บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาวิธีการทำลายการพักตัวของเมล็ดพันธุ์ข้าวญี่ปุ่น โดยนำเมล็ดพันธุ์ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ ก.วก.1 ที่เก็บเกี่ยว 30 วันหลังดอกบานมาเก็บไว้และนำมาผ่านวิธีการทำลายการพักตัวในวันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 วันหลังจากเก็บเกี่ยว แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD : Completely Randomized Design)

3.1 วัสดุเกษตร

เมล็ดพันธุ์ข้าวญี่ปุ่นพันธ์ ก.วก. 1 ที่ทำการเก็บเกี่ยวหลังดอกบาน 30 วัน ซื้อจากแปลงปลูกของเกษตรกร อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่ เก็บเกี่ยวโดยใช้รถเกี่ยวนวดข้าว นำเมล็ดพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวได้มาตากลดความชื้นในร่มจนความชื้นลดลงเหลือ 12 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจึงนำไปทำความสะอาด คัดแยกขนาดเมล็ด เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ไว้ในถังภาชนะปิดที่อุณหภูมิห้องก่อนทำการสุ่มตัวอย่างนำไปทดลอง เมล็ดข้าวที่ใช้ในการทดลองทำการเก็บเกี่ยวเมื่อวันที่ 21 เมษายน 2550 และ 11 เมษายน 2551

ภาพที่ 3.1 การเก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ ก.วก. 1

3.2 วัสดุอุปกรณ์

3.2.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบชั่งจากด้านบน 2 ตำแหน่ง (Digital Balance 0.01 g) รุ่น PB 1502-S บริษัท Mettler-Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.2.2. เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบชั่งจากด้านบน 4 ตำแหน่ง (Digital Balance 0.0001 g) รุ่น AB 204-S บริษัท Mettler-Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.2.3 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) รุ่น Venticell ขนาด 111 ลิตร ยี่ห้อ MMM ประเทศเยอรมัน

3.2.4 ตู้อบความร้อน (Ovent Set) ขนาด 108 ลิตร ยี่ห้อ Memmert รุ่น UFB 500

3.2.5 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง (Seed Germinator) รุ่น KPB6395FL ยี่ห้อ Termaks รุ่น S/N 2-858,

3.2.6 อ่างควบคุมอุณหภูมิระบบหมุนเวียน (Heating Circulator Water Bath) รุ่น MV-26 ความจุประมาณ 26 ลิตร

3.2.7 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Heat Circulate Water Bath) รุ่น YCW 010 S/M 303711

3.2.8 ชุดดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Auto Pipette Set) รุ่น Reserch ยี่ห้อ Eppendorf

3.2.9 เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนในน้ำ (Oximeter) รุ่น Oxi 320/SET ยี่ห้อ WTW

3.3 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การดำเนินการทดลองวิธีการทำลายการพักตัว

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD : Completely Randomized Design) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง ทำการทดลองกรรมวิธีละ 10 ซ้ำ โดยทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการลดความชื้น การทำความสะอาด และคัดแยกขนาดเมล็ดแล้วนำมาบรรจุลงในภาชนะตัวอย่างละ 200 กรัม

การทดลองที่ 1 ทดสอบเบื้องต้นเพื่อศึกษาลักษณะการพักตัว (dormancy type)

การทดลองนี้ใช้เมล็ดข้าวญี่ปุ่นที่ทำการเก็บเกี่ยวเมื่อวันที่ 21 เมษายน 2550 มาทำการทดสอบการพักตัวในเบื้องต้นและศึกษาจำแนกลักษณะการพักตัวของเมล็ด

วิธีการ

1.1 นำ ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ ข้าวญี่ปุ่น มาอบด้วยวิธีให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48, 96 และ 144 ชั่วโมง โดยใช้ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

1.2 สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ ข้าวญี่ปุ่น ที่ผ่านการอบด้วยวิธีให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 48, 96 และ 144 ชั่วโมงมาตรวจสอบการพักตัว โดยการเพาะความงอกแบบ Standard germination test

การทดลองที่ 2 ศึกษาการแก้การพักตัวที่เหมาะสมในของข้าวญี่ปุ่น

การทดลองนี้ใช้เมล็ดข้าวญี่ปุ่นที่ทำการเก็บเกี่ยวเมื่อวันที่ 11 เมษายน 2551 มาทำการทำลายการพักตัวด้วยกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 การแก้การพักตัวโดย การแช่น้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง กับการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

วิธีการ

1.1 เตรียมน้ำกลั่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) จำนวน 5 ลิตร โดยกำหนดอุณหภูมิของน้ำที่ 40 องศาเซลเซียส

1.2 นำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวญี่ปุ่นชุดแรกมาแช่น้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และชุดที่สองมาแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวญี่ปุ่นที่ผ่านการแช่น้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และการแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มาตรวจสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

คุณสมบัติ ด้านเปอร์เซ็นต์ความงอก, ความแข็งแรงของเมล็ด, อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า และความมีชีวิตของเมล็ด

กรรมวิธีที่ 2 หาระดับความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมต่อการทำลายการพักตัวของเมล็ดข้าวญี่ปุ่น โดยใช้ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

การเตรียมสารละลาย

สารละลายเอทานอลความเข้มข้น 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เตรียมโดยตวงเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (ethanol, องค์การสุรา) ปริมาตร 31.578, 42.105 และ 52.631 มิลลิลิตร ตามลำดับ ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

วิธีการ

3.1 นำ ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ ข้าวญี่ปุ่น มาแช่เอทานอล เป็นระยะเวลา 24 ชม. ที่ระดับความ 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ ข้าวญี่ปุ่น ที่ผ่านการแช่เอทานอลแล้ว มาตรวจสอบคุณสมบัติเช่นเดียวกับกรรวิธีที่ 2

กรรมวิธีที่ 3 หาระดับความเข้มข้นของจิบเบอเรลลิก แอซิด (gibberellic acid: GA_3) ที่เหมาะสมต่อการทำลายการพักตัวของเมล็ดข้าวญี่ปุ่น โดยทดลองใช้ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.02, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

การเตรียมสารละลาย

สารละลายจิบเบอเรลลิก แอซิดความเข้มข้น 0.02 , 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยตวงจิบเบอเรลลิก แอซิด ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ w/v SL (ยี่ห้อลองจิ๊บ 2 เปอร์เซ็นต์, บริษัทโซตัส อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด) ปริมาตร 10, 25 และ 50 มิลลิลิตรตามลำดับ ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

วิธีการ

4.1 นำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวญี่ปุ่นมาแช่ในจิบเบอเรลลิก แอซิด ที่ความเข้มข้น 0.02, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

4.2 สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวญี่ปุ่นที่ผ่านการแช่จิบเบอเรลลิก แอซิดแล้วมาตรวจสอบคุณสมบัติเช่นเดียวกับกรรวิธีที่ 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 4 การแก้การพักตัวโดย การเพิ่มความเข้มข้นออกซิเจนในน้ำ โดยใช้เครื่องปั๊มออกซิเจน

การเพิ่มความเข้มข้นออกซิเจนในน้ำ

นำน้ำกลั่นเทลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) จำนวน 5 ลิตร โดยกำหนดอุณหภูมิของน้ำที่ 28 องศาเซลเซียส โดยใส่เครื่องปั๊มออกซิเจนตู้ปลาจำนวน 5 หัวปั๊ม วางกระจาย 5 ตำแหน่งให้ทั่วบริเวณแล้วปิดฝาอ่างควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นทำการปั๊มออกซิเจนลงน้ำเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงจนถึงจุดอิ่มตัว ทำการวัดปริมาณออกซิเจนในน้ำด้วยเครื่อง oximeter รุ่น Oxi 320/SET แล้วบันทึกผล (ภาพที่ 3.2)

วิธีการ

4.1 นำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวญี่ปุ่นมาแช่ในน้ำอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสที่มีการปั๊มออกซิเจนลงในน้ำเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงจนถึงจุดอิ่มตัว เมื่อแช่ตัวอย่างเรียบร้อยแล้วจึงปิดฝาทำการปั๊มออกซิเจนลงในน้ำอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง.

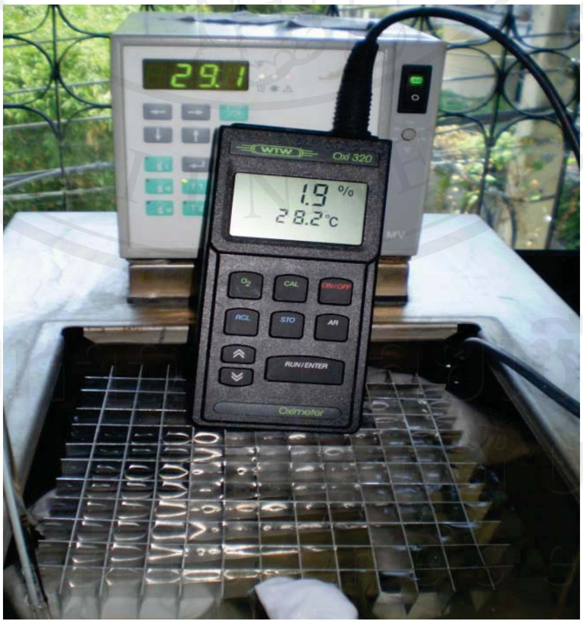
4.2 สุ่มตัวอย่าง เมล็ดพันธุ์ข้าวญี่ปุ่น ที่ผ่านการแช่ในน้ำ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่มีการปั๊มออกซิเจนลงในน้ำเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงจนถึงจุดอิ่มตัว มาเปรียบเทียบกับการแช่น้ำที่ไม่เพิ่มออกซิเจนในอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3. 3) แล้วนำตัวอย่างที่ได้มาตรวจวัดเช่นเดียวกับกรรวิธีที่ 2

กรรมวิธี 5 ชุดควบคุม

โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ด ข้าวญี่ปุ่นที่ไม่ผ่านการทำลายการพักตัว มาตรวจสอบ คุณสมบัติต่างๆ เช่นเดียวกับกรรวิธีที่ 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 3.2 การแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวญี่ปุ่นในน้ำอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสที่มีการปั๊มออกซิเจนลงในน้ำเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงจนถึงจุดอิ่มตัว



ภาพที่ 3.3 การแช่เมล็ดพันธุ์ข้าวญี่ปุ่นในน้ำอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 วิธีการวัดผล

3.5.1 การตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความงอก (germination test)

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จำนวน 400 เมล็ด ในแต่ละวิธีการทดลอง มาทดสอบความงอก โดยวิธี Standard germination test แบบ between paper ทำการเพาะซ้ำละ 100 เมล็ด 4 ซ้ำ เพาะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์สูง ตรวจนับเปอร์เซ็นต์ความงอกในวันที่ 5 และ 14 หลังการเพาะ ประเมินความงอก จำนวนต้นอ่อนปกติ จำนวนต้นอ่อนผิดปกติ เมล็ดตาย และเมล็ดแข็ง คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ บันทึกผล

3.5.2 การทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์โดยการเร่งอายุ (accelerate aging test)

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จำนวน 400 เมล็ด ในแต่ละวิธีการทดลอง มาทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์โดยการเร่งอายุ จำนวน 4 ซ้ำ นำไปเร่งอายุที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 100 เปอร์เซ็นต์เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำเมล็ดที่ผ่านการเร่งอายุแล้วมาทดสอบความงอก

3.5.3 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า

โดยการประเมินผลการเจริญเติบโตของต้นกล้าจากการทดสอบความงอกมาตรฐาน นำต้นกล้าที่งอกปกติมาตัดเอาเฉพาะส่วนของยอดอ่อนและรากอ่อนบรรจุใส่ถุงกระดาษ นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและรากอ่อน แล้วคำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้าจากสูตร

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของยอดอ่อนและรากอ่อน}}{\text{จำนวนต้นกล้าปกติ}} \quad (\text{มิลลิกรัม/ต้น})$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.4 ตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์โดยตรวจสอบการติดสีของพื้นที่ที่ย้อมด้วยเตตระโซเลียม (the topographical tetrazolium test)

การเตรียมสารละลาย

สารละลายเตตระโซเลียม 0.1 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดย ชั่งสาร 2,3,5-ไตรฟรีนิล เตตระโซเลียม (2,3,5- Triphenyl tetrazolium, บริษัท Ajex, ประเทศออสเตรเลีย) 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

การตรวจสอบ

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จำนวน 400 เมล็ด ในแต่ละวิธีการทดลอง มาทดสอบความมีชีวิต จำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด นำเมล็ดพันธุ์ที่ได้ไปทำให้ชื้นที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยการแช่น้ำเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการเตรียมเมล็ดพันธุ์ก่อนย้อมสี โดยนำเมล็ดมาผ่าตามยาวผ่านคัพภะ และ 3 ส่วน 4 ของเอนโดสเปิร์ม นำเมล็ดที่ผ่าเรียบร้อยแล้วแช่ในสารละลาย 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride ที่มี pH 6.5-7.5 ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วิเคราะห์การติดสีบริเวณผิวหน้าที่ผ่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved