

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วิธีการ

1. ศึกษาวิธีการและความเข้มข้นในการทรีตมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรด้วยสารโคลชิซิน

1.1 การทรีตสารโคลชิซินกับเมล็ดมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พร

1. แกะเปลือกหุ้มเมล็ดมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรออกแล้วทรีตด้วยสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0% เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง

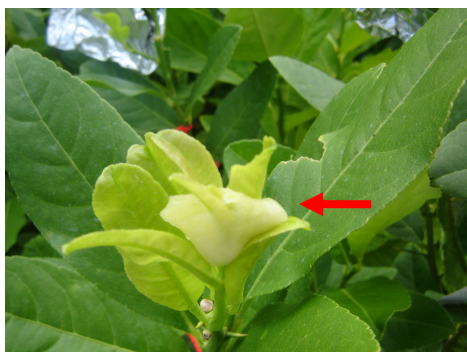
2. ไม่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดแล้วทรีตด้วยสารโคลชิซินความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0% เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง

โดยแต่ละความเข้มข้นใช้เมล็ดทั้งสิ้นจำนวน 50 เมล็ด แล้วนำเมล็ดที่ผ่านการทรีตโคลชิซินไปเพาะในถุงเพาะกล้าที่มีดินผสมและดูแลรักษาภายใต้สภาพเรือนกระจก ทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดหรือเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของต้นอ่อน และการหาเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด แล้วคำนวณดัชนีความเร็วในการงอก ตามวิธีการของ วัลลภ (2540) ดังนี้

$$\text{ดัชนีความเร็วในการงอก} = \frac{\text{จำนวนต้นกล้าปกติ}}{\text{วันที่ตรวจนับครั้งแรก}} + \dots + \frac{\text{จำนวนต้นกล้าปกติ}}{\text{วันที่ตรวจนับครั้งสุดท้าย}}$$

1.2 การทรีตสารโคลชิซินกับปลายยอดต้นกล้ามะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พร

เพาะกล้ามะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรจากข้อ 1.1 เมื่ออายุได้ 8 เดือนนำมาตัดยอดให้แตกตาข้างเพื่อจะได้ยอดเพิ่มมากขึ้น จากนั้นเมื่อยอดอายุได้ 2 เดือนจึงทำการทรีตสารโคลชิซินที่บริเวณปลายยอดอ่อนโดยใช้ความเข้มข้นต่างดังนี้ 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0% วิธีการทรีตใช้สำลีชุบสารแล้วนำไปวางบนบริเวณปลายยอดครอบด้วยกระดาษฟอยด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำสำลีออกจากบริเวณปลายยอด (ภาพที่ 6) ปล่อยให้ต้นกล้าเจริญเติบโตจนปลายยอดยืดยาวประมาณ 2 นิ้ว (ประมาณ 2 เดือน) จึงทำการตัดชำปลายยอดเพื่อนำรากมาทำการตรวจนับจำนวนโครโมโซมใช้ความเข้มข้นของสารชนิดละ 25 ต้น



(ก)



(ข)

ภาพที่ 6 การทรีตสารโคลชิซินกับปลายยอดมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พร (ก) ลักษณะการวางลำสืบนยอดอ่อน และ (ข) การปิดแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อกันสารจากแสงแดด (ศรีจี)

ย้ายต้นกล้าปลูกในถุงเพาะ หลังจากนั้นทำการบันทึกการเจริญเติบโตของยอดที่ได้รับการทรีตสารโคลชิซิน โดยวัดความสูงของยอดใหม่ทุก 1 เดือน และทำการบันทึกลักษณะใบที่มีรูปร่างผิดปกติกับใบปกติต่อหนึ่งปลายยอด

2. วิธีการบันทึกผลการทดลอง

1. การเจริญเติบโต โดยวัดความสูงของต้นหลังจากการทรีตโดยโคลชิซิน ประมาณ 1 เดือนและทำการวัดทุก 1 เดือน

2. สุ่มวัดขนาดใบ ความกว้าง และความยาวใบ

3. นับจำนวนต่อมน้ำมันของใบมะนาวฝรั่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอกำลังขยาย 4 เท่า

4. ศึกษาความหนาแน่นและวัดขนาดของเซลล์ปากใบ ตรวจสอบโดยนำใบพืชมาลอกเอาเนื้อเยื่อบางๆ ชั้นผิวนอกของหลังใบ วางเนื้อเยื่อลงบนสไลด์ พร้อมกับหยดอะซีโตคาร์บอนเข้มข้น 1% ลงบนสไลด์ 1-2 หยด ปิดด้วยแผ่น cover glass หาความหนาแน่นของปากใบด้วย hemacytometer โดยนับจำนวนปากใบ/พื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตรภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอกำลังขยาย 10 เท่า และวัดขนาดปากใบโดยใช้ stage micrometer และ ocular micrometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วนำค่าที่เข้าสูตรดังสมการนี้

ขนาดปากใบ = ค่า O.M. x ความกว้างที่วัดได้ หน่วยออกมาเป็นไมโครเมตรโดยเก็บตัวอย่างใบจากทุกต้น ต้นละ 2 ใบ

5. หาปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบี โดยเก็บใบที่มีอายุและสีใบใกล้เคียงกันมาเก็บตัวอย่างจากทุกต้นตัดให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำมาบดให้ละเอียดในโกร่งร่วมกับ

แมกนีเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 0.5 กรัม และอะซิโตน เข้มข้น 80 % ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติมอะซิโตนที่ความเข้มข้นเดียวกันเพิ่มอีก 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำมาปั่นที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาเฉพาะสารละลายส่วนบนเก็บไว้เพื่อนำมาหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอและบีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวช่วงคลื่น 647 นาโนเมตร สำหรับคลอโรฟิลล์เอ และ 664 นาโนเมตร สำหรับคลอโรฟิลล์บี นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตรของ Inskeep และ Bloom (1985) อ้างโดย Jeff และคณะ (1996) ดังนี้

$$E = 17.90E_{647} + 8.08E_{664}$$

โดย E คือ ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และบี

E_{647} และ E_{664} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์เอและบีตามลำดับ

6. หาค่า LD_{50} ของความเข้มข้นสารแต่ละวิธี

6.1 วิธี Typical sigmoid mortality

โดยการนับจำนวนเมล็ดงอกและรอดชีวิตกับการฝอยอดใหม่ของปลายยอดมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรต่อความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ใช้ นำมาเขียนกราฟโดยใช้วิธี typical sigmoid mortality ทำโดยการคำนวณค่า corrected % mortality (Capella *et al.*, 1967 อ้างโดย ชีระ, 2525)

$$\text{Corrected \% mortality} = \frac{x-y}{x} \times 100$$

x = % survival of control

y = % survival of treated plant

นำค่า corrected % mortality ซึ่งเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดมาเขียนความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารโคลชิซินแล้วลากเส้นจากแกนเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่จุด 50% มาตัดกราฟแล้วลากมาตัดแกนความเข้มข้นของสาร โคลชิซิน M_1 จุดนั้นเป็น LD_{50}

6.2 คำนวณหา LD_{50} จากสูตร Regression Capella และคณะ (1967) อ้างโดย ชีระ (2525)

$$y = \bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$$

y = เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด

x_{50} = อัตราความเข้มข้นของสาร โคลชิซินที่ LD_{50}

n = จำนวน treatment

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

$$b = \frac{\sum xy}{\sum x^2}$$

$$\begin{aligned}\sum xy &= \sum xy - (\sum x)(\sum y) / n \\ \sum x^2 &= \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \\ \bar{x} &= \sum x / n \\ \bar{y} &= \sum y / n\end{aligned}$$

7. การตรวจนับจำนวนโครโมโซมหลังจากทรีตสารโคลชิซิน

ทำโดยตัดปลายรากยาว 0.5 เซนติเมตร มาใส่ในหลอดแก้วที่บรรจุสารละลายฟริทรีตเมนต์ นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำปลายรากไปใส่ในหลอดที่บรรจุ Carnoy's fluid (absolute ethanol : glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3 : 1) นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บในที่มืด จากนั้นนำปลายรากมาแช่ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที นำปลายรากที่ผ่านการแช่กรดมาใส่ในน้ำกลั่น แช่ในอะซิโตคาร์บอนเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์ นาน 30 นาที จากนั้นตัดเฉพาะส่วนของปลายรากวางลงบนแผ่นสไลด์หยดกรดอะซิติกเข้มข้น 45 เปอร์เซนต์ 1-2 หยด ขยี้ปลายรากด้วยเข็มเจียและปิดด้วย cover glass ใช้ปลายดินด้ามที่มียางลบเกาะลงเบาๆ จากนั้นนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ใช้กำลังขยาย 1000 เท่า ตรวจนับเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟส ส่วนการตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากการทรีตปลายยอด ขั้นตอนการทำคือ ตัดปลายยอดที่ทำการทรีตสารโคลชิซินอายุ 2 เดือน หลังจากทำการทรีต นำปลายยอดที่ตัดมาปักในกระบะพ่นหมอก หลังจากนั้นประมาณ 1 เดือน ครั้ง ก็สามารถนำรากมาตรวจนับโครโมโซมตามขั้นตอนที่กล่าวมาแล้ว

8. วางแผนการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. วัสดุพืช

- มะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พร โดยนำผลมะนาวพิมพ์พรที่สุกแก่แล้วมาล้างและผ่าเอาเฉพาะเมล็ด นำเมล็ดมาล้างน้ำเพื่อขจัดเมือกออก และนำเมล็ดมาศึกษาจำนวน 500 เมล็ด
- ต้นกล้ามะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรอายุ 8 เดือน จำนวน 75 ต้น

2. สารเคมี

- โคลชิซิน
- คาร์มีน
- กรดอะซิติก
- 8-hydroxyquinoline
- แอลกอฮอล์
- อะซิโตน
- แมกนีเซียมคาร์บอเนต
- กรดไฮโดรคลอริก

อุปกรณ์

- สไลด์, แผ่นปิดสไลด์, กระจกพลาสติก, ทRAY,
- กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
- ฟิล์มถ่ายรูป
- Hemacytometer, stage micrometer , ocular micrometer
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- เครื่องไมโครเซ็นทริฟิวก์
- โกร่งบดตัวอย่าง, กรรไกร, มีด
- เครื่องแก้ว กระจกตวง และขวดต่างๆ
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติ
- ปิเปตปรับปริมาตร
- เครื่องเขย่า (vortex)

- คินสอ