บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารละลาย

1.1 เตรียมสารละลายโดยนำสีย้อมที่ทราบความเข้มข้นของน้ำหนักสดจากวัสดุธรรมชาตินำมาละลายในน้ำกลั่นตามอัตราส่วนดังนี้

สีย้อมใบมังคุด

กลุ่มทดลองที่ 1 สีย้อมใบมังคุดต่อน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 :3

กลุ่มทดลองที่ 2 สีย้อมใบมังคุดต่อน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 :2

กลุ่มทดลองที่ 3 สีย้อมใบมังคุดต่อน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 :1

สีย้อมเปลือกลูกเนียง

กลุ่มทดลองที่ 4 สีย้อมเปลือกลูกเนียงต่อน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 :3

กลุ่มทดลองที่ 5 สีย้อมเปลือกลูกเนียงต่อน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 :2

กลุ่มทดลองที่ 6 สีย้อมเปลือกลูกเนียงต่อน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 :1

ชุดการทดลองควบคุม

น้ำกลั่น

1.2 ทำการเพาะรากหอมแดงโดยทำในถังเพาะชักนำการงอกรากด้วยน้ำและสารละลายสีย้อมที่ความเข้มข้นตามข้อที่ 1.1 โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวนซ้ำ 5 ซ้ำ ในแต่ละถังเพาะมีหอมแดงจำนวน 10 หัว

2. การเก็บรากหอมแดง

2.1 หลังเพาะหอมแดง 5 วัน ทำการเก็บรากหอมแดง

2.2 ผ่าหอมแดงออกเป็น 2 ซีกต่อหัว ตัดปลายรากใส่ขวดที่เตรียมไว้ เพื่อใช้ศึกษาดัชนีไมโตติกส่วนหนึ่ง และอีกส่วนหนึ่งใช้ศึกษาโครโมโซม

3. การตรวจสอบดัชนีไมโตติก โดยวิธีแบบสควอช (squash technique)

3.1 นับจำนวนเซลล์จากรากหอมที่เตรียมไว้ให้ได้ประมาณ 1,000 เซลล์ต่อถังเพาะ ดังนั้นใน 1 ชุดการทดลองจะได้จำนวนเซลล์ไม่ต่ำกว่า 5,000 เซลล์ (ดัดแปลงจาก Rank and Nielson, 1998) โดยนับจำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะอินเตอร์เฟส โปรเฟส เมตาเฟส แอนาเฟส และเทโลเฟส แล้วนำมาตรวจสอบดัชนีไมโตติก ดังนี้

$$\% \text{ ดัชนีไมโตติก} = \frac{\text{จำนวนระยะ โปรเฟส+ เมตาเฟส + แอนาเฟส + เทโลเฟส}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

4. การตรวจสอบโครโมโซม

4.1 การเตรียมรากในการตรวจสอบโครโมโซมจะใช้วิธีแบบสควอช (squash technique) (ดัดแปลงจาก Sharma and Sharma, 1980) โดยตัดรากหอมแช่ในสารละลายโคลชิซิน 0.01%เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

4.2 ตัดปลายรากแช่ในน้ำยาคงสภาพ โดยใช้แอลกอฮอล์ : เกลเชียลอะซิติก ในอัตราส่วน 3:1 เป็นเวลา 30 นาที และแช่ใน alcohol 70% แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

4.3 วิธีการตรวจนับจำนวนโครโมโซมจะตัดปลายรากบริเวณขาวขุ่นวางบนแผ่นสไลด์และหยดกรดไฮโดรคลอริก 5 % ลงไป 1-2 หยด ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วซับกรดออก

4.4 หยดสีย้อมอะซิโตออซินลงไป 2-3 หยดทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วปิดด้วยแผ่นสไลด์ใช้กระดาษทิชชูซับวางทับ แล้วกดด้วยหัวแม่มือใช้ปลายแท่งแก้วเคาะเบา ๆ

4.5 นับจำนวนโครโมโซมที่กระจายดีในแต่ละเซลล์และศึกษาความผิดปกติที่เกิดขึ้นถังเพาะละ 10 เซลล์ ดังนั้นใน 1 ถังเพาะจะตรวจสอบจำนวนโครโมโซมไม่ต่ำกว่า 50 เซลล์ โดยแบ่งเกณฑ์จำนวนดังนี้

เซลล์ดิพลอยด์ (diploid) ได้แก่ เซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วงค่าเฉลี่ยของจำนวนโครโมโซมที่ได้จากชุดการทดลองควบคุมบวกหรือลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD)

เซลล์ไฮโปดิพลอยด์ (hypodiploid) ได้แก่ เซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมน้อยกว่าเซลล์ดิพลอยด์ (น้อยกว่า mean ± SD)

เซลล์ไฮเปอร์ดิพลอยด์(hyperdiploid)ได้แก่ เซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมมากกว่าเซลล์ดิพลอยด์ (มากกว่า mean ± SD)

4.6 การตรวจสอบโครงสร้างโครโมโซม

ศึกษาความผิดปกติของโครงสร้าง เช่น

- chromatid break
- chromatid gap
- อื่น ๆ

วิธีวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี One–Way ANOVA ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ เมื่อพบว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ใช้ค่าสถิติ LSD เป็นค่าทดสอบกับผลต่างค่าเฉลี่ยของการทดลองโดยโปรแกรม SAS