บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียว (พันธุ์ชัยนาท 72) ที่เริ่มทดลองปลูกวันที่ 30 เมษายน พ.ศ. 2545 ถึง 3 กรกฎาคม พ.ศ. 2545 จากแปลงทดลองศูนย์ขยายพันธุ์พืชที่ 4 ชัยนาท ต.หางน้ำสาคร อ.มโนรมย์ จ.ชัยนาท มาทำการทดลอง

นำเมล็ดที่ได้ไปปรับระดับความชื้นให้ได้ระดับความชื้นที่ 7, 9, 11 และ 13 เปอร์เซ็นต์ แล้วใส่ถุงพลาสติกปิดผนึก 2 ชั้นเก็บไว้ในระดับอุณหภูมิ 15, 20, 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (27-32 องศาเซลเซียส) ทำการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวในสภาพต่างๆแล้วทำการสุ่มตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ทุกๆ 3 สัปดาห์ เป็นเวลา 18 สัปดาห์ (126 วัน)

โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD โดยมี 2 ปัจจัยคือ

ปัจจัยที่ 1 ระดับความชื้นของเมล็ดพันธุ์ 4 ระดับคือ 7, 9, 11 และ 13 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยที่ 2 ระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ 4 ระดับ คือ 15, 20, 25 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 16 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1. ความชื้นเมล็ด 7 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 2. ความชื้นเมล็ด 7 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 3. ความชื้นเมล็ด 7 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 4. ความชื้นเมล็ด 7 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
กรรมวิธีที่ 5. ความชื้นเมล็ด 9 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 6. ความชื้นเมล็ด 9 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 7. ความชื้นเมล็ด 9 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 8. ความชื้นเมล็ด 9 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
กรรมวิธีที่ 9. ความชื้นเมล็ด 11 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 10. ความชื้นเมล็ด 11 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 11. ความชื้นเมล็ด 11 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 12. ความชื้นเมล็ด 11 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 13. ความชื้นเมล็ด 13 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 14. ความชื้นเมล็ด 13 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 15. ความชื้นเมล็ด 13 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 16. ความชื้นเมล็ด 13 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

การทดสอบคุณภาพเบื้องต้นของเมล็ดพันธุ์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD)

1. ตรวจสอบความงอกมาตรฐาน (standard germination; SG test)

ทำการทดสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์ (seed germination) ด้วยวิธีมาตรฐาน โดยเพาะเมล็ดระหว่างกระดาษเพาะชื้น (between paper method; BP) ตามกฎการทดสอบความงอกของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ (ISTA, 1996) โดยสุ่มเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวในแต่ละกรรมวิธีมา 4 ซ้ำๆละ 50 เมล็ด เพาะในกระดาษเพาะสำหรับเพาะเมล็ด จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้เพาะที่ระดับอุณหภูมิ 25 °C ตรวจนับความงอกในวันที่ 7 หลังจากเพาะ ประเมินผลต้นกล้าปกติ (normal seedling) แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความงอก

2. ตรวจสอบความแข็งแรง (seed vigor test) ของเมล็ดพันธุ์ดังนี้

2.1 ทดสอบด้วยวิธีวัดค่านำไฟฟ้า (electrical conductivity test) สุ่มเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวในแต่ละกรรมวิธีมา 4 ซ้ำๆละ 25 เมล็ด ชั่งน้ำหนักเมล็ดแล้วแช่ในน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร นำเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นรินน้ำที่แช่เมล็ดเฉพาะสารละลายส่วนบนมาทำการวัดการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง Conductivity Meter Model 152 Fisher คำนวณผลที่ได้มีหน่วยเป็นไมโครโมล์/กรัม (micromhos/gram) (Perry,1981) โดยคำนวณค่าการนำไฟฟ้าดังนี้

$$\text{ค่าการนำไฟฟ้า} = \frac{\text{ค่าการนำไฟฟ้า}}{\text{น้ำหนักเมล็ด 25 เมล็ด}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 **ทดสอบด้วยการเร่งอายุ** (accelerated aging; AA test) สุ่มเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวในแต่ละกรรมวิธีมา 4 ซ้ำๆละ 50 เมล็ด ใส่ลงขวดเร่งอายุ ใส่น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ นำไปไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 41±2°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Delouche and Baskin, 1973) จากนั้นนำเมล็ดมาทดสอบความงอกมาตรฐานโดยเพาะเมล็ดระหว่างกระดาษเพาะชื้น

2.3 **ทดสอบด้วยการวัดอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า** (seedling growth rate; SGR test) สุ่มเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวในแต่ละกรรมวิธีมา 4 ซ้ำๆละ 50 เมล็ด วางเมล็ดในกระดาษเพาะ 2 แถวๆละ 25 เมล็ด นำไปเพาะที่ระดับอุณหภูมิ 25°C ไม่มีแสงสว่างเป็นเวลา 7 วัน ตรวจนับความงอกในวันที่ 7 หลังจากเพาะ แล้ววัดความยาวของยอดและราก อบต้นกล้าที่ระดับอุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คำนวณผลที่ได้มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/ต้น/7วัน (mg./seedling/7 days) จากนั้นคำนวณอัตราการเจริญของต้นกล้าดังนี้

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของต้นกล้า}}{\text{จำนวนต้นกล้าปกติ}}$$

3.ทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์โดยทางชีวเคมี (tetrazolium; TZ test) สุ่มเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวในแต่ละกรรมวิธีมา 4 ซ้ำๆละ 50 เมล็ด แช่ในสารละลาย 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride ที่มี pH 6.5-7.5 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ วางไว้ในที่มืดหรือนำไปใส่ไว้ในตู้อบที่ระดับอุณหภูมิ 35-40°C เมื่อครบกำหนดล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นและแช่ในน้ำกลั่นตลอดเวลาเพื่อป้องกันการเปลี่ยนสีแล้วแกะเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) ประเมินผลโดยตรวจดูการติดสีตามตำแหน่งต่างๆของเมล็ด

4.ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเกิดเชื้อรา (fungi infection)

ทดสอบโดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (blotter method) โดยใช้กระดาษฟาง 3 แผ่น กระดาษกรอง 1 แผ่น ชุบน้ำกลั่นแล้วใส่จานแก้วเลี้ยงเชื้อ (petri dishes) วางเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวในแต่ละกรรมวิธีลงในจานแก้วซ้ำละ 10 เมล็ด ทำ 10 ซ้ำ แล้วนำเมล็ดที่วางในจานแก้วแล้วไปไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการตรวจสอบเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Sterioscopic microscrope และ Compound microscope โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดเชื้อราดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดเชื้อรา} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่ติดเชื้อรา}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะทั้งหมด}} \times 100$$

5.ตรวจสอบการเข้าทำลายของแมลง (insect infection)

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวมาซ้ำละ 100 เมล็ด ทำ 4 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบดูการเข้าทำลายของแมลงและหาไข่แมลงที่ติดอยู่บริเวณผิวเมล็ด โดยการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Sterioscopic microscrope นับจำนวนเมล็ดที่เสียหายคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความเสียหายจากการเข้าทำลายของแมลง โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของแมลงดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของแมลง} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่ถูกทำลายโดยแมลง}}{\text{จำนวนเมล็ด 100 เมล็ด}} \times 100$$

6.ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนโดยนำค่าไนโตรเจนที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl (Yoshida *et al.*, 1976)ดังนี้

1.การเตรียมสารละลาย

1.1 สารละลายย่อยตัวอย่าง ซึ่งมีส่วนผสมของ K_2SO_4 : $CuSO_4.5H_2O$: Metallic selenium ในอัตราส่วน 50 : 10 : 1 ผสมให้เข้ากันแล้วละลายใน Conc. H_2So_4 1 litre สารละลายที่ได้เรียกว่า Digestion Mixture

1.2 สารละลายสำหรับวิเคราะห์

Boric acid 4% : ละลายกรด Boric 40 g. ในน้ำ 1 litre

Indicator : - ละลาย Methyl red 1.25 g. ใน 95% Ethanol จำนวน 900 ml.

- ละลาย Methylene blue 0.825 g.ในน้ำกลั่น 100 ml.

ผสมสารละลายทั้งสองนี้เข้าด้วยกัน

ส่วนผสมของ Indicator นำ Indicator ผสมกับ Boric acid 4 %ในอัตราส่วน 1:100

1.3 NaOH 60% : ละลาย NaOH จำนวน 600 g.ในน้ำกลั่น 1 litre

1.4 HCl 0.1 N : เจือจาง HCL จำนวน 9 ml. ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 litre

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.การย่อยตัวอย่าง (digestion)

ชั่งตัวอย่างพืชที่แห้งและบดละเอียดแล้วจำนวน 0.2 g.ใส่ลงใน 100 ml. Kjeldahl flask เติม Digestion Mixture 5 ml. นำไปตั้งบนเตาย่อยในตู้ดูดควัน ค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิจนกระทั่งได้สารละลายใส (ใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3.การกลั่น (distillation)

เทสารละลายที่ย่อยได้ลงในเครื่องกลั่นให้หมด โดยใช้น้ำกลั่นล้างซ้ำกัน 2-3 ครั้ง จากนั้นเติม 60% NaOH ลงไปประมาณ 10 ml. และใส่ส่วนผสมของ indicator จำนวน 10 ml. ลงใน erlenmeyer flask นำเอา flask ไปวางไว้ใต้ปลายเครื่องควบแน่นอยู่ใต้ผิวระดับของสารละลายใน Flask ทำการกลั่นประมาณ 7 นาที แล้วปล่อยให้สารละลายในเครื่องควบแน่นหยดลงใน flask ให้หมด พร้อมที่ล้างปลายเครื่องควบแน่นด้วยน้ำกลั่น

4.การไตเตรท (titration)

นำสารละลายที่ได้จากการกลั่นทั้งหมดมาไตเตรทด้วย HCl 0.1 N บันทึกจำนวน ml. ของ HCl ที่ใช้ไป

5.การคำนวณ

$$\%\text{Nitrogen} = \frac{(\text{sample titer} - \text{blank titer}) \times \text{normality of HCL} \times 14 \times 100}{\text{sample of weight (g.)} \times 1000}$$

%Protein = % Nitrogen × 6.25*

* คือค่าคงที่ (factor) สำหรับเปลี่ยนปริมาณไนโตรเจนเป็นปริมาณโปรตีนโดยทั่วไปมีค่า 6.25 ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในการคำนวณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7.ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ของคาร์โบไฮเดรตโดยวัดปริมาณการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแป้งในเมล็ดโดยวิธี Anthrone (Yoshida *et al.*, 1976)

1.การเตรียมสาร

1.1 Anthrone reagent : ชั่ง Anthrone 1 g. เติม conc.H_2SO_4 ให้ครบ 500 ml. แล้วห่อด้วยกระดาษฟรอย์และเก็บไว้ในตู้เย็น(ต้องเตรียมสารละลายใหม่ทุกๆ 2 วัน)

1.2 80% ethanol

1.3 9.2 N Perchloric acid : เจือจาง 793 ml. ของ 70% $HClO_4$ ให้เป็น 1 litre

1.4 4.6 N Perchloric acid : เจือจาง 397 ml. ของ 70% $HClO_4$ ให้เป็น 1 litre

2.การย่อยตัวอย่าง (digestion)

2.1 ชั่งตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 0.1 g. (100 mg.) โดยใช้เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง แล้วใส่ flask ขนาด 125 cc.

2.2 เติม 80% ethanol ปริมาตร 20 ml.ลงในตัวอย่างเพื่อสะกัดน้ำตาลออกมาโดยวางบน water bath 80-85^{o}C นาน 1 ชั่วโมง

2.3 นำกากที่เหลือ (residue) ของพืชตัวอย่าง ไปอบให้แห้งในตู้อบ ที่ 80^{o}C นาน 4-5 ชั่วโมง

2.4 เติมน้ำกลั่น 2 ml. ลงในหลอดเซนติฟิวที่มีส่วนอบแห้งเหลืออยู่ วางหลอดบน water bath 100^{o}C นาน 15 นาที คนเป็นครั้งคราว ทิ้งให้หลอดเย็น

2.5 เติม 9.2 N $HClO_4$ ปริมาตร 2 ml. พร้อมกับคนไปด้วยอย่างคงที่ จนกระทั่งสารละลายเป็นครั้งคราว 15 นาที จากนั้นส่วนผสม (suspension) จะถูกปรับให้มีปริมาตร 10 ml. แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 200 rpm. นาน 15-20 นาที

2.6 รอบรวมเอาส่วนใส (supernatant) แล้วเติม 4.6 N $HClO_4$ ปริมาตร 2 ml.ลงในส่วนที่เหลือ (residue) คนส่วนผสมนี้ 15 นาที แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml. ด้วยน้ำกลั่น นำไป centrifuge อีกครั้งหนึ่งแล้วรวบรวมส่วนใสปรับปริมาตรให้เป็น 50 ml. ด้วยน้ำกลั่นใน 50 ml. volumetric flask

2.7 ดูด starch extract ปริมาตร 5 ml. ที่เจือจางที่ใสแล้วลงในหลอดทดสอบและหลอดที่มีมาตรฐานลงในอ่างน้ำแข็ง เติม สารละลาย anthrone ปริมาตร 10 ml. ลงในหลอดแต่ละหลอดอย่างช้าๆให้ไหลลงข้างหลอด คนด้วยแท่งแก้วเป็นระยะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.8 นำหลอดทั้งหมด (ทั้งหลอดทดลองและหลอดมาตรฐาน) ไปตั้งบน water bath 100° C 7.5 นาที แล้วนำหลอดทดลองออกทำให้เย็นโดยทันทีโดยนำมาแช่ในอ่างน้ำเย็น

2.9 นำไปวัดค่า OD ที่ 630 nm.

2.10 นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟของ standard

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลของข้อมูลที่ได้จากการทดลองไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธี analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของสิ่งทดลองโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) และนำค่าดังกล่าวมาวิเคราะห์สหสัมพันธ์และการถดถอยเพื่อสร้างสมการในการคาดคะเน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved