

การประยุกต์ใช้สารไกลโฟเซตเป็นสารพรีทรีตเมนต์ในการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ในทานตะวัน

Application of Glyphosate as a Pre-Treatment for Mitosis Study in *Helianthus annuus* L.

กฤษฎิพงศ์ ภาษิตวิไลธรรม* และ จารุวรรณ เนื่อทอง

โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย

Kritsaphong Phasitvilaitham* and Jaruwat Nuethong

Program of Biological Science, Faculty of Science and Technology, Chiang Rai Rajabhat University

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ทหาระยะเวลาของการทำพรีทรีตเมนต์ด้วยสารละลายไกลโฟเซตที่เหมาะสมต่อการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวันด้วยวิธีการทำพรีทรีตเมนต์ โดยวางแผนการทดลองแบบแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัวอย่าง มีปัจจัยศึกษา 1 ปัจจัยคือระยะเวลาของการทำพรีทรีตเมนต์ 4 กรรมวิธี ได้แก่ 0 ชั่วโมง, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง โดยใช้พืชตัวอย่างคือทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) พบว่า ระยะเวลาของการทำพรีทรีตเมนต์ ที่แตกต่างกันมีผลต่อค่าเฉลี่ยร้อยละของการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยพบว่ากรรมวิธีการพรีทรีตเมนต์ด้วยสารละลายไกลโฟเซตเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ให้ผลค่าร้อยละของการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวันมากที่สุดคือ ร้อยละ 65.00 ± 5.00 ในขณะที่ กรรมวิธีควบคุมซึ่งใช้น้ำกลั่น ไม่ทำให้เกิดการยับยั้งการแบ่งเซลล์ (ร้อยละ 0) นอกจากนี้ยังพบว่า ค่าคะแนนของการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวันที่เกิดจากการใช้สารละลายไกลโฟเซตเป็นสารพรีทรีตเมนต์ในระยะเวลาที่ต่างกันทั้ง 3 กรรมวิธี ให้ค่าที่เท่ากันคือ 3 คะแนน ดังนั้นการวิจัยนี้ จึงสรุปว่า สารไกลโฟเซต สามารถใช้เป็นสารพรีทรีตเมนต์ในการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในทานตะวันได้

*Corresponding author : kritsaphong.pas@crru.ac.th

คำสำคัญ : ไกลโฟเสท, สารพรีทรีตเมนต์, การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส, ทานตะวัน

Abstract

The objective of this studies was to find out the appropriated time for using a glyphosate solution for study of mitotic cell division using pretreatment technique. Completely Randomized Design (CRD) was set up with 3 replicates, 10 samples each of 4 treatments consist of control methods, 1 hour, 2 hours and 3 hours and using the Sunflower (*Helianthus annuus* L.) as example plant. The results indicated that the different of pretreatment with a glyphosate solution had effect on the percentage of inhibiting mitotic cell division in sunflowers at the confidence level of 95%. In addition, it was found that the pre-treatment method with glyphosate solution for 2 hours gave the highest percentage of inhibition of mitotic cell division in sunflowers, which was 65.00 ± 5.00 percent. While the control method uses distilled water as a pre-treatment substance. It does not cause any inhibition of cell division (0 percent). Moreover, it was found that the scores for inhibiting mitotic cell division of sunflowers which caused by using glyphosate solution as a pre-treatment substance in all 3 treatments had values equal is 3 points. Therefore, in this research it is concluded that glyphosate concentration can be used as a pre-treatment substance for studying mitotic cell division in sunflowers.

Keywords : Glyphosate, Pre-treatment, Mitosis study, *Helianthus annuus* L.

ที่มาและความสำคัญ

สารกำจัดวัชพืช (Herbicide) เป็นสารที่ถูกใช้เพื่อกำจัดพืชที่ไม่ต้องการในพื้นที่เกษตรกรรม สารกำจัดวัชพืชถูกใช้อย่างกว้างขวางทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย และมีให้เลือกใช้หลายชนิดตามความต้องการกำจัดของเกษตรกร เช่น สารกำจัดวัชพืชชนิดเลือกทำลาย ซึ่งจะออกฤทธิ์กำจัดเฉพาะชนิดพืช เช่น 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) ที่ออกฤทธิ์ทำลายเฉพาะวัชพืชชนิดใบกว้าง เป็นต้น สารกำจัดวัชพืชอีกชนิดคือ สารกำจัดวัชพืชชนิดไม่เลือกทำลายที่ออกฤทธิ์ฆ่าวัชพืชทุกชนิด เช่น สารพาราควอต (Paraquat) [1] สารไกลโฟเสท (Glyphosate) เป็นสารกำจัดวัชพืชอีกชนิดหนึ่งในกลุ่มชนิดไม่เลือกทำลายที่ถูกใช้อย่างแพร่หลายในพื้นที่เกษตรของไทย ตัวสารที่มีสถานะเป็นของแข็งจะมีลักษณะเป็นผงคริสตัลใสหรือสีขาว ขณะที่สารไกลโฟเสทที่เป็นของเหลวจะมีสีเหลืองอ่อนไปจนถึงสีน้ำตาล และมีกลิ่นเฉพาะตัว กลไกการทำงานของสารไกลโฟเสทต่อพืชจะมีลักษณะเดียวกันกับสารกำจัดวัชพืชชนิดไม่เลือกทำลายชนิดอื่น ๆ กล่าวคือ สารจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งนิวเคลียสของเซลล์พืช โดยสารจะเข้าไปยึดเกาะจับกับทิวบูลินโปรตีนที่อยู่ในไมโครทิวบูล (Microtubule) ทำให้เซลล์ไม่สามารถสร้างไมโครทิวบูลได้ โดยเฉพาะในบริเวณจุดเจริญของราก จึงทำให้เซลล์พืชในบริเวณดังกล่าว ไม่สามารถเกิดการแบ่งและขยายตัวของเซลล์ต่อไปได้ ซึ่งทำให้การพัฒนาของเซลล์ผิดปกติ นอกจากนี้ ยังส่งผลให้การแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟสเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์หรือผิดปกติไป [1]

ในการศึกษาการแบ่งเซลล์ของพืช ไม่ว่าจะเป็นการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (Mitosis) หรือแบบไมโอซิส (Meiosis)

จำเป็นต้องอาศัยเทคนิควิธีการที่ทำให้เราสามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ในแต่ละระยะของการแบ่งเซลล์ได้ง่าย รวมถึงทำให้เราสามารถสังเกตเห็นลักษณะรูปร่าง ขนาดของโครโมโซมที่มีความแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละสิ่งมีชีวิตได้ โดยเทคนิคในการศึกษาการแบ่งเซลล์นั้น เราสามารถทำได้ 2 แบบ คือ การศึกษาการแบ่งเซลล์โดยไม่ผ่านการทำพรีทรีตเมนต์และการศึกษาโดยผ่านการทำพรีทรีตเมนต์ ในการศึกษาที่ต้องการเห็นลักษณะของโครโมโซมในแต่ละระยะได้ชัดเจน เรามักนิยมใช้วิธีการศึกษาโดยการทำพรีทรีตเมนต์ ซึ่งต้องอาศัยสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งเส้นใยสปินเดิล (Spindle fiber) ในกระบวนการทำ เราเรียกสารที่มีฤทธิ์ดังกล่าวว่า “สารพรีทรีตเมนต์” และด้วยวิธีการดังกล่าวทำให้เราสามารถทำให้เราสามารถศึกษาลักษณะรูปร่างของโครโมโซม และนับจำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยสารเคมีที่นิยมใช้เป็นสารพรีทรีตเมนต์ ได้แก่ โคลชิซิน (Colchicine) 8-ไฮดรอกซีควิโนลีน (8-Hydroxyquinoline) และ พาราไดคลอโรเบนซีน (Paradichlorobenzene) [2]

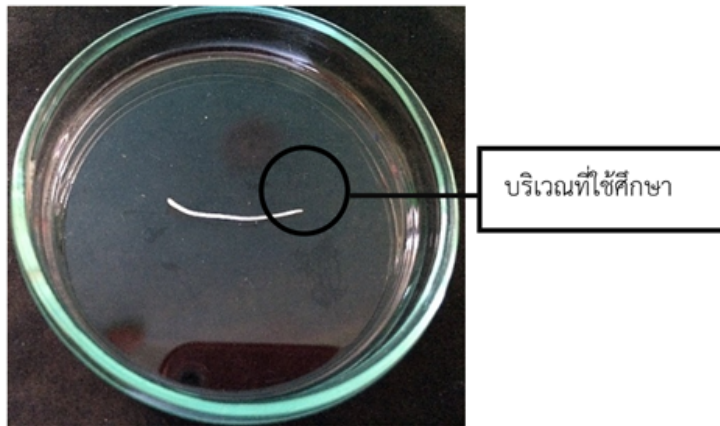
ที่ผ่านมา มีรายงานการวิจัยที่ผ่านมาว่า สารกำจัดวัชพืชบางชนิดมีฤทธิ์แบบเดียวกับสารพรีทรีตเมนต์ ตัวอย่างเช่น สารกลุ่มไดไนโตรอนิลิน (Dinitroaniline) เช่น ออริไซลิน (Oryzrin) เป็นต้น โดยสารชนิดดังกล่าว มีการนำมาใช้ประโยชน์ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ในขณะที่สารไกลโฟเซต (Glyphosate) มีรายงานการวิจัยเช่นกันว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของพืชได้ [3, 4] อย่างไรก็ตาม การนำสารไกลโฟเซตที่เป็นสารกำจัดวัชพืชราคาถูกไปใช้เพื่อการศึกษาการแบ่งเซลล์มีรายงานในประเทศไทยไม่มากนัก การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ หาระยะเวลาของการทำพรีทรีตเมนต์ด้วยสารละลายไกลโฟเซตความเข้มข้น ที่เหมาะสมต่อการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวัน โดยวิธีการทำพรีทรีตเมนต์ เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่ง ในการใช้ไกลโฟเซตเป็นสารพรีทรีตเมนต์ทดแทนที่มีราคาสูงในท้องตลาด

วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาศึกษาการประยุกต์ใช้สารไกลโฟเซตเป็นสารพรีทรีตเมนต์ในการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) มีปัจจัยศึกษาจำนวน 1 ปัจจัยคือ ระยะเวลาของการทำพรีทรีตเมนต์ จำนวน 4 กรรมวิธี ได้แก่ 0 ชั่วโมง (ชุดควบคุม; ใช้น้ำกลั่นเป็นสารพรีทรีตเมนต์), 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง และเลือกใช้ด้วยสารละลายไกลโฟเซตที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) ซึ่งได้จากการคัดเลือกความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการทำการทดลองก่อนหน้านี้ ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัวอย่าง (เมล็ด) และในการวิจัยในครั้งนี้เลือกใช้พืชตัวอย่างคือ ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) มีรายละเอียดวิธีการวิจัยดังนี้

การเตรียมตัวอย่างพืช

นำเมล็ดทานตะวันไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดไปเพาะในวัสดุเพาะเมล็ด โดยมีการให้น้ำทุกวันจนเมล็ดทานตะวันมีรากเกิดขึ้น ทำการเตรียมตัวอย่างรากทานตะวัน โดยเลือกทำในช่วงเวลาเช้า 8.00 ถึง 9.00 นาฬิกา โดยนำตัวอย่างทานตะวันที่เกิดรากไปล้างทำความสะอาดอย่างระมัดระวังไม่ให้ส่วนปลายรากเกิดความเสียหาย จากนั้นทำการตัดรากให้ได้ความยาว 0.5 เซนติเมตร โดยให้ได้ส่วนของปลายรากติดไปด้วย (ภาพที่



ภาพที่ 1: แสดงลักษณะรากทานตะวันที่ใช้ในการวิจัย

1) เมื่อครบจำนวนรากที่ต้องการแล้ว นำไปทดลองการใช้สารไกลโฟเฟตในขั้นตอนต่อไป

การทดลองการใช้สารไกลโฟเฟตเป็นสารพรีทรีตเมนต์ในการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส

ในขั้นตอนนี้ ดำเนินการต่อเนื่องจากขั้นตอนแรก โดยนำรากทานตะวันความยาว 0.5 เซนติเมตร ที่มีอายุเท่ากัน ไปล้างด้วยน้ำสะอาดด้วยวิธีผ่านน้ำไหล (Running tap water) เป็นเวลา 3 นาที จากนั้น ซับน้ำบริเวณรากออกด้วยความระมัดระวัง นำรากไปตัดเอาส่วนของหนวกราก (Root cap) ออก (ประมาณ 0.2 เซนติเมตร นับจากส่วนปลายรากขึ้นไป) จากนั้นทำการตัดส่วนของปลายราก (Root tip) (ถัดจากส่วนหนวกรากประมาณ 0.2 เซนติเมตร) นำไปเข้าขั้นตอนของการทำพรีทรีตเมนต์ด้วยสารละลายไกลโฟเฟตที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) ตามแผนการทดลอง ที่ศึกษาระยะเวลาของการทำพรีทรีตเมนต์ด้วยสารละลายไกลโฟเฟตที่แตกต่างกัน จำนวน 4 กรรมวิธี คือ 0 ชั่วโมง (ใช้น้ำกลั่นเป็นสารพรีทรีตเมนต์), 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง จากนั้น นำตัวอย่างปลายรากของทุกกรรมวิธี ไปล้างด้วยน้ำกลั่นอีกจำนวน 3 ครั้ง ด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรอีกจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำตัวอย่างรากทานตะวันรากทั้งหมด ไปแช่ในน้ำยาคงสภาพ (Fixative) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังครบกำหนดเวลา 24 ชั่วโมง นำรากทานตะวันของแต่ละกรรมวิธีมาล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง จากนั้น ทำให้น้ำเยื่อปลายรากอ่อนตัวด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 N ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำรากทานตะวันของแต่ละพรีทรีตเมนต์ไปวางบนสไลด์ ทำการย้อมสีโครโมโซมด้วยสียอะซิโตนอร์ซิน โดยหยดสียลงบนสไลด์ที่มีตัวอย่างรากประมาณ 1-2 หยด ทิ้งไว้ 2 นาที ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้น ทำการสควอช (Squash) ปลายรากเพื่อให้เซลล์กระจายออกจากกัน ซึ่งจะช่วยให้สามารถสังเกตโครโมโซมได้ง่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทำการสังเกตโดยใช้กล้องขยายภาพ 400 เท่าตามลำดับ และการบันทึกผลการทดลองค่าคะแนนตามเกณฑ์ที่กำหนดขึ้นเพื่อใช้ในการประเมินต่อไป

การประเมิน การบันทึกผล และการวิเคราะห์ผลการวิจัย

ก. ค่าร้อยละของการยับยั้งการเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวัน

ค่าร้อยละของการยับยั้งการเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวัน ทำได้โดยการสังเกต และบันทึกผลค่าความถี่ของการเกิดการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของทานตะวัน โดยสังเกตการแบ่งเซลล์บริเวณปลายรากทานตะวันของ

ตารางที่ 1: หลักเกณฑ์การพิจารณาการเกิดการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส

ลักษณะที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ยับยั้ง*	ไม่มีการยับยั้ง
เซลล์มีขนาดใหญ่ เห็นขอบเขตของนิวเคลียสชัดเจน ไม่เห็นโครโมโซมมีรูปร่างเป็นแท่งชัดเจน	✓	
เซลล์มีขนาดใหญ่ ไม่เห็นขอบเขตของนิวเคลียส เห็นโครโมโซมมีลักษณะเป็นแท่ง (โครมาทิด) ตำแหน่งของโครมาทิดกระจายอยู่ภายในเซลล์แบบไม่มีทิศทางแน่นอนจากการการสควอช	✓	
เซลล์มีขนาดใหญ่ ไม่พบ การเคลื่อนตัวของโครมาทิดไปยังแต่ละขั้วของเซลล์ หรือลักษณะของโครโมโซมที่มีรูปร่างคล้ายอักษรตัววี (V) ตัวเจ (J) และตัวไอ (I)	✓	
เซลล์มีขนาดใหญ่ ไม่เห็นขอบเขตของนิวเคลียส เห็นโครโมโซมมีลักษณะเป็นแท่งจากการหดสั้น มองเห็นเป็นแท่งชัดเจนมีลักษณะการเรียงตัวเข้าสู่แนวกึ่งกลางเซลล์		✓
พบการเคลื่อนตัวของโครมาทิดไปยังแต่ละขั้วของเซลล์หรือลักษณะของโครโมโซมที่มีรูปร่างคล้ายอักษรตัววี (V) ตัวเจ (J) และตัวไอ (I)		✓
โครมาทิดแยกออกจากกันไปอยู่ที่แต่ละขั้วของเซลล์อย่างสมบูรณ์ เห็นขอบเขตของนิวเคลียสชัดเจน เห็นเซลล์เพลทหรือเห็นเป็นสองเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่าเซลล์เริ่มต้น		✓

ยับยั้ง* หมายถึง การยับยั้งกลไกการแบ่งเซลล์ในระยะก่อนการแบ่งเซลล์ระยะเมตาเฟสจนถึงระยะเมตาเฟส โดยเกณฑ์การชี้วัดบางส่วน อ้างอิงมาจากการวิจัยของ Kevin และ Larry ปี 1991 [1] ที่วิจัยการยับยั้งการแบ่งเซลล์ที่มีผลมาจากสารกำจัดวัชพืช

แต่ละกรรมวิธีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยายภาพ 400 เท่า พิจารณาการพบและไม่พบการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของทานตะวัน โดยใช้หลักเกณฑ์การพิจารณาดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 ในส่วนของการบันทึกผล ทำการบันทึกจำนวน 2 บริเวณ (Field) ต่อ 1 ตัวอย่าง

บันทึกผลค่าความถี่ของการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของกรรมวิธีการพรีทรีตเมนต์ของแต่ละกรรมวิธี จากนั้น นำค่าความถี่ในแต่ละซ้ำของแต่ละกรรมวิธี ไปคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบ ไมโทซิส (ดัดแปลงจาก Gomes, R. et al. (2010)) [5] ต่อไปดังสมการ

$$\text{ร้อยละของการยับยั้ง} = \frac{\text{ความถี่ที่พบการยับยั้งของแต่ละกรรมวิธี}}{\text{ความถี่ทั้งหมดที่สังเกตในแต่ละกรรมวิธี}} \times 100 \quad (1)$$

หมายเหตุ

- ค่าความถี่ของการยับยั้ง คือ จำนวนการพบการยับยั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่ตรงตามเกณฑ์ ในตารางที่ 1 ในแต่ละบริเวณสังเกต (field) และในแต่ละซ้ำของกรรมวิธี

- ค่าความถี่ทั้งหมดของแต่ละกรรมวิธี คือ จำนวนความถี่ทั้งหมด ทั้งที่พบและไม่พบในแต่ละกรรมวิธี

ข. ค่าคะแนนการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวัน

การให้ค่าคะแนนการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวันของงานวิจัยนี้ พิจารณาจากเกณฑ์การให้คะแนนที่กำหนดขึ้นดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2: หลักเกณฑ์การให้ค่าคะแนนการเกิดการยับยั้งกระบวนการเกิดไมโทซิส

ลักษณะที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์*	ค่าคะแนน**
พบระยะที่เซลล์มีขนาดใหญ่ มองเห็นขอบเขตของนิวเคลียสชัดเจนแต่ไม่เห็นโครโมโซมมีรูปร่างเป็นแท่ง และเป็นระยะที่ไม่สามารถสังเกตเห็นขอบเขตของนิวเคลียสชัดเจน แต่สามารถสังเกตเห็นโครโมโซมมีลักษณะเป็นแท่ง (โครมาทิด) โดยที่ตำแหน่งของโครมาทิด กระจายอยู่ภายในเซลล์แบบไม่มีทิศทางแน่นอนอันเกิดจากการการทาสควอซ์ และไม่พบระยะที่ภายในเซลล์มีการเคลื่อนตัวของโครมาทิดไปยังแต่ละขั้วของเซลล์หรือลักษณะของโครโมโซมมีรูปร่างคล้ายอักษรตัววี (V), ตัวเจ (J) และตัวไอ (I)	5
พบแบบเดียวกันกับลักษณะที่พบในระยะข้างต้น แต่ พบตำแหน่งของโครมาทิด อยู่บริเวณใกล้แนวกึ่งกลางเซลล์หรือมีลักษณะการเรียงตัวเข้าสู่แนวกึ่งกลางเซลล์หรือเซลล์มีขนาดใหญ่ ไม่เห็นขอบเขตของนิวเคลียสชัดเจน เห็นโครโมโซมมีลักษณะเป็นแท่งจากการหดสั้น มองเห็นเป็นแท่งชัดเจนมีลักษณะการเรียงตัวเข้าสู่แนวกึ่งกลางเซลล์ แต่ไม่พบระยะที่มีการเคลื่อนตัวของโครมาทิดไปยังแต่ละขั้วของเซลล์หรือลักษณะของโครโมโซมมีรูปร่างคล้ายอักษรตัววี (V), ตัวเจ (J) และตัวไอ (I)	3
พบแบบเดียวกันกับลักษณะที่พบในระยะก่อนหน้า แต่ พบตำแหน่งของโครมาทิดอยู่บริเวณใกล้แนวกึ่งกลางเซลล์ หรือมีลักษณะการเรียงตัวเข้าสู่แนวกึ่งกลางเซลล์ หรือเซลล์มีขนาดใหญ่ ไม่เห็นขอบเขตของนิวเคลียส เห็นโครโมโซมมีลักษณะเป็นแท่งจากการหดสั้น มองเห็นเป็นแท่งชัดเจนมีลักษณะการเรียงตัวเข้าสู่แนวกึ่งกลางเซลล์ แต่ไม่พบระยะที่มีการเคลื่อนตัวของโครมาทิดไปยังแต่ละขั้วของเซลล์หรือลักษณะของโครโมโซมมีรูปร่างคล้ายอักษรตัววี (V), ตัวเจ (J) และตัวไอ (I) และพบโครมาทิดแยกออกจากกันไปอยู่ที่แต่ละขั้วของเซลล์อย่างสมบูรณ์ เห็นขอบเขตของนิวเคลียสชัดเจน เห็นเซลล์เพลทหรือเห็นเป็นสองเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่าเซลล์เริ่มต้น	1
ไม่พบลักษณะใด ๆ เนื่องจากเซลล์ตายหรือไม่สามารถสังเกตเห็นเซลล์ได้ชัดเจน	0

หมายเหตุ

* หมายถึง ลักษณะภาพโดยรวมในแต่ละบริเวณ (Field)

** หมายถึง ค่าคะแนนลักษณะของการยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสที่เกิดจากการทำพรีทรีตเมนต์ด้วยสารไกลโฟเซต โดยพิจารณาลักษณะที่พบตามเกณฑ์ในตารางที่ 1 และพิจารณาให้ค่าคะแนนศักยภาพของสารไกลโฟเซตในการเป็นสารพรีทรีตเมนต์ในการวิจัย การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในการทดลองครั้งนี้

การพิจารณา 2 บริเวณ (Field) ต่อ 1 สไลด์ หรือ (จำนวน 20 บริเวณต่อ 1 กรรมวิธีต่อครั้ง ในการทดลองนี้) ทำการบันทึกผลความถี่ที่พบของแต่ละเกณฑ์ค่าคะแนนของแต่ละกรรมวิธี จากนั้น เลือกค่าคะแนนการยับยั้งที่มีความถี่สูงสุด นำค่าความถี่ไปคำนวณเป็นร้อยละของการยับยั้งที่ดีที่สุดของแต่ละกรรมวิธีของการทดลอง จะได้เป็นค่าคะแนนที่ดีที่สุดของกรรมวิธีและร้อยละการยับยั้งที่ดีที่สุดของกรรมวิธีเพื่อนำไปเปรียบเทียบทางสถิติต่อไป

$$\text{ร้อยละของการยับยั้งที่ดีที่สุด} = \frac{\text{ความถี่ที่พบมากที่สุดของค่าคะแนนของแต่ละกรรมวิธี}}{\text{ความถี่ทั้งหมด}} \times 100 \quad (2)$$

การวิเคราะห์การทดลองทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดยวิธีการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยผลการทดลองโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบ Analysis of Variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

ก. ผลการวิจัย

การวิจัยการประยุกต์ใช้สารไกลโฟเซตเป็นสารพรีทรีตเมนต์ในการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวัน วางแผนการทดลองแบบแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) มีปัจจัยศึกษาจำนวน 1 ปัจจัยคือ ระยะเวลาของการทำพรีทรีตเมนต์ด้วยสารละลายไกลโฟเซตความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) จำนวน 4 กรรมวิธี ได้แก่ 0 ชั่วโมง (ชุดควบคุม), 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัวอย่าง (เมล็ด) โดยเลือกใช้พืชตัวอย่างคือ ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) ในการทำวิจัย ได้ผลการวิจัยดังนี้

ก). ค่าร้อยละของการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวัน

ผลของระยะเวลาของการทำพรีทรีตเมนต์ด้วยสารละลายไกลโฟเซตต่อการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวันโดยวิธีการทำพรีทรีตเมนต์พบว่า ระยะเวลาของการทำพรีทรีตเมนต์ด้วยสารละลายไกลโฟเซตที่แตกต่างกัน มีผลต่อค่าเฉลี่ยร้อยละของการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวันที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 3

โดยจากผลการวิจัยพบว่า กรรมวิธีที่ 3 การพรีทรีตเมนต์ด้วยสารละลายไกลโฟเซต 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมงให้ค่าร้อยละของการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวันมากที่สุดคือ ร้อยละ 65.00 ± 5.00 รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ 2 และ กรรมวิธีที่ 4 คือ กรรมวิธีการพรีทรีตเมนต์เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมงและ 3 ชั่วโมง ที่ให้ผลค่าเฉลี่ยร้อยละของการยับยั้งรองลงมาคือร้อยละ 56.67 ± 2.89 และร้อยละ 53.33 ± 2.89 ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ กรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นในการทำพรีทรีตเมนต์ไม่ทำให้เกิดการยับยั้งการแบ่งเซลล์แต่อย่างใด โดยให้ค่าร้อยละการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 0

ข). ค่าคะแนนการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวัน

จากผลการวิจัยข้างต้น เมื่อให้คะแนนการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวันโดยพิจารณาจากเกณฑ์การให้คะแนนที่กำหนดไว้ในตารางที่ 2 ผลการวิจัยพบว่า หากพิจารณาค่าความถี่ของการยับยั้งการแบ่งเซลล์

ตารางที่ 3: แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวัน

กรรมวิธีที่	ระยะเวลาการทำ		ค่าเฉลี่ยร้อยละ การยับยั้ง $\pm$ S.D.
	พรีทรีตเมนต์ (ชั่วโมง)	เกณฑ์คะแนน*	
1	0 (น้ำกลั่น)	1	0.00 ^c
2	1	3	56.67 ^b $\pm$ 2.89
3	2	3	65.00 ^a $\pm$ 5.00
4	3	3	53.33 ^b $\pm$ 2.89

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันหมายถึง ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P > 0.05$) และ $CV = 7.38$

หมายเหตุ

$\pm$ หมายถึง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

* หมายถึง ค่าคะแนนที่มีความถี่ที่พบมากที่สุดของกรรมวิธี

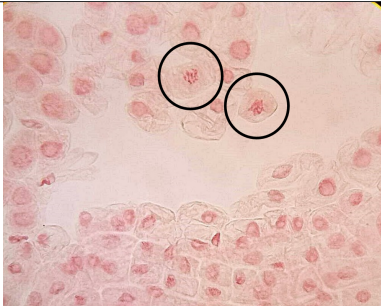
** หมายถึง ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งที่มากที่สุด

แบบไมโทซิส ร่วมกับผลการสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายภาพ 400 เท่า พบว่า กรรมวิธีที่ 3 ให้ผลค่าร้อยละของการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสมากที่สุดจากการพบความถี่ของการยับยั้งการแบ่งเซลล์มากที่สุด โดยเมื่อพิจารณาตามเกณฑ์การให้คะแนนที่กำหนดไว้ในตารางที่ 2 แล้ว กรรมวิธีที่ 3 นี้จะให้ค่าคะแนนของการเกิดการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเท่ากับ 3 คะแนน ซึ่งไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ 2 และกรรมวิธีที่ 4 ที่มีค่าคะแนนการเกิดการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเท่ากับ 3 คะแนนเช่นกัน ซึ่งเมื่อทำการพิจารณาจากตัวอย่างภาพถ่ายการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปลายรากของทานตะวันที่เกิดขึ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายภาพ 400 เท่า ของทั้ง 3 กรรมวิธีที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่า เราพบลักษณะของโครโมโซมที่มีลักษณะเป็นแท่ง อยู่บริเวณกลางเซลล์ โดยที่ไม่ปรากฏเห็นขอบเขตของเยื่อหุ้มนิวเคลียส ในกรรมวิธีทั้ง 3 คือ กรรมวิธีที่ 2 3 และ 4 ซึ่งสามารถสังเกตและเปรียบเทียบความแตกต่างกับการติดสีย้อมของนิวเคลียสในระยะอินเตอร์เฟส (Interphase) ของเซลล์ข้างเคียงได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังปรากฏตามภาพของแต่ละกรรมวิธี ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 โดยทั้ง 3 กรรมวิธีให้ผลที่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุมที่มีค่าคะแนนของการยับยั้งเท่ากับ 1 คะแนน (ไม่มีการยับยั้ง)

ข. อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการวิจัย การประยุกต์ใช้สารละลายไกลโฟเซตเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเป็นสารพรีทรีตเมนต์ และศึกษาผลของระยะเวลาการทำพรีทรีตเมนต์ที่แตกต่างกันต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวัน 4 กรรมวิธี คือ 0 ชั่วโมง (น้ำกลั่น), 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง สามารถอภิปรายผลการวิจัยได้ดังนี้

ตารางที่ 4: แสดงค่าคะแนนของการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวันพร้อมภาพประกอบ

ระยะเวลาการ กรรมวิธีที่ ทำพรีทรีตเมนต์ ค่าคะแนน ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า (ชั่วโมง)			
1	0 (น้ำกลั่น)	1	
2	1	3	
3	2	3	
4	3	3	

จากผลการวิจัยที่พบว่า สารละลายไกลโฟเซตที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สามารถใช้เป็นสารพรีทรีตเมนต์สำหรับการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสโดยวิธีการทำพรีทรีตเมนต์ของทานตะวันได้ มีคล้ายคลึงกับรายงานวิจัยของ *Acar et al.* (2010) [3] ที่ได้ทำการวิจัยผลของสารละลายไกลโฟเซต ไอโซโพรพิลามีน (Glyphosate isopropylamine) ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันได้แก่ 0.5, 1, 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ต่อกิจกรรมการแบ่งเซลล์บริเวณ

เซลล์บริเวณปลายราก (root tip) ของหอมหัวใหญ่ (*Aulium cepa* L.) และพบว่า สารละลายไกลโฟเซต ไอโซโพรพิลามีน เพียงระดับเดียวคือ 5 เปอร์เซ็นต์ที่มีผลต่อการเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของหอมหัวใหญ่ที่ลดลงอย่างไรก็ตาม ในการวิจัยของ *Acar et al.* (2010) นั้น เป็นการแช่รากหอมหัวใหญ่ที่มีความยาว 1.5 - 2.5 เซนติเมตร เป็นระยะเวลาถึง 48 ชั่วโมง จะแตกต่างจากการวิจัยในครั้งนี้ที่ใช้ระยะเวลาน้อยกว่าคือ 1 - 3 ชั่วโมง แต่กลับให้ผลการวิจัยไปในทางเดียวกัน กล่าวคือ กรรมวิธีที่มีการใช้สารละลายไกลโฟเซตเป็นสารพรีทรีตเมนต์ทำให้การแบ่งเซลล์บริเวณปลายรากของทานตะวันมีค่าลดลง โดยดูได้จากการที่พบค่าร้อยละของการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม นอกจากนี้ ผลการวิจัยนี้ ยังมีความคล้ายคลึงกับรายงานการวิจัยของ *Swamy และ Jagannath* ในปี 2012 [4] ที่ศึกษาผลสารกำจัดวัชพืช Oxadiargyl ซึ่งเป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้ในกระบวนการปลูกอ้อยที่มีผลต่อเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของทานตะวัน ที่พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของสาร Oxadiargyl ส่งผลต่อค่าความถี่ของการเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสบริเวณเนื้อเยื่อเจริญปลายรากของทานตะวันในทิศทางที่ลดลง และสอดคล้องกับงานวิจัยของ *Gomes, R. et al.* (2010) [5] ที่ศึกษาการตอบสนองของทานตะวันต่อการกระตุ้นการสัมผัสสารไกลโฟเซต (glyphosate) และไตรเนกซาแพก-เอทิล (trinexapac-ethyl) ที่พบว่า การตอบสนองต่อการสัมผัสพิษของสารไกลโฟเซต (glyphosate) และไตรเนกซาแพก-เอทิล (trinexapac-ethyl) ขึ้นกับชนิดและปริมาณของสารที่ส่งผลต่อการเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของทานตะวัน ด้วยเหตุนี้ จากผลการวิจัยที่ได้ทำให้สามารถยืนยันว่า สารละลายไกลโฟเซตที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรมีคุณสมบัติของการเป็นสารพรีทรีตเมนต์ในการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสโดยวิธีการทำพรีทรีตเมนต์ ทั้งนี้เนื่องจากสามารถการยับยั้งการเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวันได้เช่นเดียวกันกับคุณสมบัติของสารพรีทรีตเมนต์อย่าง โคลชิซิน (Colchicine) พาราไดคลอโรเบนซีน (Paradichlorobenzene) และ 8 ไฮดรอกซีควิโนลีน (8-hydroxyquinoline) ที่ใช้โดยทั่วไปในการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสโดยวิธีการพรีทรีตเมนต์ของพืช แต่มีราคาที่ถูกกว่ามาก นอกจากนี้ ระยะเวลาของการทำ พรีทรีตเมนต์ มีผลต่อการยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสที่แตกต่างกันของทานตะวันเป็นการยืนยันได้ว่า หากต้องการนำเอาสารไกลโฟเซตไปประยุกต์ใช้เพื่อการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของพืชชนิดอื่น ผู้ใช้จำเป็นต้องหาความเข้มข้นของสารที่เหมาะสม รวมไปถึงระยะเวลาในการทำพรีทรีตเมนต์ที่เหมาะสมเช่นเดียวกัน เพื่อให้การศึกษาเกิดประสิทธิภาพมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ในการวิจัยนี้สามารถนำไปปรับกับการเรียนการสอนในหัวข้อการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของพืชได้ในการศึกษาระดับต่าง ๆ เนื่องจากสามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายจากการซื้อสารพรีทรีตเมนต์ซึ่งมีราคาสูงได้

สรุปผลการวิจัย

ในการวิจัยนี้สรุปได้ว่า การใช้สารละลายไกลโฟเซตที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรสามารถใช้เป็นสารพรีทรีตเมนต์ในการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของทานตะวันได้ โดยกรรมวิธีการพรีทรีตเมนต์ เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ให้ผลการยับยั้งการเกิดไมโทซิสได้มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 65 ± 5.00 ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการใช้สารไกลโฟเซตเป็นสารพรีทรีตเมนต์แต่ใช้น้ำกลั่นแทนนั้น ให้ค่าคะแนนน้อยที่สุดเท่ากับ 1 คะแนน คือ ไม่สามารถยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการโปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย ที่ได้เอื้อเฟื้อเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีในการทำการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- [1] ทศพล พรพรม. (2547). สารป้องกันกำจัดวัชพืช : หลักการและกลไกการทำลายพืช. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แสงแดด.
- [2] อติสร กระแสชัย. (2539). บทปฏิบัติการ Cytogenetics in Agriculture. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- [3] Okan Acar, .Sefer Demirbas,, Dogan Ilhan and Nagme Ozdinc. (2010). The Effects Of Glyphosate Isopropylamine on Mitotic Activity, Superoxide Dismutase and Peroxidase Activities of Allium cepa L. Root Tip Cells. Fresenius environmental bulletin, 19(3), 522-525.
- [4] N.N. Swamy and Shobha Jagannath (2012). Cytological studies on the effect of a herbicide, oxadiazyl on root meristemlls of sunflower, Helianthus annuus L.. Nature Environment and Pollution Technology, 11(3), 511-514.
- [5] Roberto Gomes Vital, Adriano Jakelaitis, Alan Costa and F.B. SILVA. (2017). Sunflower plant response to simulated drift of glyphosate and trinexapac-ethyl. Planta Daninha, 35, 1-13.