

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก

การทำ Electrophoresis

1. การเตรียม extraction buffer

Tris-HCl 0.05 M pH 8.4	100.00	มิลลิลิตร
NaCl 150 mM	1.7532	กรัม
cysteine 10 mM	0.1212	กรัม
ascorbic acid 1 mM	0.0352	กรัม
CaCl ₂ 1 mM	0.0294	กรัม
Na ₂ -EDTA 1 mM	0.7444	กรัม
nicotine 2 %	2.00	มิลลิลิตร

2. การเตรียม electrode buffer

stock A Tris buffer pH 8.3 (x10)		
Tris	6.0	กรัม
glycine	28.8	กรัม
H ₂ O adjust	1,000	มิลลิลิตร

3. การเตรียมส่วนประกอบของเจล

stock B Tris-chloride buffer pH 8.9

HCl 1 N	48	มิลลิลิตร	} dissolve and heat then adjust pH to 8.9
Tris	36.6	กรัม	
TEMED	0.23	มิลลิลิตร	
H ₂ O adjust	100	มิลลิลิตร	

filtrate and keep in dark condition

stock C Tris-chloride buffer pH 6.7

HCl 1N	48	มิลลิลิตร
Tris	5.98	กรัม
TEMED	0.46	มิลลิลิตร
H ₂ O adjust	100	มิลลิลิตร

filtrate and keep in dark condition

stock D acrylamide stock

acrylamide 28 กรัม
 N,N' –methylene bis acrylamide 0.74 กรัม
 H₂O adjust 100 มิลลิลิตร
 filtrate and keep in dark condition

stock E (NH₄)₂S₂O₈ solution (fresh prepare can keep 1 week)

(NH₄)₂S₂O₈ 0.1 กรัม
 H₂O 1 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวก 1 อัตราส่วนสารที่ใช้ในการเตรียมเจล

% เจล	Running gel				Stacking gel			
	B (ml)	D (ml)	H ₂ O (ml)	E (μl)	C (ml)	D (ml)	H ₂ O (ml)	E (μl)
7.5	7.5	17.17	35.35	300	2.50	2.00	15.20	300
8.5	7.5	18.21	34.29	300	2.50	2.00	15.20	300
10	5	14.29	20.71	300	2.50	2.00	15.20	300

4. การเตรียม marker dye solution

bromphenol blue 0.05 กรัม
 stock C 10 มิลลิลิตร
 glycerol 1 มิลลิลิตร

ผสมตัวอย่างกับ dye solution ในอัตราส่วน 85:15

5. การเตรียม phosphate buffer 0.1 M pH 6.0

stock A : 0.1 M monobasic potassium phosphate (KH₂PO₄) 13.6 กรัม ต่อ 1000 มิลลิลิตร

stock B : 0.1 M dibasic potassium phosphate (K₂HPO₄) 17.9 กรัม ต่อ 1000 มิลลิลิตร

นำ stock A 87.7 มิลลิลิตร ผสมกับ stock B 12.3 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นพร้อมกับปรับ pH ให้ได้ 6.0 ด้วย NaOH หรือ HCl ที่ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

6. การเตรียม acetate buffer 0.5 M pH 4.8

stock A : 0.5 M solution of acetic acid (28.875 ml. in 1,000 ml)

stock B : 0.5 M solution of sodium acetate (41 g. of $C_2H_3O_2Na$ or 68 g. of

$C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ in 1,000 ml.)

นำ stock A 20.0 มิลลิลิตร ผสมกับ stock B 30.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น ปรับ pH 4.8 ที่ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

7. การเตรียมสีย้อมเอนไซม์

7.1 peroxidase

stock A: 3-amino-9-ethylcarbazole	420	มิลลิกรัม
β -naphthol	290	มิลลิกรัม
acetone	200	มิลลิลิตร

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

stock B : Tris buffer 0.1 M pH 4.0

Tris- hydroxymethyl aminomethane	3.78	กรัม
acetic acid	4.05	มิลลิลิตร

ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับ pH 4.0 ที่ปริมาตร 2.5 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

stock C: H_2O_2 3%

H_2O_2 30 %	10.0	มิลลิลิตร
---------------	------	-----------

เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ ทุกครั้ง)

นำ stock A : stock B : stock C ในอัตราส่วน 20:80:1 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

7.2 acid phosphatase

1. acetate buffer 0.5 M pH 4.8	150.0	มิลลิลิตร
2. fast blue-B salt	150.0	มิลลิกรัม
3. 1% -naphthyl acid phosphate (monosodium salt)	150.0	มิลลิกรัม
4. $MgCl_2$ 10 %	10	หยด

นำสารในข้อ 1, 2 และ 3 ละลายให้เข้ากันแล้วกรองในที่มืดแล้วเติมสารละลายในข้อ 4 ลงไป

7.3 esterase

1. phosphate buffer 0.1 M pH 6.0	150.0	มิลลิลิตร
2. fast blue-B salt	225.0	มิลลิกรัม
3. 1% naphthyl acetate in absolute alcohol	4.5	มิลลิลิตร

นำสารในข้อ 1 และ 2 ละลายให้เข้ากัน แล้วกรองในที่มืดแล้วเติมสารในข้อ 3 ลงไป

การตรวจนับจำนวนโครโมโซม

1. การเตรียมน้ำยาหุควงซีฟเซลล์ (pre-treatment)

1.1 p-dichlorobenzene	10	กรัม
1.2 น้ำ	500	มิลลิลิตร

นำ สารในข้อ 1.1 และ 1.2 ผสมกัน ทิ้งไว้หนึ่งคืน แล้วนำมาคนให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย magnetic stirrer ที่ 60 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (fixative)

absolute ethanol	3	ส่วน
glacial acetic acid	1	ส่วน

3. การเตรียมน้ำยาล้างเซลล์ (hydrolysis)

hydrochloric acid	1	N
-------------------	---	---

4. การเตรียมน้ำย้อม

4.1 สี lacto-propionic orcein

1. lacto-propionic orcein	2	กรัม
2. lactic acid	50	มิลลิลิตร
3. propionic acid	50	มิลลิลิตร

นำสารในข้อ 1, 2 และ 3 ผสมกัน ทิ้งไว้หนึ่งคืน นำมากรอง เวลาใช้ผสมกับน้ำในอัตราส่วน น้ำ : สีย้อม 55-40 : 45-60 แล้วกรองอีกครั้งหนึ่ง

4.2 สี carbol fuchsin (stock D)

stock A

basic fuchsin	3	กรัม
70 % ethanol	100	มิลลิลิตร

stock B

stock A	10	มิลลิลิตร
5 % phenol	90	มิลลิลิตร

stock C

stock B	55	มิลลิลิตร
glacial acetic acid	6	มิลลิลิตร
37% formaldehyde	6	มิลลิลิตร

stock D

stock C	5	มิลลิลิตร
45% acetic acid	95	มิลลิลิตร
sorbitol	1.8	กรัม

ตารางภาคผนวกที่ 2 ค่าการมีแถบสีและไม่มีแถบสีจากเอนไซม์ peroxidase ของถัสนั้ 19 พันธุ์

พันธุ์ดำแหน่ง	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
สงฮวย1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
Hakip	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
ลูกลาย	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
สงฮวย2	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
ค่อม	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
กิมเจง	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
ใบขาว *	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
บรวสเตอร์	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0
ใบอ้อ **	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
จีนใหญ่	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
กวางเจา	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
ค่อมลำเจียก	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
จีนเล็ก	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
ใบเถา ***	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
แห้ว	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
สำเภาแก้ว	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
จักรพรรดิ	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
สาแหรกทอง	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
โอวเอียะ	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0

หมายเหตุ ใบขาว* = กะโหลกใบขาว ใบอ้อ** = กะโหลกใบอ้อ ใบเถา*** = กะโหลกใบเถา

ตารางภาคผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความกว้างของใบประกอบ (ตารางที่ 21)

Source	D.F.	SS	MS	F	P
Between Groups	18	6669.8313	370.5462	1.9621	.0121
Within Groups	266	50235.7293	188.8561		
Total	284	56905.5605			

ตารางภาคผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความยาวของใบประกอบ (ตารางที่ 21)

Source	D.F.	SS	MS	F	P
Between Groups	18	2023.3790	112.4099	18.8690	.0000
Within Groups	266	1584.6677	5.9574		
Total	284	3608.0467			

ตารางภาคผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความกว้างของใบย่อย (ตารางที่ 21)

Source	D.F.	SS	MS	F	P
Between Groups	18	157.1356	8.7298	29.3836	.0000
Within Groups	1121	333.04445	0.2971		
Total	1139	490.1800			

ตารางภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความยาวของใบย่อย (ตารางที่ 21)

Source	D.F.	SS	MS	F	P
Between Groups	18	2211.8626	122.8813	41.1368	.0000
Within Groups	1121	3348.5766	2.9871		
Total	1139	5560.4392			

ตารางภาคผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความหนาของใบย่อย (ตารางที่ 21)

Source	D.F.	SS	MS	F	P
Between Groups	18	0.0927	0.0051	20.7878	.0000
Within Groups	1211	0.2777	0.0002		
Total	1139	0.3704			

ตารางภาคผนวกที่ 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความกว้างของช่อดอก (ตารางที่ 21)

Source	D.F.	SS	MS	F	P
Between Groups	17	1152.2830	67.7814	12.4261	.0000
Within Groups	252	1374.6013	5.4548		
Total	269	2526.8843			

ตารางภาคผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความยาวของช่อดอก (ตารางที่ 21)

Source	D.F.	SS	MS	F	P
Between Groups	17	3614.5040	212.6179	11.6683	.0000
Within Groups	252	4591.9147	18.2219		
Total	269	8206.4187			

ตารางภาคผนวกที่ 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความกว้างของผล (ตารางที่ 22)

Source	D.F.	SS	MS	F	P
Between Groups	12	55.3324	4.6110	91.4140	.0000
Within Groups	377	19.0163	0.0504		
Total	389	74.3487			

ตารางภาคผนวกที่ 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความยาวของผล (ตารางที่ 22)

Source	D.F.	SS	MS	F	P
Between Groups	12	52.5086	4.3757	88.8127	.0000
Within Groups	377	18.5744	0.0493		
Total	389	71.0830			

ตารางภาคผนวกที่ 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนน้ำหนักของผล (ตารางที่ 22)

Source	D.F.	SS	MS	F	P
Between Groups	12	9306.8222	775.5685	89.1575	.0000
Within Groups	377	3279.4707	8.6989		
Total	389	12586.2929			

ตารางภาคผนวกที่ 13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ TSS (ตารางที่ 22)

Source	D.F.	SS	MS	F	P
Between Groups	12	1014.7124	84.5594	16.9228	.0000
Within Groups	377	1883.7780	4.9968		
Total	389	2898.4904			

ตารางภาคผนวกที่ 14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความกว้างของเมล็ด (ตารางที่ 22)

Source	D.F.	SS	MS	F	P
Between Groups	12	6.4957	0.5413	1.4336	.1480
Within Groups	377	142.3497	0.3776		
Total	389	148.8454			

ตารางภาคผนวกที่ 15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความยาวของเมล็ด (ตารางที่ 22)

Source	D.F.	SS	MS	F	P
Between Groups	12	11.8680	0.9890	11.8994	.0000
Within Groups	377	31.3337	0.0831		
Total	389	43.2017			

ตารางภาคผนวกที่ 16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนน้ำหนักของเมล็ด (ตารางที่ 22)

Source	D.F.	SS	MS	F	P
Between Groups	12	91.8230	7.6519	10.7292	.0000
Within Groups	377	268.8716	0.7132		
Total	389	360.6946			

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นาย ชินวัฒน์ ยั้ววัฒนพันธ์

วัน เดือน ปี เกิด 24 ธันวาคม 2515

ประวัติการศึกษา ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2537