บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1.1 พืชทดลอง ปทุมมาพันธุ์เชียงใหม่สีชมพูใช้หัวพันธุ์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.6-2.0 เซนติเมตรที่มีตุ้มรากเฉลี่ย 4-6 ตุ้ม

ภาพที่ 1 หัวพันธุ์ปทุมมาพันธุ์ Chingmai Pink ที่ใช้ในการทดลอง

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับการคัดจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในปทุมมา

1.2.1.1 โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4)

1.2.1.2 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

1.2.1.3 โซเดียมโมลิบเดท-2-ไฮเดรต ($Na_2MoO_4.2H_2O$)

1.2.1.4 แมนนิทอล (Manitol)

1.2.1.5 โซเดียมมาเลท (Sodium malate)

1.2.1.6 โซเดียมแลคเตท 60% (Sodium-Lactate)

1.2.1.7 โพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)

1.2.1.8 น้ำตาลซูโครส (Sucrose)

1.2.1.9 สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)

1.2.1.10 แมกนีเซียมซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)

1.2.1.11 แคลเซียมคลอไรด์-2-ไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)

1.2.1.12 ไบโอติน (Biotin)

1.2.1.13 กรดพาราอะมิโนเบนโซอิค (Para – aminobenzoic acid ; PABA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.1.14 ทริปโทแฟน (Tryptophan)

1.2.1.15 เอทานอล 95% (C_2H_5OH)

1.2.1.16 Salkovskii reagent (0.5M $FeCl_3$, 35% $HClO_3$)

1.2.1.17 คลอรอกซ์ 10% (NaOCl)

1.2.1.18 สารละลาย C (Na หรือ K tartrate, 2%$NaCO_3$)

1.2.1.19 ฟอริน (Folin)

1.2.1.20 Fast green

1.2.1.21 ไซลีน (xylene)

1.2..1.22 คริสตัลไวโอเล็ต (crystal violet)

1.2.1.23 ซาฟานินโอ (safranin O)

1.2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ไนโตรเจนรวมของพืช

1.2.2.1 กรดซัลฟูริคเข้มข้น (H_2SO_4)

1.2.2.2 ไฮโดรเยนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

1.2.2.3 โซเดียมคีเลท (EDTA.2Na)

1.2.2.4 เอทานอล (C_2H_5OH)

1.2.2.5 เมธิลเรด (methyl red)

1.2.2.6 โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4)

1.2.2.7 กรดเบนโซอิก (benzoic acid)

1.2.2.8 โซเดียมไนโตรพลัสไซด์ (Sodium nitroprusside)

1.2.2.9 ฟีนอล (phenol)

1.2.2.10 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.7H_2O$)

1.2.2.11 โซเดียมฟอสเฟต ($Na_3PO_4.12H_2O$)

1.2.2.12 โซเดียมไฮโปคลอไรต์

1.2.2.13 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

1.2.2.14 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

1.2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ฟอสฟอรัส

1.2.3.1 กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)

1.2.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.3.3 กรดไฮโดรคลอริค (HCl)

1.2.3.4 แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$)

1.2.3.5 สเทนัสคลอไรด์ ($SnCl_2$)

1.2.3.6 โพแทสเซียมไดโฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

1.2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โพแทสเซียม

1.2.4.1 กรดเปอร์คลอริคเข้มข้น ($HClO_4$)

1.2.4.2 กรดไนตริก (HNO_3)

1.2.4.3 กรดไฮโดรคลอริค (HCl)

1.2.4.4 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

1.2.5 สารเคมีสำหรับตัดเนื้อเยื่อพืช

1.2.5.1 น้ำยาตรึงและรักษาสภาพเซลล์ (killing and fixing solution) ได้แก่ FAA (formalin-acetic acid-alcohol)

1.2.5.2 น้ำยาดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration solution) ได้แก่ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ tertiary butyl alcohol (TBA) และน้ำกลั่น

1.2.5.3 สารตัวกลางที่ใช้ในการฝังเนื้อเยื่อเพื่อการตัด (embedding media) ได้แก่ พาราพลาสต์

1.2.5.4 น้ำยาสำหรับทำความสะอาดเนื้อเยื่อใส (clearing reagent) ได้แก่ ไซลีน (xylene)

1.2.5.5 น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดแผ่นสไลด์ (adhesive)

1.2.5.6 สีย้อม ได้แก่ Dalafield' hematoxylin

1.2.5.7 ตัวกลางสำหรับปิดแผ่นสไลด์ คือ Canada balsam

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 อุปกรณ์

1.3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการแยกจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนในปทุมมา

1.3.1.1 มีดผ่าตัด

1.3.1.2 กรรไกรผ่าตัด

1.3.1.3 โกร่งบด

1.3.1.4 ไมโครปิเปต

1.3.1.5 ปากคีบ

1.3.1.6 สไลด์

1.3.1.7 เครื่องปั่น

1.3.1.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

1.3.1.9 แท่งแก้วคนสาร

1.3.1.10 แท่งแก้วรูปตัวแอล

1.3.1.11 เข็มเขี่ย

1.3.1.12 เครื่องวัด pH

1.3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการปฏิบัติงานในแปลงปลูก

1.3.2.1 กระถางพลาสติกดำขนาด 6 x 10 นิ้ว จำนวน 50 กระถาง

1.3.2.3 วัสดุปลูก ทราย : ถ่านแกลบ : ดิน อัตรา 1:1:1

1.3.2.6 บัวรดน้ำ

1.3.2.7 ไม้บรรทัด

1.3.3.9 ป้ายชื่อพร้อมปากกาเคมี

1.3.3.10 กล้องถ่ายรูป

1.3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมใน เนื้อเยื่อพืช

1.3.3.1 เครื่องชั่งแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.3.3.2 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

1.3.3.3 เครื่องบดตัวอย่างพืช

1.3.3.4 เตาย่อยตัวอย่างพืช

1.3.3.5 เครื่องปั่น (vortex)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3.3.5 ขวดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร

1.3.3.6 หลอดทดลองขนาด 25×200 มิลลิเมตร

1.3.3.7 ขวดปรับปริมาตรขนาด 25 50 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

1.3.3.8 ปิเปต ไมโครปิเปต

1.3.3.9 หลอดหยดสาร

1.3.3.10 แท่งแก้วคนสาร

1.3.3.11 ขวดสีชา

1.3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

1.3.4.1 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

1.3.4.2 เครื่องตัดเนื้อเยื่อพืชแบบล้อหมุน (rotary microtome)

1.3.4.3 ตู้อบเนื้อเยื่อพืช

1.3.4.4 แผ่นความร้อน (hot plate)

1.3.4.5 กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์

1.3.4.6 ขวดสำหรับใส่ชิ้นส่วนพืช

1.3.4.7 ขวดแก้วสำหรับย้อมสีสไลด์

1.3.4.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.3.4.9 พู่กัน

1.3.4.10 ปากคีบ

1.3.4.11 แท่งไม้ขนาด 1.5×1.5×1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรที่อิ่มตัวด้วยพาราฟิน

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมต่อการฆ่าเชื้อบริเวณผิวชิ้นส่วนพืช

คัดเลือกชิ้นส่วนของต้นปทุมมาในช่วงของการเจริญเติบโตทางลำต้นที่มีอายุ 9 สัปดาห์หลังปลูก ในการศึกษาครั้งนี้ได้แยกส่วนของปทุมมาเป็น 4 ส่วนด้วยกันคือ ใบ กาบใบ หัว และราก แต่ละส่วนที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ต้องไม่มีบาดแผลหรือเป็นโรค หลังจากเก็บพืชแต่ละส่วนมาแล้วนำไปทำความสะอาดโดยล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำแต่ละส่วนมาฆ่าเชื้อที่ผิวตามกรรมวิธีต่างกัน 5 กรรมวิธีๆละ 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 1 แช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที

กรรมวิธีที่ 2 แช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที

กรรมวิธีที่ 3 แช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที

กรรมวิธีที่ 4 แช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 7 นาที

กรรมวิธีที่ 5 แช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที

ในขั้นตอนฆ่าเชื้อที่ผิวนี้ทำในตู้ปลอดเชื้อ เริ่มจากแช่ใน เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที ต่อจากนั้นแช่ในคลอรอกซ์ ตามกรรมวิธีข้างต้นและตามด้วยแช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง นำตัวอย่างพืชที่ทดสอบไปกลิ้งบนอาหาร Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก) เพื่อดูการเจริญของเชื้อเปรียบเทียบกันในแต่ละกรรมวิธี

การบันทึกผล บันทึกการเจริญของเชื้อบนอาหารทดสอบในแต่ละกรรมวิธี

การทดลองที่ 2 การแยกจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนจากเนื้อเยื่อปทุมมา

2.1 การกำจัดเชื้อที่ผิวของต้นปทุมมา

นำต้นปทุมมาที่มีอายุ 8 สัปดาห์หลังปลูกแยกเป็น 4 ส่วนได้แก่ ใบ กาบใบ หัวใหม่ และราก จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวตามกรรมวิธีที่ได้จากการทดลองที่ 1 ตัดชิ้นส่วนตัวอย่างให้มีขนาด 2-3 เซนติเมตร บดชิ้นส่วนตัวอย่างด้วยโกร่งบด ค่อยๆเติม 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl ลงไปผสมจนครบ 10 เท่าของน้ำหนักตัวอย่าง บดจนละเอียด จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร Rennie Medium (ภาคผนวก ก)ที่มีอาหาร 9 มิลลิลิตรต่อหลอด ทิ้งไว้ 4-5 วัน

2.2 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

นำเอาหลอดที่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ มาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร NA จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 3-4 วัน เก็บโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน แยกโคโลนีเดี่ยวให้บริสุทธิ์บนอาหาร NA ด้วยวิธี streak plate ทิ้งไว้ 2-3 วัน นำโคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารนำมาเก็บใน slant เพื่อทำการเก็บรักษาเชื้อไว้สำหรับทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.3 การจัดกลุ่มของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในปทุมมา

2.3.1 ศึกษาลักษณะของโคโลนี

บันทึกลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่าโคโลนี (colony) บนอาหาร NA ซึ่งแบคทีเรียเอนโดไฟท์เจริญบนอาหารมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปตามชนิดตั้งแต่ ลักษณะ สีโคโลนี ขนาด รูปแบบ (form) ขอบ และส่วนเว้าส่วนโค้งของผิวหน้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการติดสีแกรม (Gram's stain)

การย้อมสีเป็นวิธีการเบื้องต้นที่จำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่มคือ แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งการย้อมลักษณะนี้เป็นการย้อมแบบ differential staining คือการใช้สีย้อมตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป ซึ่งสีย้อมแรกเรียกว่า primary stainได้แก่ crystal violet ส่วนสีที่สองเรียกว่า counterstain หรือ secondary stain ได้แก่ safanin แบคทีเรียที่ย้อมติดสี crystal violet เรียกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ถ้าติดสี safanin เรียก แบคทีเรียแกรมลบ มีขั้นตอนดังนี้คือ

1. ทำความสะอาดสไลด์และเช็ดให้แห้ง
2. นำเชื้อมาสเมียร์บนแผ่นสไลด์จากนั้นตรึงเซลล์ด้วยความร้อน
3. หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอยสเมียร์และทิ้งไว้ 1 นาที
4. เท crystal violet ทิ้งแล้วชะด้วยสารละลายไอโอดีน จากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์และทิ้งไว้ 1 นาที
5. เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะเอทธานอล 95เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งไม่มีสีม่วง ล้างด้วยน้ำทันที
6. ซับด้วยกระดาษซับแล้วย้อมสี safanin ทับอีกครั้ง ทิ้งไว้ 1 นาที
7. เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำแล้วใช้กระดาษซับ วางทิ้งไว้ให้แห้ง
8. นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบลักษณะ การติดสีแกรม และรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรีย

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อปทุมมา โดย Acetylene Reduction Assay (ARA)

นำเอาโคโลนีเดี่ยวบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง Rennie Medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เมื่อพบการเจริญของเชื้อภายในหลอดอาหารแล้ว ทำการเปลี่ยนฝาหลอดจากฝาพลาสติกเป็นจุกยางเพื่อใช้เข็มฉีดเจาะผ่าน หลังจากเปลี่ยนฝาหลอดเรียบร้อยแล้วใช้เข็มเจาะเข้าไปในหลอด ดูดเอาอากาศออกประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของช่องว่างภายในหลอด จากนั้นใส่ก๊าซอะเซทธิลีน แทนอากาศที่ดูดออกในปริมาตรที่เท่ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงนำไปวัดปริมาณของก๊าซเอทธิลีนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง gas chromatography ยี่ห้อ shimadzu GC – 14B โดยทำการดูดเอาอากาศภายในหลอดมา 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าไปในเครื่อง จากนั้นคำนวณปริมาณก๊าซเอทธิลีนจากตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟที่เกิดจากก๊าซเอทธิลีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

หลังจากวัดปริมาณของก๊าซเอทธิลีน เรียบร้อยแล้วจึงหาปริมาณของเชื้อทั้งหมดที่เจริญในหลอดอาหาร โดยการนำเอาหลอดที่มีการตรึงไนโตรเจนมาหาปริมาณเชื้อ ซึ่งทำโดยการดูด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอาตัวอย่างเชื้อจากหลอดมาทำการเจือจาง (dilution) ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-5} ดูดเอาสารละลายที่มีความเข้มข้นที่ 10^{-3} – 10^{-5} ปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร NA ทำ spread plate โดยเกลี่ยเชื้อด้วยแท่งแก้วรูปตัว L ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจนทั่วจานอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน นับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อ (plate) นำไปคำนวณหาปริมาณเชื้อทั้งหมดที่ขึ้นในหลอดอาหารกึ่งแข็ง Rennie Medium

2.5 การทดสอบประสิทธิภาพการสร้างไอเอเอของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในของเนื้อเยื่อปทุมมา

เตรียมอาหารเหลว Rennie Medium ที่เติม ทริปโทแฟน 2 กรัมต่อลิตร ดูดใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นเขี่ยเชื้อที่แยกได้โคโลนีเดี่ยวๆ (บริสุทธิ์) แล้วใส่ลงในอาหารที่เตรียมไว้ นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าจนกระทั่งเชื้อมีการเจริญเติบโตเต็มที่เปลี่ยนอาหารจากใสเป็นขุ่น (3-4 วัน) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 50000 รอบต่อนาที ส่วนที่เป็นสารละลายใสวิเคราะห์ไอเอเอ และนำส่วนที่เป็นตะกอนติดอยู่ที่ก้นหลอดหาปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ไอเอเอโดยวิธีการของ Gordon, *et al*. (1951)

ดูดสารละลายมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นเติม Salkvskii (ภาคผนวก ก) 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในที่มืดนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน Lowery, *et al*. (1951)

นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร จากนั้นดูดตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร เติม 1N NaOH 0.1 มิลลิลิตรปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย C (ภาคผนวก ก) 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาทีจากนั้นเติม Folin 1N 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที เมื่อครบกำหนดนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เข้าสมการ linear regression ได้ปริมาณไอเอเอในหน่วยของไมโครโมลต่อกรัมโปรตีน

2.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

คัดเลือกตัวอย่างของโคโลนีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนและสามารถสร้างไอเอเอได้ดีที่สุดจำนวน 4 ไอโซเลท นำไปเลี้ยงบนอาหาร NA จากนั้นส่งไปวิเคราะห์ทางชีววิทยาโมเลกุล โดยใช้เทคนิค 16s rDNA ณ.ห้องปฏิบัติการ DNA Technology มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ด้วยเครื่อง Automatic DNA sequencer โดยใช้โปรแกรม BLAST ในการค้นหาและวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 ผลของการปลูกถ่ายเชื้อเอนโดไฟท์ต่อการเจริญเติบโตของต้นปทุมมา

การทดลองที่ 3.1 การทดสอบเชื้อที่คัดเลือกต่อการเจริญเติบโตและความเข้มข้นของไนโตรเจนในพืช

คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนและการสร้างไอเอเอได้มีประสิทธิภาพสูงที่สุด จำนวน 4 ไอโซเลท คือ ECL101 ECS202 ECS203 และ ECS 204นำไปปลูกถ่ายให้กับหัวปทุมมาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (NB) เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ โดยจุ่มหัวปทุมมาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเชื้ออยู่ 10^6 เซลล์ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) จำนวน 5 กรรมวิธี ๆ ละ 10 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่ปลูกถ่ายเชื้อ)

กรรมวิธีที่ 2 ปลูกถ่ายเชื้อ ECL 101ให้กับหัวปทุมมาก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกถ่ายเชื้อ ECS 202 ให้กับหัวปทุมมาก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกถ่ายเชื้อ ECS 203 ให้กับหัวปทุมมาก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 5 ปลูกถ่ายเชื้อ ECS 204 ให้กับหัวปทุมมาก่อนนำไปปลูก

หลังจากปลูกถ่ายเชื้อไปยังหัวพันธุ์ปทุมมาแล้ว นำหัวพันธุ์ไปปลูกลงในกระถางขนาด 6 นิ้วที่ประกอบด้วยวัสดุปลูกที่มีส่วนประกอบ ดิน:ทราย:ถ่านแกลบ ในอัตราส่วน 1:1:1 วัสดุปลูกนำไปทำการฆ่าเชื้อก่อนใช้

บันทึกการเจริญเติบโต

3.1.1. ความสูงต้น ความยาวและความกว้างใบ จำนวนใบ ความยาวก้านช่อดอก ความยาวและเส้นรอบวงของช่อดอก

3.1.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรเจนโดยวิธี Indolphenol Method

3.1.2.1 เก็บตัวอย่างล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา 2 ครั้งและล้างด้วยน้ำกลั่นจากนั้นนำไปอบแห้งที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วันขึ้นอยู่กับส่วนของพืชที่อบ

3.1.2.2 นำตัวอย่างไปบดด้วยเครื่องบดยี่ห้อ KMF 10 basic KIKA WERKE และชั่งตัวอย่าง 0.05 กรัมใส่ลงไปในหลอดทดลองขนาดยาว เติมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำไปย่อยตามวิธีของ Ohyama, *et al.,* (1985; 1986)

3.1.2.3 หลังจากย่อยเสร็จแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นดูดตัวอย่างที่ย่อยมา 0.2-0.5 มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับส่วนของพืชที่นำมาวิเคราะห์ เติม A reagent 0.5 มิลลิลิตร และ B reagent 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู นำมาไตรเตรทโดยหยด NaOH 1N ลงไป เขย่าเล็กน้อยจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเติม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

C reagent 2.5 มิลลิลิตร และ D reagent 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (การเตรียม reagent ดูภาคผนวก ก)

3.1.2.4 เตรียมสารละลายมาตรฐานจากแอมโมเนียมซัลเฟต ระดับความความเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งแอมโมเนียมซัลเฟต 0.471 กรัม ละลายด้วยกรดซัลฟูริก 0.5 N แล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร ได้สารละลายมาตรฐานไนโตรเจนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายไปเจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการ

การทดลองที่ 3.2 ผลของระยะเวลาในการปลูกถ่ายเชื้อต่อการเจริญเติบโตของปทุมมา (กรณีฆ่าเชื้อหัวพันธุ์และวัสดุปลูก)

คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนและการสร้างไอเอเอที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด 4 ไอโซเลท ปลูกถ่ายให้กับหัวพันธุ์ปทุมมาก่อนนำไปปลูก โดยวัสดุปลูกที่ใช้ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ และฆ่าเชื้อที่ผิวหัวพันธุ์ด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที วางแผนการทดลองแบบ $(2 \times 5) +1$ แฟกทอเรียลในสุ่มสมบูรณ์ มี 2 ปัจจัยคือ

ปัจจัยที่ 1 ระยะเวลาในการปลูกถ่ายเชื้อให้กับหัวพันธุ์โดยการแช่หัวพันธุ์ในสารละลายที่มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นาน 30 และ 60 นาที

ปัจจัยที่ 2 ชนิดของเชื้อที่ปลูกถ่าย 5 ไอโซเลทได้แก่ ECL 101 ECS 202 ECS 203 ECS 204 และการใช้เชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทร่วมกัน

รวมทั้งสิ้น 11 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่มีการปลูกถ่ายเชื้อก่อนนำไปปลูก (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ปลูกถ่ายเชื้อ ECL 101 นาน 30 นาที ก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกถ่ายเชื้อ ECS 202 นาน 30 นาที ก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกถ่ายเชื้อ ECS 203 นาน 30 นาที ก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 5 ปลูกถ่ายเชื้อ ECS 204 นาน 30 นาที ก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 6 ปลูกถ่ายเชื้อร่วมกันทั้ง 4 ไอโซเลท นาน 30 นาทีก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 7 ปลูกถ่ายเชื้อ ECL 101 นาน 60 นาที ก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 8 ปลูกถ่ายเชื้อ ECS 202 นาน 60 นาที ก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 9 ปลูกถ่ายเชื้อ ECS 203 นาน 60 นาที ก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 10 ปลูกถ่ายเชื้อ ECS 204 นาน 60 นาที ก่อนนำไปปลูก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 11 ปลูกถ่ายเชื้อร่วมกันทั้ง 4 ไอโซเลท นาน 60 นาทีก่อนนำไปปลูก

การทดลองที่ 3.3 ผลของระยะเวลาในการปลูกถ่ายเชื้อและชนิดของเชื้อต่อการเจริญเติบโตของปทุมมา (กรณีไม่ฆ่าเชื้อหัวพันธุ์และวัสดุปลูก)

คัดเลือกแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนและการสร้างไอเอเอที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด 4 ไอโซเลท ปลูกถ่ายให้กับหัวพันธุ์ปทุมมาก่อนนำไปปลูกที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยวางแผนการทดลองแบบ $(2 \times 5) +1$ แฟกทอเรียลในสุ่มสมบูรณ์ มี 2 ปัจจัยคือ

ปัจจัยที่ 1 ระยะเวลาในการปลูกถ่ายเชื้อให้กับหัวพันธุ์ นาน 30 และ 60 นาที

ปัจจัยที่ 2 ชนิดของเชื้อที่ปลูกถ่าย 5 ไอโซเลทได้แก่ ECL 101 ECS 202 ECS 203 ECS 204 และ การใช้เชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทร่วมกัน

รวมทั้งสิ้น 11 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่มีการปลูกถ่ายเชื้อก่อนนำไปปลูก (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ปลูกถ่ายเชื้อ ECL 101 นาน 30 นาที ก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกถ่ายเชื้อ ECS 202 นาน 30 นาที ก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกถ่ายเชื้อ ECS 203 นาน 30 นาที ก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 5 ปลูกถ่ายเชื้อ ECS 204 นาน 30 นาที ก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 6 ปลูกถ่ายเชื้อร่วมกันทั้ง 4 ไอโซเลท นาน 30 นาทีก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 7 ปลูกถ่ายเชื้อ ECL 101 นาน 60 นาที ก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 8 ปลูกถ่ายเชื้อ ECS 202 นาน 60 นาที ก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 9 ปลูกถ่ายเชื้อ ECS 203 นาน 60 นาที ก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 10 ปลูกถ่ายเชื้อ ECS 204 นาน 60 นาที ก่อนนำไปปลูก

กรรมวิธีที่ 11 ปลูกถ่ายเชื้อร่วมกันทั้ง 4 ไอโซเลท นาน 60 นาทีก่อนนำไปปลูก

โดยทั้งการทดลองที่ 3.2 และ 3.3 บันทึกการเจริญเติบโตของต้นปทุมมาดังนี้คือ

3.2.1 บันทึกการเจริญเติบโตของต้น ได้แก่ ความสูง จำนวนใบ พื้นที่ใบ เส้นผ่าศูนย์กลางต้น น้ำหนักแห้งต้น และคุณภาพดอกได้แก่ ความยาวก้านดอกวัดจากระดับของวัสดุปลูกถึงส่วนล่างสุดของช่อดอก ความยาวช่อดอก เส้นผ่าศูนย์กลางของช่อดอก จำนวนกลีบประดับต่อช่อ (สีเขียวและสีชมพู) และน้ำหนักแห้งของดอก

3.2.2 วิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรเจนรวม ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม โดยวิเคราะห์ 2 ส่วนคือ ส่วนที่อยู่เหนือดิน (ใบและกาบใบ) และ ส่วนที่อยู่ใต้ดิน (รากและหัวใหม่)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรเจนไนโตรเจน เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1

3.2.2.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสโดยวัดการดูดกลืนแสงของสารที่มีสี (colorimeter)

3.2.2.2.1 เก็บตัวอย่างล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา 2 ครั้งและล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นนำไปอบแห้งที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วันขึ้นอยู่กับส่วนของพืชที่อบ

3.2.2.2.2 นำตัวอย่างไปบดด้วยเครื่องบด และชั่งตัวอย่าง 0.05 กรัมใส่ลงไปในหลอดทดลองขนาดยาว เติมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืนจากนั้นนำไปย่อยตามวิธีของ Ohyama, *et al,*. (1985 ; 1986)

3.2.2.2.3 หลังจากย่อยเสร็จแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร จากนั้นดูดตัวอย่างที่ย่อยมา 0.5-1 มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับส่วนของพืชที่นำมาวิเคราะห์ จากนั้นเติม M reagent 1 มิลลิลิตร และเติมสเทนัสคลอไรด์ 0.2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปั่น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัส (การเตรียม reagent ดูภาคผนวก ก)

3.2.2.2.4 เตรียมสารละลายมาตรฐานของฟอสฟอรัส จากโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำเป็นกราฟมาตรฐาน โดยชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.176 กรัมละลายด้วยกรดซัลฟูริก 4N แล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร ขนาด 1 ลิตร จนครบปริมาตรได้สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายไปเจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการ

3.2.2.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโพแทสเซียม

3.2.2.3.1 เก็บตัวอย่างล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา 2 ครั้งและล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นนำไปอบแห้งที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วันขึ้นอยู่กับส่วนของพืชที่อบ

3.2.2.3.2 นำตัวอย่างไปบดด้วยเครื่องบด และชั่งตัวอย่าง 0.05 กรัมใส่ลงไปในหลอดทดลองขนาดยาว เติมกรดเปอร์คลอริคเข้มข้น 0.4 มิลลิลิตร และกรดไนตริก 0.3 มิลลิลิตรตามลำดับ ปั่นให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 คืนจากนั้นนำไปย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียล เพื่อไล่ควันสีเหลืองของ NO_2^- ออกหมด จึงปรับอุณหภูมิเป็น 210 องศาเซลเซียล ทิ้งไว้จนตัวอย่างแห้ง จากนั้นนำไปทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารละลายเจือจาง ($HCl:H_2O$ อัตรา 1:4) 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาตั้งบนเตาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีเพื่อไล่ Cl^- ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

3.2.2.3.3 ดูดตัวอย่างที่ย่อยมา 0.2 – 1.0 มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับส่วนของพืชที่นำมาวิเคราะห์ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร นำไปวัดปริมาณของโพแทสเซียมด้วยเครื่อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 766 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโพแทสเซียม

3.2.2.3.4 เตรียมสารละลายมาตรฐานของโพแทสเซียมปรับให้มีความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียม 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ของบริษัท Merck

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved