บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. พืชทดลอง

เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) 4 พันธุ์ คือ พันธุ์ สจ.5 มข.35 สท.2 และ ชม.60

2. วัสดุอุปกรณ์

2.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกถั่วเหลือง

- กะบะพลาสติกขนาดกว้าง x ยาว x ลึก เท่ากับ 32 x 38 x 8 เซนติเมตร3
- สารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland's ซึ่งนำมาดัดแปลงตามวิธีการเตรียมของ นันทนา อังกินันทน์ และศุภจิตรา ชัชวาลย์ (2543)
- เครื่องวัดการนำไฟฟ้า (Digital conductivity meter)
- เครื่องวัด pH (pH meter)
- ปั๊มลมและสายยาง
- โฟม ฟองน้ำและก้านลูกโป่งสำหรับยึดต้นพืช
- 10 % clorox

2.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของพืช

- ตู้อบตัวอย่างพืช (Hot air oven)
- ตู้ดูดความชื้น (Dessicator)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่งของกรัม
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่งของกรัม

2.3 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโพรลีน

- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (Deep freezer) อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส

- ไมโครไปเปต (Micropipette)
- แท่นให้ความร้อนและคนสาร (Hot plate & stirrer)
- โกร่งบด
- กระดาษกรองเบอร์ 1
- หลอดทดลองขนาดต่างๆ
- ไนโตรเจนเหลวสำหรับแช่ตัวอย่าง
- 3% Sulfosalicylic acid
- Acid ninhydrin
- Glacial acetic acid
- 6 M Phosphoric acid
- Toluene

2.4 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษายีนและการแสดงออกของยีน *P5CS*

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Microcentrifuge)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)
- ไมโครไปเปต (Micropipette)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับทำ Hybridization (Hybridization oven)
- เครื่องกำเนิดแสง UV (UV transluminater)
- กล้องถ่ายภาพโพลารอยด์
- ชุดแยก DNA และ RNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (DNA, RNA gel electrophoresis)
- ตู้อบ (Oven 180 องศาเซลเซียส)
- ตู้อบ (Oven 80 องศาเซลเซียส)
- เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer)
- ตู้เย็น อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (Deep freezer) อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส
- หลอด microcentrifuge

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- แผ่นเมมเบรน (Hybond N^+, Amersham Pharmacia Biotech UK Limited)
- x-ray film (general purpose blue)

2.5 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA

- DNA extraction buffer (CTAB) (ดูในภาคผนวก ก)
- ไนโตรเจนเหลวสำหรับบดตัวอย่าง
- Chloroform
- Phenol
- Isopropanol
- 70% และ 95% Ethanol
- TE buffer

2.6 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA

- RNA extraction buffer (ดูในภาคผนวก ก)
- Phenol : Chloroform (1:1)
- 95% Ethanol
- 10 M $LiCl_2$
- TE buffer

2.7 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Southern และ Northern Hybridization

- agarose
- DNA marker
- RNA marker
- 5x TBE (tris borate EDTA)
- 10x MOP
- Loading dye for DNA
- Loading dye for RNA
- Ethidium bromide

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- 37% formaldehyde
- 40% formamide
- 20x SSC
- ECL labeling and detection kit (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited)
- Depurituration buffer
- Denatualization buffer
- Neutualization buffer
- Primary wash buffer
- สารเคมีที่ใช้ในการล้างฟิล์ม (developer และ fixer)

2. **วิธีการทดลอง**

ทุกการทดลองใช้ถั่วเหลืองทั้งหมด 4 พันธุ์ คือ พันธุ์ สจ.5 มข.35 สท.2 และ ชม.60 ยกเว้นบางการทดลองซึ่งระบุไว้

2.1 การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการงอกของเมล็ดและขนาดของต้นกล้าถั่วเหลือง

2.1.1 วิธีการเพาะเมล็ด

2.1.1.1 คัดเลือกเมล็ดถั่วเหลืองให้มีความสม่ำเสมอ เลือกเมล็ดที่เสียทิ้งไป

2.1.1.2 ฟอกเมล็ดด้วย 10 % Chlorox เป็นเวลา 5-10 นาทีเพื่อฆ่าเชื้อ แล้วล้างให้สะอาดด้วยน้ำ 3-4 ครั้ง

2.1.1.3 นำเมล็ดมาเรียงให้เป็นแถวประมาณ 4 แถวๆ ละ 6-8 เมล็ด บนกระดาษกรองหรือกระดาษทิชชูขนาดประมาณ 20 x 25 เซนติเมตรที่ทำให้ชื้นด้วยน้ำ (ชุดควบคุม) หรือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (40 และ 80 mM) แล้ววางกระดาษอีกแผ่นหนึ่งปิดทับ ม้วนกระดาษเป็นทรงกระบอก นำไปตั้งในภาชนะที่มีน้ำหรือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นเดียวกัน

2.1.1.4 วางภาชนะที่มีม้วนกระดาษเพาะเมล็ดนี้ที่อุณหภูมิห้องและมีความเข้มแสงประมาณ 2 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ โดยครอบภาชนะด้วยครอบแก้วหรือถุงพลาสติกเพื่อป้องกันไม่ให้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เปลี่ยนแปลง

2.1.1.5 ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำโดยแต่ละซ้ำใช้เมล็ดถั่วเหลืองจำนวน 100 เมล็ด

2.1.2 วิธีการศึกษาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด

เพาะเมล็ดตามวิธีการในข้อ 2.1.1 หลังจากเพาะเมล็ดเป็นเวลา 5 วัน นับจำนวนเมล็ดที่งอกโดยสังเกตจากรากอ่อนที่แทงออกมาจากเมล็ด นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด

2.1.3 วิธีการศึกษาขนาดของต้นกล้า

สุ่มเลือกเมล็ดที่งอกในข้อ 2.1.2 จำนวน 50 เมล็ด นำมาวัดความยาวต้น และความยาวรากเป็นเซนติเมตร

2.1.4 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์สถิติ

การศึกษาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด ใช้ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ดในการวิเคราะห์ข้อมูล และสำหรับการศึกษาขนาดของต้นกล้า วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD)

2.2 การศึกษาผลของภาวะเค็มในระยะเพาะเมล็ดถึงระยะต้นกล้าในถั่วเหลืองที่มีต่อการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำภายในต้นพืชของถั่วเหลือง

2.2.1 การปลูกพืชทดลองและการให้ภาวะเค็ม

2.2.1.1 เพาะเมล็ดตามวิธีการเพาะเมล็ดในข้อ 2.1.1

2.2.1.2 หลังจากเพาะเมล็ดเป็นเวลา 5 วัน ย้ายปลูกต้นกล้าลงในสารละลายธาตุอาหารโดยให้ต้นกล้าได้รับภาวะเดิมที่ได้รับตอนเพาะเมล็ด ทำโดยคัดเลือกต้นกล้าที่มีขนาดต้นใกล้เคียงกันนำไปปลูกในกระบะสี่เหลี่ยมขนาด 32 x 38 x 8 เซนติเมตร^3 ที่บรรจุสารละลายธาตุอาหารสูตร 1/2 Hoagland's (ชุดควบคุม) (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ก) หรือสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นเดียวกันกับตอนที่เพาะเมล็ด (40 และ 80 mM) ปริมาตร 6 ลิตร โดยยึดต้นกล้าด้วยฟองน้ำวางบนแผ่นโฟมที่เจาะรูให้รากต้นกล้าสัมผัสกับสารละลายธาตุอาหาร ที่พ่นฟองอากาศตลอดเวลา ให้แต่ละกระบะมีต้นกล้าประมาณ 50 ต้น

2.2.1.3 วางกระบะไว้ในเรือนทดลองที่มีแสงตามธรรมชาติ และมีหลังคากันน้ำฝนหรือน้ำจากภายนอกที่จะมีผลต่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง ควบคุมระดับของสารละลายธาตุอาหารโดยเติมน้ำให้สารละลายธาตุอาหารอยู่ในระดับเดียวกับตอนเริ่มต้นการทดลองทุกวัน ปรับ pH ของสารละลายธาตุอาหารให้มีค่าประมาณ 5.8-6.0 ทุก 3 วัน และเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารใหม่ทุกสัปดาห์

2.2.1.4 หลังจากปลูกต้นกล้าถั่วเหลืองในภาวะดังกล่าวเป็นเวลา 14 วัน สิ้นสุดการให้ภาวะเค็มโดยย้ายปลูกต้นกล้าลงในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ ให้แต่ละกระบะมีต้นกล้าถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ที่ได้รับภาวะเค็มทั้ง 2 ระดับ (40 และ 80 mM) อยู่รวมกันกับต้นกล้าชุดควบคุม รวมมีต้นกล้าจำนวน 12 ต้นต่อกระบะ

2.2.1.5 เก็บผลการทดลองโดยวัดการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำภายในต้นพืช หลังจากสิ้นสุดภาวะเค็มเป็นเวลา 0 4 8 และ 12 วัน

2.2.2 วิธีการวัดการเจริญเติบโต

เก็บตัวอย่างพืชมาแยกส่วนต้นและราก นำมาชั่งน้ำหนักสด จากนั้นนำไปอบในตู้อบตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง ปล่อยให้ตัวอย่างพืชเย็นลงในตู้ดูดความชื้น แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้งของต้นและรากด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.2.3 วิธีการวัดปริมาณน้ำภายในต้นพืช

นำค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งที่ได้จากข้อ 2.2.2 มาคำนวณหาปริมาณน้ำภายในต้นพืชจากสูตร

$$\text{ปริมาณน้ำในต้นพืช (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักสด} - \text{น้ำหนักแห้ง}) \times 100}{\text{น้ำหนักสด}}$$

2.2.4 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์สถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันในระยะเพาะเมล็ดจนถึงระยะต้นกล้าที่มีต่อการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง

2.3.1 การปลูกพืชทดลองและการให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชัน

2.3.1.1 เพาะเมล็ดเช่นเดียวกับวิธีการเพาะเมล็ดในข้อ 2.1.1 (เป็นการให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันในระยะเพาะเมล็ด)

2.3.1.2 หลังจากเพาะเมล็ดเป็นเวลา 5 วัน ทำการให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันต่อเนื่องในระยะต้นกล้า โดยปฏิบัติเช่นเดียวกันกับวิธีการทดลองข้อ 2.2.1.2 และ 2.2.1.3

2.3.1.3 เมื่อถั่วเหลืองได้รับภาวะดังกล่าวเป็นเวลา 14 วัน นำต้นกล้าที่ได้มาปลูกในภาวะเค็มที่ระดับ 80 mM โดยแบ่งต้นกล้าออกเป็น 3 ชุด ตามระดับของการให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชัน ดังนี้

ชุดทดลองที่ 1 คือ ต้นกล้าที่ไม่ได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชัน

ชุดทดลองที่ 2 คือ ต้นกล้าที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันระดับ 40 mM ในระยะเพาะเมล็ดและระยะต้นกล้า ก่อนได้รับภาวะเค็มระดับ 80 mM

ชุดทดลองที่ 3 คือ ต้นกล้าที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันระดับ 80 mM ในระยะเพาะเมล็ดและระยะต้นกล้า ก่อนได้รับภาวะเค็มระดับ 80 mM

เปรียบเทียบชุดทดลองทั้งสามชุดกับ**ชุดควบคุม** ซึ่งเป็นต้นกล้าถั่วเหลืองไม่ได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันและภาวะเค็มที่ระดับ 80 mM

2.3.1.4 วัดการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองหลังจากได้รับภาวะเค็ม 80 mM เป็นเวลา 0 4 8 และ 12 วันตามวิธีการในข้อ 2.2.2

2.3.2 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์สถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

2.4 การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันในระยะเพาะเมล็ดที่มีต่อการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง (การทดลองนี้ใช้ถั่วเหลืองเพียง 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ สจ.5 และ มข.35)

2.4.1 การปลูกพืชทดลองและการให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชัน

2.4.1.1 เพาะเมล็ดตามวิธีการเพาะเมล็ดในข้อ 2.1.1 (เป็นการให้โซเดียมคลอไรด์แอค-คลิเมชันในระยะเพาะเมล็ด)

2.4.1.2 หลังจากเพาะเมล็ดเป็นเวลา 5 วัน สิ้นสุดการให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันในระยะเพาะเมล็ด โดยคัดเลือกต้นกล้าที่มีขนาดต้นใกล้เคียงกันนำไปปลูกในกะบะสี่เหลี่ยมขนาด 32 x 38 x 8 เซนติเมตร^3 บรรจุสารละลายธาตุอาหาร 1/2 Hogaland's ที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 6 ลิตร โดยให้แต่ละกะบะมีต้นกล้าประมาณ 50 ต้น ควบคุมปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมตามวิธีการในข้อ 2.2.1.3

2.4.1.3 หลังจากสิ้นสุดการให้โซเดียมแอคคลิเมชันเป็นเวลา 14 วัน ย้ายปลูกถั่วเหลืองให้ได้รับภาวะเค็มที่ระดับ 80 mM โดยมีชุดทดลองต่างๆ ที่เปรียบเทียบกับ **ชุดควบคุม** (ที่ปลูกในภาวะปกติโดยไม่ได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันและภาวะเค็มตลอดการทดลอง) ดังนี้

ชุดทดลองที่ 1 คือ ต้นกล้าที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันระดับ 40 mM ในระยะเพาะเมล็ดก่อนได้รับภาวะเค็มระดับ 80 mM

ชุดทดลองที่ 2 คือ ต้นกล้าที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันระดับ 80 mM ในระยะเพาะเมล็ดก่อนได้รับภาวะเค็มระดับ 80 mM

2.4.1.4 เก็บผลการทดลองหลังจากให้ภาวะเค็มระดับ 80 mM เป็นเวลา 0 4 8 และ 12 วัน โดยวัดการเจริญเติบโต ตามวิธีการในข้อ 2.2.2 ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4.2 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์สถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

2.5 การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันในระยะต้นกล้าที่มีต่อการเจริญเติบโตและการสะสมโพรลีนของถั่วเหลือง

2.5.1 การปลูกพืชทดลองและการให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชัน

2.5.1.1 เพาะเมล็ดถั่วเหลืองเช่นเดียวกันกับวิธีในข้อ 2.1.1 โดยเพาะในน้ำเปล่าทั้งหมด

2.5.1.2 เมื่อต้นกล้ามีอายุ 5 วัน ย้ายปลูกลงในน้ำเปล่าอีกเป็นเวลา 5 วัน รวมอายุต้นกล้า 10 วันนับจากวันเพาะเมล็ด หลังจากนั้นให้ภาวะต่างๆ ดังนี้ (ดูแผนผังในภาคผนวก ข)

ชุดควบคุม คือ ต้นกล้าที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 1/2 Hoagland's ที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ตลอดการทดลอง

ชุดที่ได้รับภาวะเค็มโดยไม่ได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชัน คือ ต้นกล้าที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 1/2 Hoagland's เป็นเวลา 10 วัน หลังจากนั้นให้ภาวะเค็มโดยย้ายปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 80 mM

ชุดที่ได้รับแอคคลิเมชันแบบที่ 1 คือ ต้นกล้าที่ได้รับภาวะเค็มเพิ่มขึ้นทีละน้อยก่อนได้รับภาวะเค็ม 80 mM เริ่มด้วยการปลูกในสารละลายธาตุอาหาร 1/2 Hoagland's ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10 mM เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นย้ายลงปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นเป็น 20 mM เป็นเวลา 3 วัน และย้ายลงปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 40 mM เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นให้ภาวะเค็มโดยย้ายลงปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 80 mM (รวมระยะเวลาที่ให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชัน 10 วัน)

ชุดที่ได้รับแอคคลิเมชันแบบที่ 2 คือ ต้นกล้าที่ได้รับภาวะเค็มเพิ่มขึ้นทีละน้อยเช่นเดียวกันกับชุดที่ได้รับแอคคลิเมชันแบบที่ 1 แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ถึงระดับความเข้มข้น 40 mM แล้วเพียง 2 วัน จะย้ายกลับมาปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 2 วัน ก่อนให้ภาวะเค็มโดยย้ายลงปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 80 mM (รวมระยะเวลาที่ให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชัน 10 วัน)

ควบคุมปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมตลอดระยะเวลาทดลองตามวิธีการในข้อ 2.2.1.3

2.5.1.3 หลังจากได้รับภาวะเค็ม 80 mM เป็นเวลา 12 วัน ย้ายปลูกถั่วเหลืองทั้ง 4 ชุด กลับสู่ภาวะปกติ โดยให้สารละลายอาหารที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์เป็นระยะเวลา 12 วัน

2.5.1.4 เก็บผลการทดลองหลังจากถั่วเหลืองได้รับภาวะเค็ม 80 mM เป็นเวลา 0 4 8 12 วัน และหลังจากสิ้นสุดภาวะเค็มเป็นเวลา 12 วัน โดยวัดการเจริญเติบโตและปริมาณโพรลีนในใบ

2.5.2 วิธีการวัดการเจริญเติบโต

วัดการเจริญเติบโตโดยนำต้นพืชที่ได้มาแยกส่วนใบ ลำต้นและราก ชั่งน้ำหนักสดแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง ปล่อยให้ตัวอย่างเย็นลงในตู้ดูดความชื้น จากนั้นนำมาชั่งหาค่าน้ำหนักแห้งของต้น (ใบ + ลำต้น) และราก ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.5.3 การวัดปริมาณโพรลีน

2.5.3.1 นำใบประกอบ trifoliated ใบที่สองนับจากโคนต้นมาชั่งน้ำหนักสดประมาณ 0.1 กรัม นำไปแช่ลงในไนโตรเจนเหลวทันที และรวบรวมตัวอย่างเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2.5.3.2 เมื่อรวบรวมตัวอย่างได้ครบแล้ว ทำการวิเคราะห์ปริมาณโพรลีนด้วยวิธี Acid inhydrin ตามวิธีของ Bates และคณะ (1973) (วิธีการวิเคราะห์โดยละเอียด ระบุในภาคผนวก ก) คำนวณปริมาณโพรลีนเป็นมิลลิกรัมต่อกรัม

ของน้ำหนักแห้งใบ (เทียบเคียงน้ำหนักแห้งจากค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของพืช)

2.5.4 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์สถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 5 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

2.6 การศึกษาจำนวนยีนในยีนแฟมิลีของ *P5CS* และการแสดงออกของยีน *P5CS* ในถั่วเหลืองเมื่อได้รับอิทธิพลของโซเดียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชัน

2.6.1 การศึกษาจำนวนยีนและจำนวนชุดของยีน *P5CS* โดยใช้วิธี Southern Blot Analysis

2.6.1.1 เพาะเมล็ดถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.1.1 โดยใช้น้ำเปล่าทั้งหมด

2.6.1.2 เมื่อต้นกล้าถั่วเหลืองมีอายุ 10 วัน (นับจากวันเพาะ) สกัด DNA จากใบอ่อนคู่แรกของกล้าถั่วเหลืองโดยวิธี CTAB (ตามวิธีการดังแสดงในภาคผนวก ก)

2.6.1.3 ย่อยสาย DNA ที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) *Hind III* โดยใช้ปริมาณ DNA สุทธิ 100 ไมโครกรัม

2.6.1.4 นำ DNA ที่ได้ทำการย่อยแล้วมาแยกแถบ DNA ด้วยเครื่องแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้ความต่างศักย์ 40 โวลต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ใน 0.8 % agarose gel หลังจากนั้นนำเจลที่ได้มาทำ Southern blot ตามวิธีของ Sambrook, Fritsch และ Maniatis (1989)จากข้อ 2.6.1.4 นำมาทำ Hybridization โดยใช้ ECL labelling and detection kit RPN3000 kit (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited) ซึ่งเป็นระบบที่ไม่ใช้สารกัมมันตรังสี (non-radioactive system) และใช้ *P5CS* cDNA ของ mothbean (*Vigna aconitifolia*) (Hu, Delauney และ Verma, 1992) เป็น probe ใช้อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในการทำ hybridization และล้างด้วย primary wash buffer 20 นาที ที่ 42 องศาเซลเซียส 2 ครั้ง และ secondary wash buffer 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง

2.6.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* ในใบถั่วเหลือง

2.6.2.1 สกัด RNA จากใบถั่วเหลืองใบเดียวกันกับที่ใช้ในการวิเคราะห์โพรลีนจากการทดลองในข้อ 2.5.3 โดยวิธี Hot phenol (ตามวิธีการดังแสดงในภาคผนวก ก)

2.6.2.2 นำ RNA ที่ได้มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *P5CS* โดยวิธี Northern blot analysis ตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989)

2.6.2.3 แยกแถบ mRNA ด้วยเครื่องแยก RNA ด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้ 1% formaldehyde gel ใน RNA running buffer (1x MOPs) ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

2.6.2.4 วิเคราะห์ RNA โดยใช้วิธีการและสภาวะในการทำ Hybridization เช่นเดียวกันกับในการทดลองข้อ 2.6.1.5 และใช้ *P5CS* cDNA ของ mothbean เป็น probe

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย