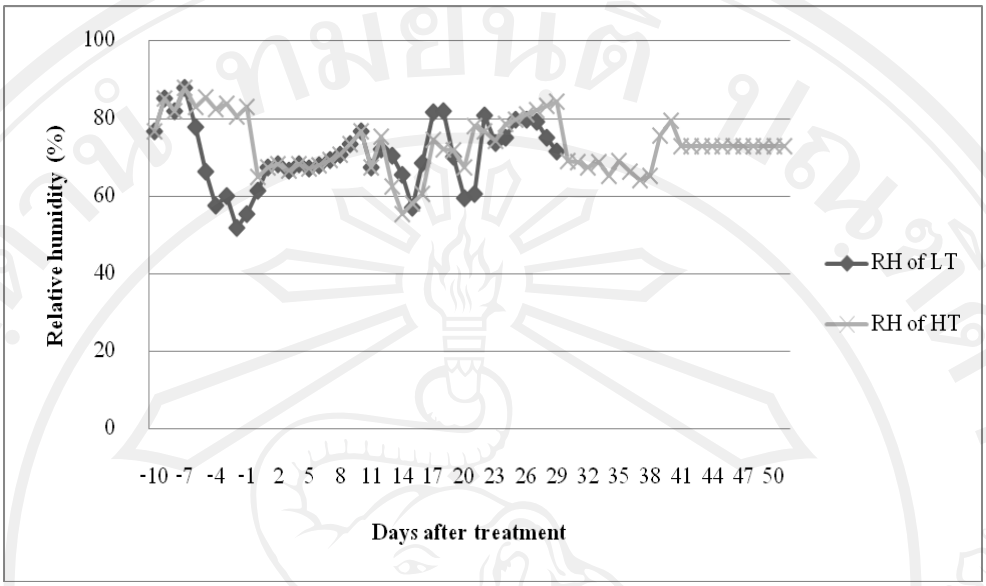
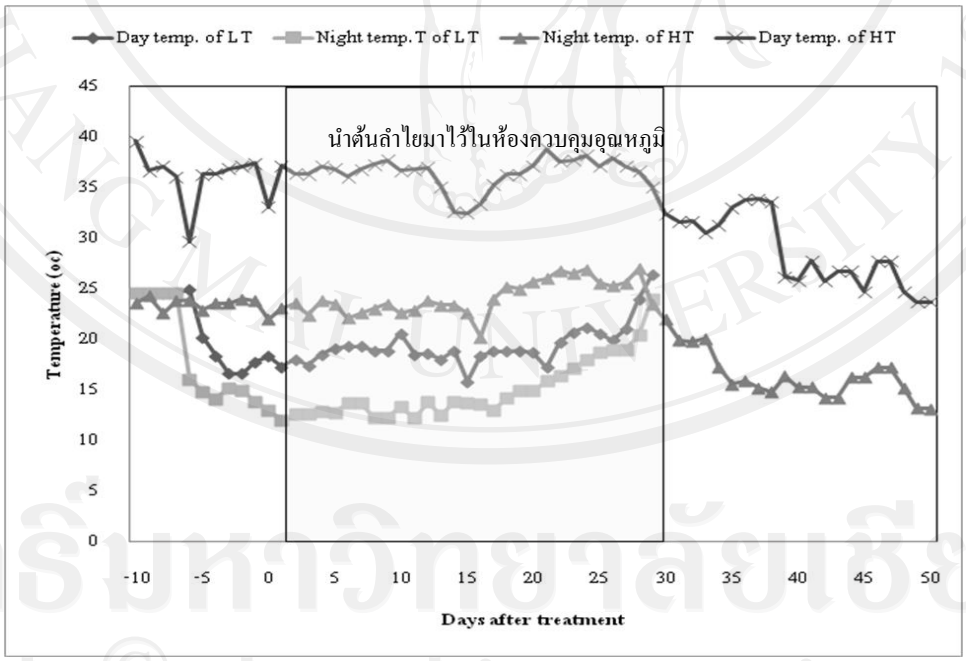
ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 28 ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงความชื้นสัมพัทธ์ โดยแสดงค่าความชื้นสัมพัทธ์ของกรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีราด $KClO_3$ อัตรา 400 ppm (RH of HT) และกรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C) (RH of LT)



ภาพที่ 29 ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ โดยแสดงอุณหภูมิกลางวัน-กลางคืน (Day temp. of HT- Night temp. of HT) ในกรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีราด $KClO_3$ อัตรา 400 ppm และอุณหภูมิกลางวัน-กลางคืน (Day temp. of LT- Night temp. of LT) ของกรรมวิธีปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไซโตไคนินชนิด iP/iPAในใบลำไยหลังกรรมวิธี

กรรมวิธี	**ปริมาณไซโตไคนินชนิด iP/iPA** (นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)						
	จำนวนวันหลังจากเริ่มทำการทดลอง						
	0	5	10	15	20	25	30
ชุดควบคุม	2.00	1.83c[1/]	2.18b	3.57b	6.02	5.02a	2.16
ราด $KClO_3$ อัตรา 400 ppm	2	6.08a	3.6a	5.97a	6.73	1.29b	1.85
ปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C)[2/]	1	5.02b	1.48c	0.16c	5.91	3.22ab	2.93
$LSD_{0.05}$	ns	*	*	*	ns	*	ns

ตารางที่ 14 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไซโตไคนินชนิด iP/iPA ในยอดลำไยหลังกรรมวิธี

กรรมวิธี	**ปริมาณไซโตไคนินชนิด iP/iPA** (นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)						
	จำนวนวันหลังจากเริ่มทำการทดลอง						
	0	5	10	15	20	25	30
ชุดควบคุม	17.29	20.73b[1/]	21.784a	14.91b	18.28a	18.85	13.74b
ราด $KClO_3$ อัตรา 400 ppm	16.8	19.95c	16.44ab	31.03a	15.47ab	25.64	22.10a
ปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C)[2/]	17.75	25.53a	14.30b	29.34a	12.47b	18.13	10.94c
$LSD_{0.05}$	ns	*	*	*	*	ns	*

[1/] ตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

[2/] ปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (กลางวัน/กลางคืน = 17/12°C)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 15 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไซโตไคนินชนิด iP/iPAในรากลำไยหลังกรรมวิธี

กรรมวิธี	**ปริมาณไซโตไคนินชนิด iP/iPA** (นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) [1/]						
	จำนวนวันหลังจากเริ่มทำการทดลอง						
	0	5	10	15	20	25	30
ชุดควบคุม	860.77a	388.50a	1007.5a	400.18b	1531.80a	189.01c	748.39b
ราด $KClO_3$ อัตรา 400 ppm	469.28b	256.39b	228.09b	742.66a	355.09c	730.14b	526.96c
ปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C) [2/]	335.28c	362.07ab	900.84a	405.28b	975.38b	960.8a	1049.20a
$LSD_{0.05}$	*	*	*	*	*	*	*

ตารางที่ 16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไซโตไคนินชนิด *t*Z/ZR ในใบลำไยหลังกรรมวิธี

กรรมวิธี	**ปริมาณไซโตไคนินชนิด *t*Z/ZR** (นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)						
	จำนวนวันหลังจากเริ่มทำการทดลอง						
	0	5	10	15	20	25	30
ชุดควบคุม	4.93	2.84	3.76	4.14b [1/]	9.88a	8.97a	12.43a
ราด $KClO_3$ อัตรา 400 ppm	3.96	2.94	3.38	15.56a	8.17a	4.72b	3.87b
ปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C) [2/]	3.11	2.44	3.82	1.19c	3.84b	4.93b	4.45b
$LSD_{0.05}$	ns	ns	ns	*	*	*	*

[1/] ตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

[2/] ปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (กลางวัน/กลางคืน = 17/12°C)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 17 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไซโตไคนินชนิด *t*Z/ZR ในยอดลำไยหลังกรรมวิธี

กรรมวิธี	**ปริมาณไซโตไคนินชนิด *t*Z/ZR** (นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)						
	จำนวนวันหลังจากเริ่มทำการทดลอง						
	0	5	10	15	20	25	30
ชุดควบคุม	3.91c[1/]	3.43b	4.05	4.56	13.78b	18.53b	4.07b
ราด $KClO_3$ อัตรา 400 ppm	6.41b	3.33c	2.06	12.04	18.82a	53.74a	26.51a
ปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C) [2/]	9.82a	5.14a	5.09	9.73	6.03c	1.35c	5.94b
$LSD_{0.05}$	*	*	ns	ns	*	*	*

ตารางที่ 18 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไซโตไคนินชนิด *t*Z/ZRในรากลำไยหลังกรรมวิธี

กรรมวิธี	**ปริมาณไซโตไคนินชนิด *t*Z/ZR** (นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)						
	จำนวนวันหลังจากเริ่มทำการทดลอง						
	0	5	10	15	20	25	30
ชุดควบคุม	6.03	7.92	6.71b[1/]	6.37b	6.38	3.94c	5.60b
ราด $KClO_3$ อัตรา 400 ppm	5.46	9.36	6.26b	12.99a	13.81	5.68b	2.96c
ปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (17/12°C) [2/]	5.54	7.61	9.23a	5.94b	12.11	15.49a	16.00a
$LSD_{0.05}$	ns	ns	*	*	ns	*	*

[1/] ตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

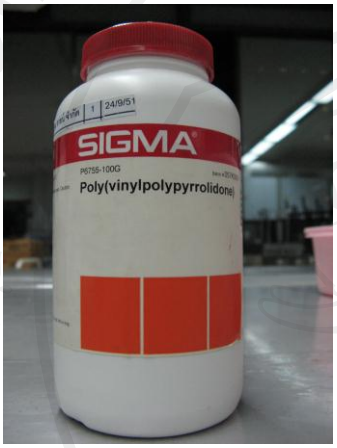
[2/] ปลูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำ (กลางวัน/กลางคืน = 17/12°C)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารเพื่อบรรจุคอลัมภ์ในการ purification ตัวอย่างยอด ใบ และรากเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณไซโตไคนิน

1.1 การเตรียม PVP (Polyvinylpyrrolidone ; Sigma chemical Co. Deisenhofen, germany)



1) ชั่งสาร PVP จำนวน 50 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

2) คนให้เข้ากันนาน 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเทส่วนใสทิ้ง

3) จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4) คนให้เข้ากันนาน 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเทส่วนใสทิ้ง

5) จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

6) คนให้เข้ากันนาน 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเทส่วนใสทิ้ง

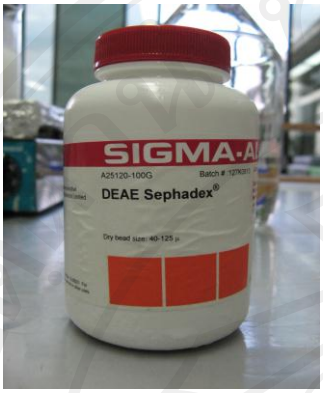
7) เติมน้ำกลั่นอีกครั้งให้ได้ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปิดปากบีกเกอร์ด้วยกระดาษอะลูมิเนียม และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8) ก่อนนำมาใช้ กวนให้เข้ากันนาน 30 นาที

9) เติม PVP ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน column พักไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดการตกตะกอน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 การเตรียม Sephadex (DEAE Sephadex–A25; Sigma chemical Co.)



1) ชั่ง DEAE Sephadex จำนวน 25 กรัม

2) เติม 0.1 M ammonium acetate, pH 8.5 ปริมาตร300 มิลลิลิตร และต้มด้วยบีกเกอร์ที่มีน้ำร้อนภายใน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3) ทำให้เย็นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4) กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยผ่านกรวยกรองและเครื่องสูบอากาศ

5) ตัก DEAE-Sephadex ที่เหลือบนกระดาษกรองในข้อ 4 แล้วเติม 0.1 M ammonium acetate, pH 8.5 ปริมาตร 200มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, PBS) pH 7.4

สารละลาย ก. $NaH_2PO_4.2H_2O$	78.004	กรัม/น้ำ 1 ลิตร
สารละลาย ข. $Na_2HPO_4.12H_2O$	35.814	กรัม/น้ำ 1 ลิตร
สารละลาย ค. NaCl	61.365	กรัม/น้ำ 1 ลิตร
Gelatin	1	กรัม
น้ำอุ่น	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น 18 MΩ	1	ลิตร

นำสารละลาย ก.ปริมาตร 6.66 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย ข. ปริมาตร 66.87 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย ค. ปริมาตร 133.30 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 900 มิลลิลิตร เติมสาร Gelatin จำนวน 1 กรัมด้วยน้ำอุ่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.4 ด้วย 1 N NaOH แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียม 0.4% BSA

ชั่ง BSA 0.4 กรัม ละลายใน coating buffer 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้งานอุ่นใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สำหรับการล้างเพลท (washing buffer)

สารละลาย PBS 10X ประกอบด้วย NaCl 80 กรัม, KCl 2 กรัม, $Na_2HPO_4.2H_2O$ 14.4 กรัม, KH_2PO_4 2.4 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

Washing buffer ประกอบด้วย PBS 10X ปริมาตร 400 มิลลิลิตร เติม polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 4,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สำหรับการเคลือบเพลท (coating buffer)

Na_2CO_3	4.29	กรัม
$NaHCO_3$	2.93	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ชั่ง Na_2CO_3 4.29 กรัม และ $NaHCO_3$ 2.93 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 9.6 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. การเตรียมสารละลายตั้งต้น

สำหรับฮอร์โมน iP/iPA (substrate diluent buffer)

ชั่ง magnesium chloride 0.1 กรัม และ diethanolamine 97 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 9.8 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สำหรับฮอร์โมน *t*Z/ZR (citrate phosphate buffer)

ชั่ง citric acid (monohydrate) 10.30 กรัม และ $Na_2HPO_4.2H_2O$ 18.16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.0 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. การเตรียมสารตั้งต้นสำหรับการพัฒนาสีของ ELISA

สำหรับฮอร์โมน iP/iPA

ชั่ง p-nitrophenylphosphate 0.024 กรัม ละลายใน substrate diluent buffer ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ทำในหลอดทดลองที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์เพื่อป้องกันแสง นำไปเขย่าโดยใช้ vortex mixer เมื่อ p-nitrophenylphosphate ละลายหมดแล้วจึงเติม 0.03% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(H_2O_2) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (การเตรียม p-nitrophenylphosphate จะต้องเตรียมก่อนใช้เท่านั้น เนื่องจากสารละลายจะเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็วเมื่อถูกแสงสว่าง)

สำหรับฮอร์โมน *t*Z/ZR

ชั่ง O-phenylenediamine acetate (OPD) 0.018 กรัม ละลายใน citrate phosphate buffer ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ทำในหลอดทดลองที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์เพื่อป้องกันแสง นำไปเขย่าโดยใช้ vortex mixer เมื่อ OPD ละลายหมดแล้วจึงเติม 0.03% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (การเตรียม OPD จะต้องเตรียมก่อนใช้เท่านั้น เนื่องจากสารละลายจะเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็วเมื่อถูกแสงสว่าง)

8. การเตรียมสารละลายหยุดปฏิกิริยา (Stop solution)

สำหรับฮอร์โมน iP/iPA

การเตรียม 5N KOH ประกอบด้วยสาร KOH 56.11 กรัม ค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

สำหรับฮอร์โมน *t*Z/ZR

การเตรียม 4N H_2SO_4 ประกอบด้วยสาร H_2SO_4 21.36 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

9. การเตรียม CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) buffer (กฤษณาและคณะ, 2553)

100 mM Tris-Hcl pH 8.0

2 M NaCl

25 mM EDTA

2 % CTAB

น้ำกลั่น

คำนวณปริมาณสารให้ได้ตามความเข้มข้นดังกล่าว นำมาผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. การเตรียม 0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA

น้ำกลั่น

ชั่ง EDTA 186.10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

11. การเตรียม 5 M NaCl

NaCl

น้ำกลั่น

ชั่ง NaCl 292.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

12. การเตรียม 1 M Tris-Hcl (pH 8.0)

Tris base

น้ำกลั่น

ชั่ง Tris base 157.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

13. การเตรียม 50x TAE buffer

Tris base	242 กรัม
Glacial Acetic acid	57.1 มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	100 มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

14. การเตรียม 1.2% Formaldehyde Agarose Gel

Agarose

Formaldehyde

1x TAE buffer

ผสม agarose 1.2 กรัม และ 1x TAE buffer 100 มิลลิลิตร นำไปละลายที่อุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 37% (12.3 M) formaldehyde 1.8 มิลลิลิตร และเติม 10 mg/ml ethidium bromide 1 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน จากนั้น เทลงในถาดเจลที่เตรียมไว้ทิ้งไว้นาน 30 นาที

15. เตรียม 1.2% Agarose Gel

Agarose 1.2 กรัม

1x TAE buffer 100 มิลลิลิตร

ผสม agarose และ 1x TAE buffer 100 มิลลิลิตร นำไปละลายที่อุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 10 mg/ml ethidium bromide 1 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทลงในถาดเจลที่เตรียมไว้ทิ้งไว้นาน 30 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวพิชญ์ทิพา ศุทธิธนาวัฒน์

วัน เดือน ปี เกิด 11 ตุลาคม 2528

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนส่วนบุญโญปถัมภ์ จ.ลำพูน
สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนส่วนบุญโญปถัมภ์ จ.ลำพูน
สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved