บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 อิทธิพลของขนาดหน่วยการทดลองที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนในการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินโดยวิธี Rice Secondary Leaf Sheath Bioassay (RSLSB)

วัตถุประสงค์ ศึกษาอิทธิพลของขนาดหน่วยการทดลองที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนในการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินของข้าวเหนียวพันธุ์แพร่ 1

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 5 การทดลอง โดยใช้เมล็ดข้าวเหนียวพันธุ์แพร่ 1 จำนวน 2, 4, 6, 8, และ 10 เมล็ด ในแต่ละการทดลองเปรียบเทียบค่า C.V.ที่ได้จากการวัดความยาว secondary leaf sheath ของเมล็ดข้าวที่งอกในสารละลาย GA_3 (Kyowa)(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) เข้มข้น 3×10^{-9}, 3×10^{-7}, 3×10^{-5}, 3×10^{-3}, และ 3×10^{-1} สตล ตามลำดับ

อุปกรณ์และวิธีการ (ดัดแปลงจากนพพร, 2539)

1) การคัดเลือกเมล็ดข้าวเหนียวพันธุ์แพร่ 1 ประมาณ 600 เมล็ด มาฆ่าเชื้อโดยแช่ในสารละลาย sodium hyperchlorite 5.25%:น้ำ (ในอัตราส่วน 1:10โดยปริมาตร) เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

2) การเพาะเมล็ดข้าวที่ฆ่าเชื้อแล้วบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (Whatman Laboratory Division, Maidstone, England) ที่วางอยู่ในกล่องพลาสติกขนาด 16×24×8 เซนติเมตร (กว้าง×ยาว×สูง) จำนวน 4 กล่อง พ่นน้ำกลั่นให้เปียกชุ่มปิดฝากล่องแล้วนำไปไว้ในที่มืดในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อม (growth chamber) ที่มีอุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 °ซ เป็นเวลา 3 วัน

3) การเตรียมสารละลาย GA_3 (Kyowa) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ความเข้มข้นละ 500 มิลลิลิตร โดยเตรียมจากการทำ stock สารละลาย GA_3 (Kyowa) เข้มข้น 2,000 สตล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ดังนี้

3.1) คำนวณเพื่อหาปริมาณ GA_3 (Kyowa) ที่จะนำไปใช้เป็น stock ดังนี้

GA_3 (Kyowa) 2,000 สตลในน้ำ 50 มิลลิลิตร มีเนื้อสาร 100 มิลลิกรัม

GA_3 (Kyowa) 1.6 กรัม มีเนื้อสารอยู่ 50 มิลลิกรัม

ถ้าต้องการเนื้อสาร 100 มิลลิกรัม จะต้องชั่งสาร (100×1.6)/50 = 3.2 กรัม

3.2) ชั่ง GA_3 (Kyowa) มา 3.2000 กรัม (ตามที่คำนวณได้ในข้อ 3.1) ด้วยเครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นใน volumatric flask ให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย GA_3 (Kyowa) เข้มข้น 2,000 สตล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.3) นำ stock solution ที่ได้ไปเจือจางให้เป็น 1 สตล ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรโดยคำนวณดังนี้

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

$$V_1 = (1{,}000 \times 1)/2{,}000 = 0.5 \text{ มิลลิลิตร}$$

N_1 = ความเข้มข้นของ stock GA_3(Kyowa) มีหน่วยเป็น สตล

N_2 = ความเข้มข้นของ stock GA_3(Kyowa) ที่ต้องการ มีหน่วยเป็น สตล

V_1 = ปริมาตรของ stock GA_3(Kyowa) มีหน่วยเป็น มิลลิลิตร

V_2 = ปริมาตรของ GA_3(Kyowa) ความเข้มข้นที่ต้องการ มีหน่วยเป็น มิลลิลิตร

จากนั้นจึงใช้ graduate pipet ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ดูดสารละลายมา 0.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตรใน volumatric flask จะได้ สารละลาย GA_3(Kyowa) เข้มข้น 1 สตล ปริมาตร 1,000 ลิตร

3.4) การเตรียม GA_3(Kyowa) เข้มข้น 3×10^{-9}, 3×10^{-7}, 3×10^{-5}, 3×10^{-3}, และ 3×10^{-1} สตล สามารถเตรียมได้จาก GA_3(Kyowa) เข้มข้น 1 สตล โดยคำนวณจากสูตรและเตรียมโดยวิธีเดียวกัน

4) ตัดกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด 6×4×3.5 เซนติเมตร แล้วใช้ graduate pipet ดูดสารละลาย GA_3(Kyowa) ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ในข้อ 3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในกล่องพลาสติก

5) คัดต้นกล้าข้าวพันธุ์แพร่ 1 ที่มี coleoptile ยาวประมาณ 5 มิลลิลิตร จากข้อ 2 ใส่ในกล่องพลาสติกในข้อ 4 กล่องละ 2, 4, 6, 8, และ 10 ต้นตามลำดับ ปิดฝากล่องแล้วปิดด้วยเทปกาว แล้วนำไปไว้ในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อม ซึ่งมีแสงจากหลอด fluorescent ความเข้มแสงประมาณ 115.38 วัตต์/ตารางเมตร อุณหภูมิ 28±2 °ซ เป็นเวลา 7 วัน

การบันทึกผลการทดลอง

1) วัดความยาวของ secondary leaf sheath (หน่วยเป็นเซนติเมตร) เมื่ออายุได้ 7 วันหลังบ่ม
2) วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV Assumption เพื่อตรวจสอบ
   - การกระจายของข้อมูล
   - ความเป็นเอกภาพของความต่างของกรรมวิธี
   - main effect ของ model
   - ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของประชากร
   - ความแปรปรวนของการทดลอง
   - Polynomial contrast เพื่อตรวจสอบ treatment ว่าเป็น linear หรือ quadratic

   LSD เพื่อตรวจสอบความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยของ treatment

   Linear regression เพื่อหาสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ของ 2 ตัวแปร

   Correlation เพื่อหาความสัมพันธ์ของ 2 ตัวแปร

การทดลองที่ 2 การหาตำแหน่ง R_f ที่มีสารคล้ายจิบเบอเรลลินจากยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าโดยวิธี RSLSB

วัตถุประสงค์ ศึกษาตำแหน่ง R_f ที่มี activity ของสารคล้ายจิบเบอเรลลินในยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้า

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์มี 11 วิธีการ ใช้ R_f 0.1-1.0 และ control (R_f 0.0) เป็นวิธีการวิธีการละ 6 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลองคือ ต้นกล้าข้าวพันธุ์แพร่ 1 จำนวน 8 ต้น (ผลจากการทดลองที่ 1)

อุปกรณ์และวิธีการ

1) การเก็บตัวอย่าง ตัดยอดมะปรางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง) 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 30 ยอด ต่อหนึ่งหน่วยการทดลอง ตัดใบทิ้งแล้วใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็งแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 °ซ เพื่อสกัดต่อไป

2) การสกัด นำตัวอย่างแต่ละถุงมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า ชั่งน้ำหนักตัวอย่างสด ที่บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า ซึ่งชั่งน้ำหนักตัวอย่างสดที่บดแล้วให้ได้ 20.0000 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) แล้วนำมาใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม methanol 95 % (lab. grade) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้ผสมกันแล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำกากไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่กรองได้มารวมกันแล้วนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 35 °ซ จนแห้งติดก้นขวด แล้วจึงละลายส่วนที่แห้งด้วย 0.5 M sodium phosphate buffer pH 8.0 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร

3) การแยกส่วน นำสารละลายในข้อ 2 มาแยกส่วนด้วยกรวยแยก (separatory funnel) โดยใช้ ethyl acetate 100% (A.R. 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 °ซ จนแห้งติดขวด แล้วละลายส่วนที่แห้งด้วย methanol 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้ volumatric pipet แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

4) การทำให้บริสุทธิ์

4.1) ใช้วิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟฟี (paper chromatography) เริ่มจากเตรียมแผ่น chromatogramโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 9×28 เซนติเมตร ขีดเส้นกำหนดจุดเริ่มต้นที่จะ strip สารโดยขีดด้วยดินสอดำห่างจากขอบล่าง 2 เซนติเมตร และจุดสุดท้ายที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปถึง (16.5 เซนติเมตรวัดจากจุดที่จะ strip สาร) นำสารละลายจากข้อ 3 มา strip ลงบนแผ่น chromatogram โดยใช้ตัวอย่างแผ่นละ 50 µl (เทียบเท่าตัวอย่างสด 1 กรัม)

4.2) จากนั้นปล่อยให้สารละลายที่ strip ไว้ให้แห้ง แล้วจึงนำแผ่น chromatogram ไปแช่ใน chamber ที่มีตัวทำละลาย isopropanol 99.7% (A.R. grade):NH_4OH 25% (A.R. grade): น้ำ

กลั่น ในอัตราส่วน 10:1:1 โดยปริมาตร โดยให้แถบสารอยู่เหนือตัวทำละลาย ทิ้งไว้จนตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงระยะ 16.5 เซนติเมตร วัดจากรอย strip สาร ใช้เวลาประมาณ 6-7 ชั่วโมงแล้วนำไปผึ่งให้แห้ง

4.3) เมื่อแผ่น chromatogram แห้งแล้ว แบ่งเป็น R_f 0.1-1.0 โดยส่วนที่อยู่ใต้แถบสารเป็น control (R_f 0.0) ส่วน R_f 0.1-1.0 คือส่วนที่อยู่เหนือแถบสารจนถึง solvent front ให้แบ่งเป็น 10 ส่วนเท่า ๆ กัน ตัดกระดาษแต่ละ R_f ใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 6×4×3.5 เซนติเมตร ซึ่งมีสารละลาย 0.01 M potassium phosphate buffer pH 5.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

5) การทำ Rice Secondary Leaf Sheath Bioassay (RSLSB)(ดัดแปลงจาก นพพร, 2539)

5.1) นำเมล็ดข้าวพันธุ์แพร่ 1 มาทำความสะอาด โดยแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite (5.25 %v/v) : น้ำ (1:10 โดยปริมาตร) เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นนำไปเพาะในที่มืดที่อุณหภูมิ 28±2 °ซ เป็นเวลา 3 วัน

5.2) การบ่มคัดเลือกต้นกล้าข้าวที่มี coleoptile ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร วางลงในกล่องพลาสติกที่เตรียมไว้ในข้อ 4.3 กล่องละ 8 ต้น ปิดฝากล่องแล้วปิดด้วยเทปกาว นำไปไว้ในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อมที่มีแสงจากหลอด fluorescent ความเข้มแสง ประมาณ 115.38 วัตต์/ตารางเมตร อุณหภูมิ 28±2 °ซ เป็นเวลา 7 วัน

การบันทึกผลการทดลอง

1) วัดความยาวของ secondary leaf sheath (หน่วยเป็นเซนติเมตร) เมื่ออายุได้ 7 วันหลังบ่ม

2) เทียบหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินที่ได้จากตำแหน่ง R_f ต่าง ๆ กันจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น μgGA_3(Kyowa)equivalent/g f.wt. วิเคราะห์ผลการทดลอง โดยวิเคราะห์ test of AOV Assumption, AOV, C.V., Polynomial contrast, LSD, Linear regression, และ Correlation

การทดลองที่ 3 อิทธิพลของความยาวยอดมะปรางที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินในยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าโดยวิธี RSLSB

วัตถุประสงค์ เปรียบเทียบปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินที่ได้จากการวิเคราะห์เมื่อใช้ขนาดความยาวที่ต่างกัน

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์มี 3 วิธีการ ใช้ความยาวยอด 3 ระดับ คือ ขนาดความยาวยอด 5, 7.5, และ 10 เซนติเมตร เป็นวิธีการ ทำ 7 ซ้ำ โดย 1 หน่วยการทดลอง คือ ต้นกล้าข้าวพันธุ์แพร่ 1 จำนวน 8 ต้น (ผลจากการทดลองที่1)

อุปกรณ์และวิธีการ

1) การเก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างโดยตัดยอดมะปรางที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.3-0.4 เซนติเมตร (โดยวัดที่โคนกิ่ง) ยาว 5, 7.5, และ 10 เซนติเมตร จำนวน 60, 45, และ 30 ยอดรวมกันเป็นหนึ่งตัวอย่างตามลำดับ ตัดใบทิ้งแล้วใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็งแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 °ซ เพื่อสกัดต่อไป

2) การสกัด การแยกส่วน และการทำให้บริสุทธิ์ ทำเหมือนการทดลองที่ 2

3) การหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลิน

3.1) ตัดแผ่นโครมาโตแกรมเฉพาะ R_f 0.3-0.8 ซึ่งเป็น R_f ที่พบ activity ของสารคล้ายจิบเบอเรลลิน (ผลจากการทดลองที่ 2) ใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 6×4×3.5 เซนติเมตรที่มีสารละลาย 0.01 M potassium phophate buffer pH 5.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.2) หาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลิน ใช้วิธี RSLRB โดยนำต้นกล้าข้าวพันธุ์แพร่ 1 ที่มี coleoptile ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร วางลงในกล่องพลาสติกในข้อ 3.1 กล่องละ 8 ต้น ปิดฝากล่องแล้วปิดด้วยเทปกาว นำไปไว้ในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อมที่มีแสงจากหลอด fluorescent ความเข้มแสง 115.38 วัตต์/ตารางเมตร อุณหภูมิ 28±2 °ซ เป็นเวลา 7 วัน

การบันทึกผลการทดลอง

1) วัดความยาวของ secondary leaf sheath (หน่วยเป็นเซนติเมตร) เมื่ออายุได้ 7 วันหลังบ่ม

2) เทียบหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินที่ได้จากตำแหน่ง R_f ต่าง ๆ กันจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น μgGA_3(Kyowa) equivalent/g f.wt. วิเคราะห์ผลการทดลอง โดยวิเคราะห์ test of AOV Assumption, AOV, C.V., Polynomial contrast, LSD, Linear regression, และ Correlation

การทดลองที่ 4 อิทธิพลของระยะเวลาในการเก็บรักษาตัวอย่างยอดมะปรางที่มีต่อการวิเคราะห์โดยวิธีปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินโดยวิธี RSLSB

วัตถุประสงค์ เปรียบเทียบปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี RSLSBหลังจากใช้ระยะเวลาในการเก็บรักษายอดมะปรางที่ต่างกัน

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 10 ซ้ำ เก็บรักษาตัวอย่างยอดมะปรางที่อุณหภูมิ –20 °ซ ก่อนนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลิน โดยมีระยะเวลาในการเก็บรักษาตัวอย่างเป็นวิธีการ มี 4 วิธีการ คือเก็บตัวอย่างไว้ 4 ชั่วโมง, 1 เดือน, 2 เดือน, และ 3 เดือน

อุปกรณ์และวิธีการ

1) การเก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างยอดมะปรางเหมือนการทดลองที่ 3 โดยเก็บเกี่ยวยอดมะปรางจำนวนประมาณ 1,200 ยอด (เก็บตัวอย่างวันที่ 8 พฤษภาคม พ.ศ. 2542) แช่ยอดมะปรางที่ตัดไว้ในกระติกน้ำแข็งประมาณครึ่งชั่วโมงเพื่อนำมาสกัดในขั้นตอนต่อไป

2) ในวันที่เก็บตัวอย่างซึ่งเป็นวิธีการที่เก็บตัวอย่างไว้ 4 ชั่วโมง แบ่งตัวอย่างยอดมะปรางมาทำการสกัด การแยกส่วน การทำให้บริสุทธิ์ และการทำ RSLSB เหมือนการทดลองที่ 3

3) ส่วนตัวอย่างยอดมะปรางที่เหลือ ให้นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 °ซ เพื่อรอนำมาทำการสกัด การแยกส่วน การทำให้บริสุทธิ์ และการทำ RSLSB เหมือนข้อ 2 เมื่อครบกำหนดการเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 1, 2, และ 3 เดือน

การบันทึกผลการทดลอง

1) วัดความยาวของ secondary leaf sheath (หน่วยเป็นเซนติเมตร) เมื่ออายุได้ 7 วันหลังบ่ม

2) เทียบหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินที่ได้จากตำแหน่ง R_f ต่าง ๆ กันจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น μgGA_3(Kyowa)equivalent/g f.wt. วิเคราะห์ผลการทดลอง โดยวิเคราะห์ test of AOV Assumption, AOV, C.V., Polynomial contrast, LSD, Linear regression, และ Correlation

การทดลองที่ 5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินในช่วงก่อนการออกดอกของยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าโดยวิธี RSLSB

วัตถุประสงค์ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินในช่วงระยะเวลาที่ต่างกันก่อนการออกดอก

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์มี 4 วิธีการ ใช้จำนวนสัปดาห์ก่อนการออกดอก (เห็นด้วยตาเปล่า) 2 ,4, 6 ,8 สัปดาห์เป็นวิธีการ ทำ 11 ซ้ำ โดยมี 1 หน่วยการทดลอง คือ ต้นกล้าข้าวพันธุ์แพร่ 1 จำนวน 8 ต้น

อุปกรณ์และวิธีการ

1) การเก็บตัวอย่างจำนวน 4 ครั้งโดยเริ่มเก็บตัวอย่างครั้งแรกวันที่ 26 กันยายน พ.ศ. 2541 และเก็บทุก 14 วัน เก็บตัวอย่างวันสุดท้ายวันที่ 7 พฤศจิกายน พ.ศ. 2541โดยมีวิธีการเก็บตัวอย่างเหมือนการทดลองที่ 3

2)ในการสกัด การแยกส่วน การทำให้บริสุทธิ์ และการทำ RSLSB ทำเหมือนการทดลองที่ 3

3) การทำ microtrome section (ดัดแปลงจาก มนัส, 2525)

3.1) การเก็บรักษาและตัดตัวอย่าง นำส่วนปลายยอดมะปรางมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ยาวประมาณ 0.3-0.5 เซนติเมตร โดยตัดเอาเฉพาะส่วน apical meristem และ leaf primodia ประมาณ 1-2 ใบเพื่อนำไปทำในขั้นตอนต่อไป

3.2) การฆ่าและคงสภาพเนื้อเยื่อ (killing and fixing) นำชิ้นส่วนในข้อ 3.1 ที่ตัดหรือแยกแล้ว ไปแช่น้ำยาฆ่าและคงสภาพเซลล์คือ formalin-acetic acid alcohol (FAA) 70% โดยใช้ ethyl alcohol 70% (lab. grade):glacial acetic acid (lab. grade):formalin (lab. grade) อัตรา 18:1:1 ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว (vial) โดยใส่น้ำยาให้ท่วมชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช

3.3) การดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อ นำชิ้นส่วนที่แช่อยู่ใน FAA 70% เข้าเครื่องดูดอากาศ (suction pump) เพื่อดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อ และช่วยให้น้ำยาซึมเข้าไปทั่วถึง โดยใช้ vacuum ที่ 600 mg.Hg นาน 1 ชั่วโมง จนกว่าฟองอากาศจะออกหมด โดยสังเกตได้จากการที่เนื้อเยื่อจมลงก้นขวดและไม่มีฟองอากาศผุดขึ้นมา จากนั้นทิ้งไว้ในสภาพสูญญากาศ 24 ชั่วโมง

3.4) การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) นำชิ้นส่วนพืชแช่ใน tertiary butyl alcohol (TBA) และ ethyl alcohol ที่มีระดับความเข้มข้นแอลกอฮอล์ 5 ระดับคือ 50, 70, 85, 95, และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4) แต่ละระดับใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 100% ให้ผสมสี erythrosin ลงไปเล็กน้อยเพื่อให้ชิ้นส่วนติดสีมองเห็นได้ชัดเจน

ตารางที่ 4 ระดับความเข้มข้นของส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ

Composition	Approximate total percentage of alcohol (%)				
	50	70	85	95	100
Distilled water (ml)	50	30	15	-	-
95% ethyl alcohol(ml)	40	50	50	45	-
Tertiary butyl alcohol(ml)	10	20	85	55	75
100% ethyl alcohol(ml)	-	-	-	-	25

3.5) การแทนที่แอลกอฮอล์ (infiltration) แช่ชิ้นส่วนที่ดึงน้ำออกแล้วใน TBA 100% 3 ครั้ง ๆ ละ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในส่วนผสมของ TBA 100% กับ paraffin oil ในอัตราส่วน 1:1 นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นย้ายชิ้นส่วนของพืชลงในขวดแก้ว (vial) ที่มี paraffin oil เพียงอย่างเดียวนาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเอา paraplast แข็งเข้าตู้อบอุณหภูมิ 60 °ซ ทิ้งไว้ ประมาณ 12 ชั่วโมงจะได้เป็น paraplast เหลว แล้วนำเนื้อเยื่อใส่ลงไปในขวดแก้วที่มี paraplast เหลว จากนั้นเก็บรักษาไว้ในตู้อบ ณ อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์

3.6) การฝังเนื้อเยื่อ (embedding) ใน paraplast ใช้กระดาษแข็งหน้ามันพับเป็นกระทงประมาณ 3×4 เซนติเมตร เท paraplast ที่หลอมไว้แล้วที่อุณหภูมิ 60 °ซ มาแล้วไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง ลงไปให้เกือบเต็มกระทง รอให้ส่วนล่างของ paraplast เย็นตัว จึงใช้เข็มปลายแหลมที่ลนไฟจนร้อนจัดปาดผิวหน้าของ paraplastให้เหลวตลอดเวลา จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการ infiltrate แล้วในตู้อบ เทใส่กระทง 1 ชิ้น พร้อมกับใช้เข็มปลายแหลมที่ร้อนจัดเรียงชิ้นส่วนพืชให้อยู่แนวที่ต้องการ และเป็นการไล่ฟองอากาศออกจาก paraplast ด้วย แล้วรีบนำ paraplast ไปตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าตามลักษณะของเนื้อเยื่อพืช เพื่อรอการฝังบนแท่นไม้และรอการตัดต่อไป

3.7) การตัดเนื้อเยื่อด้วย rotary microtome (Leitz Wetzlar ของบริษัท Scicrope Instrument Co. IA,U.S.A.) นำชิ้นส่วนพืชที่ฝังใน paraplast มาแต่งเป็นแท่งสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ แล้วนำไปติดบนแท่นไม้ โดยใช้ paraplast เป็นตัวเชื่อม แล้วในไปตัดด้วย rotary microtome ให้มีความ

หนาประมาณ 15-20 ไมครอนจะได้แถบ paraplast ribbon ที่มีชิ้นส่วนพืชติดอยู่ ถ้าเป็นชิ้นส่วนพืชที่แข็งให้ตัดผิวหน้าของ paraplast จนถึงเนื้อเยื่อพืช แล้วนำไปแช่น้ำยาที่ทำให้เนื้อเยื่อนิ่ม (softening) ด้วยกรด hydroflouric (AR. grade) 50% ประมาณ 3-4 สัปดาห์ เพื่อให้น้ำยาซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อจนอ่อนตัว ก่อนตัดนำเนื้อเยื่อไปล้างด้วยน้ำไหลอย่างน้อย 46 ชั่วโมง

3.8) การนำแถบ paraplast ติดบนกระจกสไลด์ (affixation) ใช้ hapt's adhesive 2% โดยเตรียมจากไข่ขาว 2 มล ต่อน้ำกลั่น 98 มล ในปริมาตร 100 มล แล้วหยดน้ำยา 1-2 หยดทาบนกระจกสไลด์ โดยใช้พู่กันเกลี่ยบริเวณที่จะติดเนื้อเยื่อ นำแถบ paraplast ที่ตัดไว้บนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) ปล่อยให้แห้งวางทิ้งไว้ 3-4 วัน ก่อนทำการปิดสไลด์

3.9) ปิดสไลด์ด้วย cover slip โดยใช้ Canada balsam หรือ permount เป็น mounting media ไล่ฟองอากาศออกโดยใช้ปลายมีดผ่าตัด ทิ้งไว้ 4-5 วัน

3.10) นำสไลด์ที่ได้ไปถ่ายรูปด้วยกล่อง photomicroscope (Olympus รุ่น PM-30, Olympus Optical Co.Ltd. Tokyo, Japan) ใช้ฟิล์มขนาด 35 มิลลิเมตร ขนาดกำลังขยาย 47 เท่า ในการถ่ายภาพ แล้วนำภาพที่ได้มาเทียบขนาดมาตราส่วนบอง stage micrometer ที่ถ่ายด้วยกำลังขยายขนาดเดียวกัน

การบันทึกผลการทดลอง

1) วัดความยาวของ secondary leaf sheath(หน่วยเป็นเซนติเมตร) เมื่ออายุได้ 7 วันหลังบ่ม

2) เทียบหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินที่ได้จากตำแหน่ง R_f ต่าง ๆ กันจากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น μgGA_3(Kyowa)equivalent/g f.wt. วิเคราะห์ผลการทดลอง โดยวิเคราะห์ test of AOV Assumtion, AOV, C.V., Polynomial contrast, LSD, Linear regression, และ Correlation

3) บันทึกภาพเพื่อตรวจสอบการสร้างตาดอก จาก microtome section

สถานที่ทำการวิจัย

1) สวนวังน้ำค้าง อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่

2) ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

เดือน กันยายน 2541 ถึง มกราคม 2543