

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของ GA_3 (Kyowa) ที่มีต่อกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์สารคล้ายจิบเบอเรลลิน โดยวิธี Rice Micro-drop Bioassay (RMB)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 12 ซ้ำ มี 5 วิธีการ คือ ความเข้มข้น GA_3 (Kyowa) 5 ระดับ 3×10^{-11} , 3×10^{-9} , 3×10^{-7} , 3×10^{-5} และ 3×10^{-3} สด โดยมี 1 หน่วยการทดลอง คือ ต้นกล้าข้าว 7 ต้น

วิธีการวิจัย (วิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินโดยวิธี Rice Micro-drop Bioassay ตามแบบของ Nishijima *et al.*, 1993)

1. คัดเลือกเมล็ดข้าวพันธุ์ กข7 ประมาณ 600 เมล็ด ล้างด้วยน้ำยาล้างจานโดยการขยี้เมล็ดข้าวเบาๆ แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด 4 ครั้งจนหมดฟอง นำเมล็ดมาแช่ในสารละลายผสมระหว่าง prohexadione calcium (BX-112) lab grade 40 mM (1.0004×10^{-2} สด) กับ uniconazole (S-3307) lab grade 80 μ M (2.332×10^{-5} สด) แล้วนำไปไว้ใน growth chamber ที่มีอุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง
2. นำเมล็ดข้าวจากข้อ 1 มาฆ่าเชื้อโดยแช่ในสารละลาย chlorox 5% (sodium hypochlorite 5.25% ai.) เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น (ที่ autoclave แล้ว) 5 ครั้ง (ทำในสภาพปลอดเชื้อ) แล้วนำเมล็ดไปเพาะในน้ำกลั่น (ที่ autoclave แล้ว) ที่สภาพแวดล้อมเหมือนข้อ 1 เป็นเวลาประมาณ 2 วัน ซึ่งจะทำให้ coleoptile ยาวออกมาประมาณ 2 มม
3. เตรียมวุ้น 0.8% (w/v) ปริมาตร 3,000 มล โดยชั่งผงวุ้นมา 24 กรัม แล้วนำไปต้มให้วุ้นละลายในน้ำ 3,000 มล เทใส่ในหลอดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 2.4 ซม ยาว 15 ซม หลอดละ 30 มล ใช้สำลี่ปิดปากหลอด และใช้กระดาษขนาด 7.5 ซม x 7.5 ซม หุ้มปากหลอดแล้วรัดด้วยยางอีกชั้นหนึ่ง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใส่ในภาชนะปิดประมาณ 20 นาที แล้วจึงปิดวาล์ว รอจนกระทั่งความดันถึง 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว จึงจับเวลา 20 นาที
4. นำต้นกล้าข้าวไปเพาะในอาหารวุ้น หลอดละ 7 ต้น ในสภาวะ อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอด fluorescent ที่มีความเข้มแสง 5,000 lux เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

5. เตรียมสารละลาย GA_3 (Kyowa) ความเข้มข้นละ 100 มล โดยเตรียมจาก stock 2,000 สตกล ปริมาตร 50 มล โดยชั่ง GA_3 (Kyowa) 3.2000 กรัม ด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด (analytical balance) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 50 มล ใน volumetric flask ขนาด 50 มล จะได้สารละลาย GA_3 2,000 สตกล ปริมาตร 50 มล นำ stock ที่ได้ไปเจือจางให้เป็น 1 สตกล โดยใช้ graduate pipet ขนาด 0.5 มล ดูดมา 0.5 มล แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มล ใน volumetric flask ขนาด 1,000 มล ก็จะได้ GA_3 เข้มข้น 1 สตกล ปริมาตร 1,000 มล ส่วนการเตรียมความเข้มข้น 3×10^{-11} , 3×10^{-9} , 3×10^{-7} , 3×10^{-5} และ 3×10^{-3} สตกล สามารถเตรียมได้โดยคำนวณจากสูตร

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

โดยที่ N_1 คือ ความเข้มข้นของ GA_3 (Kyowa) 1 สตกล

N_2 คือ ความเข้มข้นของ GA_3 (Kyowa) เช่น 3×10^{-11} , 3×10^{-9} , 3×10^{-7} , 3×10^{-5} และ 3×10^{-3} สตกล

V_1 คือ ปริมาตรของ GA_3 (Kyowa) เข้มข้น 1 สตกล

V_2 คือ ปริมาตรของ GA_3 (Kyowa) ที่ต้องการเตรียม

เช่นถ้าต้องการเตรียม GA_3 (Kyowa) เข้มข้น 3×10^{-3} สตกล ปริมาตร 100 มล จะคำนวณได้ดังนี้

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

$$1 V_1 = 3 \times 10^{-3} \times 100$$

$$V_1 = 0.5 \text{ มล}$$

ดังนั้นจึงดูดสารละลาย GA_3 (Kyowa) 1 สตกล มา 0.5 มล ด้วย graduate pipet 0.5 มล ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มล แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล ด้วยน้ำกลั่น สำหรับระดับความเข้มข้นอื่นๆก็ทำเช่นเดียวกัน

6. เมื่อเพาะต้นกล้าครบ 72 ชั่วโมง หรือต้นกล้ามี first leaf งอกขึ้นมาและมีความงอกที่สม่ำเสมอในหลอดเดียวกันทั้ง 7 ต้นแล้ว จึงนำมาหยดด้วยสารละลาย GA_3 (Kyowa) ในระดับความเข้มข้นต่างๆที่ได้เตรียมไว้ โดยหยดต้นละ 1 ไมโครลิตร (μl) ด้วย microsyringe บริเวณระหว่าง coleoptile กับ first leaf
7. นำไปบ่มใน growth chamber ที่สภาวะแวดล้อมเหมือนข้อ 4 เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงนำมาวัดผล

การบันทึกผลการทดลอง

1. วัดความยาวของ secondary leaf sheath ในแต่ละหลอด (7 ต้น) มีหน่วยเป็น เซนติเมตร เมื่ออายุครบ 3 วัน นับจากวันที่ให้สารจิบเบอเรลลิน
2. วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรม Statistix Version 3.5 ของ NH analytical software โดยการวิเคราะห์ Test of AOV assumption , AOV , Polynomial contrast , Linear regression และ Correlation

การทดลองที่ 2 การศึกษาอิทธิพลของพันธุ์ข้าวที่มีต่อกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินโดยวิธี Rice Micro-drop Bioassay (RMB)

วางแผนการทดลองแบบ 3 x 5 ปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ ทำ 6 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 คือ พันธุ์ข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ กข7 , สุพรรณบุรี2 และ แพร่1 ปัจจัยที่ 2 คือ ความเข้มข้นของ GA_3 (Kyowa) 5 ระดับ คือ 3×10^{-11} , 3×10^{-9} , 3×10^{-7} , 3×10^{-5} และ 3×10^{-3} สตล โดยมี 1 หน่วยการทดลอง คือ ต้นกล้าข้าว 7 ต้น

วิธีการวิจัย

วิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินโดยวิธี Rice Micro-drop Bioassay เหมือนการทดลองที่ 1 ข้อ 1-7 โดยทดลองกับพันธุ์ข้าว 3 พันธุ์ คือ กข7 , สุพรรณบุรี2 และ แพร่1

การบันทึกผลการทดลอง

- 1 วัดความยาว secondary leaf sheath เหมือนการทดลองที่ 1
2. วิเคราะห์ผลการทดลองเหมือนการทดลองที่ 1
3. หาค่า C.V. (%) ของข้าวแต่ละพันธุ์
4. หาช่วง linear ของข้าวแต่ละพันธุ์

การทดลองที่ 3 การหาตำแหน่ง R_f ที่มีสารคล้ายจิบเบอเรลลินจากยอดลิ้นจี่พันธุ์สงขลวยโดยวิธี

Rice Micro-drop Bioassay

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 11 วิธีการ ทำ 9 ซ้ำ ใช้ R_f 0.1 – 1.0 และ control เป็นวิธีการ โดยมี 1 หน่วยการทดลอง คือ ต้นกล้าข้าว 7 ต้น
วิธีการวิจัย (ข้อ 1 – 4 ตามแบบสุวลิ, 2540)

1. การเก็บตัวอย่าง (Sample preparation)

เก็บตัวอย่างโดยตัดยอดลิ้นจี่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.5 ซม (วัดที่โคนกิ่ง) ยาว 10 ซม จำนวน 30 ยอดต่อ 1 หน่วยการทดลอง ตัดใบทิ้งแล้วใส่ถุงพลาสติกมิดปากถุงแล้วแช่น้ำแข็ง จากนั้นเดินทางประมาณครึ่งชั่วโมงเพื่อนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30°C องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาสกัด (เก็บไว้ประมาณ 2 เดือน)

2. การสกัด (Extraction)

นำยอดลิ้นจี่ 30 ยอดมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (blender ขนาด 750 watts) แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก โดยใช้เครื่องชั่งละเอียดให้ได้น้ำหนักประมาณ 20 กรัม แล้วนำมาใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มล เติม methanol 95% (lab. grade) 40 มล ปิดปาก flask โดยใช้ถุงพลาสติกแล้วรัดด้วยหนังยาง เขย่าให้ผสมกัน แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4°C องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมารองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำกากไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่กรองได้มารวมกันจะได้สารละลายประมาณ 90 มล แล้วนำไปประเหยให้แห้งที่อุณหภูมิ 35°C องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ (vacuum rotary evaporator) ในสภาพสูญญากาศที่ 600 mmHg แล้วจึงละลายส่วนที่แห้งด้วย 0.5 M sodium phosphate buffer pH 8.0 ปริมาตร 15 มล แล้วนำแยกส่วนต่อไป

3. การแยกส่วน (Partition)

นำสารละลายในข้อ 2 มาแยกส่วนด้วยกรวยแยก (separatory funnel) โดยใช้ ethyl acetate 100% (AR grade) ปริมาตร 20 มล เขย่าสารละลายให้เข้ากันประมาณ 10 ครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น แยกเอาส่วนบน (ethyl acetate) เก็บไว้ นำชั้นล่าง (ซึ่งเป็นสารละลายบัฟเฟอร์) มาปรับ pH ให้เท่ากับ 2.0 – 2.5 ด้วย HCl เข้มข้น 6 N แล้วนำไปแยกส่วนด้วย ethyl acetate ปริมาตร 20 มล ซ้ำอีก 4 ครั้ง จากนั้นนำสารละลาย ethyl acetate ที่ได้ทั้ง 5 ครั้งมารวมกัน แล้วนำไปประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ ในสภาพสูญญากาศที่ 600 mmHg ที่อุณหภูมิ 35°C องศาเซลเซียส จนแห้งติดกันขวด แล้วละลายส่วนที่แห้งด้วย methanol 95% (lab grade) ปริมาตร 1 มล โดยใช้ volumetric pipet นำสารละลายที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

4. การทำให้บริสุทธิ์ (Purification)

4.1 ใช้วิธีเฟลเปอร์โครมาโตกราฟี เตรียมแผ่นโครมาโตแกรม โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 9 x 28 ซม มาขีดเส้นกำหนดจุดเริ่มต้นที่จะ strip สารละลาย โดยขีดด้วยดินสอคำ ห่างจากขอบล่าง 2 ซม และจุดสุดท้ายที่สารละลายเคลื่อนที่ไปถึง (16.5 ซม วัดจากจุดที่ strip) แล้วใช้หลอดแก้ว capillary ดูดสารละลายจากข้อ 3 มา strip เป็นแนวยาวลงบนแผ่นโครมาโตแกรมโดยใช้ตัวอย่างแผ่นละ 100 μ l (ซึ่งเทียบเท่ากับตัวอย่าง 2.0 กรัมสด) แล้วทิ้งไว้ให้แถบสารแห้ง

4.2 นำแผ่นโครมาโตแกรมแช่ในตัวทำละลายที่มีส่วนผสมของ isopropanol 99.7% (AR grade) : NH_4OH 25% (AR grade) : น้ำกลั่น (10:1:1 โดยปริมาตร) ใน developing chamber ขนาด 20 x 60 x 40 ซม โดยให้แถบสารอยู่เหนือสารละลาย ทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงระยะ 16.5 ซม (ใช้เวลาประมาณ 6 – 7 ชั่วโมง) ให้นำออกจาก developing chamber แล้วผึ่งให้แห้ง

4.3 แบ่งแผ่นโครมาโตแกรม เป็น R_f 0.1 – 1.0 โดยส่วนที่อยู่ใต้แถบสารเป็น R_f 0.0 (control) ส่วน R_f 0.1 – 1.0 คือส่วนที่อยู่เหนือแถบสารจนถึง solvent front โดยแบ่งเป็น 10 ส่วนเท่าๆกัน

5. การหาค่าแห่ง R_f ของสารคล้ายจิบเบอเรลลิน

5.1 นำแผ่นโครมาโตแกรมที่แบ่ง R_f เรียบร้อยแล้วในข้อ 4 มาตัดแยก R_f 0.0 – 1.0 นำแต่ละ R_f มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ขวดแก้วขนาด 20 มล (ขวดยาลึก) ที่มีอะซิโตน 50% (v/v) ปริมาตร 3 มล เพื่อละลายสารที่อยู่ในกระดาษโครมาโตแกรม

5.2 การทำ RMB (ตามแบบของ Nishijima *et al.*, 1993) นำเมล็ดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 2 มาแช่ในสารละลายผสมระหว่าง uniconazole (lab grade) กับ prohexadione calcium (lab grade) ความเข้มข้น 2.33×10^{-5} สด และ 1×10^{-2} สด (ในอัตราส่วน 1:1) ตามลำดับ เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวมาแช่ในสารละลาย chlorox 5% (sodium hypochlorite 5.25% ai. (lab grade) : น้ำ = 1:10 โดยปริมาตร) เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ autoclave แล้ว 5 ครั้ง (ทำในสภาพปลอดเชื้อ) แล้วนำเมล็ดมาเพาะในน้ำกลั่นที่ autoclave แล้วภายใต้สภาพเดิม เป็นเวลา 2 วัน (ให้ coleoptile ยาวประมาณ 2 มล) นำไปเพาะในอาหารวุ้น 0.8% (w/v) ในหลอดทดลอง ขนาด 2.4 ซม ยาว 15 ซม หลอดละ 7 ดัน แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อม (growth chamber) อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอด fluorescent ความเข้มแสง 5,000 lux เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จึงนำมาหยดสารละลายที่ได้จากข้อ 5.1 (บริเวณระหว่าง coleoptile กับ first leaf ของต้นกล้า) ปริมาตร 1 μ l โดยใช้ microsyringe

5.3 นำไปไว้ในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อม สภาพแวดล้อมเหมือนข้อ 5.2 เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงบันทึกผล

การบันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกความยาว secondary leaf sheath (ซม) เมื่ออายุ 3 วัน นับจากวันเริ่มหยดสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ในข้อ 5.1
2. เทียบหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินจากกราฟมาตรฐาน มีหน่วยเป็น $\mu\text{g GA}_3(\text{Kyowa})\text{equi.}/\text{g f.wt.}$
3. วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรม Statistix Version 3.5 ของ NH analytical software โดยการวิเคราะห์ Test of AOV assumption, AOV, Polynomial contrast, LSD

การทดลองที่ 4 การศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาในการเก็บรักษาตัวอย่างชนิดอื่นที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลิน โดยวิธี RMB

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 10 ซ้ำ โดยมีระยะเวลาในการเก็บรักษาตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียสก่อนนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินเป็นวิธีการ มี 4 วิธีการ คือ เก็บตัวอย่างไว้ 4 ชั่วโมง 1 เดือน 2 เดือน และ 3 เดือน

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างชนิดอื่นที่เหมือนการทดลองที่ 3 โดยเก็บประมาณ 1,200 ยอด (เก็บตัวอย่างวันที่ 7 มิถุนายน พ.ศ. 2541) แฉ่แห้งในกระดิกน้ำแข็ง จากนั้นเดินทางประมาณครึ่งชั่วโมง เพื่อนำมาสกัดในชั้นต่อไป
2. ในวันที่เก็บตัวอย่างซึ่งเป็นวิธีการที่เก็บตัวอย่างไว้ 4 ชั่วโมง แบ่งตัวอย่างชนิดอื่นมาทำการสกัด การแยกส่วน การทำให้บริสุทธิ์ และการทำ Rice Micro-drop Bioassay (RMB) เหมือนการทดลองที่ 3
3. การทำ RMB สารละลายที่จะนำมาทดสอบบริเวณระหว่าง coleoptile กับ first leaf ปริมาตร 1 μl จะนำมาจากกระดิกโครมาโตแกรม ที่ $R_f 0.3 - 0.8$ ซึ่งเป็น R_f ที่พบ activity ของจิบเบอเรลลินในชนิดอื่น (จากผลการทดลองที่ 3) โดยละลายในอะซิโตน 50%(v/v) ปริมาณ 3 มล
4. ส่วนตัวอย่างชนิดอื่นที่เหลือ ให้นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำมาทำการสกัด การแยกส่วน การทำให้บริสุทธิ์ และการทำ RMB เหมือนข้อ 2 และ 3 เมื่อครบกำหนด 1 เดือน 2 เดือน และ 3 เดือน

การบันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกความยาว secondary leaf sheath (ชม) เมื่ออายุ 3 วัน นับจากวันเริ่มหยดสารละลาย ตัวอย่างที่สกัดได้
2. เทียบหาปริมาณสารคลอโรฟิลล์จากกราฟมาตรฐาน มีหน่วยเป็น $\mu\text{g GA}_3(\text{Kyowa})\text{equi.}/\text{g f.wt.}$
3. วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรม Statistix Version 3.5 ของ NH analytical software โดยการวิเคราะห์ Test of AOV assumption, AOV, Polynomial contrast, LSD

การทดลองที่ 5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคลอโรฟิลล์เบอเรลลินในช่วงก่อนการออกดอกของยอดคลิ่นจีพันธุ์สงขลา

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 10 ซ้ำ มี 5 วิธีการ คือ จำนวนสัปดาห์ก่อนการออกดอก (flower initiation) ตรวจสอบด้วยวิธี microtome section ได้แก่ 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ก่อนการออกดอก โดยมี 1 หน่วยการทดลอง คือ ต้นกล้าข้าว 7 ต้น

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง (sample preparation) เริ่มเก็บตัวอย่างวันที่ 31 ธันวาคม พ.ศ. 2540 และเก็บทุกๆ 7 วัน เก็บตัวอย่างวันสุดท้ายวันที่ 29 มกราคม พ.ศ. 2541 โดยมีวิธีการเก็บตัวอย่างเหมือนการทดลองที่ 3 ข้อ 1
2. ในการสกัด (extraction) การแยกส่วน (partition) และการทำให้บริสุทธิ์ (purification) ทำเหมือนการทดลองที่ 3 ข้อ 2 - 4 ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์นั้นให้ strip สารลงบนแผ่นโครมาโตแกรมแผ่นละ 50 μl (ซึ่งเทียบเท่าตัวอย่าง 1.0 กรัมสด)
3. การทำ Rice Micro-drop Bioassay เหมือนการทดลองที่ 3 ข้อ 5.1 - 5.3 โดยเลือกใช้แผ่นโครมาโตแกรมเฉพาะ R_f ที่ 0.3 - 0.8 ซึ่งเป็น R_f ที่พบกิจกรรมของจีเบอเรลลิน
4. การทำ microtome section (ตามแบบรัชวัฒน์, 2542)
 - 4.1 การเก็บและการตัดตัวอย่าง นำส่วนปลายยอดคลิ่นจีมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆยาวประมาณ 0.3-0.5 ซม โดยตัดเฉพาะส่วน apical meristem และ leaf primordia ประมาณ 1-2 ใบ เพื่อนำไปทำในขั้นตอนต่อไป

- 4.2 การฆ่าและคงสภาพเนื้อเยื่อ (killing and fixing) นำชิ้นส่วนในข้อ 4.1 ที่ตัดหรือแยกแล้วไปแช่ในน้ำฆ่าและคงสภาพเซลล์ 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 และช่วยให้น้ำยาซึมเข้าไปได้ทั่วถึง โดยใช้ความดัน 20 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 1 ชั่วโมง จนกว่าฟองอากาศจะออกหมด โดยสังเกตได้จากการที่เนื้อเยื่อจมลงก้นขวดและไม่มีฟองอากาศผุดขึ้นมา จากนั้นทิ้งไว้ในสภาพสูญญากาศ 24 ชั่วโมง
- 4.4 การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) นำชิ้นส่วนพืชแช่ใน TBA (tertiary butyl alcohol) ที่มีความเข้มข้นแอลกอฮอล์ 5 ระดับ คือ 50 , 70 , 85 , 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 3) แต่ละระดับใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ผสมสี erythrosin ลงไปเล็กน้อยเพื่อให้ชิ้นส่วนติดสีมองเห็นได้ชัดเจน

ตารางที่ 3 ระดับความเข้มข้นของส่วนผสมของ tertiary butyl alcohol

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

- 4.5 การแทนที่แอลกอฮอล์ (infiltration) แช่ชิ้นส่วนใน pure TBA 3 ครั้งๆละ ไม่ต่ำกว่า 6 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในส่วนผสมของ pure TBA กับ paraffin oil ในอัตราส่วน 1:1 นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นย้ายชิ้นส่วนพืชลงในขวดแก้วที่มีส่วนผสมของ pure TBA กับ paraffin oil ใส่ในหลอดแก้วที่มี paraffin แข็ง ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำเข้าตู้อบอุณหภูมิประมาณ 60 °ซ ทิ้งไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง เปลี่ยนประมาณ 3-4 ครั้ง แต่ละครั้งทิ้งไว้ในตู้อบประมาณ 4 สัปดาห์

- 4.6 การฝังเนื้อเยื่อใน embedding parplast ใช้กระดาษแข็งหนา 1 มม. เป็นกระดุมประมาณ 3 ซม. x 4 ซม. เท parplast สำหรับฝังชิ้นตัวอย่างพืชที่หาลอมไว้แล้วที่อุณหภูมิ 60°C มาแล้ว ไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง ลงไปให้เกือบเต็มกระดุม รอให้ส่วนล่างของ parplast เย็นตัว จึงใช้เข็มปลายแหลมที่ทนไฟจนร้อนจัดปาดผิวหน้าของ parplast ให้หลุดลอกเวลา จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการแทนที่แอลกอฮอล์แล้วในตู้อบ เทใส่กระดุม พร้อมกับใช้เข็มปลายแหลมที่ร้อนจัดเรียงชิ้นส่วนพืชให้อยู่แนวที่ต้องการ และเป็นการไล่ฟองอากาศออกจาก parplast ด้วย แล้วรีบนำกระดุมไปลอยน้ำที่เย็นเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดฟองอากาศ เมื่อ parplast แข็งตัวดีแล้วนำไปตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าตามลักษณะของเนื้อเยื่อพืช เพื่อรอการฝังบนแท่นไม้ และรอการตัดต่อไป
- 4.7 การตัดเนื้อเยื่อด้วย rotary microtome นำชิ้นส่วนพืชที่ฝังใน paraffin มาแต่งเป็นแท่งสี่เหลี่ยมเล็กๆ แล้วนำไปติดบนแท่นไม้ โดยใช้ parplast เป็นตัวเชื่อม แล้วนำไปตัดด้วย rotary microtome ให้มีความหนา 15-20 ไมครอน จะได้แถบ paraffin(ribbon) ที่มีชิ้นส่วนพืชติดอยู่ ถ้าเป็นชิ้นส่วนพืชที่แข็ง ให้ตัดผิวหน้าของ paraffin จนถึงเนื้อเยื่อพืช แล้วนำไปแช่น้ำยาที่ทำให้เนื้อเยื่อนิ่ม (softening) 1-2 วัน เพื่อให้ น้ำยาซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อจนอ่อนตัว ก่อนตัดนำไปล้างน้ำก่อน
- 4.8 การนำแถบ paraffin ติดบนกระจกสไลด์(affixation) ใช้ hapt's adhesive 2 % ทาบนกระจกสไลด์ ใช้ฟุ้งกันเกล็ดบริเวณที่จะติดเนื้อเยื่อ นำแถบ paraffin (ribbon) ที่ตัดไว้วางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) ป้อนให้แห้ง วางทิ้งไว้ 3-4 วัน ก่อนทำการปิดสไลด์
- 4.9 ปิดสไลด์ด้วย cover slip โดยใช้ Canada balsam หรือ permount เป็น mounting media ไล่ฟองอากาศออก โดยใช้ปลายมีดผ่าตัด ทิ้งไว้ 4-5 วัน
- 4.10 นำสไลด์ที่ได้ไปถ่ายภาพด้วยกล้อง stereo microscope ใช้ฟิล์มขนาด 35 มิลลิเมตร และกำลังขยายประมาณ 47 เท่าในการถ่ายภาพ แล้วนำภาพที่ได้มาเทียบกับขนาดสเกลของ stage micrometre ที่ถ่ายด้วยกำลังขยายขนาดเดียวกัน

การบันทึกผลการทดลอง

1. วัดความยาว Secondary leaf sheath ในแต่ละหลอด (7 ต้น) มีหน่วยเป็นเซนติเมตร เมื่ออายุครบ 3 วัน นับจากวันเริ่มหยดสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ซึ่งละลายอยู่ในอะซิโตน 50%(v/v)
2. เทียบหาปริมาณสารคลอโรฟิลล์จากกราฟมาตรฐานเหมือนการทดลองที่ 4
3. วิเคราะห์ผลการทดลองเหมือนการทดลองที่ 4
4. ตรวจสอบ flower initiation โดยการทำให้ microtome section