

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 มวลสดและมวลแห้งของยูคาลิปตัส ไคลน C1, C2, C3, C4, C5 และ C6
หลังจากเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0
(Control), 100 และ 200 mM เป็นเวลา 14 และ 28 วัน หลังจากย้ายปลูก

ไคลน	โซเดียม คลอไรด์	มวลสด (กรัม/ต้น)		มวลแห้ง (กรัม/ต้น)	
		14 DAT	28 DAT	14 DAT	28 DAT
C1	0 mM	5.89	16.08	1.52	3.32
	100 mM	9.15	10.68	1.82	2.17
	200 mM	3.77	5.84	1.11	1.03
C2	0 mM	5.15	10.34	1.36	2.34
	100 mM	5.39	8.24	1.43	1.93
	200 mM	3.50	4.10	1.37	0.78
C3	0 mM	5.00	14.19	1.19	3.14
	100 mM	3.98	13.30	0.93	2.44
	200 mM	2.80	5.27	0.63	0.84
C4	0 mM	7.19	14.67	1.81	3.60
	100 mM	7.72	11.37	1.85	2.51
	200 mM	1.90	0.00	0.56	0.00
C5	0 mM	3.89	7.20	0.94	1.63
	100 mM	4.43	8.49	1.22	1.72
	200 mM	2.24	3.58	0.70	0.72
C6	0 mM	5.01	8.36	1.14	1.53
	100 mM	4.03	7.10	1.09	1.46
	200 mM	2.62	3.31	0.63	0.72
CV%		12.87	25.18	22.93	26.92
ไคลน					
	C1	6.27 a	10.87 a	1.48 a	2.17 a
	C2	4.68 b	7.56 b	1.39 a	1.69 ab
	C3	3.93 cb	10.92 a	0.92 b	2.14 a
	C4	5.60 a	8.68 ab	1.41 a	2.03 a
	C5	3.52 c	6.42 b	0.95 b	1.36 b
	C6	3.89 c	6.26 b	0.96 b	1.24 b
LSD					

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	มวลสด (กรัม/ต้น)		มวลแห้ง (กรัม/ต้น)	
	14 DAT	28 DAT	14 DAT	28 DAT
NaCl				
0 mM	5.36 a	11.81 a	1.33 a	2.60 a
100 mM	5.78 a	9.86 a	1.39 a	2.04 b
200 mM	2.80 b	3.68 b	0.83 b	0.68 c
LSD	0.54 **	1.97 **	0.25 **	0.43 **

ค่าเฉลี่ยในแถวตั้งเดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบแบบ LSD

*,** = มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 2 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของยูคาลิปตัส โคลน C1, C2, C3, C4, C5 และ C6
หลังจากเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0
(Control) , 100 และ 200 mM เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน หลังจากย้ายปลูก

โคลน	โซเดียม คลอไรด์	อัตราการอยู่รอด (%)			
		7 DAT	14 DAT	21 DAT	28 DAT
C1	0 mM	100.00	100.00	100.00	100.00
	100 mM	100.00	100.00	100.00	100.00
	200 mM	100.00	83.33	75.00	70.00
C2	0 mM	100.00	100.00	100.00	100.00
	100 mM	100.00	100.00	91.67	80.00
	200 mM	100.00	91.67	75.00	51.67
C3	0 mM	100.00	100.00	100.00	100.00
	100 mM	100.00	100.00	100.00	85.00
	200 mM	75.00	46.67	43.33	13.33
C4	0 mM	100.00	100.00	100.00	100.00
	100 mM	100.00	100.00	100.00	76.67
	200 mM	80.00	40.00	16.67	3.33
C5	0 mM	100.00	100.00	100.00	100.00
	100 mM	100.00	100.00	100.00	93.33
	200 mM	93.33	78.33	78.33	61.67
C6	0 mM	100.00	100.00	100.00	100.00
	100 mM	100.00	100.00	100.00	86.67
	200 mM	100.00	85.00	68.33	56.67
CV%		2.53	4.39	4.47	3.97
โคลน					
C1		100.00 a	94.44 a	91.67 a	90.00 a
C2		100.00 a	97.22 a	88.89 a	77.22 c
C3		91.67 b	82.22 b	81.11 b	66.11 d
C4		93.33 b	80.00 b	72.22 c	60.00 e
C5		97.78 a	92.78 a	92.78 a	85.00 b
C6		100.00 a	95.00 a	89.44 a	81.11 bc
LSD		3.15 **	5.09 **	4.93 **	3.90 **

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

	อัตราการอยู่รอด (%)			
	7 DAT	14 DAT	21 DAT	28 DAT
โซเดียมคลอไรด์				
0 mM	100.00 a	100.00 a	100.00 a	100.00 a
100 mM	100.00 a	100.00 a	98.61 a	86.94 a
200 mM	91.39 b	70.83 b	59.44 b	42.78 b
LSD	2.22 **	3.60 **	3.49 **	2.76 **

ค่าเฉลี่ยในแถวตั้งเดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบแบบ LSD

*,** = มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 3 มวลสดและมวลแห้งของยูคาลิปตัส โคลน C1, C4 และ C5 หลังจากเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0 (Control), 100 และ 200 mM เป็นเวลา 7, 14 และ 21 วัน หลังจากย้ายปลูก

โคลน	โซเดียม คลอไรด์	มวลสด (กรัม/ต้น)			มวลแห้ง (กรัม/ต้น)		
		7 DAT	14 DAT	21 DAT	7 DAT	14 DAT	21 DAT
C1	0 mM	3.88	13.70	28.57	2.70	2.93	6.53
	100 mM	3.82	12.77	13.70	2.63	2.83	2.97
	200 mM	3.24	9.33	6.10	1.97	1.70	1.17
C4	0 mM	4.16	16.47	25.10	2.83	3.73	5.07
	100 mM	3.14	12.07	12.83	1.97	2.57	2.40
	200 mM	1.80	9.53	7.83	1.07	2.07	1.63
C5	0 mM	3.54	19.17	21.47	2.57	4.63	4.97
	100 mM	3.89	14.70	12.40	2.47	3.23	2.30
	200 mM	2.40	10.13	10.63	1.60	2.17	1.90
CV%		30.69	25.72	37.47	28.60	25.86	34.88
โคลน							
C1		3.66	11.93	16.12	2.43	2.48	3.56
C4		3.04	12.69	15.26	1.96	2.79	3.03
C5		3.27	14.67	14.83	2.21	3.34	3.06
LSD		ns	ns	ns	ns	ns	ns
0 mM		3.86 a	16.44 a	25.04 a	2.70 a	3.77 a	5.52 a
100 mM		3.62 a	13.18 ab	12.99 b	2.36 ab	2.88 ab	2.56 b
200 mM		2.49 b	9.67 b	8.19 b	1.54 b	1.98 b	1.57 b
LSD		0.94*	4.60 **	7.29 **	0.92 **	1.00 **	1.63 **

ค่าเฉลี่ยในแถวตั้งเดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบแบบ LSD

*,** = มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 4 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของยูคาลิปตัส โคลน C1, C4 และ C5 หลังจากเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0 (Control), 100 และ 200 mM เป็นเวลา 7, 14 และ 21 วัน หลังจากย้ายปลูก

โคลน	โซเดียมคลอไรด์	อัตราการอยู่รอด (%)		
		7 DAT	14 DAT	21 DAT
C1	0 mM	100.00	100.00	100.00
	100 mM	100.00	100.00	53.33
	200 mM	73.33	70.00	20.00
C4	0 mM	100.00	100.00	100.00
	100 mM	100.00	100.00	70.00
	200 mM	53.33	33.33	10.00
C5	0 mM	100.00	100.00	100.00
	100 mM	100.00	100.00	83.33
	200 mM	100.00	100.00	70.00
CV%		11.85	13.11	51.81
โคลน				
C1		91.11 ab	90.00 a	57.78 b
C4		84.44 b	77.78 b	60.00 b
C5		100.00 a	100.00 a	84.44 a
LSD		10.78 *	15.88 **	22.92 **
NaCl				
0 mM		100.00 a	100.00 b	100.00 a
100 mM		100.00 a	100.00 b	68.89 b
200 mM		75.56 b	32.22 a	33.33 c
LSD		14.77 **	15.88 **	22.92 **

ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบแบบ LSD

*,** = มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 5 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของยูคาลิปตัส โคลน C1, C4 และ C5 เมื่อได้รับ โซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0 (Control), 100 และ 200 mM

NaCl	อัตราการเจริญเติบโต (กรัม/วัน)		
	C1	C4	C5
0 mM	2.54	3.33	4.26
100 mM	2.45	2.29	2.88
200 mM	1.42	1.92	1.94

$$\text{อัตราการเจริญเติบโต} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งที่ 21 DAT} - \text{น้ำหนักแห้งที่ 7 DAT}}{\text{ }}$$

ตารางผนวกที่ 6 การเตรียม Competent Cell คัดแปลงจากวิธีของ Sambrook *et al.* (1989)

ขั้นตอนการเตรียม Competent Cell	
1	เลือก Colony ของเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 α ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง 12-16 ชั่วโมง ลงอาหารสูตร LB (ตารางผนวกที่ 6) 25 ml บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ($OD_{600} = 0.3-0.4$)
2	เทสารละลายแบคทีเรียลงในหลอดขนาด 125 ml แช่ในน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทอาหารส่วนบนทิ้ง แล้วเติม TFB I (30 mM Potassium Acetate, 10 mM $CaCl_2$, 50 mM $MnCl_2$ และ 15% Glycerol, pH 5.8) ที่แช่เย็นปริมาตร 20 ml ทำให้เซลล์กระจายด้วยการเขย่าเบา ๆ จนไม่เหลือตะกอน แล้วจึงแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที
3	ปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วเติม TFB II (10 mM MOPS, 75 mM $CaCl_2$ และ 15% Glycerol, pH 6.5) ที่แช่เย็นปริมาตร 2 ml ทำให้เซลล์กระจายด้วยการเขย่าเบา ๆ จนไม่เหลือตะกอน หลังจากนั้นทำการแบ่งสารละลายลงสู่ Microtube ขนาด 1.5 ml หลอดละ 100 μ l และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 7 สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

1. LB (Luria-Bertani Broth)

ชื่อสาร	ปริมาณ	วิธีการเตรียม
Tryptone	10 g	ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1 liter ปรับ pH เป็น 7.5 แบ่งใส่ Erlenmeyer Flask ปริมาตรตามต้องการปิดปากขวดด้วยสำลีและกระดาษ แล้ว Autoclave ด้วยความดัน 15 psi (121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที
Yeast Extract	5 g	
NaCl	5 g	

2. LB (Luria-Bertani) Agar

ชื่อสาร	ปริมาณ	วิธีการเตรียม
Tryptone	10 g	ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1 liter ปรับ pH เป็น 7.5 จากนั้นเติม Agar 15 g แล้ว Autoclave ด้วยความดัน 15 psi (121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทใส่ Plate ประมาณ 15-20 ml กรณีที่ต้องการเติมยาปฏิชีวนะในอาหาร ต้องรอให้อาหารเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ก่อน แล้วจึงเติมยาปฏิชีวนะลงไปผสมให้เข้ากันก่อนที่จะเทลงในจานเพาะเลี้ยง
Yeast Extract	5 g	
NaCl	5 g	

3. SOC Medium

ชื่อสาร	ปริมาณ	วิธีการเตรียม
Tryptone	20 g	ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำ กลั่น 965 ml แล้วเติม 250 mM KCl ปริมาตร 10 ml แล้ว Autoclave ด้วยความดัน 15 psi (121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวางทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม 1 M Glucose ปริมาตร 20 ml ก่อนใช้ นำไปเติม 2 M MgCl ₂ ที่ Autoclave แล้ว 5 ml
Yeast Extract	5 g	
NaCl	0.5 g	

ภาพผนวกที่ 1 ลักษณะอาการของยูคาลิปตัสโคลน C1 (a), C4 (b) และ C5 (c) หลังจากเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0 (Control), 100 และ 200 mM เป็นเวลา 21 วันหลังจากย้ายปลูก

