บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 อิทธิพลของชนิดถั่วที่มีต่อการทำกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินโดยวิธี Beans Hypocotyl Bioassay

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 10 ซ้ำ แบ่งเป็น 3 การทดลองย่อย โดยใช้ถั่ว 3 ชนิดได้แก่ ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 , ถั่วแดงหลวง และถั่วพร้า ต่อไคเนตินความเข้มข้น 4 ระดับ $5x10^{-6}$, 5×10^{-5} , 5×10^{-4} และ 5×10^{-3} สตล เป็นวิธีการ โดยหนึ่งหน่วยการทดลอง คือ hypocotyl 6 ชิ้น ยาวชิ้นละ 1 มิลลิเมตร

วิธีการ (ตามแบบของ ดรุณี,2539)

1. คัดเลือกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง(สจ.5) , ถั่วแดงหลวง และถั่วพร้าที่มีเมล็ดสมบูรณ์และมีขนาดใกล้เคียงกันพันธุ์ละ 20 เมล็ด นำมาฆ่าเชื้อโดยแช่ในสารละลาย chlorox 10 เปอร์เซ็นต์ (sodium hypochorite 5.25% ai.) โดยใช้ chlorox 10 มล ต่อ น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มล แล้วแช่เมล็ดเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง (ทำในสภาพปลอดเชื้อ)
2. เตรียมอาหารวุ้นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำตาล(sucrose)และผงวุ้นในอัตราส่วน 1:3 โดยใช้น้ำตาล 3 กรัม และผงวุ้น 9 กรัม นำไปต้มให้เดือดแล้วเทใส่หลอดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.4 เซนติเมตร ยาว 15 เซนติเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยพลาสติก PP(polypropylene) ใช้กระดาษขนาด 7.5 x 7.5 เซนติเมตรปิดทับแล้วรัดด้วยยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยไล่อากาศออก 20 นาที แล้วนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที
3. นำเมล็ดถั่วแต่ละพันธุ์ในข้อหนึ่งมาเพาะในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำไปไว้ในที่มืดอุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จะได้ hypocotyl ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร
4. เตรียมอาหารเลี้ยง hypocotyl สูตร Miller(1965) (ตารางที่ 8)

เช่น การเตรียมอาหารที่มี kinetin ความเข้มข้น 5×10^{-6} สตล เตรียมจาก stock ของ kinetin 1 สตล โดยคำนวณจากสูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

$$1V_1 = 5 \times 10^{-6}(750)$$

$$V_1 = 0.00375 \text{ ml}$$

$$= 3.75 \ \mu l$$

โดยที่ N_1 คือ ความเข้มข้นของ stock kinetin

N_2 คือ ความเข้มข้นของ kinetin ที่ต้องการ

V_1 คือ ปริมาตรของ stock kinetin

V_2 คือ ปริมาตรของอาหารที่ต้องการเตรียม

จากนั้นจึงดูด kinetin stock solution 1 สตล มา 3.75 μl ด้วย micro pepet ใส่ในอาหารสูตร Miller (1965) ปรับปริมาตรให้เป็น 750 มิลลิลิตร จะได้อาหารเลี้ยง hypocotyl ที่มีความเข้มข้น 5×10^{-6} สตล จำนวน 750 มิลลิลิตร สำหรับการเตรียมอาหารวุ้นที่มี kinetin ที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ ก็ทำในทำนองเดียวกันเดียวกัน

5. นำสารละลายทุกความเข้มข้นไปปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 5.7–5.8 โดยใช้ KOH เข้มข้น 1 N และ HCl เข้มข้น 1 N แล้วใส่วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (ชั่งวุ้น 0.8 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร) ลงไปในสารละลาย แล้วนำไปต้มให้วุ้นละลาย ในที่นี้ใช้ผงวุ้น 18 กรัม
6. นำอาหารวุ้นมาเทใส่ขวดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร(ขวดฉีดยา) ขวดละ 10 มิลลิลิตร วิธีการละ 10 ขวด(ซ้ำ) ปิดปากขวดด้วยพลาสติก PP และกระดาษขนาด 7.5 x 7.5 เซนติเมตรอีกชั้นหนึ่ง แล้วรัดที่ปากขวดด้วยยาง
7. นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยไล่อากาศออก 15 นาที แล้วใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที
8. นำต้นถั่วที่เพาะไว้ในข้อสามมาตัดเอาเฉพาะ hypocotyl แล้วตัด hypocotyl ให้แต่ละชิ้นยาว 1 มิลลิเมตร ใช้ปากคีบคีบแต่ละชิ้นวางลงในขวดอาหารที่เตรียมไว้ขวดละ 6 ชิ้น โดยวางแต่ละชิ้นห่างกันประมาณ 0.3-0.5 มิลลิเมตร ปิดปากขวดด้วยพลาสติก PP ตามเดิม (ขั้นตอนนี้ทำในสภาพปลอดเชื้อ)
9. นำไปบ่มในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อมซึ่งมีแสงความเข้มประมาณ 1,000 lux อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน

การบันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกน้ำหนักสดของ hypocotyl (มก / 6 ชิ้น) เมื่อครบ 13 วัน นับจากวันเริ่มบ่ม
2. วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม statistix version 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV assumption , AOV , polynomial contrast , C.V. , linear regression และ correlation

การทดลองที่ 2 อิทธิพลของจำนวนวันในการบ่มถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 ที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินโดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay

วางแผนการทดลองแบบ 3 x 4 แฟคทอเรียล ในสุ่มสมบูรณ์ ทำ 9 ซ้ำ โดยมีปัจจัยที่ 1 มี 3 ระดับ คือ จำนวนวันในการบ่ม 9 วัน , 13 วัน และ 17 วัน ปัจจัยที่ 2 มี 4 ระดับ คือ ความเข้มข้นของไคเนติน 5×10^{-5}, 5×10^{-4}, 5×10^{-3} และ 5×10^{-2} สตล โดยหนึ่งหน่วยการทดลอง คือ hypocotyl 6 ชิ้น แต่ละชิ้นยาว 1 มิลลิเมตร

วิธีการ (ตามแบบของ ดรุณี,2539)

ทำ Soybean Hypocotyl Bioassay เหมือนการทดลองที่ 1 ข้อ 1-9 โดยใช้ถั่วเหลือง พันธุ์ สจ.5

การบันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกน้ำหนักสดของ hypocotyl (มก / 6ชิ้น) เมื่อครบ 9 วัน , 13 วัน และ 17 วัน นับจากวันเริ่มบ่ม
2. วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม statistix version 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV assumption , AOV , polynomial contrast , C.V. และLSD

การทดลองที่ 3 อิทธิพลของเวลาที่แตกต่างกันในการทำกราฟมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินโดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 4 แฟคทอเรียล ในสุ่มสมบูรณ์ ทำ 10 ซ้ำ โดยปัจจัยที่ 1 คือ ช่วงเวลาที่ทำการทดลอง 2 ช่วง 30 สิงหาคม 2540 และ 15 กันยายน 2540 ปัจจัยที่ 2 คือ ความเข้มข้นของสารละลายไคเนติน 4 ระดับ 5×10^{-5} , 5×10^{-4} , 5×10^{-3} และ 5×10^{-2} สตล โดยหนึ่งหน่วยการทดลอง คือ hypocotyl 6 ชิ้น แต่ละชิ้นยาว 1 มิลลิเมตร

วิธีการ (ตามแบบของ ดรุณี ,2539)

ทำ Soybean Hypocotyl Bioassay เหมือนการทดลองที่ 1 ข้อ 1-9 โดยใช้ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5

การบันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกน้ำหนักสดของ hypocotyl (มก / 6ชิ้น) เมื่อบ่มครบ 13 วัน นับจากวันเริ่มบ่ม
2. วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม statistix version 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV assumption , AOV , polynomial contrast , C.V. และLSD

การทดลองที่ 4 อิทธิพลของขนาดของหน่วยการทดลองที่มีต่อการทำกราฟมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินโดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 10 ซ้ำ โดยมีสารละลายไคเนตินเข้มข้น 4 ระดับ คือ 5×10^{-5} , 5×10^{-4} , 5×10^{-3} และ 5×10^{-2} สตล เป็นวิธีการ โดยแบ่งเป็น 5 การทดลองย่อย คือ hypocotyl จำนวน 2 , 4 , 6 , 8 และ 10 ชิ้น (ยาวชิ้นละ 1 มิลลิเมตร) ต่อไคเนตินความเข้มข้นระดับต่างๆเป็นหนึ่งหน่วยการทดลอง

วิธีการ (ตามแบบ ดรุณี,2539)

ใช้วิธี Soybean Hypocotyl Bioassy เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 1-9 โดยใช้ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5

การบันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกน้ำหนักสดของ hypocotyl (มก สด / 2ชิ้น ,4ชิ้น ,6ชิ้น ,8ชิ้น ,10ชิ้น) เมื่อบ่มครบ 13 วัน หลังจากวันเริ่มบ่ม
2. วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม statistix version 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV assumption , AOV , polynomial contrast และ C.V.

การทดลองที่ 5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในช่วงก่อนการออกดอกของลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 8 ซ้ำ มี 5 วิธีการ คือ จำนวนสัปดาห์ก่อนการออกดอก (flower initiation) ตรวจสอบด้วยวิธี microtrome section 0 , 2 , 4 , 6 และ 8 สัปดาห์ โดยหนึ่งหน่วยการทดลอง คือ hypocotyl 6 ชิ้น แต่ละชิ้นยาว 1 มิลลิเมตร

วิธีการ (ตามแบบครุณี ,2539)

1. การเก็บตัวอย่าง (sample preparation)

เริ่มเก็บตัวอย่างวันที่ 1 ธันวาคม พ.ศ. 2538 และเก็บทุก 14 วัน เก็บตัวอย่างวันสุดท้ายวันที่ 31 มกราคม พ.ศ. 2539 โดยตัดยอดลิ้นจี่ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใกล้เคียงกัน โดยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง(วัดที่โคนกิ่ง) 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตรจำนวน 30 ยอดเป็นหนึ่งตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกมัดปากถุงแล้วแช่น้ำแข็งในกระติกน้ำแข็ง จากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำมาสกัดในข้อต่อไป

2. การสกัด (extraction)

นำยอดลิ้นจี่ 30 ยอดมาบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น (blender ขนาด 750 watts) แล้วนำมาชั่งน้ำหนักโดยเครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ให้ได้น้ำหนักประมาณ 25 กรัม ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติม ethanol (lab grade) 80 เปอร์เซ็นต์ 250 มิลลิลิตร ปิด flask ด้วยจุกยางเขย่าให้ผสมกัน แล้วเก็บที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นาน 17 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษวัตแมนเบอร์ 1 (Whatman No.1) จนได้สารละลายประมาณ 200 มิลลิลิตร ตวงด้วย volumetric flask แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไปลดปริมาตรโดยใช้เครื่องระเหยความดันต่ำ (vacuum rotary evaporator) ในสภาพสูญญากาศที่ 600 mm.Hg อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตรประมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 2.5 ด้วย HCl (lab grade) เข้มข้น 6 N

3. การแยกส่วน (partition)

นำสารละลายที่ได้จากข้อสองมาแยกส่วนด้วยกรวยแยก (separatory funnel) โดยใช้ ethyl acetate AR grade (99.8%) 1.5 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 1 กรัมสด (จากการสกัดในข้อสอง) เริ่มต้นใช้ตัวอย่าง 25 กรัมสด แช่ใน ethanol 250 มิลลิลิตร แต่หลังจากกรองแล้วจะต้องให้ได้สารละลาย 200 มิลลิลิตรด้วย volumetric flask เนื่องจากไม่สามารถกรองได้ทั้งหมด จึงเหลือตัวอย่างเทียบเท่า 20 กรัมสด ดังนั้นจึงใช้ ethyl acetate 30 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้ผสมกันแล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น จึงแยกเอาส่วนที่อยู่ชั้นล่าง (water phase) ซึ่งจะได้ 25 มิลลิลิตร นำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

4. การทำให้บริสุทธิ์ (purification)

4.1 การกำจัดสิ่งเจือปนและสารยับยั้งการเจริญเติบโตโดยใช้ column chromatography นำ water phase ที่ได้จากข้อ 3 ผ่าน column ซึ่งบรรจุ Dowex resin 50WX8-100 (50-100 mesh , Strongly acidic cation exchanger ionic form : Hydrogen ของ Sigma) โดย column ที่ใช้ คือ burette ขนาด 1 x 25 เซนติเมตร โดยแช่ Dowex resin ในน้ำกลั่นประมาณ 20 นาที เพื่อให้ Dowex resin ขยายตัวเต็มที่ก่อนจึงบรรจุลงใน burette โดยบรรจุ Dowex resin ใน burette สูง 20 เซนติเมตร เตรียม column โดยการล้าง column ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 100 มิลลิลิตร จากนั้นผ่าน water phase ที่ได้จากข้อ 3 ลงใน column ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ควบคุมให้สารละลายหยดลงด้วยอัตราเร็วประมาณ 2 มิลลิลิตร/นาที (ระวังอย่าให้ Dowex resin แห้ง) เมื่อสารละลายลดระดับลงจนใกล้จะถึงผิวหน้า Dowex resin แล้วเริ่มล้างด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรในอัตราเร็วเดียวกัน เมื่อน้ำกลั่นลดระดับลงจนใกล้จะถึงผิวหน้าของ Dowex resin เติม ethanol 70% (lab grade) 20 มิลลิลิตร และปรับให้มีการไหลผ่าน column ในอัตราเดียวกัน เมื่อเอทานอลลดระดับใกล้ถึงผิวเรซินเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรล้างในอัตราเดียวกัน สารละลายที่ไหลออกมาให้เอาทิ้งไป จากนั้นเติม NH_4OH (AR grade) เข้มข้น 5 N 20 มิลลิลิตร และปล่อยให้ชะในอัตราเร็วประมาณ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที (เนื่องจากจะเกิดความร้อนมากจนเดือดถ้าปล่อยให้ชะเร็วเกินไป) เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาเมื่อชะด้วย NH_4OH 5N (AR grade) เมื่อ NH_4OH 5N (AR grade) ลดระดับใกล้ถึงผิว Dowex resin เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาเมื่อล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นครั้งสุดท้าย ซึ่งจะมีปริมาตรรวมกันประมาณ 40 มิลลิลิตร จากนั้นล้าง column เพื่อใช้ใหม่ (เพื่อผ่าน water phase ครั้งต่อไป)

โดยล้างด้วย HCl (AR grade) เข้มข้น 2 N ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้กรดผ่านออก column ในอัตรา 2 มิลลิลิตร ต่อนาที เมื่อกรดลดระดับลงจนใกล้จะถึงผิวหน้าของ Dowex resin แล้วเติมน้ำกลั่นทีละ 20 มิลลิลิตร จนครบ 100 มิลลิลิตร ปล่อยให้ไหลในอัตราเร็ว 2 มิลลิลิตรต่อนาที นำสารละลายที่ได้ปริมาตรรวมประมาณ 40 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรโดยใช้เครื่องระเหยความดันต่ำ (vacuum rotary evaporator) ที่ 600 mm.Hg อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ให้เหลือสารละลายเพียงเล็กน้อย (น้อยกว่า 1 มล) จากนั้นดูดสารละลายที่เหลือภายในขวดระเหยด้วย graduate pipette 1 มิลลิลิตร ใส่ใน micro tube ขนาดปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วล้างสารละลายที่ติดในขวดระเหยด้วย ethanol 80 % (lab grade) พยายามล้างสารละลายออกจากขวดระเหยให้ได้มากที่สุดจนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทำ paper chromatography ต่อไป

ในขั้นตอนนี้ cytokinin ที่อยู่ใน water phase เมื่อผ่าน column cytokinin จะถูกยึดอยู่ที่ Dowex 50W resin ซึ่งเป็น cation exchange ส่น hormone หรือ inhibitor ตัวอื่น ๆ จะไม่ถูกดูดยึดที่ Dowex 50W resin ดังนั้น จะเหลือเฉพาะสารคล้ายไซโตไคนินและสารที่เป็น cation อยู่ใน column และ สารคล้ายไซโตไคนินจะถูกชะล้างออกมาเมื่อชะด้วย NH_4OH (AR grade) เข้มข้น 5 N 20 มิลลิลิตร และล้างด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ดังนั้น จึงเก็บสารละลาย 2 ส่วนนี้ไว้เพื่อการวิเคราะห์ หาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินขั้นตอนต่อไป

4.2 การทำ paper chromatography เตรียมแผ่น chromatogram โดยใช้กระดาย Whatmam No. 1 ขนาด 9 x 28 ซม จำนวน 3 แผ่น นำมาขีดเส้นจุดเริ่มต้นที่จะ strip สารละลาย โดยขีดด้วยดินสอดำห่างจากขอบล่าง 2 เซนติเมตร และจุดสุดท้ายที่ตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ไปถึง (18 ซม วัดจากจุดที่จะ strip สาร) นำสารละลายที่ลดปริมาตรแล้วจากข้อ 4.2 มา strip ลงบนแผ่น chromatogram โดยใช้ตัวอย่างแผ่นละ 200 µl (ซึ่งเทียบเท่าตัวอย่างสด 4 กรัมสด) หลังจากทิ้งให้แถบสารแห้งแล้ว นำแผ่น chromatogram แช่ใน developing chamber ขนาด 20x60x40 ซม ซึ่งมีตัวทำละลาย คือ isopropanol 99.7% (AR grade):NH_4OH 25% (AR grade):H_2O =10:1:1(v/v) โดยให้แถบสารอยู่เหนือตัวทำละลาย ทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงระยะ solvent front (ใช้เวลาประมาณ 8-9 ชั่วโมง) แล้วจึงนำออกมาผึ่งให้แห้ง

4.3 นำแผ่น chromatogram มาแบ่งเป็น 10 ส่วน เพื่อให้ได้ R_f 0.1-1.0 การแบ่งจะเริ่มจากเส้นที่อยู่เหนือแถบสารจนถึง solvent front โดย R_f 0.0 เป็น control จะอยู่ใต้แถบสาร ส่วน R_f 0.1-1.0 คือส่วนที่อยู่เหนือแถบสาร

4.4 ตัดแผ่น chromatogram เฉพาะ R_f ที่ 0.1 และ 0.6-0.9 (ซึ่งเป็น R_f ที่พบ cytokinin activity จากการทดลองที่ 2 ของครุณี ,2539) ตัดเป็นชิ้นเล็กๆใส่ขวดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร (ขวดยาฉีด)

4.5 ใส่กระดาษ chromatogram ที่ R_f 0.1 และ 0.6-0.9 ใส่ในขวดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร (ขวดยาฉีด) เตรียมอาหารสูตร Miller (1965) (ตารางที่ 8) โดยเตรียมเหมือนการทดลองที่ 1 ข้อ 2-5 แต่ไม่ใส่ kinetin ใส่อาหารขวดละ 10 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยพลาสติก PP และปิดทับด้วยกระดาษขนาด 7.5 x 7.5 เซนติเมตร อีกชั้นหนึ่ง แล้วรัดด้วยยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) โดยไล่อากาศนาน 15 นาที และใช้ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว นาน 30 นาที

5. การหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน

5.1 หาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน โดยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay นำต้นถั่วเหลืองสจ.5 ที่เพาะไว้มาตัด hypocotyl แต่ละชิ้นยาว 1 มิลลิเมตร ใช้ปากคีบ คีบแต่ละชิ้นวางลงในขวดอาหารที่เตรียมไว้ขวดละ 6 ชิ้น โดยวางแต่ละชิ้นห่างกัน 0.3-0.5 มิลลิเมตร ปิดปากขวดด้วยพลาสติก PP ตามเดิม (ขั้นตอนนี้ทำในสภาพปลอดเชื้อ)

5.2 นำไปบ่มในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มแสงประมาณ 1,000 lux อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน

5.3 การทำ standard curve เหมือนการทดลองที่ 1 ข้อ 1-9 โดยใช้ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 และความเข้มข้นของ ไคเนติน 5 ระดับ คือ 5×10^{-1} , 5×10^{-2} , 5×10^{-3} , 5×10^{-4} และ 5×10^{-5} สตล

6. การทำ microtome section (ตามแบบ มนัส,2525)

6.1 การเก็บและการตัดตัวอย่าง นำส่วนปลายยอดลิ้นจี่มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ยาวประมาณ 0.3-0.5 เซนติเมตร โดยตัดเอาเฉพาะส่วน apical meristem และ leaf primodia ประมาณ 1-2 ใบ เพื่อนำไปทำในขั้นตอนต่อไป

6.2 การฆ่าและคงสภาพเนื้อเยื่อ (killing and fixing) นำชิ้นส่วนในข้อ 6.1 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

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

6.4 การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) นำชิ้นส่วนพืชแช่ใน TBA (tertiary butyl alcohol) ที่มีระดับความเข้มข้นแอลกอฮอล์ 5 ระดับ คือ 50 , 70 , 85 , 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 7) แต่ละระดับใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ผสมสี erythrosin ลงไปเล็กน้อยเพื่อให้ชิ้นส่วนติดสีมองเห็นได้ชัดเจน

ตารางที่ 7 ระดับความเข้มข้นของส่วนผสมของ tertiary butyl alcohol

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

6.5 การแทนที่แอลกอฮอล์ (infiltration) แช่ชิ้นส่วนใน pure TBA 3 ครั้งๆ ละ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในส่วนผสมของ pure TBA กับ paraffin oil ในอัตราส่วน 1:1 นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นย้ายชิ้นส่วนพืชลงในขวดแก้ว (vial) ที่มี paraffin oil เพียงอย่างเดียวนาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเอา paraplast แข็ง เข้าตู้อบอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมงจะได้เป็น paraplast เหลว แล้วนำเนื้อเยื่อใส่ลงไปในขวดแก้วที่มี paraplast เหลว แล้วเข้าตู้อบทิ้งไว้ในตู้อบประมาณ 4 สัปดาห์

6.6 การฝังเนื้อเยื่อใน embedding paraplast ใช้กระดาษแข็งหน้ามันพับเป็นกระทงประมาณ 3 x 4 เซนติเมตร เท paraplast สำหรับฝังชิ้นตัวอย่างพืชที่หลอมไว้

แล้วที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสมาแล้วไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง ลงไปให้เกือบเต็มกระทง รอให้ส่วนล่างของ paraplast เย็นตัว จึงใช้เข็มปลายแหลมที่ลนไฟจนร้อนจัดปาดผิวหน้าของ paraplast ให้เหลวตลอดเวลา จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการ infiltrate แล้วในตู้อบ เทใส่กระทง 1 ชิ้น พร้อมกับใช้เข็มปลายแหลมที่ร้อนจัดเรียงชิ้นส่วนพืชให้อยู่ในแนวที่ต้องการ และเป็นการไล่ฟองอากาศออกจาก paraplast ด้วย แล้วรีบนำกระทงไปลอยน้ำที่เย็นเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดฟองอากาศ เมื่อ paraplast แข็งตัวดีแล้วนำไปตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าตามลักษณะของเนื้อเยื่อพืช เพื่อรอการฝังบนแท่นไม้ และรอการตัดต่อไป

6.7 การตัดเนื้อเยื่อด้วย rotary microtome นำชิ้นส่วนพืชที่ฝังใน paraplast มาแต่งเป็นแท่งสี่เหลี่ยมเล็กๆ แล้วนำไปติดบนแท่งไม้ โดยใช้ paraplast เป็นตัวเชื่อม แล้วนำไปตัดด้วย rotary microtome ให้มีความหนาประมาณ 15- 20 ไมครอน จะได้แถบ paraplast (ribbon) ที่มีชิ้นส่วนพืชติดอยู่ ถ้าเป็นชิ้นส่วนพืชที่แข็งให้ตัดผิวหน้าของ paraplast จนถึงเนื้อเยื่อพืช แล้วนำไปแช่น้ำยาที่ทำให้เนื้อเยื่อนิ่ม (softening) ด้วยกรด hydroflouric (AR grade) 50% ประมาณ 3-4 สัปดาห์ เพื่อให้น้ำยาซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อจนอ่อนตัว ก่อนตัดนำเนื้อเยื่อไปล้างด้วยน้ำไหลอย่างน้อย 48 ชั่วโมง

6.8 การนำแถบ paraplast ติดบนกระจกสไลด์ (affixation) ใช้ hapt's adhesive 2 % โดยเตรียมจากไข่ขาว 2 มิลลิลิตร ต่อน้ำกลั่น 98 มิลลิลิตร ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วหยดน้ำยา 1-2 หยดทาบนกระจกสไลด์โดยใช้พู่กันเกลี่ยบริเวณที่จะติดเนื้อเยื่อ นำแถบ paraplast (ribbon) ที่ตัดไว้วางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) ปล่อยให้แห้งวางทิ้งไว้ 3-4 วัน ก่อนทำการปิดสไลด์

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

6.10 นำสไลด์ที่ได้ไปถ่ายรูปด้วยกล้อง stereio micro scope ใช้ฟิล์มขนาด 35 มิลลิเมตร ขนาดกำลังขยายประมาณ 47 เท่า ในการถ่ายภาพแล้วนำภาพที่ได้มาเทียบกับขนาดสเกลของ stage micrometre ที่ถ่ายด้วยกำลังขยายขนาดเดียว

การบันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกน้ำหนักสด hypocotyl (มก /6 ชิ้น) เมื่อครบ 13 วัน นับจากวันเริ่มบ่ม แล้วเปรียบเทียบกับ standard curve
2. วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม statistix version 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV assumption , AOV , polynomial contrast , linear regression , correlation , C.V. และ LSD
3. ตรวจสอบ flower initiation โดยการทำ microtome section

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 8 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยง hypocotyl สูตร Miller (1965)

สารเคมี	ความเข้มข้น (สตล)
KH_2PO_4	300
KNO_3	1,000
NH_4NO_3	1,000
$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$	0.35
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	500
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	71.5
KCl	65.0
$MnSO_4 \cdot H_2O$	14.0
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0.1
KI	0.75
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	3.80
H_3BO_3	1.60
myoinositol	100
nicotinic acid	0.5
pyridoxine·HCl	0.2
thiamine·HCl	0.2
Na_2EDTA	13.4
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	9.9
Sucrose	30,000
Bacto agar	10,000
α–napthalene acetic acid	2.0
kinetin	0.5