บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

การเตรียมกระถางใส่ดินที่จะปลูกและเมล็ดพันธุ์พืช

เตรียมกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว จำนวน 60 ใบ สำหรับการทดลองครั้งที่ 1 และจำนวน 105 ใบ สำหรับการทดลองครั้งที่ 2 ใช้ถุงพลาสติคกรุภายในกระถางบรรจุดินสีดาผสมกับปุ๋ยคอกในอัตราส่วน 2:1 ลงในกระถาง กระถางละ 7 กก. ดินผสมที่ใช้มีความชื้นในดินก่อนรดน้ำ 16.7% และมี field capacity 32.7% pH ของดินประมาณ 7.63 เนื่องจากการทดลองครั้งแรกพบว่ามีไรพืชตามต้นถั่วเหลือง ในการทดลองครั้งที่ 2 จึงใช้ยา Omite พ่นดินในกระถางก่อนทำการปลูก

เมล็ดพันธุ์พืชที่ใช้ คือ ถั่วเหลือง (Glycine max L.) สายพันธุ์ สจ.5 ได้จากสาขาพืชน้ำมัน กองพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เชื้อไรโซเบี่ยมที่ใช้คลุกเมล็ดในการทดลองครั้งที่ 2 ได้จากศูนย์เพาะเชื้อไรโซเบียม กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ซึ่งใช้คลุกเมล็ดถั่วเหลืองก่อนปลูกตามวิธีการที่จะกล่าวถึงต่อไป

วิธีการทดลอง

ครั้งที่ 1 เริ่มวันที่ 14 พฤษภาคม 2525

แบ่งการทดลองเป็น 6 treatment treatment ละ 5 replicate replicate ละ 2 กระถาง กระถางละ 6 ต้น

1. Control รดน้ำลงในกระถางที่ใส่ดิน 1120 มล. ซึ่งจะทำให้ความชื้นในดินถึง field capacity เพาะเมล็ดถั่วเหลืองโดยไม่ต้องแช่น้ำ ลงกระถางละ 15 เมล็ด ลึกประมาณ 1 นิ้ว ทุก ๆ 3 วัน นำดินในกระถางไปตรวจวัดความชื้น โดยสุ่มดินทุก treatment treatment ละ 3 กระถาง ตัวอย่างละประมาณ 10 กรัม และคำนวณปริมาณน้ำที่จะต้องเติม เพื่อรักษาความชื้นให้อยู่ในระดับที่ต้องการ คือที่ field

capacity เมื่อต้นมีอายุ 10 วัน เลือกต้นที่สมบูรณ์และมีขนาดใกล้เคียงกันไว้ กระถางละ 6 ต้น

2. ขาดน้ำช่วงออกดอก ทำเช่นเดียวกับ control ยกเว้นเมื่อพืชเริ่มออกดอก คือเมื่อพืชเจริญมาประมาณ 36 วัน ก็ให้ได้รับสภาวะขาดน้ำ จนกระทั่งพืชแสดงอาการเหี่ยว ซึ่งใช้เวลาประมาณ 6 วัน ก็ให้น้ำใหม่จนถึง field capacity

3. ขาดน้ำช่วงติดผล ทำเช่นเดียวกับ control ยกเว้นเมื่อพืชเริ่มติดผล คือเมื่อฝักที่ข้อใดข้อหนึ่งของสี่ข้อบนสุดซึ่งมีใบที่เจริญเต็มที่แล้ว มีขนาดยาว 5 มม. (Fehr et al, 1971) ก็ให้พืชได้รับสภาวะขาดน้ำ โดยงดให้น้ำ จนกระทั่งพืชแสดงอาการเหี่ยว ซึ่งใช้เวลาประมาณ 5 วัน ก็ให้น้ำใหม่จนถึง field capacity

4. ขาดน้ำช่วง pod filling ทำเช่นเดียวกับ control แต่ให้พืชได้รับสภาวะขาดน้ำ โดยงดให้น้ำเมื่อพืชเริ่มเข้าสู่ระยะ pod filling คือเมื่อเมล็ดในฝักที่ข้อใดข้อหนึ่งของสี่ข้อบนสุด ซึ่งมีใบที่เจริญเต็มที่แล้ว มีขนาดยาว 3 มม. (Fehr et al, 1971) จนกระทั่งพืชเริ่มแสดงอาการเหี่ยวซึ่งใช้เวลาประมาณ 5 วัน ก็ให้น้ำใหม่จนถึง field capacity

5. ความชื้นต่ำ treatment นี้ กำหนดให้ดินในกระถางมีความชื้นต่ำกว่า field capacity 10% คือมีความชื้น 22.7% โดยเติมน้ำกระถางละ 420 มล. แล้วปลูกถั่วเหลืองเช่นเดียวกับ control และให้ได้รับความชื้นระดับนี้ตลอดการทดลอง

6. ขาดน้ำเป็น cycle ทำเช่นเดียวกับ control เมื่อถั่วเหลืองมีอายุ 20 วัน ซึ่งเป็นระยะที่ถั่วเหลืองมี trifoliate leaf ที่คลี่แล้ว 2 ใบ ก็เริ่มให้พืชได้รับสภาวะขาดน้ำโดยงดให้น้ำจนกระทั่งพืชแสดงอาการเหี่ยว ก็ให้น้ำใหม่จนถึง field capacity แล้วให้เจริญต่อไปจนพืชฟื้นตัวเป็นปกติ ก็ให้ขาดน้ำอีก ทำอย่างนี้ไปเป็น cycle จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งในการทดลองนี้ พืชได้รับสภาวะขาดน้ำรวมทั้งหมด 6 cycle

ในการทดลองครั้งนี้ หลังจากพืชอายุประมาณ 1 เดือน ซึ่งเป็นระยะก่อนออกดอกเล็กน้อย พบว่ามีไรแดงตามใบถั่วเหลืองแทบทุกต้น จึงได้ทำการฉีดยา Kelthane ฆ่าไรแดง และเมื่อเริ่มระยะ pod filling ปรากฏว่ามีหนอนเจาะฝักแทบทุกต้น จึงฉีด

ยา Lannate ฆ่าหนอนอีกครั้งหนึ่ง

ครั้งที่ 2 เริ่มวันที่ 8 ธันวาคม 2525

แบ่งการทดลองครั้งนี้เป็น 7 treatment treatment ละ 5 replicate replicate ละ 3 กระถาง กระถางละ 6 ต้น treatment ที่ 1 ถึง 6 ทำเช่นเดียวกับการทดลองครั้งแรก ส่วน treatment ที่ 7 ที่เพิ่มขึ้น มีวิธีการดังนี้คือ ทำเหมือน control ของการทดลองครั้งที่ 1 ยกเว้นเมล็ดที่จะใช้ปลูก มีการคลุกเชื้อไรโซเบียมก่อนจึงนำไปปลูก โดยการนำเมล็ดมาประมาณ 30 กรัม พรมน้ำให้พอชื้น ๆ แล้วใช้เชื้อไรโซเบี่ยมสำหรับถั่วเหลือง ประมาณ 1.1 กรัม คลุกกับเมล็ดแล้วปลูกทันที

สำหรับการรดน้ำ ใช้วิธีสุ่มตัวอย่างดินมาวัดความชื้นทุก 3 วัน โดยสุ่มตัวอย่างดินทุก treatment treatment ละ 3 กระถาง ตัวอย่างละประมาณ 10 กรัม มาวัดความชื้น แล้วคำนวณปริมาณน้ำที่จะต้องเติม เพื่อรักษาความชื้นให้อยู่ในระดับที่ต้องการ เช่นเดียวกับการทดลองครั้งแรก

ในช่วงของการทดลองครั้งที่ 2 นี้ ได้บันทึกอุณหภูมิในเรือนต้นไม้บริเวณที่ทำการทดลองทุกวัน เวลา 8.00, 12.00 และ 16.00 น. ตลอดการทดลอง

การวัดผล

1. วัดความสูง วัดความสูงของต้นโดยวัดจากพื้นดินขึ้นไปถึงยอดทุก 2 สัปดาห์ ใช้ 4 ต้น ต่อ 1 replicate 5 replicate รวมทั้งหมด treatment ละ 20 ต้น

2. วัดพื้นที่ใบ วัดพื้นที่ใบทุก 2 สัปดาห์ โดยใช้ใบกลางของ trifoliate leaf ที่ข้อที่ 3 จากยอด ซึ่งเป็นใบที่เจริญเต็มที่แล้ว มาวาดลงบนกระดาษกราฟ แล้วตัดกระดาษกราฟไปชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำมาเทียบหาพื้นที่จาก standard curve ซึ่งหาได้โดยการชั่งกระดาษกราฟที่ทราบพื้นที่ แล้วนำมาเขียนกราฟระหว่างน้ำหนักกับพื้นที่ ก็จะได้พื้นที่ใบที่ต้องการจะหา การหาพื้นที่ใบนี้ ใช้ 10 ใบในแต่ละ treatment

3. วัดน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง นำต้นถั่วเหลืองมาหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งทุก 2 สัปดาห์ ในการทดลองครั้งที่ 1 ใช้ 1 ต้น ต่อ 1 replicate รวมทั้งหมด treatment ละ 5 ต้น ในการทดลองครั้งที่ 2 ใช้ 2 ต้น ต่อ 1 replicate รวมทั้งหมด

treatment ละ 10 ต้น โดยการตัดต้นถั่วเหลืองส่วนที่เหนือดินขึ้นมา นำไปชั่งน้ำหนักสด แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 85°C เป็นเวลา 48 ชม. แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง

4. วัดเปอร์เซนต์การแบ่งตัวของเซลล์ที่ใบอ่อน (mitotic index) ใช้วิธีของ Yegappan และคณะ (1980) และมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยการเก็บใบแรกจากยอด ซึ่งเป็นใบที่ยังไม่คลี่ นำมา fix ใน acetic alcohol (acetic acid : absolute alcohol 1:3) เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นนำไปใส่ใน alcohol 70% และแช่ในตู้เย็น แล้วนำใบมา hydrolyse ใน N HCl เป็นเวลา 15 นาที แล้วย้อมสี proprionocarmine เป็นเวลา 1 ชม. นำใบมาวางบนสไลด์ หยด proprionocarmine ลงบนสไลด์ 1 หยด ปิด cover glass ใช้ปลายดินสอเคาะเบา ๆ ให้เซลล์กระจายออกจากกัน เมื่อกระจายดีแล้ว ก็เอากระดาษซับวางบน cover glass ใช้นิ้วหัวแม่มือกดเพื่อให้เซลล์อยู่ในระนาบเดียวกัน แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ objective กำลังขยาย x40 โดยนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดในแต่ละ field และจำนวนเซลล์ที่แบ่งตัวใน field นั้น ๆ เพื่อหาเปอร์เซนต์ของเซลล์ที่แบ่งตัวในแต่ละ field การหาเปอร์เซนต์ของเซลล์ที่แบ่งตัวนี้ แต่ละ treatment ทำ 3 สไลด์ แต่ละสไลด์ดู 3 field หาเปอร์เซนต์ของเซลล์ที่แบ่งตัว โดยหาจากจำนวนเซลล์ทั้งหมดประมาณ 1,000 เซลล์ เป็นอย่างน้อย

5. หาเปอร์เซนต์การติดฝัก หาได้โดยการนับจำนวนดอก ตั้งแต่ถั่วเหลืองเริ่มออกดอก และนับไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งจำนวนดอกคงที่ ซึ่งกินเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ ใช้ replicate ละ 2 ต้น รวม treatment ละ 10 ต้น ทำเครื่องหมายไว้ และนับจำนวนฝักจากต้นทั้ง 2 นี้ ตั้งแต่เริ่มติดฝัก นับไปเรื่อย ๆ จนจำนวนฝักคงที่ คือไม่มีการติดฝักอีกแล้ว จากนั้นก็นำมาหาเปอร์เซนต์การติดฝัก

6. วัดช่วงเวลาที่เมล็ดเจริญเต็มฝัก (ช่วงเวลา pod filling) โดยเริ่มนับจากเมื่อเมล็ดในฝักมีความยาว 3 มม. ไปจนกระทั่งฝักเริ่มแก่เต็มที่ คือ เริ่มมีการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล วัดช่วงเวลาเป็นจำนวนวัน ใช้ replicate ละ 2 ต้น รวมทั้งหมด treatment ละ 10 ต้น

7. หาน้ำหนักของเมล็ดและอัตราการเจริญของเมล็ด โดยนำเมล็ดทั้งหมดไปชั่งน้ำหนัก หาน้ำหนักต่อร้อยเมล็ดและน้ำหนักต่อเมล็ด แล้วหาอัตราการเจริญเฉลี่ยของเมล็ด โดยเอาน้ำหนักต่อเมล็ด หารด้วยช่วงเวลา pod filling จากข้อ 6 จะได้อัตราการเจริญของเมล็ดเป็น กรัม/เมล็ด/วัน ใช้ replicate ละ 2 ต้น รวมทั้งหมด treatment ละ 10 ต้น

8. หาปริมาณโปรตีนในเมล็ด โดยใช้ Lowry's method (Lowry et al, 1951) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ก. หา standard curve

1. เตรียม Bovine serum albumin ที่มีความเข้มข้น 0.5,1,2, 3 และ 4 mg/ml อย่างละ 1 ml

2. เตรียม test tube ที่สะอาด 6 หลอด หลอดที่ 1 เป็น blank ไม่ใส่ Bovine serum albumin อีก 5 หลอด pipette 0.1 ml ของแต่ละ standard ลงในหลอด ซึ่งจะได้ Bovine serum albumin ในปริมาณ 50,100, 200,300 และ 400 μg

3. เติม 0.4 ml ของ 1 N NaOH ลงในแต่ละ test tube และ blank

4. เติม 5 ml ของ alkaline copper reagent ซึ่งเตรียมโดยผสม 1 ml ของ 0.5% $CuSO_4 .5 H_2O$ กับ 50 ml ของ 2% Na_2CO_3 - 0.02% NaK Tartrate ลงในแต่ละ test tube และ blank แล้วปั่นให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที

5. เติม 0.5 ml ของ Folin - phenol reagent ที่ผสมเสร็จใหม่ ๆ ซึ่งเตรียมได้โดยใช้ Folin - Ciocalteus Phenolreagenz (Merck) ผสมกับน้ำกลั่น 1:1 ปั่นให้เข้ากันในเวลา 2 - 3 วินาที

6. หลังจากนั้น 30 นาที นำไปอ่านค่า absorbance ของ standard ทั้ง 5 หลอด โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ wavelength 750 nm plot

graph ระหว่าง absorbance และความเข้มข้น จะได้ standard curve

ข. สกัดโปรตีนและหาปริมาณโปรตีนจาก standard curve

1. ใช้ 1 N NaOH เป็นตัวสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเหลือง โดยนำเมล็ดถั่วเหลืองมาแช่น้ำเป็นเวลาประมาณ 14 ชม. แล้วนำเมล็ดประมาณ 1 กรัม มาแช่ใน 1 N NaOH 100 ml และบดเมล็ดถั่วเหลืองให้ละเอียด ทิ้งไว้ 1 - 2 ชม.

2. pipette 0.1 ml ของ sample ออกมา เติม 0.4 ml ของ 1 N NaOH, 5 ml ของ alkaline copper reagent, 0.5 ml ของ Folin - phenol reagent ปั่นให้เข้ากันดี ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วอ่านค่า absorbance ที่ wavelength 750 nm จากนั้นก็นำไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนในแต่ละ treatment จาก standard curve

011120