ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำหล่อเลี้ยงลำต้นจากระบบท่อ Xylem

ในการทดลองนี้ใช้น้ำที่ซึมออกจากตอวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกละรวดเร็วมากที่สุดในการเก็บตัวอย่างน้ำหล่อเลี้ยงลำต้นที่ถูกส่งมาจากรากโดยตรง (root bleeding) โดยแรงดันของรากให้ไหลซึมออกมาจากตอถั่วที่ตัดไว้

1. ตัดต้นถั่วด้วยมีดหรือกรรไกรตัดต้นไม้คมๆที่เหนือผิวถัดจากข้อแรกลงไป
2. ใช้สายยาง (ซิลิคอนหรือลาเท็กซ์) ยาว 2-4 ซม.สวมตรงตอที่ตัดไว้เลือกใช้สายยางให้ได้ขนาดที่จะสวมตอได้กระชับพอดีที่จะขังน้ำที่ซึมออกมาไว้อยู่
3. ใช้เข็มฉีดยาหรือปาสเตอร์ปิเปต (Pasteur Pipette) ดูดน้ำหล่อเลี้ยงลำต้นที่ไหลซึมออกตามแรงดันของรากมาขังอยู่ในสายยางออกจาสายยางได้แต่ก่อนสวมสายยางควรปล่อยน้ำที่ซึมออกมา 1 นาทีแรกทิ้งไปเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่อาจเกิดจากเซลล์ลำต้นที่ถูกตัด อีกประการหนึ่งควรรีบเก็บตัวอย่างน้ำหล่อเลี้ยงที่ซึมออกมาภายในเวลาไม่เกิน 20-30 นาทีหลังจากตัดเพราะถ้าปล่อยไว้นานอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีเกิดขึ้นกับสารประกอบในน้ำหล่อเลี้ยงซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดพลาดในค่ามี่วิเคราะห์ได้ เพื่อป้องกันปฏิกิริยาการย่อยหรือการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมที่อาจเกิดขึ้นในน้ำหล่อเลี้ยงลำต้นนี้อาจจะทยอยเก็บตัวอย่างทุก 2-3 นาทีรวมใส่ลงในหลอดปิดฝาที่แช่เย็นเอาไว้
4. ตัวอย่างน้ำหล่อเลี้ยงลำต้นนี้ต้องเก็บแช่เย็นไว้ในถังน้ำแข็งทันทีเก็บมาแล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ หรือถ้าไม่อาจแช่แข็งได้การผสมกับเอทานอลบริสุทธิครึ่งต่อครึ่งก็สามารถระงับปฏิกิริยาเคมีและชีวเคมีต่างๆได้ผล

การวิเคราะห์สารประกอบไนโตรเจนในน้ำหล่อเลี้ยงลำต้น

1. เครื่องมือ

   เครื่องชั่งที่ชั่งได้แม่นยำถึง 0.1 มก.

   หลอดทดลองพร้อมที่ตั้ง

   ไมโครปิเปตพร้อม tip (e.g. Gilson Pipetman, France) และ/หรือ dispensers (e.g. Wheaton Zi[[ette, England) ที่มีขนาด 2-20 และ 50-200 ไมโครลิตร 0.2-1 และ 1-5 มล.

   Vortex mixer

   Boiling water bath

   Spectrophotometer หรือ Colorimeter

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อ่างน้ำแข็งหรือ Refrigerated water bath

2. การวิเคราะห์ยูริไอด์ (Young and Conway, 1942)

2.1 รีเอเจนต์

A. 0.5 M NaOH

NaOH	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

B. Phenylhydrazine hydrochloride

Phenylhydrazine hydrochloride*	0.33	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ต้องผสมใหม่ทุกวันที่จะใช้เมื่อผสมแล้วเก็บไว้ในขวดสีชาหรือหุ้มด้วย tin foil ในตู้แช่แข็ง

* เก็บไว้รวมกับสารดูดความชื้น

C. 0.65 M HCl

กรดไฮโดรครอริกเข้มข้น (32% w/w)	6.5	มล.
เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้	100	มล.

D. Potassium ferricyanide

Potassium ferricyanide	0.833	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ต้องผสมใหม่ทุกวันที่จะใช้เมื่อผสมแล้วเก็บไว้ในขวดสีชาหรือหุ้มด้วย tin foil

E. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (32% w/w = 10 M) แช่เย็นไว้ที่ 0 องศาเซียลเซียส

F. มาตรฐานอะลันโทอิน (Allantoin standards)

อะลันโทอินเข้มข้น 1 ไมโครโมล/มล. (Allantoin stock)

Allantoin (เก็บไว้กับสารดูดความชื้น)	15.812	มก.
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เป็น	100	มล.

การทำ Allantoin standards โดยการเจือจาง Allantoin stock ดังนี้

1 มล.ใน 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น (10 nmole/ml), ใช้ 2.5 มล. = 25 nmole/tube

1 มล.ใน 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น (20 nmole/ml), ใช้ 2.5 มล. = 50 nmole/tube

1 มล.ใน 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น (30 nmole/ml), ใช้ 2.5 มล. = 75 nmole/tube

1 มล.ใน 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น (40 nmole/ml), ใช้ 2.5 มล. = 100 nmole/tube

1 มล.ใน 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น (50 nmole/ml), ใช้ 2.5 มล. = 125 nmole/tube

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หมายเหตุ ใช้น้ำกลั่น 2.5 มล.เป็น blank ร่วมไปกับ standard เสมอ ก่อนจะดำเนินการไปถึงการวิเคราะห์ยูริไอด์ควรลองวิเคราะห์ Standard 1 ชุดตั้งแต่ 0-125 nmole เพื่อยืนยันลักษณะของการตอบสนองว่าเป็นเส้นตรงจริง

2.2 วิธีการ

เนื่องจากสีที่เกิดขึ้นไม่มีความคงที่จึงควรวิเคราะห์ยูริไอด์ทีละ 20-30 ตัวอย่างเท่านั้น ซึ่งรวม water blank 2 และอย่างน้อย 3 standards (เช่น 10 20 และ 50 nmole/ml)

2.2.1 นำตัวอย่างน้ำหล่อเลี้ยงต้นที่ได้จากดูดจากต้นหรือที่ซึมออกมาจากตอถั่ว 0.2 มล.หรือ 0.05-0.1 มล.ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นให้ครบ 2.5 มล.สำหรับ blanks ใช้น้ำกลั่น 2.5 มล.และ standards ใช้ 2.5 มล.ของสารละลายที่ได้เจือจางไว้

2.2.2 เติม NaOH 0.5 M ลงไป 0.5 มล.

2.2.3 เขย่าเพื่อผสมให้เข้ากันแล้วนำหลอดทดลองไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10-15 นาที

2.2.4 ยกหลอดทดลองออกจากอ่างน้ำเดือด ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมกรดไฮโดรคลอริก 0.65 M ลงไปหลอดลอง 0.5 มล.ตามด้วย phenylhydrazine hydrochloride ที่เตรียมไว้ 0.5 มล.ผสมให้เข้ากัน

2.2.5 นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดอีก 2-4 นาที

2.4.6 ยกออกจากน้ำร้อนแล้วจุ่มลงในอ่างน้ำเย็นจัด ทิ้งไว้ 15 นาที ในขั้นตอนนี้การเย็นลงทันทีของสารละลายในหลอดทดลองมีความจำเป็นที่จะทำให้เกิดสีที่จะเป็นเครื่องบ่งความเข้มข้นของยูริไอด์ ดังนั้นอาจจำเป็นต้องใช้เกลือผสมกับน้ำแข็งเพื่อให้เย็นจัดมากขึ้น

2.2.7 ยกออกจากอ่างน้ำแข็งเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นที่แช่เย็นไว้ 2 มล.และ potassium fericyanide 0.5 มล. ผสมกันทันทีที่เติม potassium fericyanide ทุกครั้ง

2.2.8 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาทีแล้วนำไปอ่านความเข้มแสง (Optical Density หรือ Absorbance) ด้วย spectrophotometer ที่ 525 nm

หมายเหตุ สีที่ใช้อ่านนี้ไม่อยู่คงตัวถ้าปล่อยไว้นาน 1 ชั่งโมงสีจะจางไป 8-15% ดังนั้นจึงควรทำตัวอย่างทั้งหมดรวมทั้ง blanks และ standards ด้วย ที่สามารถอ่านเสร็จได้ในเวลาประมาณ 20 นาที

2.2.9 สร้างเส้นแสดงความสัมพันธ์ (standard curve) ระหว่างความเข้มข้นของ allantoin standard และค่า Absorbance แล้วอ่านค่าความเข้มข้นจาก standard

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

curve และการใช้ correction factor (เช่น ถ้าใช้ตัวอย่าง 0.5 มล. correction factor คือ 2.5/0.5 = x 5) เปลี่ยนเป็นความเข้มข้น nmole/ml ในตัวอย่างที่มาจากพืช

3. วิธีการวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยวิธีนินไฮดริน

(Yemm and Cocking, 1955) [An adaptation of the method by Herridge, 1984]

3.1 รีเอเจนต์

A. Citrate buffer pH 5 (citric acid 16.8% w/v, NaOH 6.4% w/v)

กรดซิตริก	16.8	กรัม
NaOH	6.4	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ปรับ pH ด้วยสารละลายกรดซิตริกหรือ NaOH ให้ได้ 5.0

B. นินไฮดรินรีเอเจนต์ (ninhydrin 0.96% w/v, ascorbic acid 0.033% w/v ใน 2-methoxyethanol)

Ninhydrin	0.96	กรัม
Ascorbic acid	0.033	กรัม
ละลายสารทั้งสองใน 2-methoxyethanol	100	มล.

C. เอทานอล 60% (v/v)

D. มาตรฐานแอสพาราจีน (Asparagine standards)

Asparagine เข้มข้น 2.5 ไมโครโมล/มล. (Asparagine stock)

Asparagine (เก็บไว้กับสารดูดความชื้น)	0.3303	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เป็น	1,000	มล.

การทำ Asparagine standards โดยการเจือจาง Asparagine stock ดังนี้

2 มล.ใน 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น (50 nmole/ml), ใช้ 0.5 มล. = 25 nmole/tube

4 มล.ใน 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น (100 nmole/ml), ใช้ 0.5 มล. = 50 nmole/tube

6 มล.ใน 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น (150 nmole/ml), ใช้ 0.5 มล. = 75 nmole/tube

8 มล.ใน 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น (200 nmole/ml), ใช้ 0.5 มล. = 100 nmole/tube

10 มล.ใน 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น (250 nmole/ml), ใช้ 0.5 มล. = 125 nmole/tube

<u>หมายเหตุ</u> ใช้น้ำกลั่น 0.5 มล.เป็น blank ร่วมไปกับ standard เสมอ

3.2 วิธีการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1 ใส่ตัวอย่าง 0.5 มล. (น้ำหล่อเลี้ยงลำต้น 20-50 ไมโครลิตรผสมน้ำกลั่น 450-480 ไมโครลิตร) ลงในหลอดทดลองสำหรับ standard ใช้สารละลายมาตรฐาน Asparagine ที่เจือจางไว้อย่างละ 0.5 มล. ส่วน blank (2 ซ้ำ) ใช้น้ำกลั่น 0.5 มล.

3.2.2 เติม Citrate buffer pH 5 0.5 มล.

3.2.3 เติมนินไฮดรินรีเอเจนต์ 1.2 มล.

3.2.4 ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตั้งในอ่างน้ำเดือดประมาณ 25 นาที

3.2.5 ยกออกจากอ่างน้ำเดือดปล่อยให้เย็นตามอุณหภูมิห้อง

3.2.6 เติมเอทานอล 60% 3 มล.ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปอ่านความเข้มแสง (Optical Density หรือ Absorbance) ด้วย spectrophotometer ที่ 570 nm

3.2.7 สร้างเส้นแสดงความสัมพันธ์ (standard curve) ระหว่างความเข้มข้นของ Asparagine standard และค่า Absorbance แล้วอ่านค่าความเข้มข้นจาก standard curve และการใช้ correction factor (เช่น ถ้าใช้ตัวอย่าง 0.05 มล. correction factor คือ 0.5/0.05 = x 10) เปลี่ยนเป็นความเข้มข้น nmole/ml ในตัวอย่างที่มาจากพืช

4. วิธีวิเคราะห์ไนเตรตโดยวิธีกรดซาลิไซลิก (Cataldo *et al*., 1975)

ใช้ได้กับถั่วทุกชนิดที่ได้ทดสอบนอกจากถั่วมะแฮะ ซึ่งจำเป็นต้องผ่านขบวนการ metal reduction (Herridge, 1984) จึงได้ค่าไนเตรทที่ถูกต้อง

4.1 รีเอเจนต์

A. กรดซาลิไซลิกในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (5% (w/v) SA-H_2SO_4)

กรดซาลิไซลิก	5	กรัม
กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4)	100	มล.

รีเอเจนต์ตัวนี้ควรเตรียมไว้ล่วงหน้าอย่างน้อย 1 วันเก็บไว้ในขวดสีชาสามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน 1 สัปดาห์

B. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 M (2 M NaOH)

NaOH	40	กรัม
น้ำกลั่น	500	มล.

C. มาตรฐานไนเตรท (Nitrate standards)

สารละลายโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) เข้มข้น 2.5 ไมโครโมล/มล. (Nitrate stock)

KNO_3 (เก็บไว้กับสารดูดความชื้น)	0.2528	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เป็น	100	มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ถ้าไม่มี KNO_3 ใช้ $Ca(NO_3)_2$ แทนได้)

การทำ Nitrate standards โดยการเจือจาง Nitrate stock ดังนี้

1 มล.ใน 10 มล.ด้วยน้ำกลั่น (2.5 µmole/ml), ใช้ 0.05 มล. = 0.125 µmole/tube

2 มล.ใน 10 มล.ด้วยน้ำกลั่น (5.0 µmole/ml), ใช้ 0.05 มล. = 0.25 µmole/tube

3 มล.ใน 10 มล.ด้วยน้ำกลั่น (7.5 µmole/ml), ใช้ 0.05 มล. = 0.375 µmole/tube

4 มล.ใน 10 มล.ด้วยน้ำกลั่น (10 µmole/ml), ใช้ 0.05 มล. = 0.5 µmole/tube

หมายเหตุ ใช้น้ำกลั่น 0.05 มล.เป็น blank ร่วมไปกับ standard เสมอ

4.2 วิธีการ

4.2.1 ดูดตัวอย่าง 0.05 มล.ใส่ลงในหลอดทดลอง (มาตรฐานที่เจือจางไว้ใช้อย่างละ 0.05 มล.พร้อมทั้งน้ำกลั่น 0.05 มล. 2 ซ้ำเป็น blanks)

4.2.2 เติมรีเอเจนต์ SA-H_2SO_4 0.2 มล.ผสมให้เข้ากัน

4.2.3 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที

4.2.4 เติม 2 M NaOH 4.75 ml (เติมช้าๆ pH ประมาณ 12)

4.2.5 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4.2.6 นำไปอ่านความเข้มแสง (Optical Density หรือ Absorbance) ด้วย spectrophotometer ที่ 410 nm

4.2.5 สร้างเส้นแสดงความสัมพันธ์ (standard curve) ระหว่างความเข้มข้นของ Nitrate standard และค่า Absorbance แล้วอ่านค่าความเข้มข้นจาก standard curve

5. การคำนวณค่าดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์ (Relative ureide index)

$$\text{ดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์ (\%)} = \frac{\text{Ureide N}}{\text{Total sap N}} \times 100$$

เมื่อยูริไอด์ 1 โมเลกุลประกอบด้วยไนโตรเจน 4 อะตอม ดังนั้นยูริไอด์-ไนโตรเจน (Ureide N) จะได้ 4 x ความเข้มข้นของยูริไอด์ (4 x ureide) และ Totalsap N คำนวณได้จาก 4 x ureide + amino acid + nitrate ดังนั้นค่าดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์ (%) คำนวณได้ดังนี้

$$\text{ดัชนียูริไอด์สัมพัทธ์ (\%)} = \frac{\text{4 x Ureide}}{\text{(4 x ureide + amino acid + nitrate)}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์คุณสมบัติของพืช

วิธีเตรียม stock solution ของตัวอย่างพืช

1. เก็บตัวอย่างพืชส่วนเหนือดิน อบให้แห้งแล้วบดตัวอย่างทั้งหมดโดยแยกตัวอย่างพืชแต่ละถุง
2. ชั่งตัวอย่างพืชที่บดมาประมาณ 0.5 กรัม บันทึกน้ำหนักไว้
3. นำตัวอย่างไปย่อยด้วยกรดย่อย (H_2SO_4 +selenium powder) ที่ผสมกับกรดซาลิไซลิก 7 มล.
4. ย่อยเสร็จปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น
5. กรองด้วยกระดาษเบอร์ 5 ได้เป็น stock solution ของตัวอย่างพืชเพื่อใช้ในการหาไนโตรเจนฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมทั้งหมดในตัวอย่างพืช

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total-N) โดยวิธี Indophenol blue method หรือ Colorimetry method (Novozamsky *et al*.,1974)

1. รีเอเจนต์

A. 10 M NaOH

B. Salicylic acid 110 กรัม ใน 10 M NaOH 105 มล.ปรับปริมาตรให้เป็น 250 มล.ด้วยน้ำกลั่น

(เตรียมก่อนใช้ในวันนั้น วันต่อวัน)

C. Buffer pH 12.3

Na_2HPO_4 (anhydrous) 13.35 กรัมละลายในน้ำกลั่น เติม 40 % NaOH (10 M NaOH) 5 มล.

ปรับ pH เป็น 12.3 และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

D. 4% EDTA

E. Sodium hypochlorite 1 M ใน 0.1 M NaOH

Sodium hypochlorite 258.66 มล.

10 M NaOH 5 มล.

ปรับปริมาตรให้เป็น 500 ml ใน volume metric flask ด้วยน้ำกลั่น (เก็บไว้ได้) (การนำไปใช้ โดยเจือจาง Sodium hypochlorite 1 M ใน 0.1 M NaOH 20 มล.ปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น) (เตรียมก่อนใช้)

F. Sodium nitroprusside 50 มก. (0.05 กรัม) ละลายในน้ำ 100 มล. (เตรียมก่อนใช้)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

G. การเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 2,500 มก./ลิตร (stock solution)
$(NH_4)_2SO_4$ 11.739 กรัมปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มล.
เจือจางสารละลายมาตรฐานให้ได้ความเข้มข้น 0 2.5 5.0 7.5 10.0 12.5 15.0 มก./ลิตร(ppm) ตามลำดับ

H. การเตรียมสารละลาย 1 และ 2
สารละลาย 1 ประกอบด้วยสารเคมีข้อ B, E และ D อัตราส่วน 50 มล.: 100 มล.: 5 มล. รวม 155 มล. ใช้ 3 มล./ตัวอย่าง
สารละลาย 2 ประกอบด้วยสารเคมีข้อ C และ E อัตราส่วน 200 มล: 50 มล. รวม 250 มล.ใช้ 5 มล./ตัวอย่าง
สารละลายทั้งสองสามารถใช้ได้ประมาณ 50 ตัวอย่าง

2. วิธีการ

2.1 ดูด stock solution ของตัวอย่างพืชลงในหลอดทดลอง 0.2 มล. (สำหรับ standard ใช้สารละลายมาตรฐานที่เจือจางไว้อย่างละ 0.2 มล. ส่วน blank (2 ซ้ำ) ใช้น้ำกลั่น 0.2 มล.)

2.1 เติมสารละลาย 1 ปริมาตร 3 มล. ผสมให้เข้ากัน

2.2 เติมสารละลาย 2 ปริมาตร 5 มล. ผสมให้เข้ากัน

2.3 ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง (รอพัฒนาสีอย่างสมบูรณ์) หลังจากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density หรือ Absorbance) ด้วย spectrophotometer ที่ 660 nm

2.4 เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐานแล้วคำนวณปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

2.5 คำนวณ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในตัวอย่างจากสมการ

$$\text{Total N (\%)} = \frac{C \times V \times \text{dilution factor} \times 100}{10^6 \times W}$$

เมื่อ C : ความเข้มข้นไนโตรเจนในตัวอย่าง – ความเข้มข้นไนโตรเจนใน blank เมื่อเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐาน

V : ปริมาตรของ stock solution ของตัวอย่างที่ปรับปริมาตรแล้วหลังจากการย่อย (มล.)

W : น้ำหนักตัวอย่างพืชที่ใช้วิเคราะห์ (กรัม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร yeast-mannitol broth (YMB) (Vencent, 1970 อ้างโดย Somasegaran and Hoben, 1994)

Mannitol	10	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่น คนให้ละลาย ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.8 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล. ถ่ายใส่ขวดจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ตรียมเป็นอาหารแข็ง (YMA) ให้เติมผงวุ้น (agar) 15 กรัมภายหลังการปรับปริมาตร จากนั้นต้มให้ผงวุ้นละลายโดยสมบูรณ์ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. YMA ที่มี congo red อินดิเคเตอร์

2.1 เตรียม stock solution ของ congo red โดยละลาย congo red 0.25 มล.ลงในน้ำกลั่น 100 มล.

2.2 เติม stock solution ของ congo red 10 มล. ลงใน YMA ปริมาตร 1,000 มล. เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ congo red เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มล. แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave เป็นเวลา 15 นาที

3. YMA ที่มี bromthymol blue อินดิเคเตอร์

3.1 เตรียม stock solution ของ bromthymol blue โดยละลาย bromthymol blue 0.5 มล.ลงในน้ำกลั่น 100 มล.

3.2 เติม stock solution ของ bromthymol blue 5 มล. ลงใน YMA ปริมาตร 1,000 มล.เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ bromthymol blue เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มล.แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตรวจสอบปริมาณไรโซเบียมในดินโดย plant infection most-probable-number count method (MPN) (Somasegaran and Hoben, 1994)

อุปกรณ์

1. plastic growth pouch บรรจุน้ำยาปลูกถั่ว (N-free medium) ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
2. rack for growth pouch
3. เมล็ดถั่วที่ต้องการทดสอบ
4. Erlenmeyer flask
5. น้ำยาฆ่าเชื้อเมล็ดถั่ว (chlorox solution 3%)
6. N-free medium
7. Sterile water blank 90 ml.
8. Sterile pipette
9. Forcep
10. Soil sample
11. น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว
12. water agar : agar 15 g, distilled water 1 liter
13. balance
14. น้ำยาปลูกถั่ว N-free medium

Stock solution 1	$CaCl_2.2H_2O$	294.1	g/L
Stock solution 2	KH_2PO_4	136.1	g/L
Stock solution 3	Fe-citrate*	6.7	g
	*(ควรละลายในน้ำกลั่นอุ่นก่อน)		
	$MgSO_4.7H_2O$	123.3	g
	K_2SO_4	87.0	g
	$MnSO_4.H_2O$	0.338	g
	Distilled water	1	liter
Stock solution 4	H_3BO_3	0.274	g
	$ZnSO_4.7H_2O$	0.288	g
	$CuSO_4.5H_2O$	0.1	g
	$COSO_4.7H_2O$	0.056	g
	$NaMoO_2.2H_2O$	0.048	g

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Distilled water	1	liter

ใช้ Stock solution แต่ละอย่างๆละ 5 มล. ในการเตรียมน้ำยาปลูกถั่ว 10 ลิตรโดยใช้น้ำกลั่นในการปรับปริมาตร

วิธีการ

สัปดาห์ที่ 1 ฆ่าเชื้อที่ติดอยู่ภายนอกเมล็ดถั่วที่จะเพาะ โดยแทเมล็ดถั่วใส่ใน Erlenmeyer flask ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ Clorox solution 3 % ลงไปให้ท่วมเมล็ด แช่ไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วแทสารละลายทิ้ง ใส่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปแทน เขย่า แทน้ำกลั่นทิ้งแล้วใส่น้ำกลั่นลงไปใหม่ ทำซ้ำแบบนี้ 5 ครั้งเพื่อให้แน่ใจว่าสารละลาย Clorox เจือจางลงจนไม่เป็นพิษต่อไรโซเบียม นำเมล็ดถั่วที่ฆ่าเชื้อแล้วเพาะลงใน water agar จนกระทั่งมีรากงอกโผล่ออกมาเล็กน้อย ใช้ Forceps เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้เย็น คีบเมล็ดถั่วที่เพาะจนงอกแล้ว ใส่ลงใน plastic growth pouch โดยใช้ถุงละ 1 เมล็ด แล้วแท N-free medium ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงใน plastic growth pouch แต่ละถุงโดยใช้ถุงละ 40 มล. เมื่อต้นถั่วที่ปลูกใน plastic growth pouch มีอายุครบ 1 สัปดาห์หรือมีใบโผล่ให้เห็นจึงพร้อมเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

สัปดาห์ที่ 2 เตรียมสารละลายดินที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} – 10^{-6} โดยใช้ตัวอย่างดินที่ต้องการหาปริมาณเชื้อไรโซเบียมและ sterile water blank 90 มล.จากนั้น incubate สารละลายดินที่ทำให้เชื้อเจือจางลงบนรากถั่วที่ปลูกใน plastic growth pouch ล่วงหน้าเป็นเวลา 1 อาทิตย์ โดยใช้สารละลายดิน 1 มล. ต่อ plastic growth pouch 1 ถุง และ incubate 4 ถุงต่อหนึ่งความเข้มข้น

plastic growth pouch ที่ incubate แล้วทั้งหมดไว้ในที่ที่มีแสงเป็นเวลา 2 อาทิตย์ ในระหว่างที่ incubate จะต้องระวังไม่ให้ growth pouch แห้งโดยเติม N free medium แล้วนำออกมาสำรวจว่ามีปมรากถั่วหรือไม่

สัปดาห์ที่ 4 นับจำนวน growth pouch ที่มีการเกิดปมที่รากถั่วโดยไม่ต้องสนใจว่ามีปมเกิดขึ้นกี่ปม หากมีเพียง 1 ปม ก็ถือว่ามีเชื้อไรโซเบียมอยู่ใน growth pouch ถุงนั้น

หาปริมาณเชื้อในดินโดยนับจำนวน growth pouch ของแต่ละความเข้มข้นซึ่งมีการเกิดปมของถั่วโดยเทียบจากตาราง Most probable number

$$\text{ปริมาณเชื้อในดิน (cell/g ดินชื้น)} = \frac{\text{ค่า MPN ที่อ่านจากตาราง x dilution ต่ำสุด}}{\text{ปริมาตรของ soil suspension ที่ใส่ให้แก่ต้นพืช}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA

1. 0.5 M EDTA stock solution *

$Na_2EDTA•2H_2O$	46.5	กรัม
น้ำกลั่น	250	มล.

ละลาย EDTA ลงในน้ำกลั่นปริมาตรปริมาณ 150 มล. ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 8.0 ด้วยเกล็ด NaOH ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 250 มล. ถ่ายลงในขวดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave เป็นเวลา 15 นาที

*หมายเหตุ EDTA จะไม่ละลายจนกระทั่ง pH ของสารละลายใกล้เคียงกับ 8

2. TE บัฟเฟอร์ (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0)

Tris-HCl	1.2114	กรัม
0.5 M EDTA stock solution	2.0	มล.
น้ำกลั่น	1,000	มล.

ละลาย Tris-HCl ลงในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 8.0 เติม 0.5 M EDTA stock solution คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 1,000 มล. ถ่ายใส่ขวดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave เป็นเวลา 15 นาที

3. 5x TBE บัฟเฟอร์

Tris base	54.0	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5 M EDTA stock solution	20.0	มล.
น้ำกลั่น	1,000	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น คนให้เข้ากันแล้วถ่ายใส่ขวดเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. Staining solution (ethidium bromide 0.5 mg/ml)

เตรียม 1,000x stock solution ; ethidium bromide 0.5 มก./มล.

Ethidium bromide	50	มก.
น้ำกลั่น	100	มล.

ละลาย Ethidium bromide ลงในน้ำกลั่นคนให้เข้ากันแล้วถ่ายลงขวดสีชาเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 ºC เมื่อจะนำไปใช้งานให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1 : 1,000

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. Loading dye (10 มล.)

0.25% (w/v) Bromophenol blue

40% (w/v) sucrose

ชั่ง bromophenol blue 0.0025 กรัม และ sucrose 4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มล.และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารที่ใช้ในการสกัดจีโนมิก DNA

1. TE บัฟเฟอร์ผสม 0.1% (w/v) Tween 20

TE บัฟเฟอร์	100	มล.
Tween 20	0.1	มล.

ผสมสารทั้งสองแล้วคนให้เข้ากัน ถ่ายลงในขวดเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. 1 M NaCl

NaCl	58.44	กรัม

ละลาย NaCl ด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตร เป็น 1,000 มล. ถ่ายใส่ขวดแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave เป็นเวลา 15 นาที

การสกัดจีโนมิก DNA เพื่อใช้เป็น DNA แม่แบบด้วยวิธีของ Santasup *et al.* (2000)

การเตรียม DNA แม่แบบจากเชื้อบริสุทธิ์

1. นำเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มทั้ง 3 isolates มาแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารวุ้น YM ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อประมาณ 1-2 อาทิตย์

2. เมื่อได้โคโลนีเดี่ยวทำการเพิ่มปริมาณโดยการเลี้ยงบนอาหารวุ้น YM ต่อใช้ระยะเวลาประมาณ 1-2 อาทิตย์

3. ใช้ห่วงถ่ายเชื้อที่ผ่านการลนไฟให้ร้อนแดงแล้วทิ้งไว้ให้เย็นลงสักครู่ แตะเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 2 ปริมาณ 1-2 loop ถ่ายลงใน eppendorf tube ที่บรรจุสารละลาย 1 M NaCl ปริมาตร 0.5 มล.ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 15,000 รอบ/นาทีที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลา 5 นาทีทิ้งส่วนใส (ขั้นตอนนี้ทำซ้ำได้หลายครั้งหากเชื้อผลิต polysaccharide มาก)

4. เติม TE บัฟเฟอร์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส

6. เติม TE บัฟเฟอร์ผสม 0.1% (w/v) Tween 20 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

7. นำ eppendorf tube ไปแช่ใน water-bath ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที
8. เมื่อครบกำหนดนำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที
9. ส่วนใสที่ได้จะเป็น DNA ดูดเฉพาะส่วนนี้ถ่ายลงใน eppendorf tube ใหม่
10. เติม isopropanol 0.6 เท่าของปริมาตรในข้อ 9 พลิกเบาๆ ผสมให้เข้ากันนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
11. เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วเติมเอทานอล 70% ปริมาตร 200 ไมโครลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที
12. เทเอมานอลทิ้งและทำตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอน DNA (ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า) ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ-20 °C

การเตรียม DNA แม่แบบจากตัวอย่างปม

1. นำปมสดที่เก็บรักษาไว้ไปฆ่าเชื้อที่ผิวปมโดยแช่ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 5 นาที
2. ผึ่งให้แห้งเล็กน้อยก่อนนำปมแต่ละปมใส่ลงใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 มล.
3. เติม TE buffer 0.1 มล. ใช้ปลาย pipette tip พลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ขยี้ปมให้แตกละเอียด
4. นำ cell suspension ที่เกิดขึ้นไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงสักครู่ เพื่อแยกตะกอนและส่วนใสออกจากกัน หลังจากนั้นดูเฉพาะส่วนใสที่ได้ซึ่งเป็น cells suspension ของแบคทีเรียปมรากถั่วถ่ายลงใน eppendorf tube ใหม่
5. นำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส
6. ล้างตะกอนที่ได้ด้วยการเติม 1 M NaCl ปริมาตร 100 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 15,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาทีทิ้งส่วนใส ทำซ้ำ 2 ครั้ง
7. เติม TE บัฟเฟอร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส
8. เติม TE บัฟเฟอร์ผสม 0.1% (w/v) Tween 20 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
9. นำ eppendorf tube ไปแช่ใน water-bath ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที
10. เมื่อครบกำหนดนำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที
11. ส่วนใสที่ได้จะเป็น DNA ดูดเฉพาะส่วนนี้ถ่ายลงใน eppendorf tube ใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12. เติม isopropanol 0.6 เท่าของปริมาตรในข้อ 9 พลิกเบาๆให้เข้ากันนำไปเก็บที่อุณหภูมิ - 20 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

13. เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วเติมเอทานอล 70% ปริมาตร 200 ไมโครลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที

14. เทเอมานอลทิ้งและทำตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอน DNA (ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า) ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

การทำ REP- และ ERIC-PCR

เตรียมหลอดสำหรับทำ PCR ขนาด 0.2 มล. ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วอบให้แห้ง ขั้นตอนการทำพีซีอาร์ควรทำบนน้ำแข็งทั้งหมด เตรียมหลอดขนาด 1.5 มล. ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วอบให้แห้งสำหรับใส่สารละลายผสมในการทำพีซีอาร์ (master mix) จากนั้นเตรียมสารละลายผสมสำหรับแต่ละปฏิกิริยา REP- และ ERIC-PCR ขนาด 25 ไมโครลิตร โดยเติมส่วนประกอบดังตารางภาคผนวก 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางภาคผนวก ก 1 ส่วนประกอบของสารละลายผสมสำหรับการทำ REP-PCR

Stock solution	Volume (µl) / 25 µl	Final concentration
10x PCR buffer	2.50	1x
50 mM $MgCl_2$	0.75	1.5 mM
2 mM dNTP	2.50	0.2 mM
primer 1 : 50 pmole/µl REP 1R-I	0.50	25 pmole / rxn
primer 2 : 50 pmole/µl REP 2R-I	0.50	25 pmole / rxn
Autoclaved double distilled water	9.95	
5 U/µl Taq DNA polymerase	0.30	1.5 U

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก ก 2 ส่วนประกอบของสารละลายผสมสำหรับการทำ ERIC-PCR

Stock solution	Volume (µl) / 25 µl	Final concentration
10x PCR buffer	2.50	1x
50 mM $MgCl_2$	1.25	2.5 mM
2 mM dNTP	2.50	0.2 mM
primer 1 : 50 pmole/µl ERIC 1R	0.50	25 pmole / rxn
primer 2 : 50 pmole/µl ERIC 2	0.50	25 pmole / rxn
Autoclaved double distilled water	9.45	
5 U/µl Taq DNA polymerase	0.30	1.5 U

หมายเหตุ สารละลายผสม (master mix) ดังกล่าวสามารเตรียมเพิ่มได้ตามจำนวนเท่าของปฏิกิริยา (จำนวนตัวอย่าง) อาจเตรียมเผื่อ 1 เท่าเพื่อเพิ่มความแม่นยำในการดูดสาร

ตารางภาคผนวก ก 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer ที่ใช้ในการทดลอง

Primer	Sequence	Referrence
REP 1R-I	5'-IIIICGICGICATCIGGC-3'	Versalovic *et al*., 1991
REP 2-I	5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'	Versalovic *et al*., 1991
ERIC 1R	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3'	Versalovic *et al*., 1991
ERIC 2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	Versalovic *et al*., 1991

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันเบาๆ จากนั้นเติมสารละลายผสม (master mix) ปริมาตร 17 ไมโครลิตรลงในหลอดสำหรับ PCR ที่เตรียมไว้ แล้วเติม DNA แม่แบบปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลาสั้นๆ เพื่อให้สารละลายทั้งหมดตกลงก้นหลอด นำไปทำปฏิกิริยา PCR โดยตั้งโปรแกรมของเครื่องเทอร์โมไซเคลอร์ (thermo cycler) ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก ก 4 โปรแกรมในการทำ REP- และ ERIC-PCR (ฉายกริช, 2551)

	REP-PCR		**ERIC-PCR**	
I	95 ^{0}C 6 min.	1 cycle	95 ^{0}C 5 min.	1 cycle
II	94 ^{0}C 1 min. 42 ^{0}C 1 min. 65 ^{0}C 8 min.	40 cycles	94 ^{0}C 1 min. 49 ^{0}C 1 min. 72 ^{0}C 5 min.	40 cycles
III	65 ^{0}C 16 min.	1 cycle	72 ^{0}C 10 min.	1 cycle
IV	Final constant temperature 4 ^{0}C		Final constant temperature 4 ^{0}C	

เมื่อครบกำหนดนำผลผลิตจาก PCR ไปวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis ทันที หรือเก็บไว้ที่ -20 ^{0}C

การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จาก REP- และ ERIC-PCR ด้วย agarose gel electrophoresis

เตรียม 1.5% (w/v) agarose โดยละลาย agarose 1.5 กรัม ลงใน 1xTBE บัฟเฟอร์ปริมาตร 100 มล.ด้วยเตาไมโครเวฟ agarose ที่หลอมเหลว (50-60 ^{0}C) เติมสารละลาย ethidium bromide (50 mg/ml) ลงในสารละลาย agarose หลังจากนั้นเทลงในถาดซึ่งเสียบหวีเตรียมไว้เพื่อทำให้เกิดช่องบนเจลให้ได้เจลที่มีความหนา 5 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวอย่างสมบูรณ์ จึงค่อยๆดึงหวีออก นำแผ่นเจลที่ได้ใส่ลงใน chamber แล้วเท 1xTBE บัฟเฟอร์ ลงใน chamber ให้ท่วมแผ่นเจลเล็กน้อย ผสมผลผลิตจาก PCR 8 ไมโครลิตรกับ loading dye 2 ไมโครลิตร แล้วปิเปตลงในช่องของแผ่นเจล โดยช่องแรกซ้ายมือสุดของเจลจะเป็นตัวอย่างที่ได้จากการเตรียม DNA แม่แบบจากเชื้อบริสุทธิ์ หลังจากนั้นจะเป็นตัวอย่าง DNA แม่แบบจากปมถั่วพุ่ม ปิดฝาครอบแล้วเปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ จนกระทั่งแถบสีของ bromophenol blue ใน loading dye เคลื่อนที่ไป 2/3 ของความยาวเจลจึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำแผ่นเจลไปส่องบนเครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต แล้วถ่ายภาพเก็บไว้

ในส่วนของการวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ DNA ของผลผลิต PCR ที่ได้จะทำการเปรียบเทียบลายพิมพ์ DNA ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มจากปมกับเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มที่ใช้คลุกเมล็ด (เชื้อบริสุทธิ์)

<u>หมายเหตุ</u> ระมัดระวังและสวมถุงมือตลอดเวลาเมื่อทำการทดลองที่เกี่ยวข้องกับ ethidium bromide ซึ่งเป็นสาร mutagen

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวก ข 1 แสดง ANOVA ของน้ำหนักสด (SFW) และแห้งของส่วนเหนือดิน (SDW) น้ำหนักแห้งปมของถั่วพุ่มดำ (NDW) ที่ปลูกในแปลงทดลองของศูนย์ฯแม่สะป๊อกและศูนย์ฯหนองหอยในระยะ R. 3.5 สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มในการส่งเสริมการตรึงไนโตรเจนของถั่วพุ่มดำ

SOV	df	MS		
		SFW	SDW	NDW
			ศูนย์ฯแม่สะป๊อก	
ซ้ำ	3	1171848	11982	0.0044
การใส่เชื้อ	3	28608 ^{ns}	703.2 ^{ns}	0.00689 ^{ns}
error	9	89473	951.4	0.00397
			ศูนย์ฯหนองหอย	
ซ้ำ	3	1415867	47018.1	0.00105
การใส่เชื้อ	3	28133 ^{ns}	4809 ^{ns}	0.0019 ^{ns}
error	9	735689	15964.2	0.00165

หมายเหตุ ns ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก ข 2 แสดง ANOVA ของดัชนี ureide สัมพัทธ์ ปริมาณ N ที่ตรึงได้จากอากาศ ปริมาณ N ทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดิน (N-uptake) % N ที่ได้จากการตรึงของถั่วพุ่มดำที่ปลูกในแปลงทดลองของศูนย์ฯแม่สะป๊อกและศูนย์ฯหนองหอยในระยะ R. 3.5 สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียปมรากถั่วพุ่มในการส่งเสริมการตรึงไนโตรเจนของถั่วพุ่มดำ

SOV	df	MS			
		% N ที่ได้จากการตรึง	N uptake (กก.N/ไร่)	N ที่ตรึงได้ (กก.N/ไร่)	ดัชนี ureide สัมพัทธ์ (%)
			ศูนย์ฯแม่สะป๊อก		
ซ้ำ	3	101.235	17.3672	16.5251	56.969
การใส่เชื้อ	3	18.666 ns	1.5234 ns	0.9086 ns	10.483 ns
error	9	54.928	1.6627	2.1702	30.871
			ศูนย์ฯหนองหอย		
ซ้ำ	3	322.428	24.3691	12.3651	181.37
การใส่เชื้อ	3	38.574 ns	6.7806 ns	2.4178 ns	21.698 ns
error	9	81.502	17.0325	4.3619	45.845

หมายเหตุ ns ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก ข 3 แสดง ANOVA ของน้ำหนักสด (SFW) และแห้งของส่วนเหนือดิน (SDW) น้ำหนักแห้งปมของถั่วพุ่มดำ (NDW) ที่ปลูกในแปลงทดลองของศูนย์ฯแม่สะป๊อกและศูนย์ฯหนองหอยในระยะ R. 3.5 สำหรับการศึกษาความจำเป็นในการใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วในการปลูกถั่วพุ่มในฤดูกาลที่ 2

SOV	df	MS		
		SFW	SDW	NDW
			ศูนย์ฯแม่สะป๊อก	
ซ้ำ	3	1245771	16342.5	0.00269
การใส่เชื้อ	6	125162 ^{ns}	1111.6 ^{ns}	0.0003 ^{ns}
error	18	266749	6275	0.00052
			ศูนย์ฯหนองหอย	
ซ้ำ	3	446414	5399.58	0.0003865
การใส่เชื้อ	6	203335 ^{ns}	1356.57 ^{ns}	0.0004273 ^{ns}
error	18	112174	2461.88	0.0002852

หมายเหตุ ns ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก ข 4 แสดง ANOVA ของดัชนี ureide สัมพัทธ์ ปริมาณ N ที่ตรึงได้จากอากาศ ปริมาณ N ทั้งหมดที่สะสมในส่วนเหนือดิน (N-uptake) % N ที่ได้จากการตรึงของถั่วพุ่มดำที่ปลูกในแปลงทดลองของศูนย์ฯแม่สะป๊อกและศูนย์ฯหนองหอยในระยะ R. 3.5 สำหรับการศึกษาความจำเป็นในการใส่เชื้อแบคทีเรียปมรากถั่ว ในการปลูกถั่วพุ่มในฤดูกาลที่ 2

SOV	df	MS			
		% N ที่ได้จากการตรึง	N uptake (กก.N/ไร่)	N ที่ตรึงได้ (กก.N/ไร่)	ดัชนี ureide สัมพัทธ์ (%)
		ศูนย์ฯแม่สะป๊อก			
ซ้ำ	3	205.67	6.73735	4.93717	115.59
การใส่เชื้อ	6	92.02 ns	1.30701 ns	1.90353 ns	51.753 ns
error	18	73.921	4.12059	3.06979	41.551
		ศูนย์ฯหนองหอย			
ซ้ำ	3	37.969	4.92481	3.49162	21.328
การใส่เชื้อ	6	169.207 ns	0.988 ns	0.44483 ns	95.168 ns
error	18	69.776	1.74965	1.14355	39.252

หมายเหตุ ns ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก ข 5 แสดง ANOVA ของจำนวนปมของถั่วพุ่มในฤดูกาลเพาะปลูกครั้งแรกสำหรับการศึกษาความสามารถของสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียปมรากถั่วที่ใช้คลุกเมล็ด

SOV	df	MS			
		จำนวนปม/ต้น			
		0-5 cm	5-10 cm	> 10 cm	รวม
		ดินจากศูนย์ฯแม่สะป๊อก			
การใส่เชื้อ	3	9810.42 ns	6874.56 ns	3336.92 ns	13873.7 ns
error	12	5832.21	2272.52	1262.92	8070.6
		ดินจากศูนย์ฯหนองหอย			
การใส่เชื้อ	3	6236.42 ns	7520.56 ns	66476.7 ns	85344.6 ns
error	12	4448.54	3485.56	26661.6	50683.8

หมายเหตุ ns ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวก ข 6 แสดง ANOVA ของจำนวนปมของถั่วพุ่มสำหรับการศึกษาความจำเป็นในการใช้เชื้อซ้ำในฤดูกาลปลูกที่ 2

SOV	df	MS			
		จำนวนปม/ต้น			
		0-5 cm	5-10 cm	> 10 cm	รวม
		ดินจากศูนย์ฯแม่สะป๊อก			
การใส่เชื้อ	6	5199.95*	2655.64*	10712.2 ns	27065.1*
error	21	9738.82	2284.67	5832.4	25278.5
		ดินจากศูนย์ฯหนองหอย			
การใส่เชื้อ	6	8741.32 ns	5213.07 ns	13900 ns	31247.5 ns
error	21	6405.31	4248.43	6786.6	29733.2

หมายเหตุ * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์
ns ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาว สุปราณี จี้มูล

วัน เดือน ปีเกิด 21 กรกฎาคม 2526

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนบ้านแป้นพิทยาคม อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน ปีการศึกษา 2542 (มีนาคม 2543)

สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนจักรคำคณาทร อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน ปีการศึกษา 2544 (มีนาคม 2545)

สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาปฐพีศาสตร์และอนุรักษศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2548 (มีนาคม 2549)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved