



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายเข้มข้นอาหารสูตร MS

1. สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายเข้มข้นอาหารสูตร MS เพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.1 สารอาหารหลัก (macronutrients) ความเข้มข้น 20x

NH_4NO_3	(Ajax Finechem, Australia)
KNO_3	(Ajax Finechem, Australia)
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(Ajax Finechem, Australia)
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	(Ajax Finechem, Australia)
KH_2PO_4	(Ajax Finechem, Australia)

1.2 สารอาหารรอง (micronutrients) ความเข้มข้น 100x

H_3BO_3	(Ajax Finechem, Australia)
$\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	(Ajax Finechem, Australia)
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	(Ajax Finechem, Australia)
KI	(Ajax Finechem, Australia)
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(Ajax Finechem, Australia)
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	(Ajax Finechem, Australia)
$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	(Ajax Finechem, Australia)

1.3 เหล็ก (iron stock) ความเข้มข้น 100x

$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	(Ajax Finechem, Australia)
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	(Ajax Finechem, Australia)

1.4 วิตามินและสารอินทรีย์ (vitamins stock) ความเข้มข้น 100x

Glycine	(Ajax Finechem, Australia)
Nicotinic acid	(Ajax Finechem, Australia)
Pyridoxine HCl	(Ajax Finechem, Australia)
Thiamine HCl	(Ajax Finechem, Australia)
Inositol	(Ajax Finechem, Australia)

- 1.5 ผงวุ้น (Agar) (Unionscience, Thailand)
- 1.6 น้ำตาลทราย (Sucrose) (มิตรผล)



ภาคผนวก ข

สูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS)

ตารางที่ ข.1 สูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS) สูตรดัดแปลง

Macronutrients	ปริมาณสารตามสูตร (mg/l)	สารละลายเข้มข้น 10 เท่า (g/l)
NH_4NO_3	1650.0	16.5
KNO_3	1900.0	19.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.0	4.4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.0	3.7
KH_2PO_4	170.0	1.7
Micronutrients	ปริมาณสารตามสูตร (mg/l)	สารละลายเข้มข้น 100 เท่า (g/l)
H_3BO_3	6.2	0.62
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	2.23
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	0.86
KI	0.83	0.083
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0025
Iron	ปริมาณสารตามสูตร (mg/l)	สารละลายเข้มข้น 100 เท่า (g/l)
Na_2EDTA	37.25	3.725
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85	2.785
Organic Components	ปริมาณสารตามสูตร (mg/l)	สารละลายเข้มข้น 100 เท่า (g/l)
Glycine	2.0	0.2
Nicotinic acid	0.5	0.05
Pyridoxine HCl	0.5	0.05
Thiamine HCl	0.1	0.01
Inositol	100.0	10.0

ที่มา : กิตติศักดิ์ โชติเดชานรงค์, 2556.

เตรียมธาตุอาหารหลักที่ใช้อาหารวัน สูตร MS โดยชั่งสารแต่ละชนิดตามข้อที่ 1 และ 2 และละลายสารแต่ละชนิดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วเทใส่ขวดเก็บสารละลายเข้มข้นปิดฝาเก็บในตู้เย็น

1. ขวดที่ 1 สารอาหารหลัก (macronutrients) ความเข้มข้น 20x

1.1 เทน้ำกลั่นประมาณ 300 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร
ชั่งสารแต่ละชนิดดังต่อไปนี้

NH_4NO_3	33	กรัม
KNO_3	38	กรัม
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.8	กรัม
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.4	กรัม
KH_2PO_4	3.4	กรัม

1.2 ใส่สารเคมีที่ชั่งไว้ลงในน้ำกลั่นทีละชนิด โดยต้องให้ชนิดแรกละลายหมดก่อนจึงใส่สารชนิดต่อไป ทำเช่นนี้จนครบหมดทุกชนิดปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

1.3 เทเก็บไว้ในขวดสีชา พร้อมทั้งเขียนรายละเอียดของสารละลายติดข้างขวด แล้วเก็บในตู้เย็น

2. ขวดที่ 2 สารอาหารรอง (micronutrient) ความเข้มข้น 100x

2.1 เทน้ำกลั่นประมาณ 300 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร
ชั่งสารแต่ละตัวดังต่อไปนี้

H_3BO_3	0.62	กรัม
$\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.23	กรัม
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.86	กรัม
KI	0.083	กรัม
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025	กรัม
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025	กรัม
$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025	กรัม

2.2 ใส่สารเคมีที่ชั่งไว้ลงในน้ำกลั่นทีละชนิด โดยต้องให้ชนิดแรกละลายหมดก่อนจึงใส่สารชนิดต่อไป ทำเช่นนี้จนครบหมดทุกชนิดปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

2.3 เทเก็บไว้ในขวดสีชา พร้อมทั้งเขียนรายละเอียดของสารละลายติดข้างขวดแล้วเก็บในตู้เย็น

3. ขวดที่ 3 เหล็ก (iron stock) ความเข้มข้น 100x

3.1 เทน้ำกลั่นประมาณ 300 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร
ชั่งสารแต่ละตัวดังต่อไปนี้

Na₂-EDTA 3.725 กรัม

FeSO₄.7H₂O 2.785 กรัม

3.2 ใส่สารเคมีซึ่งไว้ลงในน้ำกลั่นที่ละตัวโดยต้องให้ตัวแรกละลายหมดก่อนจึงใส่สารตัวต่อไป ทำเช่นนี้จนครบหมดทุกตัวปรับปริมาณให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

3.3 เทเก็บไว้ในขวดสีชา พร้อมทั้งเขียนรายละเอียดของสารละลายติดข้างขวดแล้วเก็บในตู้เย็น

4. ขวดที่ 4 วิตามินและสารอินทรีย์ (vitamins stock) ความเข้มข้น 100x

4.1 เทน้ำกลั่นประมาณ 700 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร
ชั่งสารแต่ละตัวดังต่อไปนี้

Glycine 0.2 กรัม

Nicotinic acid 0.05 กรัม

Pyridoxine HCl 0.05 กรัม

Thiamine HCl 0.01 กรัม

Inositol 10.0 กรัม

4.2 ใส่สารเคมีซึ่งไว้ลงในน้ำกลั่นทีละชนิดโดยต้องให้ชนิดแรกละลายหมดก่อนจึงใส่สารชนิดต่อไป ทำเช่นนี้จนครบหมดทุกชนิดปรับปริมาณให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

4.3 เทเก็บไว้ในขวดสีชา พร้อมทั้งเขียนรายละเอียดของสารละลายติดข้างขวดแล้วเก็บในตู้เย็น

ภาคผนวก ก

วิธีวัดค่าการนำไฟฟ้า

1. Calibrate เครื่องโดยใช้โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride) 0.745 g ละลายน้ำ 1 ลิตรจะได้สารละลายเข้มข้น 0.01 M มิเตอร์เครื่องจะอ่านค่าได้ 1,273 $\mu\text{s}/\text{cm}$ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
2. นับเมล็ดเทียมจำนวน 10 เมล็ด ชั่งน้ำหนักแต่ละซ้ำ เติมน้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI) 50 มิลลิตร ลงในขวด ปิดฝา
3. นำไปแช่ไว้ในอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการทำการวัดแต่ละครั้งควรเปิดเครื่องอย่างน้อย 15 นาที
4. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำสารละลายที่แช่เมล็ดไว้มาวัดค่าการนำไฟฟ้าที่ 20 องศาเซลเซียส ในการวัดตัวอย่างแต่ละครั้งจะต้องล้างอิเล็กโทรดด้วยน้ำกลั่นและเช็ดให้แห้งก่อนวัดตัวอย่างต่อไป
5. เมื่อวัดค่าการนำกระแสไฟฟ้าเสร็จแล้ว จะต้องนำค่าที่ได้มาคำนวณค่ากระแสไฟฟ้า ดังนี้

$$\text{ค่าการนำไฟฟ้า } (\mu\text{s}/\text{cm}/\text{g.seed}) = \frac{\text{ค่าการนำไฟฟ้า } (\mu\text{s}) \text{ แต่ละตัวอย่าง}}{\text{น้ำหนักของเมล็ดแต่ละตัวอย่าง (10 เมล็ด)}}$$

ภาคผนวก ง

วิธีการเตรียมอาหารสูตร MS เพื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของหนุ้าหวาน

1. วิธีการเตรียมสูตรอาหารเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของหนุ้าหวาน และย้ายเลี้ยงยอดอ่อนของหนุ้าหวาน

เตรียมสารละลายเข้มข้นในสูตรอาหาร MS ครั้งละ 1 ลิตร เพื่อใช้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของหนุ้าหวาน และใช้เป็นอาหารสำหรับย้ายเลี้ยงชิ้นส่วนของหนุ้าหวาน

1.1 ใส่น้ำกลั่นประมาณ 300 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

1.2 ชั่งน้ำตาลทราย 30 กรัม เทลงในบีกเกอร์ คนให้น้ำตาลละลายหมด

1.3 เติมสารละลายเข้มข้นจากภาคผนวก ข คนให้สารละลายให้เข้ากัน

1.4 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin 3 mg/l. ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร

1.5 เทใส่บีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ด้วย 1 M NaOH และ 1 M HCl ให้อยู่ในช่วงระหว่าง pH 5.7

1.6 ชั่งวุ้น 7 กรัม ใสลงในบีกเกอร์ คนให้กระจายตัวดีแล้วนำไปต้มให้วุ้นละลายหมดซึ่งจะทำให้อาหารใส

1.7 เทอาหารวุ้นลงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 8 ออนซ์ ระวังอย่าให้อาหารเปื้อนปากขวด ปิดฝาให้แน่นใส่ถุงพลาสติก รัดด้วยยางรัด

1.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

1.9 นำขวดเพาะเลี้ยงออกจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอที่เย็นแล้ว เก็บในตู้ที่สะอาดมิดชิดเพื่อนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ/เมล็ดและการย้ายเลี้ยงยอดอ่อนของหนุ้าหวานต่อไป

2. วิธีการเตรียมสูตรอาหารเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อหญ้าหวานเพื่อเตรียมต้นหญ้าหวานที่ปลอดเชื้อ
เตรียมสารละลายเข้มข้นในสูตรอาหาร MS ครั้งละ 1 ลิตร เพื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อหญ้า
หวานให้เป็นต้นปลอดเชื้อ

2.1 ใส่ น้ำกลั่นประมาณ 300 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

2.2 ชั่ง น้ำตาลทราย 30 กรัม เทลงในบีกเกอร์ คนให้น้ำตาลละลายหมด

2.3 เติมสารละลายเข้มข้นจากภาคผนวก ข และเติม kinetin 3 mg/l. คนให้สารละลายเข้า
กัน

2.4 เทใส่บีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ด้วย 1 M NaOH และ 1 M HCl ให้
อยู่ในช่วงระหว่าง pH 5.7

2.5 ชั่งวุ้น 7 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ คนให้กระจายตัวดี แล้วนำไปต้มให้วุ้นละลายหมดซึ่ง
จะทำให้อาหารใส

2.6 เทอาหารวุ้นลงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 8 ออนซ์ ระวังอย่าให้อาหารเปื้อนปากขวด ปิด
ฝาให้แน่นใส่ถุงพลาสติก รัดด้วยยางรัด

2.7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศา
เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2.8 นำขวดเพาะเลี้ยงออกจากหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่เย็นแล้ว เก็บไว้ในตู้ที่สะอาด
มิดชิด เพื่อนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อหญ้าหวานเพื่อทดสอบกับสารควบคุมการ
เจริญเติบโตต่อไป

