

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองเพื่อเปรียบเทียบวิธีการคัดเลือกพันธุ์ทนแล้งของถั่วลิสง ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น เส้นรุ้งที่ 16 องศา 29 ลิปดาเหนือ เส้นแวงที่ 120 องศา 50 ลิปดาตะวันออก สูงจากระดับน้ำทะเล 186 เมตร ระยะเวลาทำการทดลองแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงที่ 1 เป็นการทดลองปลูกถั่วลิสงในสภาพไร่ ทำการทดลองระหว่างวันที่ 27 ธันวาคม 2534 ถึง วันที่ 6 พฤษภาคม 2535 ส่วนระยะเวลาทำการทดลองช่วงที่ 2 เป็นการทดสอบดัชนีความงอกของเมล็ดในสภาพเครียดจากการขาดน้ำ ทำการทดลองระหว่างวันที่ 1-8 สิงหาคม 2535

วิธีการคัดเลือกพันธุ์ทนแล้งของถั่วลิสงที่ใช้กับการทดลองที่ทำการศึกษามีทั้งหมด 6 วิธี แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ตามลักษณะการปฏิบัติงาน คือ

ก. การทดลองในสภาพไร่ มีวิธีการทดสอบคัดเลือกพันธุ์ถั่วลิสงทนแล้ง 3 วิธี คือ

1. การคัดเลือกพันธุ์ทนแล้งจากการประเมินสายพันธุ์ โดยการให้น้ำน้อยลงอย่างต่อเนื่อง
2. การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ
3. การให้คะแนนความเหี่ยวของใบด้วยสายตา

ข. การทดสอบในห้องปฏิบัติการ มีวิธีการทดสอบคัดเลือกพันธุ์ทนแล้ง 3 วิธี คือ

1. การวัดปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบ
2. การตรวจสอบความคงทนของเยื่อหุ้มเซลล์
3. การทดสอบดัชนีความงอกของเมล็ดในสภาพเครียดจากการขาดน้ำ

รายละเอียดของอุปกรณ์และวิธีการของแต่ละการทดลอง มีดังนี้

การทดลองในสภาพไร่

1. การคัดเลือกพันธุ์ทนแล้งจากการประเมินสายพันธุ์โดยการให้น้ำน้อยลงอย่างต่อเนื่อง
การทดลองนี้ได้กำหนดให้ถั่วลิสงได้รับน้ำปริมาณต่างกันโดยมีปริมาณน้อยลงอย่างต่อเนื่อง โดยใช้เทคนิคการให้น้ำแบบ line source sprinkler ตามวิธีการของ Hanks และคณะ (1976) จากการวางท่อส่งน้ำ (line source) ที่กึ่งกลางระหว่างแปลงทดลอง แต่ละด้านของท่อส่งน้ำแบ่งออกเป็น 1 ซ้ำ (ภาพที่ 1) ท่อส่งน้ำ (line source) เป็นท่ออลูมิเนียมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง



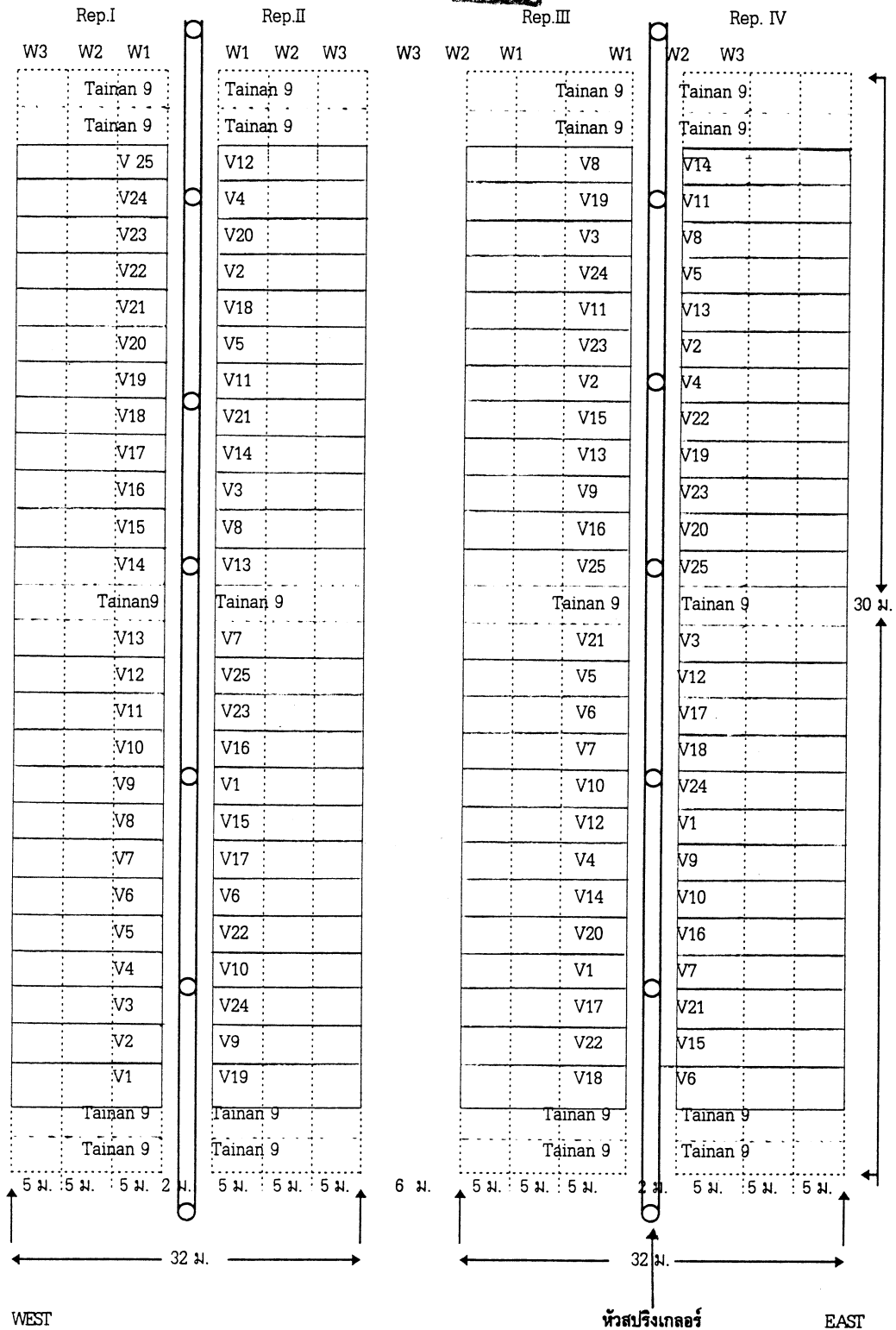
หอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ห้ามยืมออก

ท 65655

๒๗
๘๘
๒๕๖๓

25



ภาพที่ 1 แผนผังแปลงทดลอง การประเมินสายพันธุ์ทนแล้งของถั่วลิสง โดยการให้น้ำระบบ Line source sprinkler ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

4 นิ้ว ความยาวท่อละ 6 เมตร ตั้งหัวสปริงเกลอร์ระยะห่างกันทุก ๆ 6 เมตร ท่อหัวสปริงเกลอร์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว สูง 1 เมตร ใช้หัวสปริงเกลอร์ชนิด 2 หัวฉีด ยี่ห้อ LEGO รุ่น L44 เมื่อให้น้ำสามารถคลุมพื้นที่ได้ในรัศมีประมาณ 16 เมตร ซึ่งใช้แรงดันน้ำประมาณ 3 บาร์ ปริมาณน้ำที่ฉีดพ่นจากหัวสปริงเกลอร์จะลดน้อยลงตามระยะที่ห่างจากท่อส่งน้ำออกไป การทดลองนี้แบ่งระดับปริมาณน้ำออกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ ระดับน้ำที่ 1 (W_1) คือ ระดับที่ได้รับน้ำปริมาณมากที่สุดเป็นแถบขนานกับท่อส่งน้ำ ระยะ 1-6 เมตร ระดับน้ำที่ 2 (W_2) คือ ระดับที่ได้รับน้ำปานกลางเป็นแถบขนานอยู่ห่างจาก ท่อส่งน้ำ ระยะ 6-11 เมตร และระดับที่ 3 (W_3) คือระดับที่ได้รับน้ำปริมาณน้อยที่สุดที่อยู่ห่างจากท่อส่งน้ำ ระยะ 11-16 เมตร

การทดลองได้วางแผนแบบ strip plot ของ Hanks และคณะ (1980) มี 4 ซ้ำ โดยให้ ปัจจัย A เป็นพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วลิสงจำนวน 25 พันธุ์/สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) จัดลงหน่วย ทดลองแบบ randomized complete block จนครบ 4 ซ้ำ ปัจจัย B เป็นปริมาณน้ำ 3 ระดับ ตามวิธีการให้น้ำชลประทานระบบ line-source ใช้พื้นที่ในการทดลองทั้งหมด 30x70 เมตร ขนาดแปลงย่อย 1x5 เมตร จำนวน 360 แปลง (ภาพที่ 1)

การปลูกและการปฏิบัติรักษา

ก่อนปลูกได้เตรียมดินแปลงทดลองโดยการไถดะ 2 ครั้ง คราด 1 ครั้ง ปลูกถั่วลิสงเมื่อวันที่ 27 ธันวาคม 2534 ใช้วิธีปลูกแบบเปิดร่องโรยเมล็ดเป็นแถว ปลูกพันธุ์ละ 2 แถว วาง แถวในแนวตั้งฉากกับท่อส่งน้ำ ความยาวแถวละ 15 เมตร ห่างจากท่อส่งน้ำ 1 เมตร ระยะห่าง ระหว่างแถว 50 เซนติเมตร เปิดร่องตามความยาวของแถวให้ร่องลึก 5 เซนติเมตร โรยสาร ป้องกันกำจัดแมลง carbofuran 3%G อัตรา 5 กิโลกรัมต่อไร่ที่ก้นร่องก่อนโรยเมล็ดถั่วลิสง ลงในร่อง หลังจากนั้นกลบดินให้สม่ำเสมอ ใช้ถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ปลูกเป็นแถวริมของ แปลงทดลองด้านละ 4 แถว และปลูกคั่นกลางแปลง 2 แถว เพื่อกำหนดให้เป็นจุดเก็บ ความชื้นในดิน สำหรับถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 60-3 เป็นพันธุ์ที่มีการพักตัวของเมล็ด ได้ ทำลายการพักตัวของเมล็ดก่อนปลูกด้วย ethrel

หลังจากถั่วลิสงงอกแล้ว 10 วัน ทำการถอนแยกให้เหลือระยะระหว่างต้น 10 เซนติเมตร และใส่ปุ๋ย $N-P_2O_5-K_2O$ อัตรา 3-9-6 กิโลกรัมต่อไร่ โดยวิธีการเปิดร่องข้างแถวปลูกแล้ว กลบดินเมื่อถั่วลิสงอายุ 20 วันหลังจากงอก เมื่อถั่วลิสงอายุได้ 48 วันหลังจากงอกใส่ยิบซัม ($CaSO_4$) อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ ทำการกำจัดวัชพืช 3 ครั้งด้วยจอบเมื่ออายุ 20 วัน 40 วัน

ตารางที่ 1 พันธุ์/สายพันธุ์ และแหล่งที่มาของถั่วลิสง ที่ใช้ในการทดลองเปรียบเทียบวิธีการคัดเลือกพันธุ์
ทนแล้งที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น (27 ธันวาคม 2534 - 6 พฤษภาคม 2535)

ลำดับที่	พันธุ์/สายพันธุ์	แหล่งที่มาของพันธุ์/สายพันธุ์
1.	(Lampang x Robut33-1)SSD-43-2	] สายพันธุ์เพื่อผลผลิตสูงที่ผสมขึ้น โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สายพันธุ์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อผลผลิต สูงจาก ICRISAT
2.	(Lampang x UPLPn-4)8-SSD-18-2	
3.	ICG (CG)S-14	
4.	(J11 x Ah24439)-18-11-6	] สายพันธุ์เพื่อผลผลิตสูงที่ผสมขึ้น โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น
5.	(J11 x RCM387)-8-6-2	
6.	(J11 x NC7)-2-5	
7.	(Sunbelt runner x Tainan 9)-2	สายพันธุ์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อผลผลิตสูงจาก ICRISAT
8.	(Tainan 9 x RCM387)-7-3-9	] สายพันธุ์เพื่อผลผลิตสูงที่ผสมขึ้น โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น
9.	(Tainan 9 x Ah24439)-32-5-11	
10.	(Var 27 x NC8c)-7-8-15	] สายพันธุ์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ ด้านทานสารพิษ อะฟลาทอกซินจาก ICRISAT
11.	(AR-2 x Tainan 9)-37-6-19	
12.	(Ah7223 x NC7)-9-4	
13.	(PI337409 x Tainan 9)-14-1	] สายพันธุ์เพื่อผลผลิตสูงที่ผสมขึ้น โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น
14.	(Moket x RCM387)-8-14-4	
15.	(Tainan 9 x RCM387)-3-8-14	สายพันธุ์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อ ผลผลิตสูงจาก ICRISAT
16.	ICGS 38	
17.	Chiba No.1	สายพันธุ์ที่ใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อผลิต สูงของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น
18.	(Chico x NC2)-63-14-20	] สายพันธุ์อายุสั้นในโครงการ ปรับปรุงพันธุ์ของศูนย์วิจัยพืชไร่ ขอนแก่น
19.	(Chico x GA119-20)-13-14-4	
20.	(Lampang x Chico)-5-2-6	
21.	(MGS9 x Chico)-12-16-5	] พันธุ์แนะนำจากการรับรองพันธุ์ของ กรมวิชาการเกษตร
22.	Tainan 9	
23.	Khon Kaen 60-1	
24.	Khon Kaen 60-2	
25.	Khon Kaen 60-3	

และ 60 วันหลังจากออก ตามลำดับ และพ่นสารป้องกันกำจัดแมลงโมโนโครโทฟอส 30 มิลลิกรัมต่อน้ำ 20 ลิตร จำนวน 2 ครั้ง เมื่อถั่วลิสงอายุ 50 วัน และ 65 วันหลังจากออก

การให้น้ำชลประทาน

หลังจากปลูกถั่วลิสงแล้วในวันปลูกถั่วลิสงได้รับน้ำฝนที่ตกกระจาย 3 วัน มีปริมาณ 64.7 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นปริมาณที่เพียงพอสำหรับการงอกของถั่วลิสง และมีฝนตกในช่วงสัปดาห์ที่สองหลังการปลูกมีปริมาณ 23.6 มิลลิเมตร หลังจากนั้น 14 วัน จึงเริ่มวิธีการให้น้ำชลประทานแบบ line source sprinkler และให้น้ำในช่วงต่อไปทุก ๆ 14 วัน วิธีการให้น้ำชลประทานระบบ line source sprinkler กระทำเมื่อลมสงบช่วงเวลาประมาณ 18.00-22.00 น. เพื่อให้ทิศทางการกระจายของน้ำและปริมาณน้ำไม่ถูกรบกวนจากกระแสลม ปริมาณน้ำที่ได้จาก line source sprinkler จะลดน้อยลงเป็นลำดับ เมื่อมีระยะห่างจากท่อส่งน้ำมากขึ้น การให้น้ำทุกครั้งได้วัดปริมาณโดยใช้กระป๋องรับน้ำทรงกระบอกเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร วางไว้เหนือระดับทรงพุ่มของถั่วลิสง โดยได้ตั้งรับน้ำระดับน้ำ (water regime) ละ 4 จุด ที่บริเวณกึ่งกลางของแต่ละระดับน้ำ ซึ่งห่างจากท่อส่งน้ำในแนวตั้งฉากที่ระยะ 3.5 เมตร 8.5 เมตร และ 13.5 เมตร ตามลำดับ น้ำที่ได้ตวงวัดปริมาตรพร้อมคำนวณพื้นที่ปากกระป๋องแล้วนำไปหาค่าปริมาณน้ำซึ่งวัดเป็นความสูง ดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำ (มม.)} = \frac{\text{ปริมาตรน้ำ (ซม}^3\text{)}}{\text{พื้นที่ปากกระป๋อง (ซม}^2\text{)}}$$

สำหรับปริมาณน้ำที่วัดไว้ได้ทั้ง 3 ระดับ ตลอดจนปลูกแสดงไว้ในภาพที่ 2 ข.

จำนวนครั้งของการให้น้ำระบบ line source sprinkler ตลอดการทดลองรวม 6 ครั้ง ครั้งสุดท้ายให้น้ำเมื่อถั่วลิสงอายุ 88 วัน หลังจากออก หลังจากนั้นเริ่มเก็บเกี่ยวถั่วลิสงสายพันธุ์ที่มีอายุสั้น ซึ่งเริ่มเก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 94 วันหลังจากออก และมีฝนตกช่วงปลายฤดูอีก 2 ครั้งเมื่อถั่วลิสงมีอายุ 106 วัน และ 120 วันหลังจากออก มีปริมาณ 10 มิลลิเมตร และ 8.9 มิลลิเมตร ตามลำดับ จึงไม่มีการให้น้ำอีกจนสิ้นสุดการทดลอง

การบันทึกข้อมูล

สภาพฟ้าอากาศ

ข้อมูลเกี่ยวกับอุณหภูมิและปริมาณน้ำฝนตลอดฤดูปลูก ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2534 ถึงเดือนพฤษภาคม 2535 ได้จากการบันทึกของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

การวัดความชื้นในดิน

ได้เก็บตัวอย่างดินเพื่อวัดความชื้นในดินโดยวิธีกราวิเมตริก (Gravimetric method) ที่ระดับ 0-30 เซนติเมตร และ 30-60 เซนติเมตร โดยใช้เหล็กเจาะเก็บดิน (auger) ก่อนการปลูกและก่อนการให้น้ำทุกครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างดิน ทุกระดับน้ำ ระดับละ 3 จุด นำดินไปชั่งน้ำหนักทันทีหลังเก็บตัวอย่าง แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักดินหลังอบแห้ง นำน้ำหนักดินที่ชั่งได้ทั้ง 2 ครั้ง มาคำนวณหาความชื้นในดินตามวิธีของ Gardner (1986) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้นในดิน} = \frac{\text{น้ำหนักดินก่อนอบ} - \text{น้ำหนักดินอบแห้ง}}{\text{น้ำหนักดินอบแห้ง}} \times 100$$

การวัดความสูงของต้น

ทำการวัดความสูงของต้นโดยวัดจากโคนต้นระดับผิวดินถึงปลายยอด เมื่อถั่วลิสงอายุ 30 วัน 60 วัน และ 90 วันหลังจากงอก

การวัดผลผลิตน้ำหนักแห้งและเมล็ด

เก็บเกี่ยวผลผลิตถั่วลิสงตามอายุการสุกแก่ของพันธุ์/สายพันธุ์ซึ่งไม่เท่ากัน ถั่วลิสงที่เก็บเกี่ยวชุดแรกมี 4 สายพันธุ์ เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 94 วันหลังจากงอก เก็บเกี่ยวชุดที่ 2 จำนวน 9 พันธุ์/สายพันธุ์ อายุ 106 วันหลังจากงอก และเก็บเกี่ยวชุดที่ 3 จำนวน 14 พันธุ์/สายพันธุ์ เมื่ออายุ 120 วันหลังจากงอก โดยเก็บจากพื้นที่ 3 ตารางเมตร แล้วปลิดฝักแก่ออกจากต้นนำไปตากแห้งและชั่งน้ำหนักฝักแห้ง ส่วนน้ำหนักต้นแห้งรวมทั้งต้นได้สุ่มเก็บตัวอย่างจากต้นที่ปลิดฝักแก่ออกไปแล้วจำนวน 10 ต้น นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำออกมาชั่งน้ำหนักแห้ง

ฝักแห้งนำไปกะเทาะเมล็ดและชั่งน้ำหนักรวมของเมล็ดแล้วสุ่มเมล็ด 100 เมล็ด นำไปชั่งน้ำหนัก 100 เมล็ด

การวัดดัชนีทนแล้ง (Drought Index ; DI) ของถั่วลิสง วัดจากสัดส่วนการให้ผลผลิตในสภาพแห้งแล้งกับการให้ผลผลิตในสภาพที่ได้น้ำมากตามวิธีการของ Fischer และคณะ (1983) ซึ่งอ้างถึงโดยอารูธ และคณะ (2530) ดังนี้

$$DI = \frac{Yield\ stress}{Yield\ nonstress}$$

Yield stress หรือผลผลิตในสภาพแห้งแล้ง ได้แก่ ผลผลิตในระดับการให้น้ำที่ W_3

Yield nonstress หรือผลผลิตในสภาพที่ได้รับน้ำมาก ได้แก่ ผลผลิตในระดับการให้น้ำที่ W_1

วัดดัชนีน้ำหนักแห้งในการทนแล้ง (total dry matter stress index ; TSI) โดยการคำนวณจากสัดส่วนน้ำหนักแห้งรวมของถั่วลิสงใน W_3 กับ W_1 ตามวิธีของ Bouslama และ Schapaugh (1984) ดังนี้

$$TSI = \frac{Dry\ matter\ of\ stressed\ plant}{Dry\ matter\ of\ control\ plant}$$

Dry matter of stressed plant คือ น้ำหนักแห้งรวมในระดับการให้น้ำที่ W_3

Dry matter of control plant คือ น้ำหนักแห้งรวมในระดับการให้น้ำที่ W_1

2 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ (Chlorophyll content test)

ทำการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบถั่วลิสงจากใบใหม่ที่คลี่ขยายเต็มที่ (first fully expanded leaf) บนต้นถั่วลิสงที่ปลูกในแปลงทดลอง ซึ่งให้น้ำระบบ line source sprinkler โดยไม่มีการทำลายใบ จากการใช้เครื่องมือวัดปริมาณคลอโรฟิลล์แบบสนามยี่ห้อ Minolta Spad 501 วัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบเมื่อถั่วลิสงอายุ 30 วัน และ 55 วันหลังจากงอก ใช้ตัวอย่างใบจากทรีตเมนต์ละ 4 ใบ ทุกเช้า อ่านค่าตัวเลขจากเครื่องวัด แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟคู่มือของเครื่องวัดจะได้ค่าปริมาณคลอโรฟิลล์มีหน่วยวัดเป็น น้ำหนัก/พื้นที่ใบ ($mg/100\ cm^2$)

3 การให้คะแนนความเหี่ยวของใบด้วยสายตา (Visual scoring)

การตรวจให้คะแนนความเหี่ยวของใบ เพื่อประเมินความทนแล้งของพันธุ์/สายพันธุ์ด้วยสายตา อาศัยการสังเกตลักษณะของใบ เช่น จำนวนใบที่เหี่ยว การพลิก และการปรับมุมใบ ได้กำหนดช่วงคะแนน 0-5 คะแนน 0 ได้แก่ ใบปกติ คะแนน 1, 2, 3, 4, และ 5 คือ มีจำนวนใบเหี่ยว 20 เปอร์เซ็นต์ 40 เปอร์เซ็นต์ 60 เปอร์เซ็นต์ 80 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ ของใบทั้งหมดในแต่ละแปลงย่อยตามลำดับ ทำการให้คะแนนความเหี่ยวของใบ 2 ครั้ง เวลาบ่ายในวันก่อนการให้น้ำเมื่ออายุ 30 วัน และ 73 วันหลังจากงอก กับถั่วลิสงทดลองซึ่งให้น้ำในระบบ line source sprinkler

การทดสอบในห้องปฏิบัติการ

1. การวัดปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบ (Relative Water Content ; RWC)

ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบ (RWC) วัดจากใบใหม่ที่คลี่ขยายเต็มที่ โดยเก็บตัวอย่างใบถั่วลิสงจากแปลงทดลองในเวลาบ่ายก่อนการให้น้ำเมื่อถั่วลิสงอายุ 45 วัน และ 73 วันหลังจากออกใช้ตัวอย่างใบแต่ละแปลงย่อย 5 ใบย่อย โดยเก็บตัวอย่างใบใส่ถุงพลาสติกปิดปากถุงให้แน่นทันทีแล้วเก็บรักษาในกระติกน้ำแข็ง เพื่อป้องกันการคายน้ำของใบและการหายใจ เมื่อเก็บตัวอย่างจนครบทุกพันธุ์ทุกระดับการให้น้ำแล้ว จึงนำไปทดลองในห้องปฏิบัติการ เจาะเนื้อแผ่นใบเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.1 เซนติเมตร ด้วยเหล็กเจาะมีคมใบละ 1 ชิ้น รวม 5 ชิ้น ต่อแปลงย่อย ชั่งน้ำหนักสดแล้วนำไปแช่น้ำกลั่นอย่างน้อย 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเขี่ยน้ำออกจากใบด้วยกระดาษซับ ชั่งน้ำหนักใบที่อิ่มตัวด้วยน้ำ เสร็จแล้วนำไปอบให้แห้งด้วยอุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งของใบ นำค่าน้ำหนักที่ชั่งได้ไปคำนวณหาค่า RWC ตามสูตรของ Kramer (1980) ดังนี้

$$RWC = \frac{\text{fresh wt. of leaf disc} - \text{dry wt. of leaf disc}}{\text{saturated wt. of leaf disc} - \text{dry wt. of leaf disc}} \times 100\%$$

นำค่า RWC ไปวิเคราะห์ทางสถิติ และวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่าง RWC กับผลผลิตในสภาพแห้งแล้ง และกับค่าตรวจสอบจากลักษณะอื่น ๆ ที่ทำการศึกษา

2. การทดสอบความคงทนของเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell Membrane Stability Test ; CMS)

ทำการเก็บตัวอย่างใบถั่วลิสงเมื่ออายุ 31 วันหลังจากออก จากแปลงทดลอง line source sprinkler ในบริเวณระดับน้ำที่ 1 (W_1) ซึ่งเป็นถั่วลิสงที่ได้รับน้ำปริมาณมาก การทดลองนี้ได้วางแผนการทดลองแบบ RCB ทำ 4 ซ้ำ จำนวน 25 พันธุ์/สายพันธุ์

ใบที่นำมาทดลองเป็นใบใหม่ที่คลี่ขยายตัวเต็มที่แล้ว ใช้ตัวอย่างพันธุ์ละ 5 ใบย่อย เจาะใบเป็นรูวงกลมด้วยเหล็กเจาะมีคมเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.1 เซนติเมตร เพื่อให้ขนาดใบที่ใช้ในการเปรียบเทียบเท่ากันทุกพันธุ์

นำแผ่นใบถั่วลิสงที่เจาะเป็นรูวงกลมแล้วใส่ลงในหลอดทดลอง ล้างด้วยน้ำกลั่น เพื่อชำระเอาส่วนของ electrolytes ที่ละลายออกมาจากรอยตัดออกไป

นำแผ่นใบที่ล้างแล้วแช่ลงในสารละลาย PEG 6000 43 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 10 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำให้เกิด osmotic stress ประมาณ -1.8 MPa แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10°C ส่วนตัวอย่างที่เป็น control ใช้แผ่นใบจำนวนเท่ากัน แช่ในน้ำก่่าจัดประจุ (deionized water) แทนสารละลาย PEG 6000

หลังจากนั้นเทสารละลาย PEG และน้ำจาก control ออก ล้างแผ่นใบอย่างรวดเร็วด้วยน้ำก่่าจัดประจุ โดยเติมน้ำลงในหลอดทดลองเขย่า 2 ครั้ง เทออก ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง

เติมน้ำก่่าจัดประจุ 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละอันรวมทั้ง control ด้วย แล้วนำไปไว้ในตู้ปรับอุณหภูมิที่ 10°C อีก 24 ชั่วโมง

นำออกมาทำให้อุ่น 25°C เขย่าด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลองประมาณ 5 วินาที

เทน้ำที่แช่แผ่นใบในหลอดทดลองออกจากแผ่นใบแล้ววัดการนำไฟฟ้าจากน้ำที่เทออกมา (วัดครั้งที่ 1) ด้วยเครื่องวัดการนำไฟฟ้าหือ Fisher รุ่น 152 (Fisher Model 152 Conductivity Meter)

นำน้ำที่วัดค่าการนำไฟฟ้าครั้งที่ 1 แล้วเทคืนใส่แผ่นใบเดิมในหลอดทดลอง แล้วนำหลอดทดลองไปแช่ลงใน water bath 90°C 15 นาที เสร็จแล้วทำให้เย็นลงจนถึงระดับอุณหภูมิ 25°C

เทน้ำออกจากแผ่นใบในหลอดทดลองที่ต้มแล้ววัดค่าการนำไฟฟ้าของน้ำครั้งที่ 2

นำค่าการนำไฟฟ้าที่วัดได้ครั้งที่ 1 (C_1) และครั้งที่ 2 (C_2) ซึ่งมีหน่วยวัดเป็น $\mu\text{mho/cm}$. ไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ การถูกทำลายของเซลล์ โดยใช้สูตร

$$\text{Injured leaf} = \frac{C_1}{C_2} \times 100$$

ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ใบที่ไม่ถูกทำลายในตัวอย่างใบเดียวกัน หาได้โดยเอาเปอร์เซ็นต์เซลล์ใบที่ถูกทำลายไปลบออกจาก 100 ดังนี้

$$\text{Uninjured leaf} = 100 - \text{Injured leaf}$$

คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ใบที่ถูกและเซลล์ใบที่ไม่ถูกทำลาย จากการทดลองที่แช่แผ่นใบในน้ำ และทรีตเมนต์ที่แช่แผ่นใบใน PEG 6000 เพื่อนำไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ใบที่ไม่ถูกทำลายจากผลของความเครียดที่ระดับ -1.8 MPa ตามวิธีของ Sullivan และ Ross (1979) อ้างถึงโดย Laohasiriwong และคณะ (1988) ดังตัวอย่างต่อไปนี้

วัดค่าการนำไฟฟ้าจากการทดลองที่แช่แผ่นใบในน้ำ (control) ได้ C_1 เท่ากับ $9 \mu\text{mho/cm}$. และ C_2 ได้ $120 \mu\text{mho/cm}$. ดังนั้น ใบที่ถูกทำลายและไม่ถูกทำลายใน control คำนวณได้ ดังนี้

$$\begin{aligned}\text{Injured leaf in control} &= \frac{9}{120} \times 100 \\ &= 7.5 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Uninjured leaf in control} &= 100 - 7.5 \\ &= 92.5 \%\end{aligned}$$

วัดค่าการนำไฟฟ้าจากทริตเมนต์ที่แช่แผ่นใบใน PEG 6000 ได้ C_1 เท่ากับ $21 \mu\text{mho/cm}$. และ C_2 ได้ $150 \mu\text{mho/cm}$. ดังนั้น ใบที่ถูกทำลายและไม่ถูกทำลายใน PEG 6000 คำนวณได้ ดังนี้

$$\begin{aligned}\text{Injured leaf in PEG 6000} &= \frac{21}{150} \times 100 \\ &= 14 \%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Uninjured leaf in PEG 6000} &= 100 - 14 \\ &= 86 \%\end{aligned}$$

แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ใบที่ไม่ถูกทำลายจากผลของความเครียดที่ระดับ -1.8 MPa จากการเทียบสัดส่วนเปอร์เซ็นต์ใบที่ไม่ถูกทำลายจากการแช่ใน PEG 6000 กับเปอร์เซ็นต์ใบที่ไม่ถูกทำลายจากการแช่ในน้ำ ดังนี้

$$\text{Uninjured leaf} = \frac{\% \text{ Uninjured leaf in PEG 6000}}{\% \text{ Uninjured leaf in control}} \times 100$$

นำเปอร์เซ็นต์ใบที่ไม่ถูกทำลายจาก osmotic stress ที่คำนวณได้ไปวิเคราะห์ เพื่อเปรียบเทียบความคงทนของเยื่อหุ้มเซลล์ของพันธุ์/สายพันธุ์ และวิเคราะห์ correlation หาความสัมพันธ์ระหว่างความคงทนของเยื่อหุ้มเซลล์กับผลผลิตในสภาพแห้งแล้ง และกับลักษณะอื่น ๆ ที่ทำการศึกษา

3.2.3 การทดสอบความงอกของเมล็ดในสภาพเครียดจากการขาดน้ำ (Germination

Stress Index ; GSI)

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง 25 พันธุ์/สายพันธุ์ ซึ่งเป็นชุดเดียวกับที่ปลูกทดลองในสภาพไร่มาทดสอบความงอกที่ osmotic stress ต่างกัน 3 ระดับ คือ 0 -0.3 และ -0.5 MPa โดยที่ระดับ 0 MPa คือ ไม่มีความเครียดเนื่องจากการขาดน้ำ ส่วนที่ระดับ -0.3 และ -0.5 MPa นั้นเป็น

ความเครียดที่เกิดจากการขาดน้ำซึ่งทำได้โดยการเติมสาร Polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) ปริมาณ 134 กรัม และ 189 กรัม ตามลำดับ ลงในน้ำกำจัดประจุ (deionized water) ปริมาตร 1 ลิตร

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 ซ้ำ แต่ละ treatment ใช้เมล็ดพันธุ์ 10 เมล็ด ล้างผิวเมล็ดด้วยสารละลาย sodium hypochlorite 5 เปอร์เซ็นต์ (V./V.) 10 นาทีก่อนเพาะความงอก ถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 60-3 ทำลายการพักตัวด้วย ethrel หลังจากนั้นคลุกเมล็ดด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อรา Ridomil MZ 72 นำเมล็ดไปเพาะในเพลทแก้วที่ใช้กระดาษเพาะเมล็ดวางซ้อนกัน 3 ชั้น จัดให้วัสดุเพาะในเพลทแก้ว มีระดับความเครียดต่างกัน 3 ระดับ คือ ความเครียดที่ระดับ 0 MPa จากการเตรียมวัสดุเพาะโดยการใส่น้ำสะอาดลงไปในเพลทแก้ว 10 มิลลิลิตร ส่วนความเครียดที่ระดับ -0.3 MPa และ -0.5 MPa นั้นทำได้โดยการเทสารละลาย PEG 6000 ที่เตรียมให้มี osmotic stress ดังกล่าวลงในเพลทแก้ว เพลทละ 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปวางในตู้ปรับอุณหภูมิ 25°C จนกว่าเมล็ดจะงอก

การบันทึกข้อมูลของวิธี GSI

นับจำนวนต้นงอกเมื่อรากงอกออกอย่างน้อย 4 มิลลิเมตร โดยตรวจนับทุก ๆ 2 วัน จนถึงวันที่ 8 แล้วนำค่าตัวเลขที่ตรวจนับได้มาหาค่า Promptness Index (PI) ตามวิธีของ Kpoghomou และคณะ (1990) โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$PI = nd_2 (1.00) + nd_4 (0.75) + nd_6 (0.5) + nd_8 (0.25)$$

เมื่อ nd_2 , nd_4 , nd_6 และ nd_8 คือ จำนวนของเมล็ดที่งอกในวันที่ 2, 4, 6 และ 8 ตามลำดับ

นำค่า PI ของเมล็ดในสถานะ stress และ control ไปหาค่า Germination Stress Index เพื่อเปรียบเทียบความทนทานต่อความแห้งแล้งของพันธุ์ตามสูตร

$$GSI = \frac{\text{Promptness Index of stressed seeds}}{\text{Promptness Index of control seeds}}$$

นำค่า GSI จากทั้ง 2 ระดับความเครียด ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของการงอกของเมล็ด และนำไปหาค่าสหสัมพันธ์กับ ผลผลิตในระดับน้ำที่ 3 และลักษณะอื่น ๆ