

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- พรศักดิ์ รักดีวารานนท์. 2543. ผลของโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อการเจริญเติบโตและการสะสมโปรตีน
โซเดียมไอออนและคลอไรด์ไอออนในถั่วเหลือง *Glycine max* (L.) Merrill. วิทยานิพนธ์
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาพฤกษศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นันทนา อังกินันท์ และ ศุภจิตรา ชัชวาลย์. 2543. คู่มือปฏิบัติการสรีรวิทยา. ภาควิชาพฤกษศาสตร์.
คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศิริพรรณ บรรหาร. 2543. การเปรียบเทียบการตอบสนองทางสรีรวิทยาบางประการของถั่วเหลือง
(*Glycine max* (L.) Merrill พันธุ์ สจ.5 และ มข.35 ต่อภาวะเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาพฤกษศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- อรุณศิริ กำลัง. 2525. อิทธิพลของเกลือแกงที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมไอออนต่างๆ
ของถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาปฐพีวิทยา. คณะเกษตร.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อัญชลี ใจดี. 2543. บทบาทของกรดแอมไบไซคิกจากภายนอกต่อการปรับตัวทางสรีรวิทยาบาง
ประการในถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาพฤกษศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Amzallag, G.N., Lerner, H.R. and Poljakoff-Mayber, A. 1990. Induction of increased salt tolerance
in *Soyghum* bicolor by NaCl pretreatment. *J. Exper. Bot.* 41 : 29-34.
- Amzallag, G.N., Seligmann, H. and Lerner, H.R. 1993. A developmental window for salt-
adaptation in *Sorghum bicolor*. *J. Exper. Bot.* 44 : 645-652.
- Aziz, A., Martin-Tanguy, J. and Larher, F. 1998. Stress-induced changes in polyamine and
tyramine levels can regulate proline accumulation in tomato leaf discs treated with
sodium chloride. *Physiol. Plant.* 104 : 195-202.

- Bate, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 39 : 205-207.
- Chiang, H.H., Dandekar, A.M. 1995. Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyng during development and in response to desiccation. *Plant Cell Environ.* 18 : 1280-1290.
- Debez, A., Chaibi, W. and Bouzid, S. 2001. Effect of NaCl and growth regulators on germination of *Atriplex halimus* L. *Agricultures*. 10 : 135-138.
- Delane, R., Greenway, G., Munns, R. and Gibbs, J. Ion concentration and carbohydrate status of the elongation leaf tissue of *Hordeum vulgare* growing at high external NaCl. *J. Exper. Bot.* 33 : 557-573.
- Delauney, A.J. and Verma, D.P.S. 1990. A soybean gene encoding Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. *Mol. Gen. Genet.* 221 : 299-305.
- Dierks-Ventling, C. and Tonelli, C. 1982. Metabolism of proline, glutamate, and ornithine in proline mutant root tip of *Zea mays* (L.). *Plant Physiol.* 69 : 130-134.
- Flowers, T.J., Duque, E., Hajibagheri, M.A., McGonigle, T.P. and Yeo, A.R. 1985. The effect of salinity on leaf ultrastructure and net photosynthesis of two varieties of rice : Further evidence for a cellular component of salt-resistance. *New Phytol.* 100 : 37-43.
- Fougere, F., Le Rudulier, D. and Streeter, J.G. 1991. Effects of salt stress on amino acid, organic acid and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 96 : 1228-1236.
- Francois, L.E., Donovan, T. and Maas, E.V. 1984. Salinity effects on seed yield, growth and germination of grain Sorghum. *Agron. J.* 76 : 741-744.
- Friedman, R., Altman, A. and Levin, N. 1989. The effect of salt stress on polyamine biosynthesis and content in mung bean and in halophytes. *Physiol. Plant.* 76 : 295-302.

- Fujita, T., Maggio, A., Garcia-Rios, M., Bressan, R.A. and Csonka, L.N. 1998. Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionary divergent genes for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato. *Plant Physiol.* **118** : 661-674.
- Ginzberg, I., Stein, H., Kapulnik, Y., Szabados, L., Strizhov, N., Schell, J., Koncz, C. and Ziberstein, A. 1998. Isolation and characterization of two different cDNAs of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. *Plant Mol. Biol.* **38**(5) : 755-764.
- Hu, C.-A.A., Delauney, A.J. and Verma, D.P.S. 1992. A bifunctional enzyme (delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyses the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** : 9354-9358.
- Hua, X.J. van de Cotte, B., Van Montagu, M. and Verbruggen, N. 1997. Developmental regulation of pyrroline-5-carboxylate reductase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **114** : 1215-1224.
- Igarashi, Y., Yoshiba, Y., Sanada, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K. and Shinozaki, K. 1997. Characterization of the gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. *Plant Mol. Biol.* **33** : 857-865
- Igarashi, Y., Yoshiba, Y., Takeshita, T., Nomura, S., Otomo, J., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2000. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding proline transporter in rice. *Plant Cell Physiol.* **41**(6) : 750-756.
- Kishor, P.B.K., Hong, Z., Miao, G.-H., Hu, C.-A.A. and Verma, D.P.S. 1995. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* **108** : 1387-1394.

- Kuznetsov, V.V. and Shevyakova, N.I. 1997. Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity; proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. *Physiol. Plant.* 100 : 320-336.
- Larosa, P.C., Rhodes, D., Rhodes, J.C., Bressan, R.A. and Csonka, L.N. 1991. Elevated accumulation of proline in NaCl-adapted tobacco cells is not due to altered Δ^1 -pyroline-5-carboxylate reductase. *Plant Physiol.* 96 : 245-250.
- Levitte, J. 1972. *Responses of plants to environmental stress.* Academic Press, New York. 697p.
- Liu, J. and Zhu, J.K. 1997. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 114 : 591-596.
- Liu, T. and Staden, J.V. 2001. Partitioning of carbohydrates in salt-sensitive and salt-tolerant soybean callus cultures under salinity stress and its subsequent relief. *Plant Growth Regul.* 33 : 13-17.
- Lutts, S., Majerus, V. and Kinet, J.-M. 1999. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiol. Plant.* 105 : 450-458.
- Maggio, A., Garcia-Rio, M., Fujita, T., Bressan, R.A., Joly, R.J., Hasegawa, P.M. and Csonka, L.N. 1996. Cloning of *tomPRO1* and *tomPRO2* from *Lycopersicon esculentum* L. : coexistence of polycistronic and monocistronic genes which encode the enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis. *Plant Physiol.* 112 : 862+
- Matthews, M.A. and Boyer, J.S. 1984. Acclimation of photosynthesis to low leaf water potential. *Plant Physiol.* 74 : 161-166.
- Mattioni, C., Lacerenza, N.G., Troccoli, A., De Leonardis, A.M. and Di Fonzo, N. 1997. Water and salt stress-induced alteration in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. *Physiol. Plant.* 101 : 787-792.

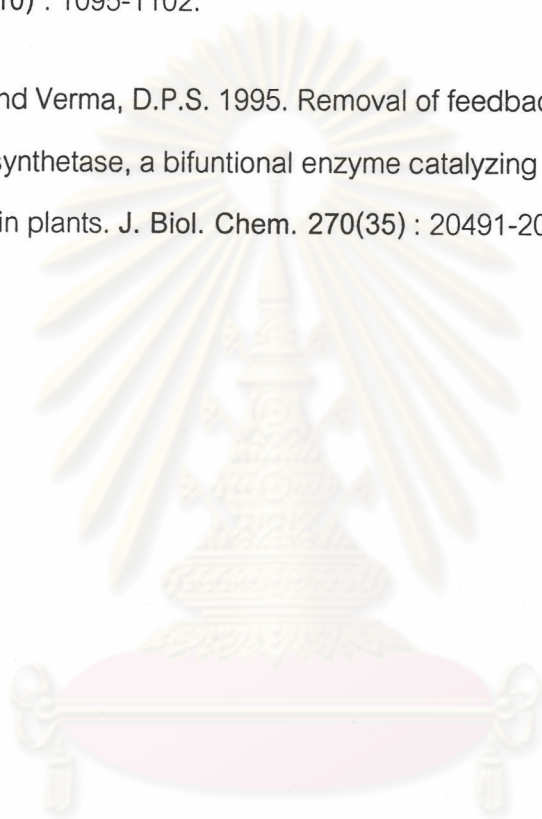
- Moftah, A.E. and Michel, B.E. 1987. The effect of sodium chloride on solute potential and proline accumulation in soybean leaves. *Plant Physiol.* 83 : 238-240.
- McNeil, S.D., Nuccio, M.L. and Hanson, A.D. 1999. Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol.* 120 : 945-949.
- Munns, R. and Termaat, A. 1986. Whole-plant responses to salinity. *Aust. J. Plant. Physiol.* 13 : 143-160.
- Peng, Z., Lu, Q. and Verma, D.P.S. 1996. Reciprocal regulation of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol. Gen. Genet.* 253 : 334-341.
- Rodri'guez, H.G., Roberts, J.K.M., Jordan, W.R. and Drew, M.C. 1997. Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. *Plant Physiol.* 113 : 881-893.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Springs Harbor, New York. : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shalhevet, J., Huck, M.G. and Schroeder, B.P. 1995. Root and shoot growth response to salinity in maize and soybean. *Agron. J.* 87 : 512-516.
- Stewart, G.R. and Lee, J.A. 1974. The role of proline accumulation in halophytes. *Planta.* 120 : 279-289.
- Strizhov, N., Abraham, E., Okresz, L., Blicking, S., Ziberstein, A., Schell, J., Koncz, C. and Szabados, L. 1997. Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by *ABA1*, *ABI1* and *AXR2* in *Arabidopsis*. *Plant J.* 12(3) : 557-569.
- Szoke, A., Miao, G.-H., Hong, Z. and Verma, D.P.S. 1992. Subcellular location of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase in root/nodule and leaf of soybean. *Plant Physiol.* 99 : 1642-1649.

- Taiz, L. and Zeiger, E. 1991. *Plant Physiology*. 1st ed. California. The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc.
- Treichel, S. 1986. The influence of NaCl on Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase in proline-accumulating cell suspension cultures of *Mesembryanthemum nodiflorum* and other halophytes. *Physiol. Plant.* 67 : 173-181.
- Tsonev, T.D., Lazova, G.N., Stoinova, Z.G., and Popova, L.P. 1998. A possible role for jasmonic acid in adaptation of barley seedlings to salinity stress. *J. Plant Growth Regul.* 17 : 153-159.
- Umezawa, T., Shimizu, K., Koto, M. and Ueda, T. 2000. Enhancement of salt tolerance in soybean with NaCl pretreatment. *Physiol. Plant.* 110 : 59-63.
- Ungar, I.A. 1974. The effect of salinity and temperature on seed germination and growth of *Hordeum jubatum*. *Can. J. Bot.* 52 : 1357-1362.
- Verbruggen, N., Villarroel, R. and Montagu, M.V. 1993. Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 103 : 771-781.
- Verslues, P.E. and Sharp, R.E. 1999. Proline accumulation in Maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potential : II Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. *Plant Physiol.* 119 : 1349-1360.
- Wignarajah, K., Jennings, D.H. and Handley, J.F. 1975. The effect of salinity on growth of *Phaseolus vulgaris* L.: I. Anatomical changes in the first trifoliate leaf. *Ann. Bot.* 39 : 1029-1038.
- Williamson, C.L. and Slocum, R.D. 1992. Molecular cloning and evidence for osmoregulation of the Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase (*proC*) gene in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* 100 : 1464-1470.

Yeo, A.R., Caporn, S.J.M. and Flowers, T.J. 1985. The effect of salinity upon photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) : Gas exchange by individual leaves in relation to their salt content. *J. Exper. Bot.* 36(169) : 1240-1248.

Yoshida, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 1997. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plant under water stress. *Plant Cell Physiol.* 38 (10) : 1095-1102.

Zhang, C.-S., Lu, Q. and Verma, D.P.S. 1995. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 270(35) : 20491-20496.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การเตรียมสารละลายธาตุอาหารสูตร 1/2 Hoagland's solution

1.1 เตรียมสารละลายธาตุอาหารโดยตวง stock solution ดังนี้

สารเคมี	ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตร)
1 M CaNO_3	15
1 M KNO_3	15
1 M MgSO_4	6
1 M KH_2PO_4	3
2.5 mg/l Fe-EDTA	6
Micronutrients	3

1.2 ค่อยๆ ละลาย stock solution แต่ละชนิดในน้ำกรอง และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 6 ลิตร ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5.8-6.0 ด้วย 1 N HCl

2. การเตรียม stock solution ของสารละลายธาตุอาหาร

สารเคมี	วิธีการ
1 M CaNO_3	- ชั่ง $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 236.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร
1 M KNO_3	- ชั่ง KNO_3 101.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร
1 M MgSO_4	- ชั่ง $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 246.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร
1 M KH_2PO_4	- ชั่ง KH_2PO_4 136.09 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร
2.5 mg/l Fe-EDTA	- ชั่ง EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 22.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 372 มิลลิลิตร - ชั่ง $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 13.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 728 มิลลิลิตร - เทสารละลายทั้งสองผสมกันที่ละน้อย และคนสารละลายตลอดเวลา จนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
Micronutrients	- ชั่ง H_3BO_3 2.86 กรัม $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 กรัม $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.81 กรัม ZnCl_2 0.11 กรัม และ $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.025 กรัม - ละลายสารเคมีในน้ำกลั่นทีละตัวแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. สูตรของสารละลายที่ใช้ในการศึกษายีน P5CS

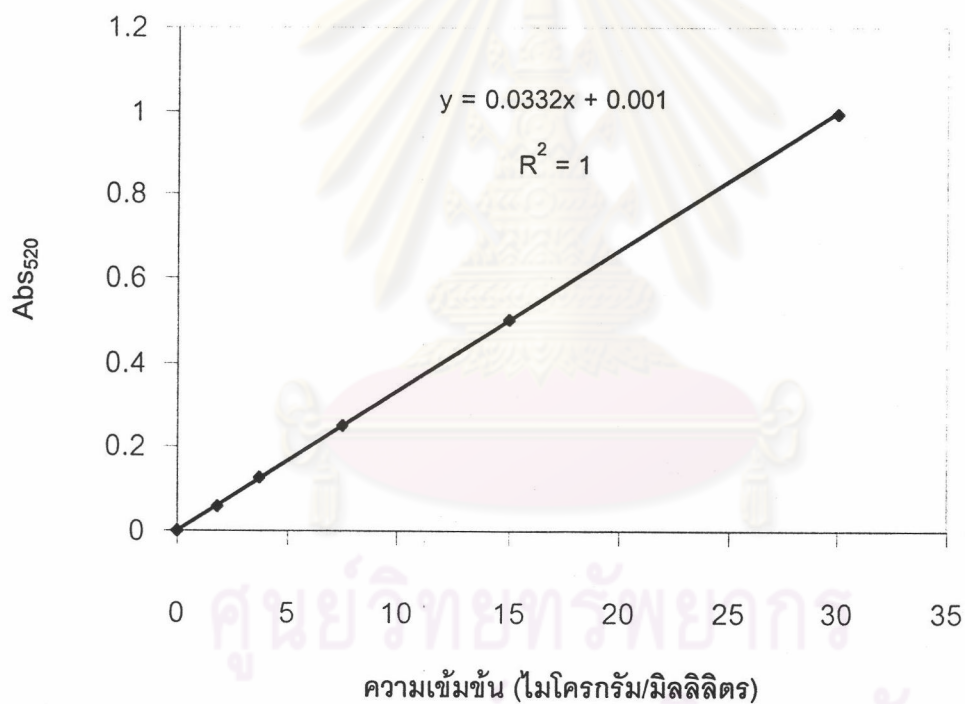
สารละลาย	ส่วนประกอบ
DNA extraction buffer (CTAB)	4% w/v CTAB 100 mM Tris pH 7.5 1.4 M NaCl 20 mM EDTA 0.1% β -mercaptoethanol
RNA extraction buffer	100 mM Tris pH 9.0 100 mM NaCl 20 mM EDTA 1% lauryl sarcosinate 0.1% β -mercaptoethanol 0.1% DEPC (diethyl pyrrocarbonate)
DNA loading dye	0.25% bromophenol blue 0.25% xylene cyanol FF 15% ficoll
RNA loading dye	50% glycerol 10 mM sodium phosphate (pH7.0) 0.25% bromophenol blue 0.25% xylene cyanol FF
Formaldehyde gel (100 ml)	1 g agarose in 70 ml water 20 ml formaldehyde 10 ml MOPS
10x MOPS	0.2 M MOPS 0.05 M sodium acetate 0.01 M EDTA

สารละลาย	ส่วนประกอบ
Denaturing buffer (for RNA) for total volume 20 ul	1 ul 10x MOP 3.5 ul 37% formaldehyde 10 ul 40% formamide 5.5 ul RNA sample
Depurination buffer	0.25 M HCl
Denaturization buffer	0.5 M NaOH 1.5 M NaCl
Nutualization buffer	0.5 M Tris HCl (pH 7.5) 1.5 M NaCl
Primary wash buffer	0.5x SSC pH 7.0 0.4% SDS 6M urea

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Bates และคณะ, 1973)

- 4.1 ชั่งน้ำหนักใบประมาณ 0.1 กรัม บดกับสารละลาย 3 % Sulfosalicylic acid ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร
- 4.2 กรองใบไม้ที่บดกับสารละลายในข้อ 4.1 ด้วย กระดาษกรองเบอร์ 1
- 4.3 เตรียมสารละลายโปรตีนความเข้มข้น 1.875, 3.75, 7.5, 15, 30 และ 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อทำกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน
- 4.4 นำสารละลายโปรตีนความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ และสารสกัดจากพืชที่กรองได้ในข้อ 3.2 มาอย่างละ 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง ทำปฏิกิริยาโดยเติม Glacial acetic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ Acid ninhydrin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 4.5 หยุดปฏิกิริยาโดยแช่หลอดที่ผ่านการต้มแล้วในน้ำแข็งทันที

- 4.6 เติม Toluene 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่หยุดปฏิกิริยาแล้ว เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex Mixer เป็นเวลาอย่างน้อย 20 วินาที
- 4.7 ดูดสารละลาย Toluene ชั้นบนที่มี chromophore สีชมพูหรือสีแดง มาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm
- 4.8 นำค่า Absorbance ที่อ่านได้ของสารละลายโพรลีนที่ทราบความเข้มข้น มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโพรลีนกับค่า Absorbance (กราฟมาตรฐานของโพรลีน แสดงดังรูปที่ 1ก)
- 4.9 คำนวณค่าความเข้มข้นของโพรลีนในสารสกัดจากพืชโดยเปรียบเทียบค่า Absorbance ที่อ่านได้กับกราฟมาตรฐานของโพรลีน



รูปที่ 1ก กราฟมาตรฐานของโพรลีน

5. วิธีการสกัด DNA ด้วยวิธี CTAB

- 5.1 บดเนื้อเยื่อพืชประมาณ 0.5-1 กรัม กับไนโตรเจนเหลว ให้เป็นผงละเอียดสีขาวด้วยโกร่งบดที่นิ่งมาซื้อแล้ว
- 5.2 เติม CTAB buffer โดยใช้อัตราส่วน 5 มิลลิลิตร ต่อเนื้อเยื่อพืช 1 กรัม ผสมให้เข้ากัน
- 5.3 เทส่วนผสมทั้งหมดใส่ในหลอดพลาสติกปริมาตร 15 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิด
- 5.4 incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- 5.5 เติม Chloroform ปริมาตรเท่ากับส่วนผสมที่อยู่ในหลอด ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมา
- 5.6 บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูสารละลายชั้นบนใสหลอดใหม่
- 5.7 สกัดซ้ำด้วย Phenol Chloroform Isoamyl โดยใช้ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่ดูมา
- 5.8 บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที และดูสารละลายชั้นบนใสหลอดใหม่
- 5.9 เติม Isopropanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายในหลอด ผสมให้เข้ากันโดยใช้วิธีพลิกหลอดกลับไปกลับมา
- 5.10 บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที
- 5.11 เท Isopropanol ออกแล้วล้างด้วย 70 % Ethanol ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร
- 5.12 เท Ethanol ออกแล้วปล่อยให้ Ethanol ระเหยจนหมด (air dried)
- 5.13 ละลาย DNA ในหลอดด้วย TE buffer (ปริมาตรที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณ DNA ที่สกัดได้)
- 5.14 วัดความเข้มข้นของสารละลายด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

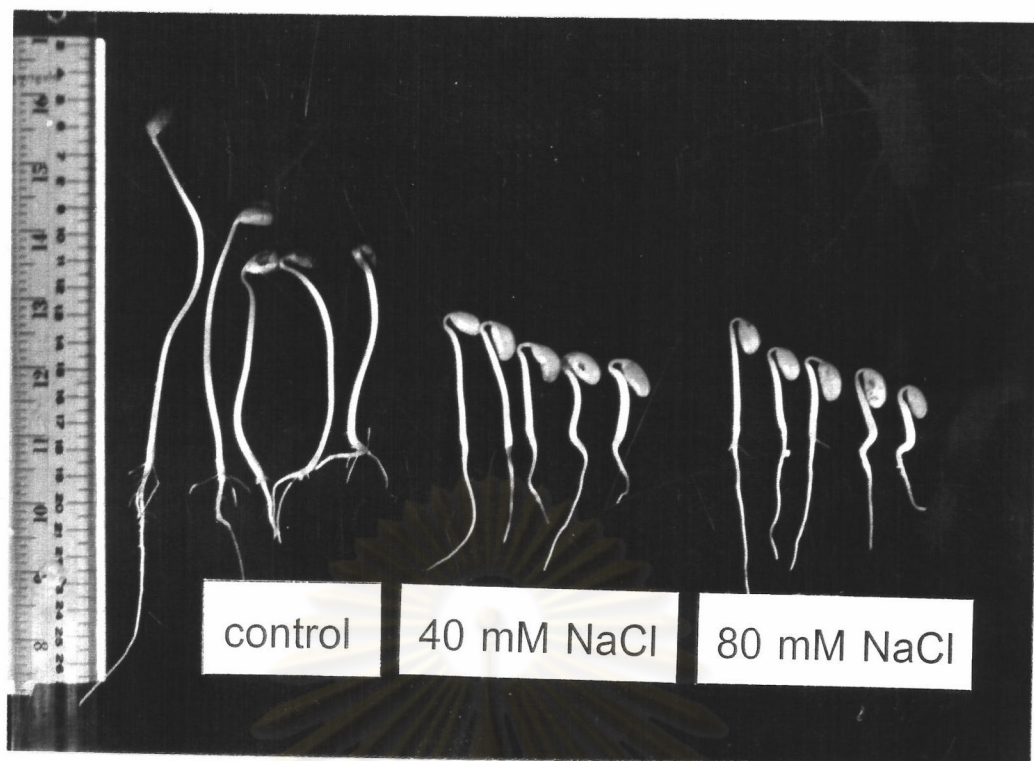
6. วิธีการสกัด RNA ด้วยวิธี Hot phenol

- 6.1 บดเนื้อเยื่อพืช ประมาณ 0.2 กรัม กับไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงสีขาว ตักใส่หลอดเซินตริฟิวจ์ (ที่บรรจุ extraction buffer กับ phenol-chloroform อย่างละ 400 ไมโครลิตร ซึ่งอุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส) แล้วเขย่าให้เข้ากัน แช่ลงในน้ำแข็ง
- 6.2 ปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
- 6.3 ดูดสารละลายชั้นบนใส่ในหลอดใหม่
- 6.4 สกัดซ้ำด้วย phenol-chloroform ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
- 6.5 ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่ เติม 95% ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่มี รอให้ตกตะกอนโดยแช่เย็นในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย ½ ชั่วโมง
- 6.6 ปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
- 6.7 เท ethanol ที่ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- 6.8 ละลายตะกอน RNA ด้วย TE buffer (ที่ผ่านการกำจัด RNase แล้ว) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
- 6.9 เติม TE buffer 60 ไมโครลิตร และ 10 M LiCl2 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร
- 6.10 เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน
- 6.11 ปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
- 6.12 เทสารละลายทิ้ง ตกตะกอน RNA ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- 6.13 ละลายตะกอน RNA ด้วย TE buffer (ที่ผ่านการกำจัด RNase แล้ว)

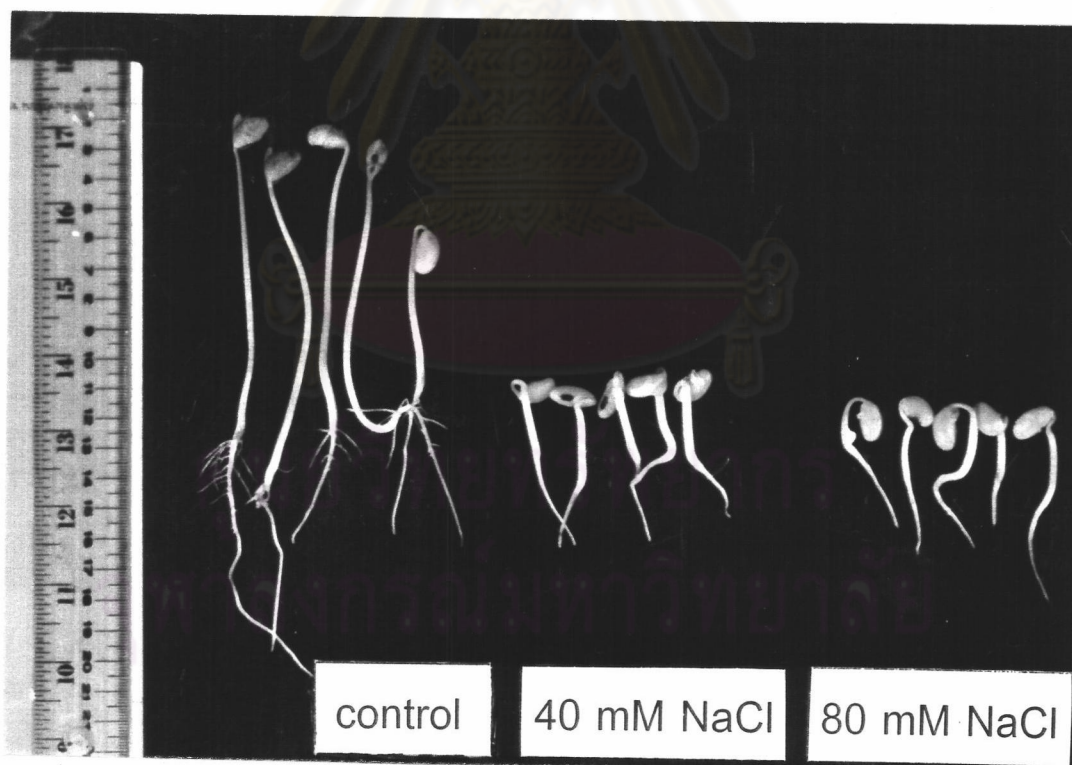


ภาคผนวก ข

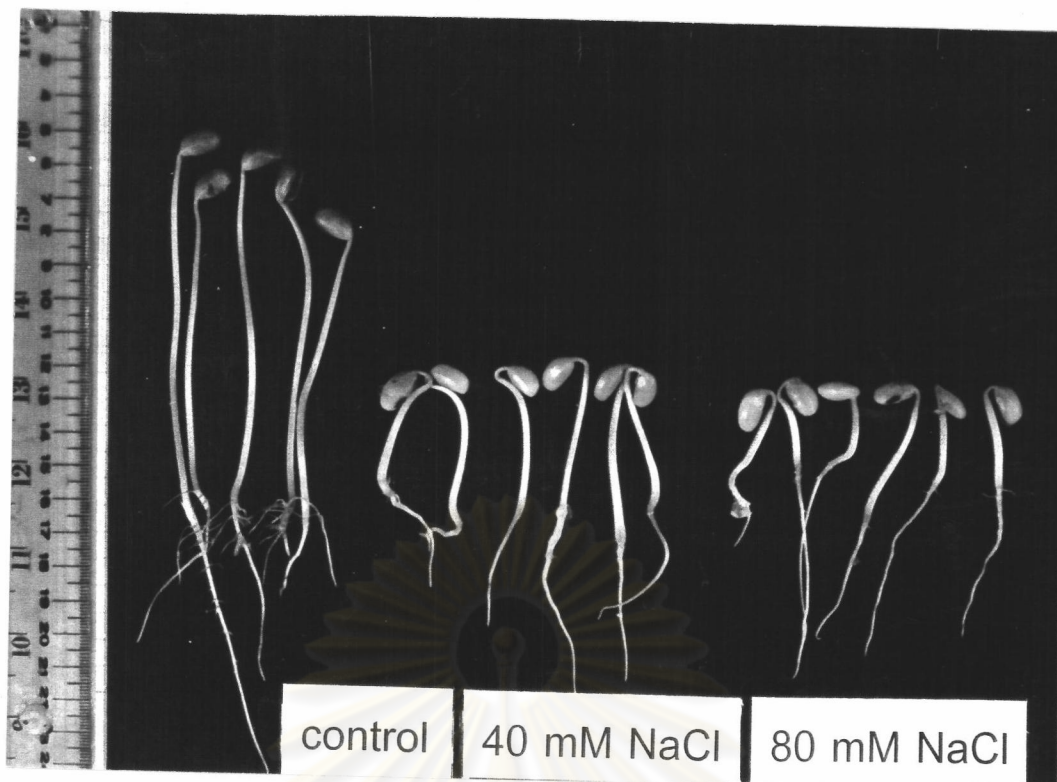
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



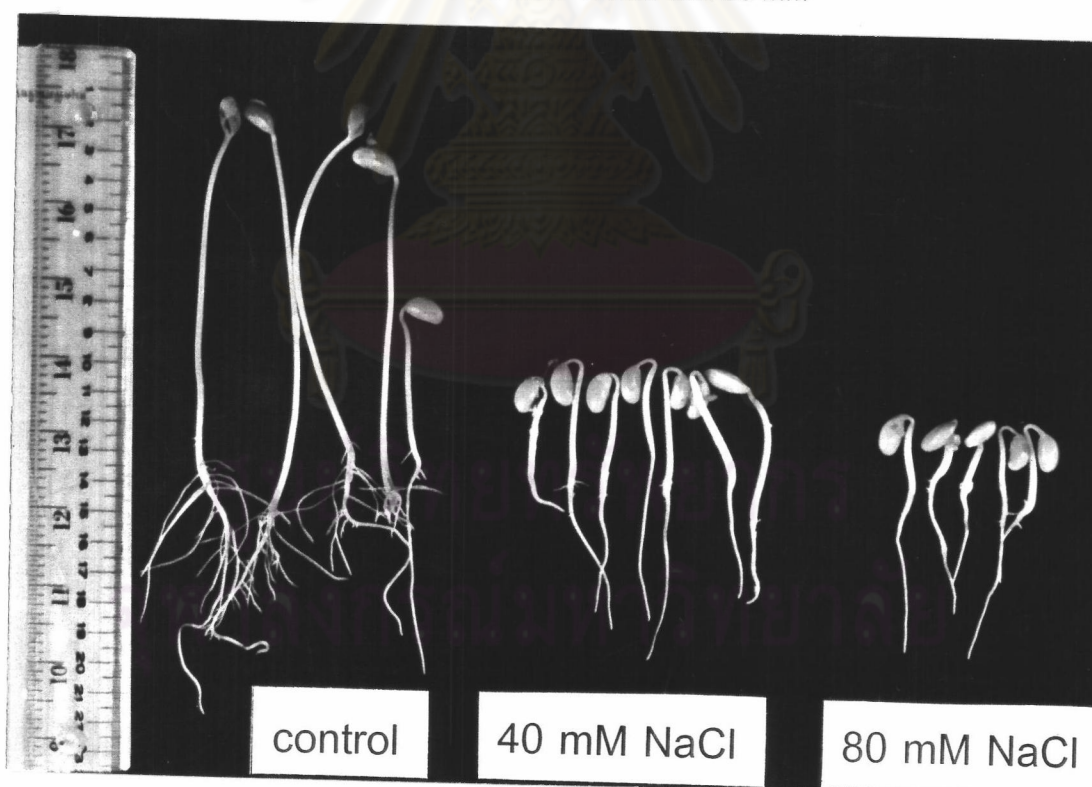
รูปที่ 1ข ต้นกล้าข้าวเหลืองพันธุ์ สจ.5 ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในน้ำกรอง (control) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 40 mM และ 80 mM



รูปที่ 2ข ต้นกล้าข้าวเหลืองพันธุ์ มข.35 ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในน้ำกรอง (control) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 40 mM และ 80 mM



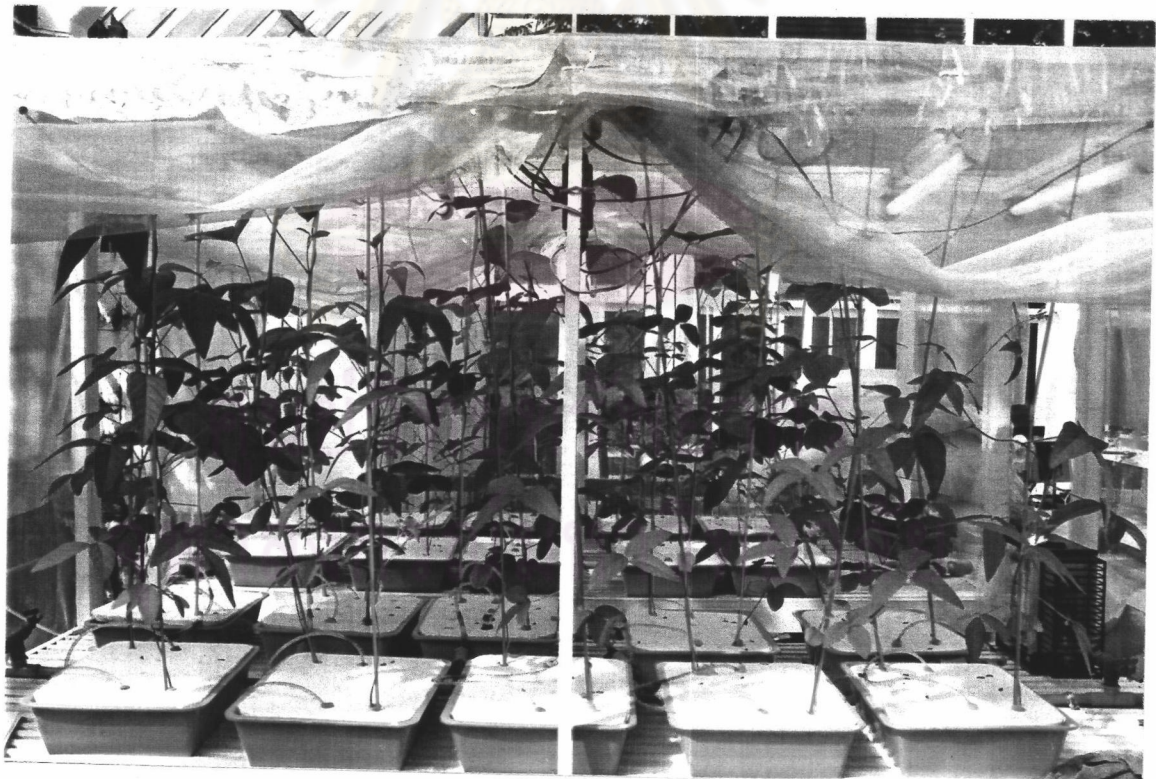
รูปที่ 3ข ต้นกล้าถั่วเหลืองพันธุ์ สท.2 ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในน้ำกรอง (control)
สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 40 mM และ 80 mM



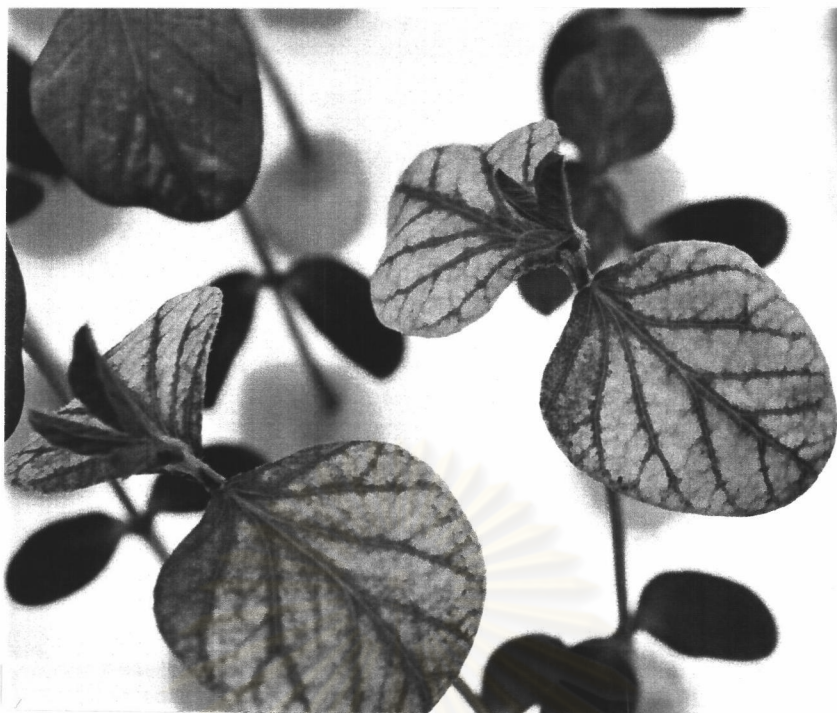
รูปที่ 4ข ต้นกล้าถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในน้ำกรอง (control)
สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 40 mM และ 80 mM



รูปที่ 5ข วิธีการเพาะเมล็ดถั่วเหลืองในภาชนะต่างๆ



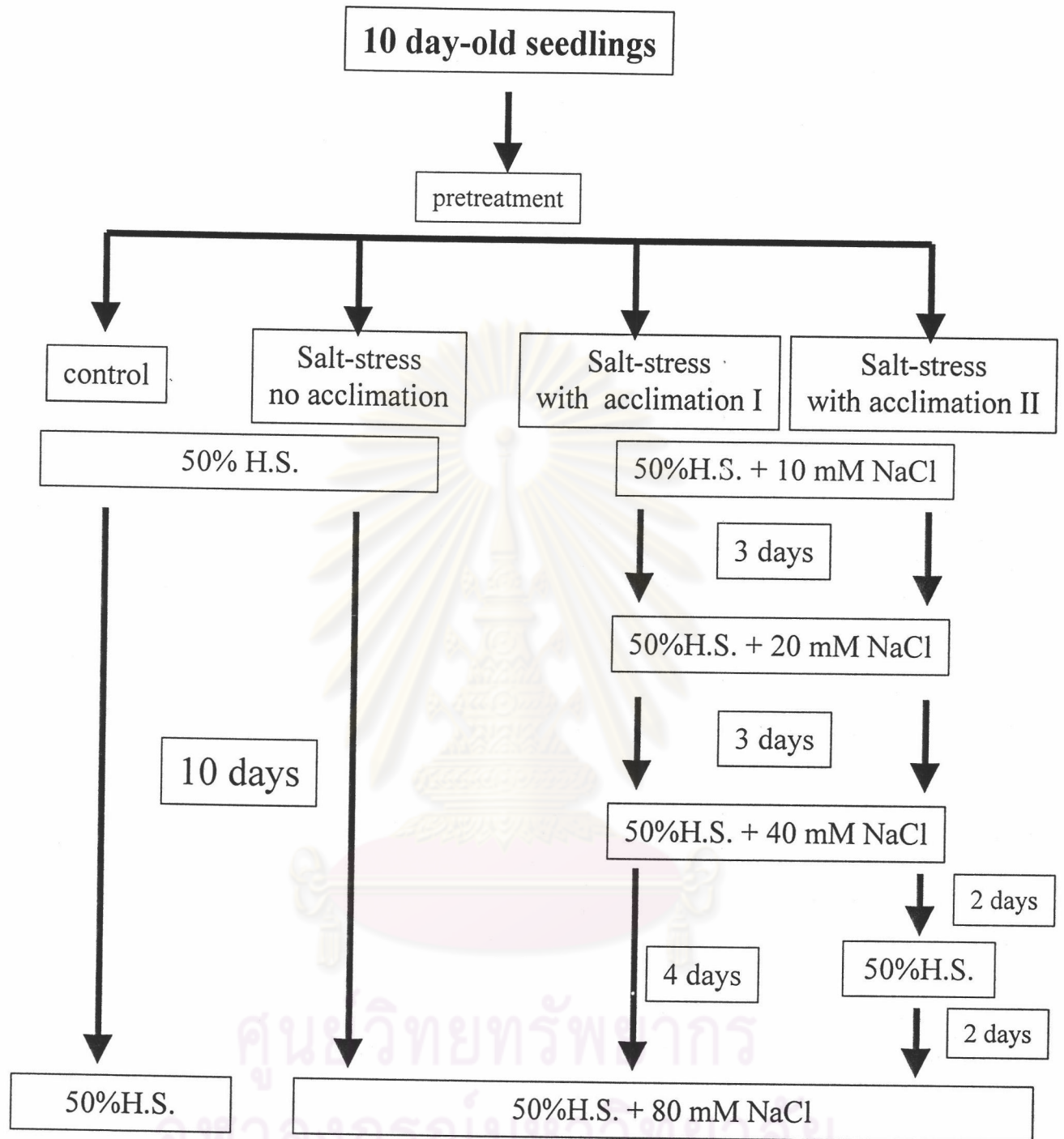
รูปที่ 6ข ลักษณะโรงเรือนที่ใช้ทำการทดลอง



รูปที่ 7ข อาการขาวซีดระหว่างเส้นใบ (bleaching) ที่พบในใบของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ด
ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ทั้งสองความเข้มข้น



รูปที่ 8ข ลักษณะใบใหม่เป็นจุดและขอบใบม้วนที่พบในใบ trifoliate ที่สองนับจากโคนต้น
ของถั่วเหลืองพันธุ์ สท.2 ที่ได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 12 วัน



รูปที่ 9๗ ไดอะแกรมแสดงวิธีการให้โซเดียมคลอไรด์แอกคลิเมชัน (ตามวิธีการศึกษาในข้อ 2.5.1.2)

50%H.S. ; 50%Hoagland's solution

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวฐปนา อัครเอกปัญญา เกิดวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ.2517 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพฤษศาสตร์ ภาควิชาพฤษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2538 หลังจากนั้นเข้ารับราชการในภาควิชาพฤษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ในปี 2539 จนถึงปัจจุบัน ในขณะเดียวกัน เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพฤษศาสตร์ ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ.2541



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย