บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การหาตำแหน่ง Rf ที่มีสารคล้ายจิบเบอเรลลินจากยอดลำไยพันธุ์ดอโดยวิธี Rice Secondary Leaf Sheath Bioassay (RSLSB)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์มี 11 กรรมวิธี ทำ 10 ซ้ำ ใช้ Rf 0.1-1.0 และ control เป็นกรรมวิธี โดยหนึ่งหน่วยการทดลองคือ ต้นกล้าข้าวพันธุ์แพร่ 1 (กุลทินี, 2542) จำนวน 10 ต้น

วิธีการทดลอง (ตามวิธีการของนพพร, 2539)

1. การทำกราฟมาตรฐาน

1.1 นำเมล็ดข้าวพันธุ์แพร่ 1 ประมาณ 600 เมล็ด มาฆ่าเชื้อโดยแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite 5.25%: น้ำ (10:1 โดยปริมาตร) เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

1.2 เพาะเมล็ดข้าวบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่วางอยู่ในกล่องพลาสติกขนาด 16×2×48 เซนติเมตร (กว้าง×ยาว×สูง) จำนวน 4 กล่อง พ่นน้ำกลั่นให้เปียกชุ่ม ปิดฝากล่องแล้วนำไปไว้ในที่มืดในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อม (growth chamber) ที่มีอุณหภูมิ 28± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน

1.3 เตรียมสารละลาย GA_3(Kyowa) ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^{-1}, 1×10^{-3}, 1×10^{-5}, 1×10^{-7}, 1×10^{-9}, 1×10^{-11} สตล ความเข้มข้นละ 500 มิลลิลิตร (วิธีการเตรียมสาร ดูภาคผนวกที่ 1)

1.4 ตัดกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด 6×4×3.5 เซนติเมตร แล้วใช้ graduate pipet ดูดสารละลาย GA_3(Kyowa) ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในกล่องพลาสติกความเข้มข้นละ 10 กล่อง

1.5 คัดเมล็ดข้าวที่มี coleoptile ยาวประมาณ 5 มิลลิลิตร จากข้อ 1.2 ใส่ในกล่องพลาสติกในข้อ 1.4 กล่องละ 10 ต้น ปิดฝากล่องแล้วปิดด้วยเทปกาว แล้วนำไปไว้ในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อมซึ่งมีแสงจากหลอด fluorescent ความเข้มแสงประมาณ 115.38 วัตต์/ตารางเมตร อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

1.6 วัดความยาวของ secondary leaf sheath เมื่ออายุได้ 7 วันหลังจากบ่ม

1.7 วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV Assumption, AOV, C.V., Polynomial contrast, LSD, Linear regression และ Correlation

2. การเก็บตัวอย่าง (Sample preparation)

เก็บตัวอย่างวันที่ 21 สิงหาคม พ.ศ. 2542 ตัดยอดลำไยพันธุ์ดอขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง) 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 30 ยอดต่อหนึ่งหน่วยการทดลอง ตัดใบทิ้งแล้วใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็งเพื่อการขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อสกัดต่อไป

3. การสกัด (Extraction)

นำตัวอย่างแต่ละถุงมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องบดอาหาร (National รุ่น MX-795N, Matsushita Electric Industrial Co., Ltd, Malaysia) ชั่งน้ำหนักตัวอย่างสดให้ได้ 20.0000 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด แล้วนำมาใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม methanol 95% (lab grade) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้ผสมกันแล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำกากไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่กรองได้มารวมกันแล้วนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสจนแห้งติดก้นขวด แล้วจึงละลายส่วนที่แห้งด้วย 0.5 M sodium phosphate buffer pH 8.0 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร

4. การแยกส่วน (Partition)

นำสารละลายในข้อ 3 มาแยกส่วนด้วยกรวยแยก (separatory funnel) โดยใช้ ethyl acetate 100% (AR grade) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น แยกเอาส่วนบน (ethyl acetate) เก็บไว้ นำชั้นล่างซึ่งเป็นสารละลายบัฟเฟอร์มาปรับ pH ให้เป็น 2.0-2.5 ด้วย HCl เข้มข้น 6 N แล้วนำไปแยกส่วนด้วย ethyl acetate ปริมาตร 20 มิลลิลิตร อีก 4 ครั้ง จากนั้นนำสารละลาย ethyl acetate ที่ได้ทั้ง 5 ครั้ง มารวมกันแล้วนำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนแห้งติดก้นขวด แล้วละลายส่วนที่แห้งด้วย methanol 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้ volumetric pipet แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

5. การทำให้บริสุทธิ์ (Purification)

5.1 ใช้วิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟฟี เริ่มจากเตรียมแผ่น chromatogram โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 9×28 เซนติเมตร ขีดเส้นกำหนดจุดเริ่มต้นโดยขีดด้วยดินสอดำห่างจากขอบล่าง 2 เซนติเมตร และจุดสุดท้ายที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปถึง (16.5 เซนติเมตร วัดจากจุดเริ่มต้น) นำสารละลายจากข้อ 4 มา strip ลงบนแผ่น chromatogram โดยใช้ตัวอย่างแผ่นละ 50 µl (ซึ่งเทียบเท่าตัวอย่างสด 1 กรัม)

5.2 หลังจากทิ้งให้แถบสารแห้งแล้วจึงนำแผ่น chromatogram ไปแช่ใน developing chamber ที่มีตัวทำละลาย isopropanol 99.7% (AR grade) : NH_4OH 25% (AR grade) : น้ำกลั่น (10:1:1 โดยปริมาตร) โดยให้แถบสารอยู่เหนือตัวทำละลาย ทิ้งไว้จนตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงระยะ 16.5 เซนติเมตร วัดจากรอย strip สาร ใช้เวลาประมาณ 6-7 ชั่วโมง ให้นำออกจาก developing chamber แล้วนำไปผึ่งให้แห้ง

5.3 หลังจากแห้งแล้วแบ่งแผ่น chromatogram เป็น Rf 0.1-1.0 โดยส่วนที่อยู่ใต้แถบสารเป็น control (Rf 0.0) ส่วน Rf 0.1-1.0 คือส่วนที่อยู่เหนือแถบสารจนถึง solvent front ให้แบ่งเป็น 10 ส่วนเท่า ๆ กัน ตัดกระดาษแต่ละ Rf ใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 6x4x3.5 เซนติเมตร ซึ่งมีสารละลาย 0.01 M potassium phosphate buffer pH 5.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

6. การทำ Rice Secondary Leaf Sheath Bioassay (RSLSB) (ตามวิธีการของนพพร, 2539)

6.1 นำเมล็ดข้าวพันธุ์แพร่ 1 แช่ในสารละลาย sodium hypochrorite (5.25%) : น้ำ (1:10 โดยปริมาตร) เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปเพาะในที่มืดที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

6.2 การบ่ม คัดเมล็ดข้าวที่มี coleoptile ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร วางลงในกล่องพลาสติกในข้อ 5.3 กล่องละ 10 ต้น ปิดฝากล่องแล้วปิดทับด้วยเทปกาว นำไปไว้ในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อมที่มีแสงจากหลอด fluorescent ความเข้มแสง 115.38 วัตต์/ตารางเมตร อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

การบันทึกผลการทดลอง

1. วัดความยาวของ rice secondary leaf sheath เมื่ออายุได้ 7 วัน หลังจากบ่ม
2. เทียบหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น μg GA_3(Kyowa) equivalent / g f. wt. วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV Assumption, AOV, C.V.และ LSD

การทดลองที่ 2 อิทธิพลของความยาวยอดลำไยที่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินในยอดลำไยพันธุ์ดอโดยวิธี RSLSB

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 10 ซ้ำ มี 3 กรรมวิธี คือ ความยาวยอดลำไย 5, 7.5 และ 10 เซนติเมตร

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง (sample preparation) เก็บตัวอย่างวันที่ 24 เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2542 โดยตัดยอดลำไยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง) 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร (30 ยอดต่อหนึ่งหน่วยการทดลอง) ตัดใบทิ้งแล้วใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็งเพื่อขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อสกัดต่อไป

2. การสกัด การแยกส่วน และการทำให้บริสุทธิ์ ทำวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3. การทำ RSLSB (ตามวิธีการของนพพร, 2539)

3.1 นำเมล็ดข้าวพันธุ์แพร่ 1 แช่ในสารละลาย sodium hypochlorite (5.25%) : น้ำ (1:1 โดยปริมาตร) เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปเพาะในที่มืดที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.2 การบ่ม คัดเมล็ดข้าวที่มี coleoptile ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร วางลงในกล่องพลาสติกที่มีแผ่นโครมาโตแกรม ที่ Rf 0.3-0.8 ซึ่งเป็น Rf ที่พบ activity ของจิบเบอเรลลินในยอดลำไย (จากผลการทดลองที่ 1) กล่องละ 10 ต้น ปิดฝากล่องแล้วปิดด้วยเทปกาว นำไปไว้ในตู้ควบคุม

สภาพแวดล้อมที่มีแสงจากหลอด fluorescent ความเข้มแสง 115.38 วัตต์/ตารางเมตร อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

การบันทึกผลการทดลอง

1.วัดความยาวของ rice secondary leaf sheath เมื่ออายุได้ 7 วัน หลังจากบ่ม

2.เทียบหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น μg GA_3(Kyowa) equivalent / g f. wt. วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV Assumption, AOV, C.V.และ LSD

การทดลองที่ 3 อิทธิพลของระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างยอดลำไยที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลิน โดยวิธี RSLSB

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 10 ซ้ำ โดยมีระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างเป็นกรรมวิธี มี 8 กรรมวิธี คือ เก็บตัวอย่างไว้ 4 ชั่วโมง, 1 เดือน, 2 เดือน, 3เดือน, 4 เดือน, 5 เดือน, 6 เดือน และ 7 เดือน

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างยอดลำไยวันที่ 21 เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2542 เก็บรักษาตัวอย่างยอดลำไยที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินต่อไป

2. การสกัด การแยกส่วน และการทำให้บริสุทธิ์ ทำวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.การทำ RSLSB เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2

การบันทึกผลการทดลอง

1.วัดความยาวของ rice secondary leaf sheath เมื่ออายุได้ 7 วัน หลังจากบ่ม

2.เทียบหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น μg GA_3(Kyowa) equivalent / g f. wt. วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV Assumption, AOV, C.V.และ LSD

การทดลองที่ 4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารคล้ายจิบเบอเรลลินในช่วงก่อนการแตกใบอ่อนของยอดลำไยพันธุ์ดอโดยวิธี RSLSB

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 15 ซ้ำ โดยใช้จำนวนสัปดาห์ก่อนการแตกใบอ่อนเป็นกรรมวิธี มี 4 กรรมวิธี คือ 8, 6, 4 และ 2 สัปดาห์ก่อนการแตกใบอ่อน

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง เริ่มเก็บตัวอย่างวันที่ 28 สิงหาคม พ.ศ. 2542 และเก็บทุก ๆ 14 วัน เก็บตัวอย่างวันสุดท้ายวันที่ 2 ตุลาคม พ.ศ. 2542 โดยตัดยอดลำไยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง) 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร (30 ยอดต่อหนึ่งหน่วยการทดลอง) ตัดใบทิ้งแล้วใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็งเพื่อการขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อสกัดต่อไป

2. การสกัด การแยกส่วน และการทำให้บริสุทธิ์ ทำวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3. การทำ RSLSB เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2

การบันทึกผลการทดลอง

1.วัดความยาวของ rice secondary leaf sheath เมื่ออายุได้ 7 วัน หลังจากบ่ม

2.เทียบหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น μg GA_3(Kyowa) equivalent / g f. wt. วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV Assumption, AOV, C.V.และ LSD

การทดลองที่ 5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินในช่วงก่อนการออกดอกของยอดลำไยพันธุ์ดอโดยวิธี RSLSB

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 15 ซ้ำ โดยใช้จำนวนสัปดาห์ก่อนการออกดอก (เห็นด้วยตาเปล่า) เป็นกรรมวิธี มี 4 กรรมวิธี คือ 8, 6, 4 และ 2 สัปดาห์ก่อนการออกดอก

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง เริ่มเก็บตัวอย่างวันที่ 6 ธันวาคม พ.ศ. 2542 และเก็บทุก ๆ 14 วัน เก็บตัวอย่างวันสุดท้ายวันที่ 17 มกราคม พ.ศ. 2543 โดยตัดยอดลำไยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง) 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร (30 ยอดต่อหนึ่งหน่วยการทดลอง) ตัดใบทิ้งแล้วใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็งเพื่อการขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อสกัดต่อไป

2. การสกัด การแยกส่วน และการทำให้บริสุทธิ์ ทำวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3. การทำ RSLSB เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2

4. การทำ microtome section (ตามวิธีการของชัยวัฒน์, 2542)

4.1 การเก็บและการตัดตัวอย่าง นำส่วนปลายยอดลำไยมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ยาวประมาณ 0.3-0.5 เซนติเมตร โดยตัดเอาเฉพาะส่วน apical meristem และ leaf primordia ประมาณ 1-2 ใบเพื่อนำไปทำในขั้นตอนต่อไป

4.2 การฆ่าและคงสภาพเนื้อเยื่อ (killing and fixing) นำชิ้นส่วนในข้อ 4.1 ที่ตัดหรือแยกแล้วไปแช่ในน้ำยาฆ่าและคงสภาพเซลล์ คือ FAA (formalin-acetic acid alcohol) 70% โดยใช้ ethyl alcohol 70% (lab grade) : glacial acetic acid (lab grade) : formalin (lab grade) อัตรา 18:1:1 ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว (vial) โดยใส่น้ำยาให้ท่วมชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช

4.3 การดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อ นำชิ้นส่วนที่แช่อยู่ใน FAA 70% เข้าเครื่องดูดอากาศ (suction pump) เพื่อดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อ และช่วยให้น้ำยาซึมเข้าไปได้ทั่วถึงโดยใช้ vacuum ที่ 600 mm.Hg นาน 1 ชั่วโมง จนกว่าฟองอากาศออกหมด โดยสังเกตได้จากการที่เนื้อเยื่อจมลงก้นขวดและไม่มีฟองอากาศผุดขึ้นมา จากนั้นทิ้งไว้ในสภาพสูญญากาศ 24 ชั่วโมง

4.4 การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) นำชิ้นส่วนพืชแช่ใน TBA (tertiary butyl alcohol) ที่มีระดับความเข้มข้นแอลกอฮอล์ 5 ระดับ คือ 50, 70, 85, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 1) แต่ละระดับใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ผสมสี erythrosin ลงไปเล็กน้อยเพื่อให้ชิ้นส่วนติดสีมองเห็นได้ชัดเจน

4.5 การแทนที่แอลกอฮอล์ (infiltration) แช่ชิ้นส่วนใน TBA บริสุทธิ์ 3 ครั้ง ๆ ละ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในส่วนผสมของ TBA บริสุทธิ์ กับ พาราฟินในอัตราส่วน 1:1 นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นย้ายชิ้นส่วนพืชลงในขวดแก้ว (vial) ที่มี พาราฟินเพียงอย่างเดียวนาน 12 ชั่วโมง

4.6 การฝังเนื้อเยื่อใน embedding paraplast ต้องมีการเตรียม paraplast ดังนี้ นำเอา paraplast เข้าตู้อบอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมงได้เป็น paraplast เหลวซึ่งพร้อมใช้งาน สามารถทิ้งไว้ในตู้อบประมาณ 4 สัปดาห์ ใช้กระดาษแข็งหน้ามันพับเป็นกระทงขนาด 3×4 เซนติเมตร เท paraplast สำหรับฝังชิ้นตัวอย่างพืชที่หลอมไว้แล้วที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มาแล้วไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง ลงไปให้เกือบเต็มกระทง รอให้ส่วนล่างของ paraplast เย็นตัว จึงใช้เข็มปลายแหลมที่ลนไฟจนร้อนจัดปาดผิวหน้าของ paraplast ให้เหลวตลอดเวลา จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการ infiltrate แล้วในตู้อบ เทใส่กระทง 1 ชิ้น พร้อมเก็บเข็มปลายแหลมที่ร้อนจัดเรียงชิ้นส่วนพืชให้อยู่ในแนวที่ต้องการ และเป็นการไล่ฟองอากาศออกจาก paraplast ด้วย แล้วรีบนำกระทงไปลอยน้ำเย็นเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดฟองอากาศ เมื่อ paraplast แข็งตัวดีแล้วนำไปตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าตามลักษณะของเนื้อเยื่อพืช เพื่อรอการฝังบนแท่นไม้ และรอการตัดต่อไป

4.7 การตัดเนื้อเยื่อด้วย rotary microtome นำชิ้นส่วนพืชที่ฝังใน paraplast มาแต่งเป็นแท่งสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ แล้วนำไปติดบนแท่งไม้ โดยใช้ paraplast เป็นตัวเชื่อม แล้วนำไปตัดด้วย rotary microtome ให้มีความหนาประมาณ 15-20 µl ได้แถบ paraplast (ribbon) ที่มีชิ้นส่วนพืชติดอยู่

4.8 การนำแถบ paraplast ติดบนกระจกสไลด์ (affixation) ใช้ hapt's adhesive 2% ซึ่งเตรียมจากไข่ขาว 2 มิลลิลิตรต่อน้ำกลั่น 98 มิลลิลิตร หยด 1-2 หยดลงบนแผ่นสไลด์ ใช้พู่กันเกลี่ยนำแถบ paraplast (ribbon) ที่ตัดวางไว้ แล้วนำแผ่นสไลด์วางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) ปล่อยให้แห้งวางทิ้งไว้ 3-4 วัน ก่อนทำการปิดสไลด์

4.9 ปิดสไลด์ด้วย cover slip โดยใช้ canada balsam หรือ permount เป็น mounting media ใช้ปลายมีดผ่าตัด ไล่ฟองอากาศออก ทิ้งไว้ 4-5 วัน

4.10 นำสไลด์ที่ได้ไปถ่ายรูปด้วยกล้อง light microscope ใช้ฟิล์มขนาด 35 มิลลิเมตร ขนาดกำลังขยาย 118 เท่าในการถ่ายภาพ

การบันทึกผลการทดลอง

1.วัดความยาวของ rice secondary leaf sheath เมื่ออายุได้ 7 วัน หลังจากบ่ม

2.เทียบหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น μg GA_3(Kyowa) equivalent / g f. wt. วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV Assumption, AOV, C.V.และ LSD

3.ตรวจสอบ flower initiation โดยการทำ microtome section

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

1. สวนลำไยของสถาบันวิจัยและฟื้นฟูสภาพแมคเคน อ. เมือง จ. เชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

ระหว่างเดือน สิงหาคม 2542 ถึง เดือน ตุลาคม 2543