุดินลึก 30 เซนติเมตรในสภาพน้ำขัง โดยใน 1  
กระถางปลูกจำนวน 5 ต้นและใน 1 หน่วยการทดลองประกอบด้วย 2 กระถาง แบ่งเก็บข้อมูลจาก 3  
การทดลองย่อย ดังนี้

#### การทดลองที่ 1.1 ประเมินความมีชีวิตของละอองเรณู โดยวิธีเพาะละอองเรณูในอาหารเลี้ยง

เมื่อถึงระยะออกดอก (Anthesis) เก็บละอองเรณูจากดอกที่กำลังเริ่มบานบริเวณกลางรวง  
ของรวงหลักในแต่ละต้น โดยตีบับละอองจากดอกที่เริ่มบานนำมาโปรยละอองเรณูในอาหารเลี้ยง  
ที่เตรียมไว้ โดย 1 จานอาหารเลี้ยง (Petri dish) ภายใน 1 กระถางเก็บละอองเรณูให้ได้ประมาณ 2-3  
ดอกต่อ 1 ต้น ซึ่งสูตรอาหารเลี้ยงสำหรับเพาะละอองเรณูประกอบด้วย Sucrose 17.1 กรัม, Agar 0.7  
กรัม,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.03 กรัม, Boric acid 0.01 กรัม ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (ดัดแปลงจาก Pfahler,  
1967; Fernando *et al.*, 1997) (ภาคผนวกที่ 1) หลังจากเก็บละอองเรณูเสร็จ นำจานอาหารเลี้ยงมาไว้

ภายใต้อุณหภูมิห้องจนกระทั่งละอองเรณูออกประมาณ 2-3 ชั่วโมง นำมาตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเรณู โดยดูจากการงอกของท่อละอองเรณูในอาหารเลี้ยง ส่องดูใต้กล้อง stereo microscope สุ่มนับ 8 จุด นับจำนวนละอองเรณูทั้งหมดและจำนวนละอองเรณูที่งอก นำมาหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเรณู (ภาพที่ 3.1) โดยคำนวณจาก

$$\text{ความมีชีวิตของละอองเรณู (\%)} = (\text{จำนวนละอองเรณูที่งอก} / \text{จำนวนละอองเรณูทั้งหมด}) \times 100$$

การทดลองที่ 1.2 ประเมินจำนวนละอองเรณูที่งอกบนยอดเกสรตัวเมีย โดยวิธีการย้อม Phenol Cotton blue

หลังจากดอกข้าวปัดประมาณ 3 ชั่วโมง สุ่มเก็บดอกข้าวมาจำนวน 12 ดอกต่อ 1 หน่วยการทดลอง โดยเก็บจากบริเวณกลางรวงของรวงหลักในแต่ละต้นมารวลงละ 4-5 ดอก นำดอกข้าวมาแกะเอายอดเกสรตัวเมียโดยระวังอย่าให้ยอดเกสรตัวเมียขาดวางลงบน glass microscope slide นำสีย้อม phenol cotton blue (Khatun and Flowers, 1995) หยดลงบนเกสรตัวเมียที่วางไว้ประมาณ 2-3 หยด แล้วปิดทับด้วย cover slip แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตการติดสีของท่อละอองเรณูที่งอกอยู่บนยอดเกสรตัวเมีย นับจำนวนละอองเรณูที่งอกบนยอดเกสรตัวเมีย (ภาพที่ 3.2)

การทดลองที่ 1.3 ประเมินการปฏิสนธิโดยดูจากการติดเมล็ดในระยะสุกแก่

เมื่อถึงระยะสุกแก่ เก็บรวงข้าวมา 2 รวงต่อต้นจากกระถางที่แยกไว้ โดยเก็บจากรวงหลัก 1 รวงและสุ่มเก็บอีก 1 รวง เก็บมา 5 ต้นต่อ 1 หน่วยการทดลอง นับจำนวนเมล็ดต่อรวง จำนวนเมล็ดดีต่อรวง จำนวนเมล็ดลีบต่อรวง (แยกเป็น ไม่ผสม, ผสมแต่ไม่เต็มเมล็ด) น้ำหนัก 100 เมล็ด นำมาหาข้อมูลเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีต่อรวง เปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบที่ผสมเกสรแต่ไม่เต็มเต็มเมล็ดต่อรวง และ เปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบที่ไม่ได้ผสมเกสรต่อรวงของแต่ละพันธุ์ เพื่อประเมินการปฏิสนธิจากการติดเมล็ด (ภาพที่ 3.3)

ข้อมูลที่บันทึก ได้แก่

1. อุณหภูมิสูงสุด ต่ำสุด ทั้งฤดูปลูก
2. วันออกดอก
3. อุณหภูมิช่วงที่ดอกบาน บันทึกทุก 15 นาที ประมาณ 1 ชั่วโมง
4. เวลาที่ดอกบานสูงสุด
5. จำนวนหน่อต่อต้น
6. จำนวนรวงต่อต้น
7. น้ำหนักแห้งต้น (กรัมต่อต้น)

รายละเอียดวันปลูกที่แตกต่างกัน 6 วันปลูก มีดังนี้

1. วันปลูกที่ 1 วันที่ 1 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2551 (PD1)
2. วันปลูกที่ 2 วันที่ 15 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2551 (PD2)
3. วันปลูกที่ 3 วันที่ 1 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2551 (PD3)
4. วันปลูกที่ 4 วันที่ 15 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2551 (PD4)
5. วันปลูกที่ 5 วันที่ 1 เดือน มกราคม พ.ศ. 2552 (PD5)
6. วันปลูกที่ 6 วันที่ 15 เดือน มกราคม พ.ศ. 2552 (PD6)

## การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบการตอบสนองต่อการเพิ่มอุณหภูมิสูงในกระบวนการสร้างผลผลิตของข้าวพันธุ์ทนทานและอ่อนแอ

วางแผนการทดลองแบบ Factorial 2 ปัจจัย ในแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ ปัจจัยแรกคือพันธุ์ข้าว โดยเลือกพันธุ์ทนทานและพันธุ์อ่อนแอต่ออุณหภูมิสูงมาจากการทดลองที่ 1 ปัจจัยที่สองคืออุณหภูมิ โดยใช้ความแปรปรวนของอุณหภูมิจากวันปลูก 2 วันปลูก ในช่วงออกดอกเพิ่มอุณหภูมิด้วยโรงเรือนพลาสติกหลังคาต่ำปิดด้านข้างทั้งสามด้าน ซึ่งทำให้ภายใน โรงเรือนพลาสติกมีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นต่างจากอุณหภูมิภายนอกประมาณ 3 องศาเซลเซียส วันปลูกแรกปลูกช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2552 วันปลูกที่สองปลูกช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2553 เพื่อให้ออกดอกในเดือนกุมภาพันธ์และเดือนเมษายน พ.ศ. 2553 ซึ่งเป็นช่วงที่มีอุณหภูมิสูงแตกต่างกัน เพาะเมล็ดบนกระดาษเพาะ เมื่อต้นกล้าอายุได้ 7 วัน ย้ายปลูกลงในถังพลาสติกสี่ด้านขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ที่บรรจุดินลึก 30 เซนติเมตรในสภาพน้ำขัง โดยใน 1 กระถางปลูกจำนวน 5 ต้นและใน 1 หน่วยการทดลองประกอบด้วย 2 กระถาง แต่ละวันปลูกทำเพิ่มอีก 1 ชุดเพื่อนำไปไว้ในโรงเรือนพลาสติกในช่วงออกดอก แบ่งเก็บข้อมูลจาก 3 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองที่ 2.1 ประเมินความมีชีวิตของละอองเรณู โดยวิธีเพาะละอองเรณูในอาหารเลี้ยง  
วิธีการทดลองและเก็บข้อมูลเหมือนกับการทดลองที่ 1.1 (ภาพที่ 3.1)

การทดลองที่ 2.2 ประเมินจำนวนละอองเรณูที่งอกและตกบนยอดเกสรตัวเมีย โดยวิธีการย้อม  
Phenol Cotton blue

วิธีการทดลองและเก็บข้อมูลเหมือนกับการทดลองที่ 1.2 แต่เพิ่มการนับจำนวนละออง  
เรณูทั้งหมดที่ตกลงบนยอดเกสรตัวเมีย (ภาพที่ 3.2)

การทดลองที่ 2.3 ประเมินการปฏิสนธิโดยดูจากการติดเมล็ดในระยะสุกแก่

วิธีการทดลองและเก็บข้อมูลเหมือนกับการทดลองที่ 1.3 (ภาพที่ 3.3)

ข้อมูลที่บันทึก ได้แก่

1. อุณหภูมิสูงสุด ต่ำสุด ทั้งฤดูปลูก (บันทึกด้วย Data locker EBI20)
2. วันออกดอก
3. อุณหภูมิช่วงที่ดอกบาน (ในโรงพลาสติก, นอกโรงพลาสติก) บันทึกทุก 15 นาที ประมาณ 1 ชั่วโมง
4. เวลาที่ดอกบานสูงสุด
5. จำนวนหน่อต่อต้น
6. จำนวนรวงต่อต้น
7. น้ำหนักแห้งต้น (กรัมต่อต้น)

**การทดลองที่ 3 เปรียบเทียบการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงกลางคืนในการสร้างจำนวนดอกของข้าว พันธุ์ทนทานและอ่อนแอ**

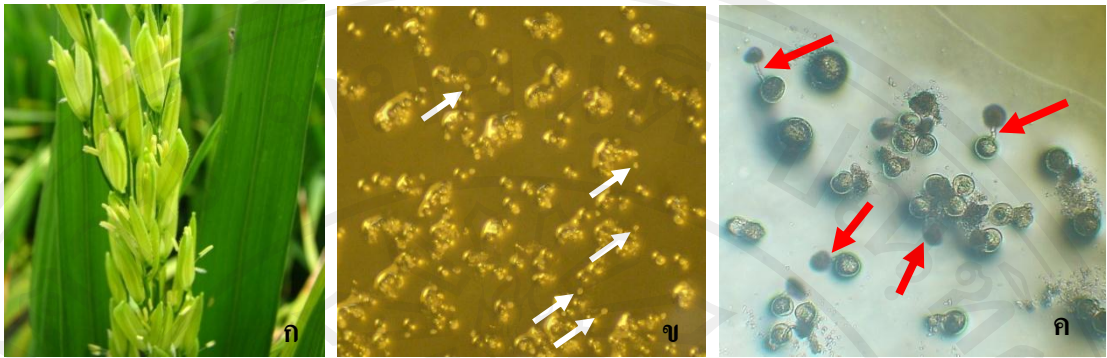
วางแผนการทดลองแบบ Factorial 2 ปัจจัย ในแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ปัจจัยแรกคืออุณหภูมิกลางคืน ปัจจัยที่สองคือพันธุ์ข้าว โดยเลือกพันธุ์ทนทานและพันธุ์อ่อนแอต่ออุณหภูมิสูงมาจากการทดลองที่ 1 เพาะเมล็ดบนกระดาษ เพาะโดยกำหนดวันปลูกแตกต่างกัน 3 วันปลูก ห่างกัน 20 วัน เพื่อให้ข้าวเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วงระยะเริ่มสร้างรวง (PI) ต่างกัน เมื่อต้นกล้าอายุได้ 7 วัน ย้ายปลูกลงในกระถางพลาสติกสีดำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตรที่บรรจุดินในสภาพน้ำขัง โดยใน 1 กระถางปลูกจำนวน 2 ต้นและใน 1 หน่วยการทดลองประกอบด้วย 4 กระถาง เมื่อข้าวเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะเริ่มสร้างรวง ย้ายกระถางที่ได้ปลูกเตรียมไว้ในแต่ละวันปลูก เข้าไปในตู้ Growth chamber ที่มีความกว้าง 52 เซนติเมตร ยาว 54 เซนติเมตร สูง 140 เซนติเมตร ประมาณ 20 วัน โดยกำหนดอุณหภูมิกลางคืนที่ใช้ในตู้ Growth chamber คือ 22 (control) 24 และ 26 องศาเซลเซียส ตามลำดับวันปลูก อุณหภูมิกลางวันใช้ 34 องศาเซลเซียส และความชื้นใช้ 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากช่วงระยะสร้างรวงผ่าน อุณหภูมิกลางคืนที่กำหนดแล้ว ย้ายกระถางออกจากตู้ Growth chamber นำมาดูแลต่อในสภาพแวดล้อมปกติเพื่อให้มีการเจริญเติบโตต่อไปจนถึงระยะออกดอกแล้วเก็บข้อมูลลักษณะต่างๆ

ข้อมูลที่บันทึก ได้แก่

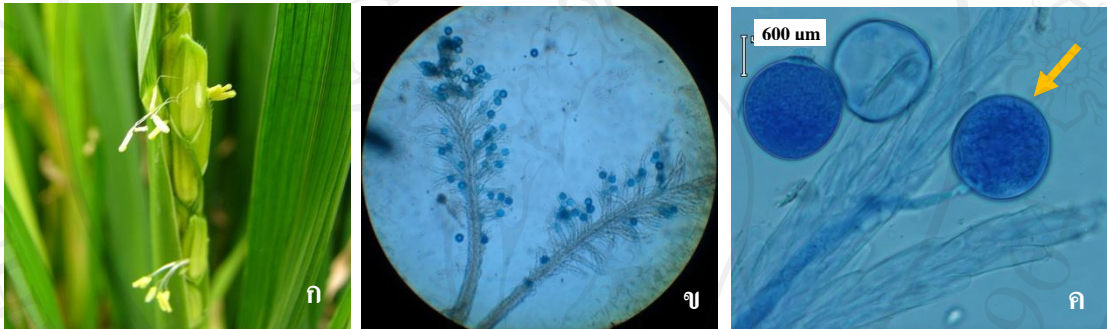
1. อุณหภูมิสูงสุด ต่ำสุด ทั้งฤดูปลูก
2. อุณหภูมิทรงพุ่มที่ระยะก่อนแทงรวง โดยใช้ Infrared Thermometer (IRT) ตามแบบวิธีของ Reynolds (1998)
3. จำนวนหน่อต่อต้น
4. จำนวนรวงต่อต้น
5. จำนวนดอกต่อรวงเฉพาะรวงหลัก
6. น้ำหนักแห้งต้น (กรัมต่อต้น)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองโดยใช้ LSD (Least Significant Difference) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3.1 แสดงลักษณะ (ก) ดอกข้าวที่กำลังเริ่มบาน และ (ข, ค) ละอองเรณูที่งอกในอาหารเลี้ยง (ลูกศรชี้)



ภาพที่ 3.2 แสดงลักษณะ (ก) ดอกข้าวที่ผสมเกสรเสร็จ (ข) เกสรตัวเมียที่นำมาย้อมและละอองเรณูที่ติดสีของ Phenol cotton blue และ (ค) ละอองเรณูที่งอกบนยอดเกสรตัวเมีย (ลูกศรชี้)



ภาพที่ 3.3 แสดงลักษณะ (ก) เมล็ดดีของข้าว (filled grain) (ข) ดอกข้าวที่ได้ผสมเกสรแต่ไม่เต็มเต็มเมล็ด (fertilized but unfilled spikelet) และ (ค) ดอกข้าวที่ไม่ได้ผสมเกสร (unfertilized spikelet)