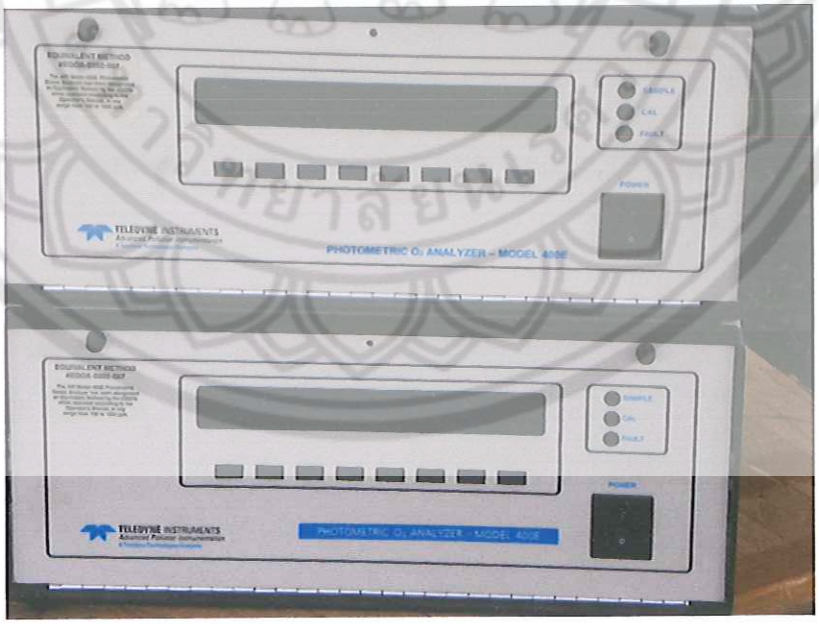
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

ภาพ 32 เครื่องกำเนิดโอโซน (Ozone generator)

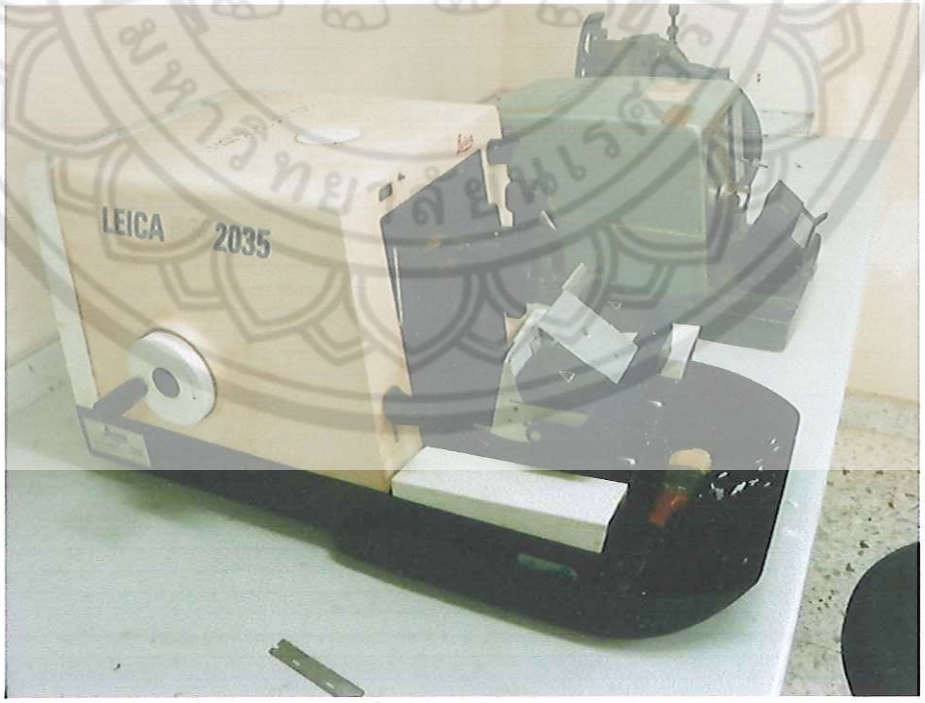


ภาพ 33 เครื่องวัดปริมาณโอโซน (Ozone monitor) PHOTOMETRIC O_3 ANALYZER-MODEL 400E

ภาพ 34 เครื่องวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ Gas Alert Micro-5 (IR)

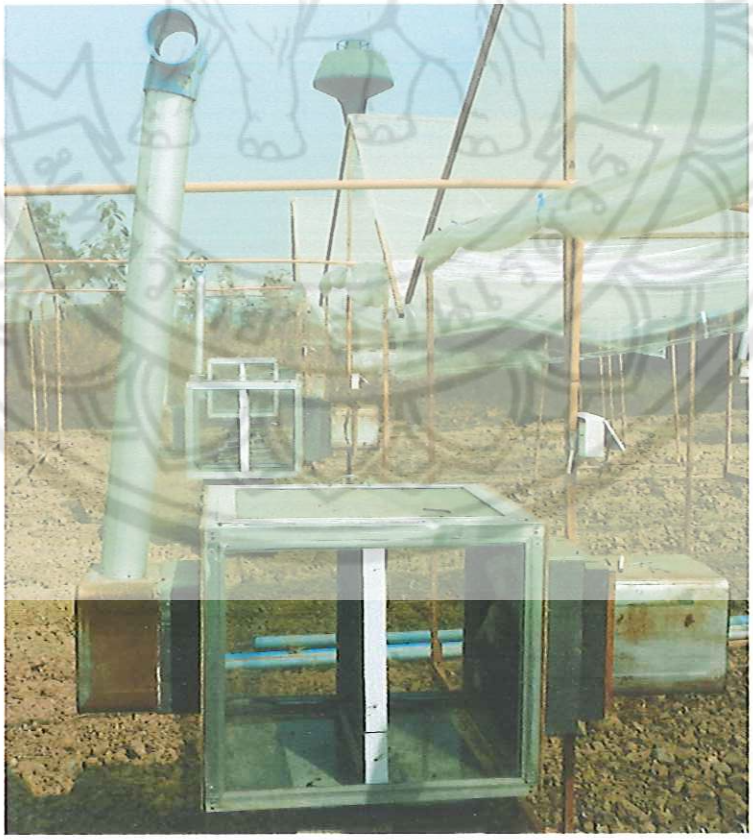
ภาพ 35 เครื่องวัดความเข้มแสง (Luxmeter)

ภาพ 36 ถ่าน Charcoal



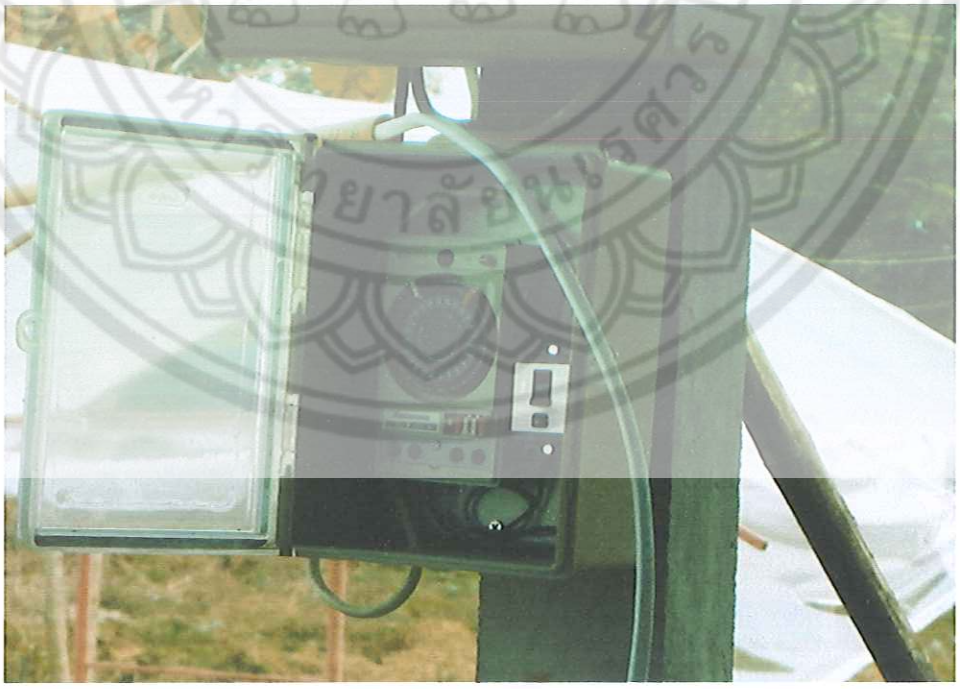
ภาพ 37 เครื่อง Rotary microtome

ภาพ 38 ตู้ทดลอง



ภาพ 39 ชุดควบคุมความเข้มข้น

ภาพ 40 พัดลมดูดอากาศ

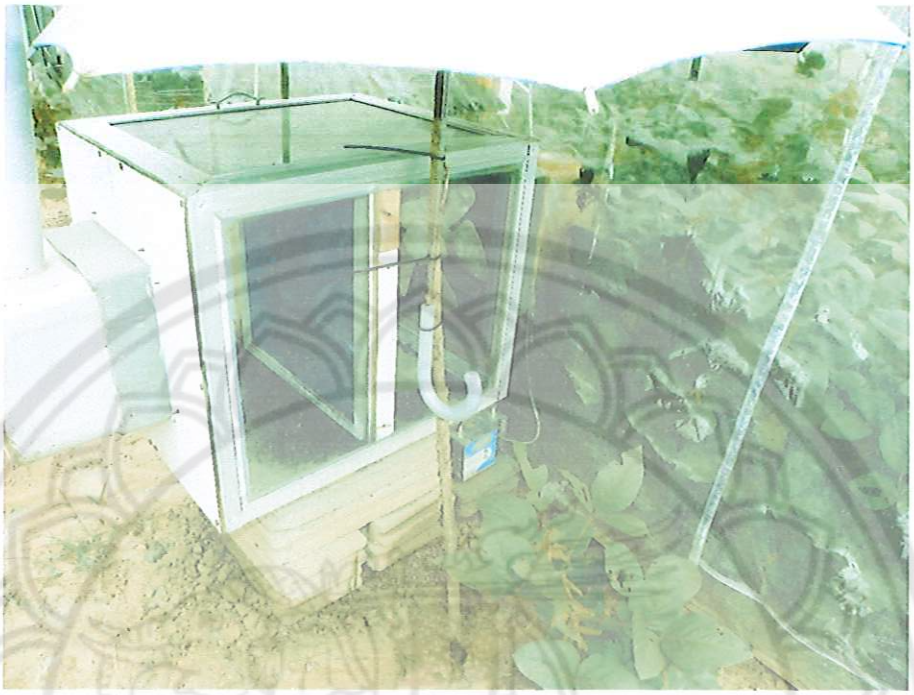


ภาพ 41 ตัวตั้งเวลา

ภาคผนวก ข ลักษณะแปลงขณะทำวิจัย

ภาพ 42 การเตรียมแปลง

ภาพ 43 การให้น้ำเพื่อเตรียมปลูกพืช



ภาพ 44 การพ่นโอโซนระหว่างการทดลอง

ภาพ 45 ลักษณะใบและแปลงที่พ่นโอโซน

ภาคผนวก ค วิธีวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุในใบ ไมโครเทคนิคทางพืช (การทำพาราฟิน) และการเตรียมตัวอย่างสำหรับ SEM

1. วิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุในใบ (คลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ บี และแคโรทีนอยด์)

เก็บตัวอย่างใบเพื่อการวิเคราะห์ผลในระยะ V 2, V4, R1, R3, R5 และ R8 การวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ โดยใช้วิธีของ Lichtenthaler and welburn (1983) ดังนี้

1. นำใบถั่วเหลืองมาล้างน้ำให้สะอาด ชั่งน้ำหนัก 0.5 กรัม นำมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง และสกัดด้วยการเติมเติม 80% Acetone 20 ml.

2. กรองสารละลายที่สกัดด้วยเครื่อง Bucher funnels ใช้กระดาษกรอง Whatmam No.1 และค่อยๆ เติม Acetone จนไม่มีสีเขียวบนกระดาษกรอง

3. รินสารละลายลงใน Flask และปรับปริมาตรด้วย Acetone ใน Volumetric Flask ให้ได้ 50 ml.

4. นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 663 nm (คลอโรฟิลล์ เอ) 645 nm (คลอโรฟิลล์ บี) และ 470 nm (แคโรทีนอยด์) ด้วยเครื่อง spectrophotometer เปรียบเทียบกับสารละลาย Blank (80% Acetone)

5. สูตรการคำนวณค่าปริมาณรงควัตถุ

Chlorophyll *a* (mg/g.fw) = $12.81^* (A_{663}) - 2.81^* (A_{645})$

Chlorophyll *b* (mg/g.fw) = $20.13^* (A_{645}) - 5.03^* (A_{663})$

Carotenoids (mg/g.fw) = $(1000^* A_{470} - (3.27^*[\text{chl } a] - 104^*[\text{chl } b]))/229$

2. ตรวจสอบลักษณะของเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบภายในใบ (การทำพาราฟิน) ดัดแปลงวิธีของ ประศาสตร์ เกื้อมณี (2537) ธวัช ดอนสกุล (2543) และ Johansen (1940)

ในแต่ละแปลงทดลอง สุ่มเก็บตัวอย่างใบ (ใบย่อยกลาง) จากต้นที่มีใบเจริญเต็มที่โดยเก็บตัวอย่างใบจากข้อที่ 5 นับจากปลายยอดลงมา เพราะเหมาะสมต่อการศึกษา เนื้อเยื่อไม่แข็งและอ่อนเกินไป จำนวน 10 ใบ

1. การรักษาสภาพเซลล์ ล้างตัวอย่างใบพืชด้วยน้ำเปล่าให้สะอาด เช็ดให้แห้ง แล้วใช้ใบมีดโกนตัดให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5 x1.0 เซนติเมตร โดยตัดบริเวณกลางใบให้ติดเส้นกลางใบ แล้วนำชิ้นตัวอย่างพืชแช่ลงในสารละลาย FAA 70% จากนั้นนำไปดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้เครื่องดูดอากาศเป็นเวลา 40-60 นาที แล้วแช่ในสารละลาย FAA 70% ต่อไปอีก 24 ชั่วโมง

2. การดึงน้ำออกจากเซลล์ แช่ชิ้นตัวอย่างในสารละลาย tertiary butyl alcohol (TBA) จากเกรด 1-5 และ TBA บริสุทธิ์ ตามลำดับ ขั้นตอนละ 24 ชั่วโมง

3. การทำให้พาราฟินแทรกซึมและการฝังในพาราฟิน นำชิ้นตัวอย่างแช่ในสารละลายที่เป็นส่วนผสมของ Paraffin oil และ TBA บริสุทธิ์ อัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 ^{0}Cประมาณ 24 ชั่วโมง เปลี่ยนพาราฟินทุก 24 ชั่วโมง 3 ครั้ง จากนั้นฝังชิ้นตัวอย่างลงในพาราฟินบริสุทธิ์ในเครื่องฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน ปล่อยให้พาราฟินแข็งตัวแล้วนำไปติดบนกรอบพลาสติก

4. การตัดชิ้นตัวอย่าง นำชิ้นตัวอย่างที่ติดบนกรอบพลาสติกไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน ให้ชิ้นส่วนตัวอย่างหนาประมาณ 10-15 ไมโครเมตร

5. การติดชิ้นส่วนตัวอย่าง นำชิ้นส่วนตัวอย่างที่ตัดเป็นชิ้นบางๆ ไปวางบนสไลด์ที่เคลือบด้วยน้ำยา haupt's adhesive ยึดชิ้นส่วนตัวอย่างในแผ่นพาราฟินที่ตัดแล้วด้วย formalin 2% แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องอุ่นสไลด์

6. การเตรียมตัวอย่างก่อนย้อมสี นำสไลด์ที่ติดชิ้นตัวอย่างแล้วไปล้างพาราฟินออกโดยแช่ใน xylene อย่างน้อย 5 นาที 2 ครั้ง แล้วย้ายไปแช่ในสารละลายที่เป็นส่วนผสมของ xylene กับ ethyl alcohol 100% อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่สไลด์ลงใน ethyl alcohol 100% เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง หลังจากนั้นย้ายไปแช่ใน ethyl alcohol 100%, 95%, 70% และ 50% ตามลำดับ โดยแช่ไว้ขั้นตอนละ 5 นาที และทำซ้ำขั้นตอนละ 2 ครั้ง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที

7. การย้อมสี ย้อมชิ้นตัวอย่างด้วยสี safranin O 1% เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำ ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยแช่ใน ethyl alcohol 50%, 70% และ 95% จากนั้นนำไปย้อมด้วยสี Fast green 1% เป็นเวลาประมาณ 5-30 วินาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วย ethyl alcohol 100% ทั้งหมด 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปแช่ในสารละลายที่เป็นส่วนผสมของ xylene กับ ethyl alcohol 100% อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้ายไปแช่ใน xylene เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปผนึกด้วย permount ก่อนนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง บันทึกภาพไว้เพื่อนำไปใช้ศึกษาเปรียบเทียบ

3. การเตรียมตัวอย่างใบสำหรับการศึกษา SEM

1. ล้างตัวอย่างใบพืชด้วย buffer solution

2. Primary fixation ด้วย 2.5% glutaraldehyde นาน 1 ชั่วโมง

3. ล้างตัวอย่างด้วย buffer (PBS) 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

4. Post fixation ด้วย 1 % OsO_4 นาน 2 ชั่วโมง

5. ล้างตัวอย่างด้วย buffer (PBS) 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

6. Dehydration ethyl alcohol เริ่มจาก 30%, 50%, 70%, 90% และ 100% ตามลำดับ ขั้นตอนละ 15 นาที (สามารถหยุดพักที่ alcohol 70% เก็บไว้ที่ตู้เย็นได้)

7. ล้างด้วย acetone 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

8. นำตัวอย่างใส่เครื่อง CPD

9. ติดตัวอย่างบน stub แล้วนำไปฉาบทอง หลังจากนั้นสามารถนำไปถ่ายภาพด้วยกล้อง SEM ได้

ภาคผนวก ง การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย FAA (fixation)

70% Ethanol	90	ml.
Glacial acetic	5	ml.
10% formalin	5	ml.

2.การเตรียมน้ำยา TBA (dehydration)

สูตรน้ำยา	1	2	3	4	5
น้ำกลั่น	30	15	5	0	0
Butyl alcohol	20	35	55	75	100
Ethanol 95%	50	50	40	25	0

3. การเตรียม Phosphate buffer solution (PBS) Stock Solution

สาร A 0.25 m.

Sodium phosphate monobasic $NaH_2PO_4 . H_2O$	27.6	g.
หรือ $NaH_2PO_4 . H_2O$	31.21	g.
เติมน้ำกลั่น	1000	ml.

สาร B 0.2 m.

Sodium phosphate dibasic $Na_2HPO_4 . 2H_2O$	35.61	g.
หรือ $Na_2HPO_4 . 7H_2O$	53.65	g.
หรือ $Na_2HPO_4 . 12H_2O$	71.64	g.
หรือ Na_2HPO_4	28.392	g.
เติมน้ำกลั่น	1000	ml.

Stock solution C = A +B

= 23 + 77 pH 7.3 ได้ PBS 0.2 m

* ทำเป็น 0.1 m PBS เติม Distilled water ลงไปเท่าตัว

4. การเตรียม Osmium tetroxide (Stock 4% Osmium tetroxide) (เตรียมใน hood)

1. ล้างหลอดบรรจุ osmic acid ให้สะอาดและเช็ดให้แห้ง
2. ห่อด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ปิดปลายทั้ง 2 ข้าง
3. ทุบหลอดบรรจุที่ห่อไว้ในกระดาษเช็ดเลนส์ แกะถ่ายแก้วที่แตกลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 ml.

4. ใส่น้ำกลั่น 25 ml. เขย่าให้เข้ากัน ปิดปาก flask ด้วย paraflim 2 ชิ้น ทิ้งไว้ค้างคืน

5. กรองสารละลายเก็บไว้ในขวดแก้วปิดฝาเกลียว และหุ้มฝาด้วย parafilm

6. เก็บขวด 4 % OsO_4 4 ในขวดปากกว้างขนาดใหญ่ปิดจุกให้แน่น เก็บไว้ในตู้ดูดควัน

* เตรียมเพื่อใช้งาน 1 % OsO_4 ใน 0.1 M PBS เตรียมจาก 4 % OsO_4

OsO_4	:	0.2 M PBS	:	น้ำกลั่น
1	:	2	:	1