

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วางแผนการทดลอง

1.1 ระยะที่หนึ่ง เป็นการประเมินการตอบสนองเบื้องต้นของข้าวไร่พื้นเมือง 30 พันธุ์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 2 ซ้ำประกอบด้วยความเค็มที่ระดับต่างกัน 2 ระดับเกลือโซเดียมคลอไรด์คือ 0 และ 6 กรัมต่อลิตร (g.l^{-1}) หรือ 103 mM

1.2 ระยะที่สอง เป็นการคัดเลือกข้าวไร่ที่ทนต่อความเค็มเพื่อนำไปจัดกลุ่มข้าวตามศักยภาพความทนเค็ม โดยใช้ข้าวไร่จำนวน 10 พันธุ์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำประกอบด้วยความเค็มที่ระดับต่างกัน 2 ระดับเกลือโซเดียมคลอไรด์คือ 0 และ 6 กรัมต่อลิตร (g.l^{-1}) หรือ 103 mM

การทดลองระยะที่หนึ่ง เป็นการทำการทดลองเบื้องต้น (preliminary experiment) เพื่อทดสอบการปลูกข้าวในเรือนทดลองของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ความเข้มข้นของเกลือที่จะใช้ในการทดลอง อายุต้นข้าวที่เหมาะสม ความงอกของเมล็ด และจำนวนต้นข้าวที่ใช้ในแต่ละชุดการทดลองที่เพียงพอสำหรับนำมาอบแห้งเพื่อส่งวิเคราะห์ Na^+ และ K^+ รวมทั้งการ screening ข้าวไร่ทั้ง 30 พันธุ์ในเบื้องต้นว่าแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองต่อเกลืออย่างไร เป็นต้น โดยจะนำค่าที่ได้ต่างๆไปปรับใช้ในการทดลองจริงในระยะที่สอง

2. ขั้นตอนและวิธีในการวิจัย

2.1 ตัวอย่างพืช

ระยะที่หนึ่ง ใช้ข้าวไร่จำนวน 30 สายพันธุ์ ที่ยังไม่ทราบระดับความทนทานต่อภาวะเครียดจากความเค็มได้ และชุดควบคุมเป็นพันธุ์ที่ทราบระดับความทนเค็ม 4 พันธุ์ คือ Pokkali (พอคคาลิ) เป็นข้าวพันธุ์ทนเค็ม, IR28 และ IR29 เป็นพันธุ์อ่อนแอ และข้าวดอกมะลิ (KDML105) เป็นพันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอ รวมทั้งสิ้น 34 พันธุ์

ระยะที่สอง เลือกใช้ข้าวไร่พื้นเมืองจำนวน 10 สายพันธุ์จากการทดลองในระยะที่หนึ่ง ข้าวพันธุ์ควบคุม 2 พันธุ์ คือ Pokkali และ IR29 และข้าวพันธุ์ปรับปรุง ปทุมธานี 1 รวมทั้งสิ้น 13 พันธุ์

หมายเหตุ ข้าวไร่พื้นเมือง ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.จิรวัฒน์ สนิทชน กลุ่มพันธุศาสตร์ และการปรับปรุงพันธุ์พืช ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งข้าวดังกล่าวถูกเก็บรวบรวมมาจากแหล่งต่างๆกัน ส่วนข้าวชุดควบคุม ได้รับความอนุเคราะห์จากดร.มีชัย เชียงหลิว หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว สถาบัน BIOTEC มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม (ตารางที่ 3.1 และ 3.2)

2.2 การปลูกพืชทดลอง ของการทดลองระยะที่หนึ่งใช้พืชตารางที่ 3.1 และระยะที่สองใช้พืชตารางที่ 3.2

2.2.1 นำเมล็ดข้าวไปฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox 1% นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า นำเมล็ดข้าวแช่น้ำเป็นเวลา 2 วัน และเพาะเมล็ดข้าวให้งอกในน้ำประปา เลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 สัปดาห์

2.2.2 นำต้นกล้าที่ได้ไปเลี้ยงในสารละลายอาหารสูตร Yoshida (ตารางที่ 3.3 และ 3.4) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ในช่วงระหว่างนั้นให้คอยเติมอาหารสูตร Yoshida และวัด pH ในอาหารอยู่เรื่อยๆ จนต้นกล้ามีใบเจริญ ประมาณ 4-5 ใบ)

2.2.3 ทำการให้เกลือช่วงแรก หรือ Pretreatment โดยการปลูกข้าวในสารละลายอาหารสูตร Yoshida ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride; NaCl) 51.5 mM เป็นเวลา 4 วัน

2.2.4 ทำการทดสอบความทนเค็มของข้าวโดยการนำต้นข้าวในข้อ 2.2.3 ไปเลี้ยงในสารละลายอาหารสูตร Yoshida ที่เติมเกลือ Sodium Chloride (NaCl) 103 mM (ค่าการนำไฟฟ้า (EC) 12 dSm^{-1}) และเลี้ยงต้นข้าวต่อไปเป็นเวลา 7 วัน (การทดลองระยะที่หนึ่ง) และเลี้ยงต้นข้าวต่อไปเป็นเวลา 10 วัน (การทดลองระยะที่สอง)

2.2.5 เมื่อครบ 5 และ 10 วัน ทำการเก็บผลการทดลองการตอบสนองต่อความเค็ม ได้แก่ อัตราการรอด ค่าคะแนนเค็มเทียบกับตารางมาตรฐาน และเก็บต้นข้าวทั้งหมดของทุกสายพันธุ์จากทั้ง 2 ระดับความเค็ม และนำไปอบแห้งที่ 60°C เป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักแห้งของส่วนต้นและราก

2.2.6 เมื่อชั่งน้ำหนักแห้งแล้ว จึงทำการบดตัวอย่างให้เป็นผง และชั่งน้ำหนักของผงตัวอย่างที่ได้ เพื่อส่งไปวิเคราะห์ เพื่อหาการสะสมของธาตุ Na^{+} และ K^{+} ในข้าวไร่เมื่อได้รับความเค็ม ที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ต่อไป

3. ขั้นตอนและวิธีการในการวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 การเตรียมสารละลายธาตุอาหาร

3.1.1 การเตรียมสารละลายสต็อกเข้มข้นตามสูตรอาหารของ Yoshida ดังตารางที่ 3.3 เป็นการเตรียมสารละลายสต็อครวม 4 ลิตร จำนวน 6 สต็อก

- สต็อกที่ 1-5 เตรียมโดยละลายสารในน้ำกรอง จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองให้ครบ 4 ลิตร

- สต็อกที่ 6 เตรียมโดยละลายสารของ micronutrient แต่ละตัวแยกกัน จากนั้นนำมาผสมกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองให้ได้ปริมาตร 2 ลิตร เติม H_2SO_4 ความเข้มข้น 98% ลงไป 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองให้ได้ปริมาตร 4 ลิตร

3.1.2 การเตรียมสารละลายธาตุอาหารจากสารละลายสต็อกเข้มข้น แสดงในตารางที่ 3.4 ถ้าต้องการเตรียมสารละลายธาตุอาหาร 40 ลิตรจะใช้สารละลายสต็อกเข้มข้น สต็อกละ 50 มิลลิลิตร ผสมกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองให้ครบ 40 ลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นปรับ pH ให้ได้ประมาณ 5.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 N

3.1.3 การเตรียมสารละลายธาตุอาหารที่เติม NaCl ทำได้โดยการเตรียมสารละลายธาตุอาหารเช่นเดียวกับข้อ 3.1.2 โดยหลังจากปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองแล้ว จึงเติม NaCl ลงไปตามความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 5.0

3.2 การเก็บข้อมูล

3.2.1 การให้ค่าคะแนนระดับความทนเค็มของข้าวในระยะต้นกล้า ทำได้โดยการตรวจสอบลักษณะการแสดงออกทางสัณฐานวิทยาของข้าวแต่ละต้น โดยการให้คะแนนเป็น 1- 9 โดยเทียบกับตารางที่ 2.1

- 3.2.2 การนับต้นข้าวที่รอดชีวิตและหาอัตราการรอดชีวิต (ร้อยละ)
- 3.2.3 หาน้ำหนักแห้งส่วนต้นและราก (หน่วยเป็นกรัม)
- 3.2.4 นำข้อมูลค่าคะแนนความทนเค็ม อัตราการรอด น้ำหนักแห้งต้นและราก ค่าการสะสม Na^+ และ K^+ และสัดส่วน Na^+/K^+ แล้วนำไปเขียนกราฟ

3.3 การวิเคราะห์ผลและข้อมูล

3.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ Na^+ และ K^+ จะใช้พืชที่อบแห้งแล้วมาบดเป็นผงให้ได้ น้ำหนักสุดท้ายไม่ต่ำกว่า 0.5 กรัม (ผ่านการกรองที่ 50 mesh) จากนั้นทำการย่อยด้วยกรดไนตริก (HNO_3) เข้มข้น 65% ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดปริมาณไอออนโดยใช้เครื่อง Atomic spectroscopy ขั้นตอนนี้ส่งตรวจวิเคราะห์ ณ หน่วยวิเคราะห์วิจัยดินพืชและวัสดุเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ค่าที่ได้จะถูกนำมาคำนวณเป็นร้อยละเทียบกับ น้ำหนักตัวอย่างที่ส่งตรวจ

3.3.2 คำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่างๆที่ได้จากผลการทดลอง วิเคราะห์หาความแตกต่างของค่าเฉลี่ย T-test และ ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS version 20 (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% $P < 0.05$)

3.3.3 ประมวลผลการตอบสนองของต้นข้าวจากข้อมูลทั้งหมด เพื่อจัดกลุ่มข้าวตาม ศักยภาพความทนเค็ม โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดของข้อมูลการตอบสนองทั้งหมดในข้าวแต่ละพันธุ์ ด้วย UPGMA cluster analysis ด้วยโปรแกรม SPSS version 20

ตารางที่ 3.1 รหัสสายพันธุ์และแหล่งที่มาของข้าวที่ใช้ในการวิจัยที่ใช้ในการทดลองระยะที่หนึ่ง

ลำดับ	รหัสสายพันธุ์	แหล่งที่มา
1	ULR078	จ.สุรินทร์
2	ULR152	จ.เลย
3	ULR159	จ.เลย
4	ULR192	จ.เพชรบูรณ์
5	ULR198	จ.เพชรบูรณ์
6	ULR234	จ.เพชรบูรณ์
7	ULR238	จ.เพชรบูรณ์
8	ULR239	จ.เพชรบูรณ์
9	ULR254	จ.เพชรบูรณ์
10	ULR284	จ.พัทลุง
11	KKU.ULR016	จ.เชียงใหม่
12	KKU.ULR031	จ.เพชรบูรณ์
13	KKU.ULR038	จ.เพชรบูรณ์
14	KKU.ULR064	จ.เพชรบูรณ์
15	KKU.ULR076	จ.เพชรบูรณ์
16	KKU.ULR121	จ.ร้อยเอ็ด
17	KKU.ULR198	จ.เพชรบูรณ์
18	KKU.ULR200	จ.เพชรบูรณ์
19	KKU.ULR229	จ.เพชรบูรณ์
20	KKU.ULR303	จ.เลย
21	KKU.ULR-T4	จ.เชียงใหม่
22	KKU.ULR-T33	จ.ขอนแก่น
23	KKU.ULR-T5	จ.เลย
24	KKU.ULR-T30	จ.เพชรบูรณ์
25	KKU.ULR-T15	จ.เลย
26	KKU.ULR-T18	จ.เลย
27	KKU.ULR-T20	จ.เชียงใหม่
28	KKU.ULR-T35	จ.เพชรบูรณ์
29	KKU.ULR-T36	จ.เพชรบูรณ์
30	KKU.ULR-T13	จ.เพชรบูรณ์
31	KDML105	อนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม
32	IR28	อนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม
33	IR29	อนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม
34	POKKALI	อนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม

ลำดับที่ 1-30 ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มพันธุ์ศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช

ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตารางที่ 3.2 รหัสสายพันธุ์และแหล่งที่มาของข้าวที่ใช้ในการวิจัยที่ใช้ในการทดลองระยะที่สอง

ลำดับ	รหัสสายพันธุ์	แหล่งที่มา
1	ULR 078	จ.สุรินทร์
2	ULR 152	จ.เลย
3	ULR 159	จ.เลย
4	ULR 192	จ.เพชรบูรณ์
5	ULR 198	จ.เพชรบูรณ์
6	ULR 234	จ.เพชรบูรณ์
7	ULR 284	จ.พัทลุง
8	KKU.ULR 076	จ.เพชรบูรณ์
9	KKU.ULR 198	จ.เพชรบูรณ์
10	KKU.ULR-T4	จ.เชียงใหม่
11	IR 29	อนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม
12	POKKALI	อนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม
13	ปทุมธานี 1	อนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าว จ.ฉะเชิงเทรา

ลำดับที่ 1-10 ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มพันธุ์ศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช
ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตารางที่ 3.3 การเตรียมสารละลายเข้มข้น (Stock solution) สำหรับสารละลายธาตุอาหารสูตร Yoshida (ดัดแปลงโดย Gregorio และคณะ, 1997)

สต็อก	ธาตุ	ชื่อสารเคมี	น้ำหนักสารเคมี (กรัม) สำหรับสารละลาย 4 ลิตร
Macronutrient			
1	N	Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	365.6
2	P	Sodium phosphate monobasic monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	142.4
3	K	Potassium sulfate (K_2SO_4)	285.6
4	Ca	Calcium chloride, dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	469.4
5	Mg	Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1296.0
Micronutrient			
6*	Mn	Manganous chloride, 4-hydrate ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	6.0
	Mo	Ammonium molybdate, 4-hydrate $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	0.296
	Zn	Zinc sulfate, 7-hydrate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.14
	B	Boric acid (H_3BO_3)	3.736
	Cu	Cupric sulfate, 5-hydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.124
	Fe	Ferric chloride, 6-hydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	30.8
		Citric acid, monohydrate ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	47.6

*หมายเหตุ stock ที่ 6 ประกอบด้วย Mn, Mo, Zn, B, Cu, และ Fe รวมกัน

การเตรียม micronutrient ทำได้โดยละลายสารของ micronutrient แต่ละตัวแยกกัน จากนั้นนำมาผสมกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 2 ลิตร จากนั้นเติม H_2SO_4 (98%) ลงไป 200 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 4 ลิตร

ตารางที่ 3.4 การเตรียมสารละลายธาตุอาหารสูตร Yoshida (ดัดแปลงโดย Gregorio และคณะ, 1997)

สต็อก	ธาตุ	ชื่อสารเคมี	ปริมาตรสารละลายสต็อกเข้มข้น (มล./40 ลิตรสารละลายธาตุอาหาร)	ความเข้มข้นสุดท้าย ของธาตุ (ppm)
<u>ธาตุหลัก</u>				
1	N	NH ₄ NO ₃	50	40
2	P	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	50	10
3	K	K ₂ SO ₄	50	40
<u>ธาตุรอง</u>				
4	Ca	CaCl ₂ .H ₂ O	50	40
5	Mg	MgSO ₄ .7H ₂ O	50	40
<u>ธาตุเสริม</u> (micronutrients)				
6	Mn	MnCl ₂ .4H ₂ O	50	0.50
	Mo	(NH ₄) Mo ₇ O ₂ .4H ₂ O		0.05
	Zn	ZnSO ₄ .7H ₂ O		0.01
	B	H ₃ BO ₃		0.20
	Cu	CuSO ₄ .5H ₂ O		0.01
	Fe	FeCl ₃ .6H ₂ O		2.00