

ภาคผนวก

### การคำนวณ

วิธีคำนวณ ปริมาณน้ำที่ให้แก่ต้นส้มจุกที่ต่อกิ่งบนต้นต่อส้มจุก ส้มจี๊ด ส้มโอ มะกรูด ส้มสามใบลูกผสมสามพันธุ์ทรอยเยอร์และสายพันธุ์สวิงเกิล ดังนี้

ความชื้นดินเบื้องต้น	25.65	เปอร์เซ็นต์	
ดินที่ใช้	100	กรัม	มีความชื้นดิน
ดังนั้นถ้าน้ำหนักดิน	1,000	กรัม	$\frac{25.65 \times 1,000}{100} = 256.45$ กรัม
ดังนั้นน้ำหนักดินแห้ง			$1,000 - 256.45 = 743.55$ กรัม
ความชื้นที่จุดอิ่มตัวของดิน			62.21 เปอร์เซ็นต์
ดังนั้นปริมาณน้ำในดินแห้งที่เต็มความจุ			$\frac{62.21 \times 743.55}{100} = 462.56$ กรัม
ต้องการปริมาณน้ำที่ร้อยละ 60 ของความจุความชื้นดิน			$\frac{462.56 \times 60}{100} = 277.54$ กรัม
∴ ปริมาณน้ำที่ต้องเติมในดิน 1,000 กรัม $277.54 - 256.45 = \underline{21.09}$ กรัม หรือ <u>21.09</u> มิลลิลิตร			

หมายเหตุ : ปริมาณน้ำ 1 มิลลิลิตร เท่ากับ น้ำ 1 กรัม

## ส่วนประกอบสารเคมี

### 1. Extraction buffer

- Tris-HCl 0.5 M pH 7.5 6.05 กรัม
- PVP 2 % 2 กรัม
- Na<sub>2</sub>EDTA 2 Mm 0.074 กรัม
- น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
- 2-Mercapthoethanol 1 % (เติมเมื่อבודตัวอย่างพืช)

### 1. Electrode buffer

- Tris-HCl 0.5 M pH 8.3 3.03 กรัม
- Glycine 14.04 กรัม

นำ Tris-HCl + Glycine ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH 8.3

## 2. ระบบสีข้อมเอนไซม์

### 3.1 เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase) (Thom and Maretzki, 1970) (E.C.1.11.1.7)

#### สารเคมี Stock A

1. 3-Amino-9-ethylcarbazole 210 มิลลิกรัม
2.  $\beta$ -Naphthol 145 มิลลิกรัม
3. Acetone 100 มิลลิลิตร

ละลายสารข้อ 1 และ 2 ในข้อ 3 ให้เป็นเนื้อเดียวกันและเก็บในขวดสีชา

#### สารเคมี Stock B

1. Tris-HCl 1.50 กรัม
2. Acetic acid 1.70 มิลลิลิตร
3. น้ำกลั่น 1 ลิตร

ละลายสารข้อ 1 และ 2 ในข้อ 3 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน

#### สารเคมี Stock C

- Hydrogen peroxide 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1 มิลลิลิตร

วิธีผสม : ผสม Stock A : B : C ในอัตราส่วน 20 : 80 : 1 เท่า ให้เป็นเนื้อเดียวกัน

วิธีข้อม : เขย่าข้อมในที่มืด เป็นเวลา 30 - 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

## 3.2 เอสเตอเรส (Esterase) (Thom and Marezki, 1970) (E.C.3.1.1.2)

สารเคมี

- |                                  |               |
|----------------------------------|---------------|
| 1. Phosphate buffer 0.1 M pH 6.0 | 100 มิลลิลิตร |
|----------------------------------|---------------|

สารเคมี Stock A : Solution of monobasic sodium

- |                 |                |
|-----------------|----------------|
| phosphate 0.1 M | 43.8 มิลลิลิตร |
|-----------------|----------------|

สารเคมี Stock B : Solution of dibasic sodium

- |                 |                |
|-----------------|----------------|
| phosphate 0.1 M | 6.15 มิลลิลิตร |
|-----------------|----------------|

นำ Stock A ผสม Stock B ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร และปรับ pH 6.0

- |                     |               |
|---------------------|---------------|
| 2. Fast blue B Salt | 150 มิลลิกรัม |
|---------------------|---------------|

- |   |             |
|---|-------------|
| 3. $\alpha$ -Naphthyl acetate in absolute alcohol | 3 มิลลิลิตร |
|---|-------------|

วิธีผสม : ละลายสารข้อ 2 ในข้อ 1 ให้เป็นเนื้อเดียวกันกรองในที่มืดและเติมข้อ 3 เมื่อจะข้อมติ

วิธีข้อม : เขย่าข้อมในที่มืด จนกว่าเจลดิสซัลดเจน ที่อุณหภูมิห้อง

## 3.3 ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส (Phosphoglucosomerase) (Tanksley, 1980 อ้างโดย Tanksley and Orton, 1985) (E.C.5.3.1.9)

สารเคมี

- |                          |               |
|--------------------------|---------------|
| 1. Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 | 100 มิลลิลิตร |
|--------------------------|---------------|

- |  |             |
|--|-------------|
| 2. N-methyl-phenazonium methyl sulfate (PMS) | 4 มิลลิกรัม |
|--|-------------|

- |                     |              |
|---------------------|--------------|
| 3. Fructose-6-P(Na) | 80 มิลลิกรัม |
|---------------------|--------------|

- |   |              |
|---|--------------|
| 4. $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide<br>phosphate (NADP <sup>+</sup> ) | 20 มิลลิกรัม |
|---|--------------|

- |   |              |
|---|--------------|
| 5. Methythiazolydiphenyl tetrazolium<br>bromide (MTT) | 20 มิลลิกรัม |
|---|--------------|

- |  |             |
|--|-------------|
| 6. Magnesium chloride (MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O) | 1 มิลลิลิตร |
|--|-------------|

- |  |          |
|--|----------|
| 7. Glucose-6-phosphate dehydrogenase<br>(G-6-P-DH) | 20 ยูนิต |
|--|----------|

วิธีผสม : ละลายสารข้อ 2-5 ในข้อ 1 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเติมสารข้อ 6 และ 7 เมื่อจะข้อมติ

วิธีข้อม : เขย่าข้อมในที่มืด เป็นเวลา 30-60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

## 3.4 ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (Phosphoglucumutase) (Tanksley, 1979 อ้างโดย Tanksley and Orton, 1985) (E.C.2.7.5.1)

สารเคมี

- |                          |               |
|--------------------------|---------------|
| 1. Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 | 100 มิลลิลิตร |
|--------------------------|---------------|

2. PMS	4 มิลลิกรัม
3. $\alpha$ D-Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-1-P)	150 มิลลิกรัม
4. NADP <sup>+</sup>	15 มิลลิกรัม
5. MTT	20 มิลลิกรัม
6. MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 1M	1 มิลลิลิตร
7. G-6-P-DH	40 ยูนิต

วิธีผสม : ละลายสารข้อ 2-5 ในข้อ 1 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเติมสารข้อ 6 และ 7 เมื่อจะข้อมติ

วิธีข้อม : เขย่าข้อมในที่มืด เป็นเวลา 30-60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

### 3.5 มาเลทดีไฮโดรจีเนส (Malate dehydrogenase) (Brown *et al.*, 1978 อ้างโดย Tanksley and Orton, 1985) (E.C.1.1.1.37)

สารเคมี

1. Tris-HCl 0.1 M pH 7.5	100 มิลลิลิตร
2. DL-Malate 1 M pH 7.5	3 มิลลิลิตร
3. NAD <sup>+</sup>	30 มิลลิกรัม
4. MTT	20 มิลลิกรัม
5. PMS	4 มิลลิกรัม

วิธีผสม : ละลายสารข้อ 3-5 ในข้อ 1 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเติมสารข้อ 2 เมื่อจะข้อมติเจด

วิธีข้อม : เขย่าข้อมในที่มืด เป็นเวลา 30-60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

### 3.6 แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Alcoholdehydrogenase) (Tanksley, 1979 อ้างโดย Tanksley and Orton, 1985) (E.C.1.1.1.1)

สารเคมี

1. Tris-HCl 0.1 M pH 7.5	100 มิลลิลิตร
2. NADP <sup>+</sup>	30 มิลลิกรัม
3. MTT	20 มิลลิกรัม
4. PMS	4 มิลลิกรัม
5. Ethanol	6 มิลลิลิตร

วิธีผสม : ละลายสารข้อ 2-5 ในข้อ 1 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน

วิธีข้อม : เขย่าข้อมในที่มืด เป็นเวลา 30-60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

### 3.7 แอซิดฟอสฟาเทส (Acid phosphatase) (Scandalios, 1969 อ้าง โดย Tanksley and Orton, 1985)

(E.C.3.1.3.2)

สารเคมี

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. Na acetate 50 Mm pH 5.5                                 | 100 มิลลิลิตร |
| 2. MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 1 M                | 1 มิลลิกรัม   |
| 3. Fast black K salt หรือ Fast garnet GBC salt             | 100 มิลลิกรัม |
| 4. 1% $\alpha$ Naphthyl acid phosphate<br>(in 50% acetone) | 3 มิลลิลิตร   |

วิธีผสม : ละลายสารข้อ 3 ในข้อ 1 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเติมสารข้อ 2 และ 4 เมื่อจะย้อมสีเจล

วิธีย้อม : เขย่าย้อมในที่มืด เป็นเวลา 1-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

### 3.8 ชิคิเมทดีไฮโดรจีเนส (Shikimate dehydrogenase) (Tanksley and Rick, 1980 อ้าง โดย Tanksley and Orton, 1985) (E.C.1.1.1.25)

สารเคมี

- |                          |               |
|--------------------------|---------------|
| 1. Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 | 100 มิลลิลิตร |
| 2. Shikimic acid         | 100 มิลลิลิตร |
| 3. NADP <sup>+</sup>     | 15 มิลลิกรัม  |
| 4. MTT                   | 20 มิลลิกรัม  |
| 5. PMS                   | 4 มิลลิกรัม   |

วิธีผสม : ละลายสารข้อ 3-5 ในข้อ 1 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเติมสารข้อ 2 เมื่อจะย้อมสีเจล

วิธีย้อม : เขย่าย้อมในที่มืด เป็นเวลา 30-60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

#### 4 Marker dye solution

- |                    |               |
|--------------------|---------------|
| - Bromophenol blue | 125 มิลลิกรัม |
| - Xylene cyanol FF | 125 มิลลิกรัม |
| - Glycerol         | 15 มิลลิลิตร  |

นำ Bromophenol blue + Xylene cyanol FF + Glycerol ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตร ให้ได้ 50 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### ตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 ส่วนประกอบเจลตอนบน (stacking gel) และเจลตอนล่าง (separate gel) สำหรับ 4 แผ่น

สารเคมี	ความเข้มข้น (%)	
	เจลตอนบน	เจลตอนล่าง
1. 30 % acrylamide gel (ml)	6.00	0.60
2. 1.5 M Tris-HCl pH 8.9 (ml)	2.90	-
3. 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (ml)	-	0.75
4. น้ำกลั่น (ml)	8.87	4.53
5. TEMED ( $\mu$ l)	5	5
6. 10% APS ( $\mu$ l)	225	120
ปริมาตรรวม (ml)	18.00	6.00

ที่มา : ดัดแปลงจากมาลี (2541)

ตารางภาคผนวกที่ 2 ปริมาณการใช้น้ำของต้นส้มจุกที่ต่อกิ่งบนต้นต่อส้มจุก ส้มจี๊ด ส้มโอ มะกรูด ส้มสามใบลูกผสมสายพันธุ์ทรอยเซอร์และสายพันธุ์สวิงเกิล หลังเลียบยอดในเวลา 0, 8, 16, 24 และ 48 สัปดาห์

ต้นต่อส้ม	ปริมาณการใช้น้ำในรอบวัน (ลิตร)				
	0	8	16	24	48
ส้มจุก	0.026	0.018	0.018	0.024b	0.028b
ส้มจี๊ด	0.038	0.020	0.023	0.026b	0.037ab
ส้มโอ	0.038	0.026	0.030	0.032b	0.038ab
มะกรูด	0.040	0.024	0.024	0.028b	0.031ab
ทรอยเซอร์	0.034	0.024	0.026	0.044a	0.042a
สวิงเกิล	0.027	0.020	0.024	0.024b	0.033ab
F-test	ns	ns	ns	**	*
C.V. (%)	32.10	26.89	23.30	18.08	27.30

ตัวเลขค่าเฉลี่ยในศตมภ์ตามด้วยอักษรแตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี

Duncan's Multiple Range Test : DMRT

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

\*,\*\* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ ) และอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $P \leq 0.01$ )ตามลำดับ

ตารางภาคผนวกที่ 3 ศักย์ของน้ำไนโบส้มจุกที่ต่อกิ่งบนต้นตอส้มจุก ส้มจี๊ด ส้มโอ มะกรูด ส้มสามใบ ลูกผสมสายพันธุ์ทรอยเยอร์และสายพันธุ์สวิงเกิล หลังเสียบยอดในเวลา 0, 8, 16, 24 และ 48 สัปดาห์

ต้นตอส้ม	ศักย์ของน้ำไนโบ (เมกกะปาสคาล)				
	0	8	16	24	48
ส้มจุก	-1.00ab	-1.25a	-1.00a	-0.95ab	-0.95a
ส้มจี๊ด	-0.95ab	-1.25a	-10.0a	-0.90a	-1.10ab
ส้มโอ	-1.00ab	-1.28a	-1.00a	-1.00ab	-1.13ab
มะกรูด	-1.00ab	-1.60b	-1.25b	-1.25c	-1.25b
ทรอยเยอร์	-1.10b	-1.25a	-1.00a	-1.00ab	-1.00ab
สวิงเกิล	-0.63a	-1.08a	-1.13ab	-1.10b	-1.00ab
F-test	**	**	**	**	*
C.V. (%)	10.24	5.74	5.60	3.95	9.04

ตัวเลขค่าเฉลี่ยในสคตมภ์ตามด้วยอักษรแตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี

Duncan's Multiple Range Test : DMRT

\*,\*\* มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ( $P \leq 0.05$ )และอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $P \leq 0.01$ )ตามลำดับ

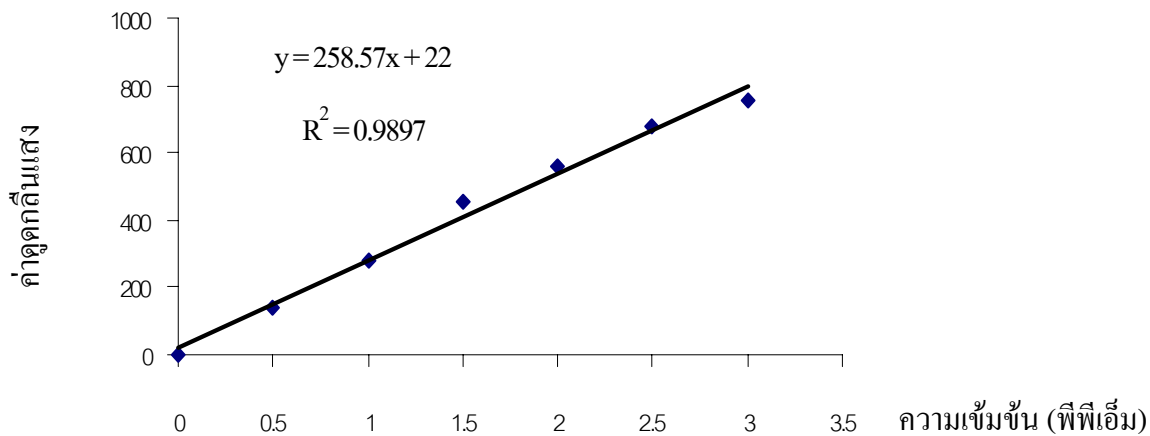
ตารางภาคผนวกที่ 4 ระดับความเข้มข้นมาตรฐาน (เปอร์เซ็นต์) ของธาตุไนโตรเจน ธาตุฟอสฟอรัส และธาตุโพแทสเซียมในต้นส้ม

ธาตุอาหาร	ระดับธาตุอาหาร (เปอร์เซ็นต์) ต่อความต้องการ		
	ขาด	พอเพียง	เกิน
ไนโตรเจน	2.20	2.50 - 2.70	3.00
ฟอสฟอรัส	0.09	0.12 - 0.16	0.30
โพแทสเซียม	0.70	1.20 - 1.70	2.40

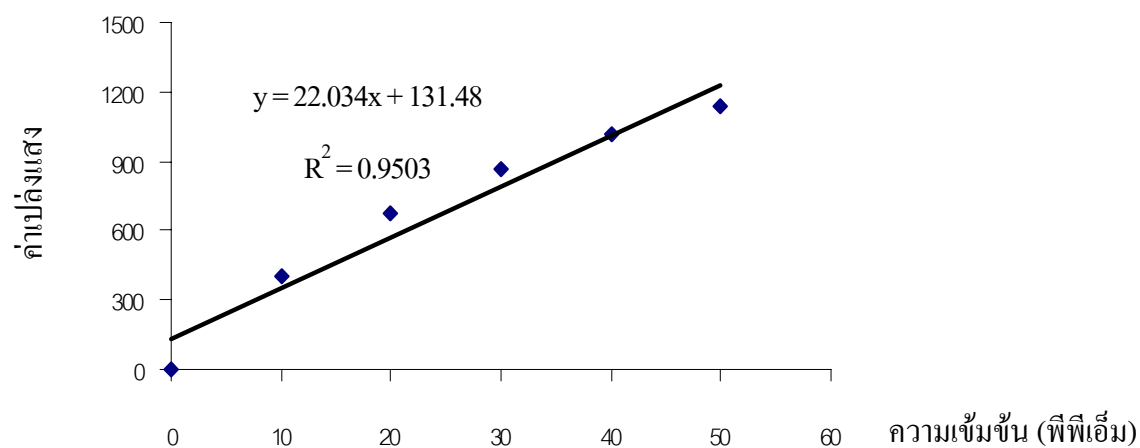
ที่มา : Smith, 1966 อ้างโดย Davies and Albrigo, 1994



### รูปภาคผนวก



รูปภาคผนวกที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงในการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในใบส้มจุกเสียบยอด



รูปภาคผนวกที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่าการเปล่งแสงในการวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียมในใบส้มจุกเสียบยอด