

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. พันธุ์ถั่วเขียวสำหรับปลูกเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ซึ่งได้รับจากโครงการการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองและถั่วเขียว สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จำนวน 20 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1)

2. อุปกรณ์ในการผสมเกสร

2.1 ปากคีบปลายโค้งแหลม

2.2 ป้ายกระดาษขนาด 1 x 2 เซนติเมตร มีเชือกร้อยสำหรับแขวน

2.3 แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

2.4 ถุงกระดาษขนาด 7 x 12 เซนติเมตร

2.5 แวนชวยขนาด 10 เท่า

3. วัสดุการเกษตร

กระดาษขนาด 12 นิ้ว กิ่ววน ปุ๋ย ยาฆ่าแมลง และอื่นๆ

4. อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง

4.1 เครื่องแก้ว ได้แก่ หลอดทดสอบ ปิเปต ชอคตวงปริมาตร  
ชอครูปชมพู บีกเกอร์ าลา

4.2 คุชชีเบิล

4.3 ทัพพ

4.4 เครื่องบด

4.5 ตะแกรงร่อนขนาด 100 เมช

- 4.6 เครื่องเหวี่ยงแม่แบบ Sorvall RC-5
- 4.7 เครื่องวัดความเป็นกรดและด่าง
- 4.8 สเปคโตรโฟโตมิเตอร์

## 5. สารเคมี

- 5.1 เอทิลแอลกอฮอล์
- 5.2 ฟีนอล
- 5.3 กรดซัลฟูริก
- 5.4 อาซีเทท บัฟเฟอร์
- 5.5 สแตนคาร์บ คี กลูโคส
- 5.6 กรดอาซีติก
- 5.7 โซเดียมคาร์บอเนต
- 5.8 โทลูอีน
- 5.9 เอ็นไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส รหัส A.7255 ของบริษัท Sigma Chemical Company.

## วิธีดำเนินการทดลอง

### 1. การปลูกและการดูแลรักษา

ปลูกถั่วเขียวทั้งสิ้น 4 ครั้ง ในการปลูกครั้งที่ 1 และครั้งที่ 4 ใช้แผนการทดลองแบบ CRD (completely randomize design) ในการปลูกทุกครั้งคลุกเมล็ดค้าย Sevin-85 0.1 กรัม ต่อน้ำหนักถั่วเขียว 15 กรัม เพื่อป้องกันแมลงในดินและใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตรา 0.4 กรัม (ประมาณ 10-15 เม็ด) ต่อกหลุม ร่องพื้นที่ทุกครั้ง หลังจากถั่วเขียวงอกแล้ว 1 สัปดาห์ ทำการพ่นยาฆ่าแมลง monocrotophos และพ่นทุกๆ 2 สัปดาห์ จนถั่วเขียวอายุ 2 เดือน หลังจากถั่วเขียวออกดอก ให้ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อีกครั้ง กำจัดวัชพืชด้วยมือ ให้น้ำเช้าและเย็นวันเว้นวัน

การปลูกครั้งที่ 1 ถึง 3 ปลูกที่เรือนเพาะชำ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การปลูกครั้งที่ 4 ปลูกที่แปลงทดลอง

ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

การปลูกครั้งที่ 1 เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ โดยปลูกด้ว้เขียว 20 สายพันธุ์ กิ่งกล้ามาแล้ว สายพันธุ์ละ 15 กระถาง ปลูก 3 ซ้ำๆ ละ 5 กระถางๆ ละ 3 วัน เก็บเกี่ยวเมล็ดจากสายพันธุ์ที่บริสุทธิ์ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณแป้งในเมล็ด นำผลจากการวิเคราะห์มาคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่มีปริมาณแป้งในเมล็ดสูงสุดและต่ำสุด เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ ( $P_1$  และ  $P_2$ ) ระยะเวลาที่ปลูก ตั้งแต่ พฤศจิกายน 2528 ถึง กุมภาพันธ์ 2529

การปลูกครั้งที่ 2 เพื่อผสมพันธุ์ผลิตเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 โดยทำการปลูกสายพันธุ์พ่อแม่ 2 สายพันธุ์ คือ VC 2755-54 และ VC 2742-26-35 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณแป้งสูงสุดและปริมาณแป้งต่ำสุด ที่คัดเลือกได้จากการปลูกครั้งที่ 1 ปลูกสายพันธุ์ละ 20 กระถางๆ ละ 2 วัน ทำการผสมแบบผสมตรง (direct cross) และแบบผสมกลับ (reciprocal cross) ระยะเวลาที่ปลูกตั้งแต่ มิถุนายน ถึง กันยายน 2529

#### วิธีการผสมพันธุ์

ก. การกำจัดเกสรตัวผู้ (emasculation) เลือกดอกที่จะบานในวันรุ่งขึ้นจากต้นแม่ ใช้ปากคีบที่สะอาดเขี่ยอับเกสรตัวผู้ทั้ง 10 อันออก เวลาที่เหมาะสมในการเขี่ยอับเกสรตัวผู้อยู่ในช่วง 16.00 น. ถึง 18.00 น. จากนั้นใช้ถุงกระดาษคลุมดอกที่เขี่ยอับเกสรตัวผู้ออกแล้ว เพื่อป้องกันการผสมข้ามจากต้นที่ไม่ต้องการ

ข. การถ่ายละอองเกสร (pollination) กระทำในเช้าวันรุ่งขึ้น ในช่วงเวลา 8.00 น. ถึง 10.00 น. เลือกดอกที่บานจากต้นพ่อ ใช้ปากคีบคีบอับเกสรตัวผู้ที่แตกใหม่นำมาแตะบนปลายเกสรตัวเมียของดอกต้นแม่ที่กำจัดเกสรตัวผู้แล้ว แขนงป้ายแสดง วัน เดือน ปี ที่ผสมเกสรและชื่อสายพันธุ์พ่อแม่ แล้วคลุมถุงกระดาษเพื่อป้องกันการผสมข้ามที่ไม่ต้องการ

ค. การตรวจผลการผสม หลังจากถ่ายละอองเกสรแล้วประมาณ 24 ชั่วโมง จึงเปิดถุงกระดาษที่คลุมออก ถ้าผสมดีก็จะเกิดฝักอ่อนสีเขียวขนาดยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร

### การเก็บเมล็ด

- ก. เก็บเมล็ดลูกผสมชั่วแรก ( $F_1$  seed) แยกต้นและแบ่งเมล็ดจากแต่ละต้นไว้สำหรับปลูกในครั้งที่ 3 และครั้งที่ 4
- ข. เก็บเมล็ดลูกผสมชั่วแรกที่ได้จากการผสมกลับ ( $F_1R$  seed) แยกต้นและแบ่งเมล็ดจากแต่ละต้นไว้สำหรับปลูกในครั้งที่ 3 และครั้งที่ 4
- ค. เก็บเมล็ดจากต้นพ่อแม่ที่ผสมตัวเอง โดยเก็บแยกต้นเพื่อปลูกในครั้งที่ 4

การปลูกครั้งที่ 3 ปลูกลูกผสมชั่วที่ 1 โดยการปลูกเมล็ด  $F_1$  และ  $F_1R$  อย่างละ 20 ต้น ในกระถาง ปล่อยให้ผสมตัวเอง เก็บเมล็ดแยกต้นซึ่งเมล็ดที่เก็บได้จากต้น  $F_1$  จะเป็นเมล็ดชั่วที่ 2 ( $F_2$  seed) และเมล็ดจากต้น  $F_1R$  เป็นเมล็ดชั่วที่ 2 แบบผสมกลับ ( $F_1R$  seed) ระยะเวลาที่ปลูกตั้งแต่ ตุลาคม ถึง มกราคม 2530

การปลูกครั้งที่ 4 ปลูกสายพันธุ์พ่อแม่ ( $P_1$  และ  $P_2$ ) จำนวน 60 ต้น ลูกผสมชั่วที่ 1 ( $F_1$  และ  $F_1R$ ) จำนวน 30 ต้น และลูกผสมชั่วที่ 2 ( $F_2$  และ  $F_2R$ ) จำนวน 120 ต้น โดยปลูกในแปลงทดลองขนาด 5 x 6 ตารางเมตร ระยะปลูก 50 x 25 ตารางเซนติเมตร ปลูกหลุมละ 3 ต้น แล้วถอนแยกเหลือ 1 ต้น ให้น้ำแบบร่องในตอนเย็นทุกวัน เมื่อต้นเขียวแก่จึงเก็บเมล็ดแยกต้น จากต้นพ่อแม่อย่างละ 10 ต้น รวมเป็น 20 ต้น จากต้นลูกผสมชั่วที่ 1 อย่างละ 10 ต้น รวมเป็น 20 ต้น และจากต้นลูกผสมชั่วที่ 2 อย่างละ 40 ต้น รวมเป็น 80 ต้น ระยะเวลาที่ปลูกในครั้งนี้อย่างน้อยตั้งแต่ กุมภาพันธ์ ถึง พฤษภาคม 2530

รวมตัวอย่าง (ต้น) ที่วิเคราะห์หาปริมาณแป้งในเมล็ดครั้งนี้ 120 ตัวอย่าง ใช้เมล็ดตัวอย่างละ 7 กรัม ซึ่งแต่ละตัวอย่างทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

### 2. การวิเคราะห์ปริมาณแป้งในเมล็ด

วิเคราะห์ปริมาณแป้งในเมล็ดที่ได้จากการปลูกครั้งที่ 1 ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน และที่ได้จากการปลูกครั้งที่ 4 ณ ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

## 2.1 การสกัดแป้ง ทำตามวิธีการของ AOAC (1975) ดังนี้คือ

2.1.1 นำข้าวอย่างฉ่ำเชื่อมมาเลือกกรวด คินและเศษไม้ขอก นำมาบดด้วยเครื่องบดแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 เมช ได้แป้งฉ่ำเชื่อมที่ละเอียด

2.1.2 นำแป้งฉ่ำเชื่อมมาเติม  $\text{NaCO}_3$  (0.1N) ในอัตราส่วนฉ่ำเชื่อมบดละเอียด :  $\text{NaCO}_3 = 1 : 40$  โดยปริมาตร กวนด้วยเครื่องกวน 15 นาที แล้วนำไปเหยียงด้วยเครื่องเหยียงที่ความเร็ว 12,000 - 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะได้สารละลายของโปรตีน ส่วนของกากและแป้ง

2.1.3 นำส่วนของกากและแป้งมาเติมน้ำนำไปเหยียงที่ความเร็ว 12,000 - 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะได้ส่วนของกากและแป้งแยกออกมา

2.1.4 นำส่วนที่เป็นแป้งมาเติมน้ำเพื่อล้างแป้งอีกครั้งแล้วนำไปเหยียงที่ความเร็ว 12,000 - 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะได้ส่วนของกากและแป้ง

2.1.5 นำแป้งมาผึ่งแดดแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 เมช ได้แป้งฉ่ำเชื่อม

## 2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณแป้งทำตามวิธีของ Southgate (1969) ดังนี้คือ

2.2.1 ชั่งแป้งฉ่ำเชื่อมที่ได้จากข้อ 2.1.5 น้ำหนัก 200 มิลลิกรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำร้อน 10 มิลลิลิตร

2.2.2 เติม อาซีเตท บัฟเฟอร์ pH 4.5 ความเข้มข้น 2 M ปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร แล้วทำให้เย็น

2.2.3 เติม เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส จากรา Rhizopus spp. ความเข้มข้น 10% ปริมาณ 5 มิลลิลิตร

2.2.4 หยดไทลลูอิน เอ อาร์ เกรด 3 หยด ลงไปเพิ่มเค็มแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 18 ชั่วโมง

2.2.5 เติมเอทิลแอลกอฮอล์ (95%) 60 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน กรองเอาส่วนที่ใสไปหาปริมาณของน้ำตาลกลูโคส

2.3 การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส ทำตามวิธีของ Dubiose, Gilles, Hamilton, Rebers และ Smith (1956)

2.3.1 นำสารละลายน้ำตาลใสในหลอดทดลองขนาดใหญ่ เติมฟีนอล ความเข้มข้น 5% 1 มิลลิลิตร

2.3.2 เติมกรดซัลฟูริกที่เข้มข้น 5 มิลลิลิตร ทิ้งหลอดทิ้งไว้ 10 นาที

2.3.3 นำมาเขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 20 นาที ใน water bath ที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$

2.3.4 นำไปอ่านค่า absorbance จากเครื่อง สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวช่วงคลื่น 490 นาโนเมตร อ่านค่าเทียบกับ standard curve เมื่อได้ เบอร์เซ็นต์ของน้ำตาลกลูโคส นำค่าคงที่ 0.92 ไปคูณก็จะได้ค่าปริมาณแป้งต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

### 3. การเก็บข้อมูลทางสถิติ

เก็บข้อมูลในการปลูกครั้งที่ 4 จากต้น  $P_1$  และ  $P_2$  จำนวน 20 ตัวอย่าง (ต้น) จากต้น  $F_1$  และ  $F_{1R}$  จำนวน 20 ตัวอย่าง (ต้น) จากต้น  $F_2$  และ  $F_{2R}$  จำนวน 80 ตัวอย่าง (ต้น) โดยทำการเก็บข้อมูลของลักษณะต่อไปนี้

- 3.1 จำนวนฝักต่อต้น
- 3.2 จำนวนเมล็ดต่อฝัก
- 3.3 น้ำหนัก 1,000 เมล็ด
- 3.4 ผลผลิตต่อต้น

### 4. การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ นำข้อมูลที่ได้อ่านวิเคราะห์ผลตามแผนการทดลอง

แบบ CRD โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (variance) ลักษณะใดที่พบความแตกต่างระหว่างข้าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะนำค่าเฉลี่ยมาเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test) ส่วนลักษณะใดที่ไม่พบความแตกต่างระหว่างข้าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะไม่วิเคราะห์ DMRT (Snedecor and Cochran, 1967)

4.2 วิเคราะห์หาค่าอิทธิพลการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแนวกว้างของลักษณะปริมาณแป้งในเมล็ด ลักษณะผลผลิตต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก จำนวนฝักต่อต้นและน้ำหนัก 1,000 เมล็ด โดยใช้สูตร ของ (Burton, 1951)

$$\text{Heritability(\%)} = \frac{V_{F_2} - \frac{(V_{P_1} + V_{P_2} + V_{F_1})}{3}}{V_{F_2}} \times 100$$

กำหนดให้

$$\begin{aligned} V_{P_1} &= \text{ความแปรปรวนระหว่างต้นในพ่อ} \\ V_{P_2} &= \text{ความแปรปรวนระหว่างต้นในแม่} \\ V_{F_1} &= \text{ความแปรปรวนระหว่างต้นของลูก } F_1 \\ V_{F_2} &= \text{ความแปรปรวนระหว่างต้นของลูก } F_2 \end{aligned}$$

4.3 วิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ ระหว่างลักษณะต่อไปนี้

4.3.1 ปริมาณแป้งในเมล็ดกับผลผลิต จำนวนเมล็ดต่อฝัก จำนวนฝักต่อต้น และ น้ำหนัก 1,000 เมล็ด

4.3.2 ผลผลิตกับจำนวนเมล็ดต่อฝัก จำนวนฝักต่อต้นและน้ำหนัก 1,000 เมล็ด โดยคำนวณจากสูตร

$$r_{xy} = \text{Cov. (x,y)} / (V_x \cdot V_y)^{\frac{1}{2}}$$

กำหนดให้

$$\begin{aligned}
 r_{xy} &= \text{สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะ } x \text{ และ } y \\
 \text{Cov. } (x,y) &= \text{โควาเรียนซ์ของลักษณะ } x \text{ และ } y \\
 V_x \text{ และ } V_y &= \text{วาเรียนซ์ของลักษณะ } x \text{ และ } y
 \end{aligned}$$

ตรวจสอบนัยสำคัญของค่าสหสัมพันธ์ที่องศาของความเป็นอิสระ (degree of freedom)  $n-2$  เมื่อ  $n$  คือจำนวนต้นกล้วยที่นำมาหาค่าสหสัมพันธ์ (เจริญ จันทลักษณ์, 2523)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย