

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาคผนวก ก

มหาวิทยาลัยศิลปากร ส่วนนิชสิทธิ์
การเตรียมอาหารและการเร่งการเจริญเติบโต

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสูตร Vacin and Went (1949) และสูตรดัดแปลงของ VW ที่ปรับลดปริมาณไนโตรเจนจาก 9 มิลลิโมลาร์ เป็น 4.5 มิลลิโมลาร์

องค์ประกอบ	สูตรอาหาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	VW	4.5VW
ธาตุอาหารหลัก		
Ca_3PO_4	200	200
KNO_3	525	262.5
KH_2PO_4	250	250
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	250
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500	250
KCl	-	193.7
ธาตุอาหารรอง		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	28.0	28.0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7.5	7.5
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	73.0	73.0
สารอินทรีย์		
Sucrose	20,000 (20 g/l)	20,000 (20 g/l)
phytagel	2,500 (2.5 g/l)	2,500 (2.5 g/l)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962)

องค์ประกอบ	มิลลิกรัมต่อลิตร
ธาตุอาหารหลัก	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
KNO_3	1,900
NH_4NO_3	1,650
KH_2PO_4	170
ธาตุอาหารรอง	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
KI	0.83
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
H_3BO_3	6.2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
สารอินทรีย์	
Na_2EDTA	37.3
Thiamine-HCl	0.1
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Glycine	2
Myo-inositol	100
Sucrose	30,000 (30 g/l)
phytagel	2,500 (2.5 g/l)

การคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนรวมในอาหารสูตร VW ตามตารางที่ 1

-ไนโตรเจนในรูป $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ มีน้ำหนักโมเลกุล 132.154 ประกอบด้วย N = 28.02

ในอาหาร 1,000 มิลลิลิตร ใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 500 มิลลิกรัม ประกอบด้วย

$$N = (500 \times 28.02) / 132.154$$

$$= 106.013 \text{ มิลลิกรัม}$$

$$\text{จำนวนโมลของ N ใน } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 106.013 / 28.02 = 3.8 \text{ มิลลิโมลาร์}$$

-ไนโตรเจนในรูป KNO_3 มีน้ำหนักโมเลกุล 101.11 ประกอบด้วย N = 14.01

ในอาหาร 1,000 มิลลิลิตร ใช้ KNO_3 525 มิลลิกรัม ประกอบด้วย

$$N = (525 \times 14.01) / 101.11$$

$$= 72.745 \text{ มิลลิกรัม}$$

$$\text{จำนวนโมลของ N ใน } \text{KNO}_3 = 72.745 / 14.01 = 5.2 \text{ มิลลิโมลาร์}$$

$$\text{ดังนั้นปริมาณไนโตรเจนรวมในอาหารสูตร VW} = 3.8 + 5.2 = 9 \text{ มิลลิโมลาร์}$$

มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ สงขลา

การเตรียมสารละลายเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโต

1. BA (6- Benzylaminopurine) ความเข้มข้น 1.0 mg/ml
ละลายฮอร์โมน BA 100 มิลลิกรัม ใน 0.1% KOH 1-2 มิลลิลิตร (หรือละลายหมด)
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร
2. NAA (α - Naphthalene acetic acid) ความเข้มข้น 1.0 mg/ml
ละลายฮอร์โมน NAA 100 มิลลิกรัม ใน 0.1% KOH 1-2 มิลลิลิตร (หรือละลายหมด)
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาคผนวก ข

การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชด้วยวิธีฟาราฟินและวิธีย้อมสีเนื้อเยื่อพืช

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

1. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชด้วยวิธีพาราฟิน

สารละลายที่ใช้

1. สารละลายที่ใช้รักษาสภาพเนื้อเยื่อพืช (fixative)

Formalin-Aceto-Alcohol (FAA)

50% (หรือ 70%) ethanol 90 มล.

glacial acetic acid 5 มล.

formalin 5 มล.

2. สารละลายที่ใช้แทนที่น้ำ (dehydrating agent)

ethanol และ *n*-butanol

3. สารที่ใช้ฝังเนื้อเยื่อ (embedding media)

พาราฟินเหลว (paraplast)

วิธีทำ

1. ใช้ใบมีดโกนตัดตัวอย่างพืชเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 5-8 มม. ขณะตัดให้ชิ้นส่วนดังกล่าวอยู่ในน้ำ

2. แช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลาย FAA เป็นเวลาอย่างน้อย 18 ชั่วโมง

3. ล้างชิ้นส่วนพืชใน - 50% ethanol ครั้งแรก 2-3 นาที

- 50% ethanol ครั้งที่ 2 1-2 ชั่วโมง ถึงล้างคืน

- 70% ethanol ค้างคืน

4. แทนที่น้ำภายในเซลล์ (dehydration) ด้วยสารละลาย ethanol กับ *n*-butanol ตามลำดับ

ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ (1-5) คือ ตั้งแต่ 50%, 70%, 85%, 95% และ 100% แอลกอฮอล์ ขึ้นละ

1 ชั่วโมง

ส่วนผสมของสารละลายแอลกอฮอล์ (1-5):

1. น้ำกลั่น 50 มล.

95% ethanol 40 มล.

butanol 10 มล.

2. น้ำกลั่น 30 มล.

95% ethanol 50 มล.

butanol 20 มล.

3. น้ำกลั่น	15 มล.
95% ethanol	50 มล.
butanol	35 มล.
4. 95% ethanol	45 มล.
butanol	55 มล.
5. absolute ethanol	25 มล.
butanol	75 มล.

5. เปลี่ยนมาแช่ใน absolute ethanol นาน 1 ชั่วโมง

6. แช่ใน absolute ethanol ที่หยดสี eosin หรือ light green ลงไปเล็กน้อย ทิ้งไว้ค้างคืน (การหยดสีลงไปด้วยเพื่อให้ชิ้นส่วนพืชมีสี ช่วยให้มองเห็นง่าย สีที่ติดบนเนื้อเยื่อนี้จะหลุดออกเมื่อ section ผ่านแอลกอฮอล์ ในขั้นตอนการย้อมสี)

7. ถ่ายชิ้นส่วนพืชมาแช่ในพาราฟินที่หลอมเหลวแล้วในตู้อบพาราฟิน (อุณหภูมิ 58°C)

ประมาณ 1 ชั่วโมง (P_1) แล้วเปลี่ยนพาราฟินใหม่อีก 2 ครั้ง (P_2, P_3) แต่ละครั้งใช้เวลาอยู่ในตู้อบนาน 1-2 ชั่วโมง (แล้วแต่ลักษณะของเนื้อเยื่อ)

8. เทพาราฟินเหลวลงในแบบ (embedding mold) แล้วฝังชิ้นส่วนพืชลงในแบบทันที และจัดเรียงให้อยู่ในแนวที่ต้องการ ตั้งทิ้งไว้จนพาราฟินแข็งตัว จากนั้น แกะแบบออก นำแท่งพาราฟินพร้อม label

9. นำแท่งพาราฟินที่มีชิ้นส่วนพืชไปตัดด้วยเครื่องไมโครโทม ความหนาของ section 10-12 μM ติด section บนแผ่นสไลด์

10. นำสไลด์ไปเข้าตู้อบ (อุณหภูมิประมาณ 56-60°C) อบนาน 45-60 นาที เพื่อให้ section ที่ติดบนแผ่นสไลด์แห้งสนิทและติดแน่น จากนั้นนำสไลด์ไปเก็บไว้ในกล่อง รอย้อมสีต่อไป

2. วิธีย้อมสีเนื้อเยื่อพืชด้วยสี safranin & fast green

สีย้อม:

1% aqueous safranin

safranin O (C.I. 50240) 1 กรัม

น้ำกลั่น 100 มล.

0.2% fast green ในแอลกอฮอล์

fast green FCF (C.I. 42053) 0.2 กรัม

absolute ethanol 100 มล.

วิธีย้อม:

1. ละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ โดยจุ่มสไลด์ลงใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 5-10 นาที
2. เพิ่มน้ำ โดยแช่สไลด์ลงใน:
 - 95% ethanol 2 ครั้งๆ ละ 3-5 นาที
 - 70% ethanol 2-3 นาที
 - 50% ethanol 2-3 นาที
 - จุ่มในน้ำประปา
3. ย้อมสี section ด้วย 1% aqueous safranin O นาน 30-50 นาที
4. ล้างสีที่ติดบนสไลด์ออกโดยจุ่มยกในน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำ 2 ครั้ง
5. แทนที่น้ำด้วย 50%, 70% และ 95% ethanol ขึ้นละ 2-3 นาที
6. counterstain ด้วย 0.2% fast green ในแอลกอฮอล์ (1-15 วินาที)
7. ล้างสีส่วนเกินและขจัดน้ำออกด้วย absolute ethanol 2 ครั้ง
8. ทำให้ใสด้วย xylene 2 ครั้งๆ ละ 3-5 นาที
9. หยด DPX แล้วปิด แผ่นแก้วทับ
10. ทำความสะอาดสไลด์ และ label

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวดวงพร โรจนวงศ์
ที่อยู่ 240 (โครงการร่วมกันสร้าง) ถนนลาดพร้าว 101 แขวงคลองจั่น อำเภอ
บางกะปิ จังหวัดกรุงเทพ 10240

ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2542 สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนมัธยมวัดบึงทองหลาง
- พ.ศ. 2545 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สาขา
ชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยศิลปากร
การศึกษารายบุคคลเรื่อง “การใช้ไอน้ำส้มสายชูเพื่อลดการเน่าเสียของ
มะละกอหลังเก็บเกี่ยว”
- พ.ศ. 2546 ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศิลปากร
วิทยานิพนธ์เรื่อง “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำให้ออกดอกใน
หลอดทดลองของกล้วยไม้ลูกผสมฟาเลนอปซิส (*Phalaenopsis Silky
Moon*)”

ผลงานที่ตีพิมพ์เผยแพร่

Rojanawong T, Thepsithar C, Thongpukdee A (2006) *In vitro* flower bud induction of *Phalaenopsis* Cygnus ‘Silky Moon’ from seed-derived plantlets. *Proceeding: 32nd Congress on Science and Technology of Thailand — Science and Technology for Sufficiency Economy to Celebrate the 60th Anniversary of the Majesty the King’s Accession to the Throne*. Sirikit Convention Hall, Bangkok, Thailand, 10-12 October, F_0008

Rojanawong T, Thepsithar C, Thongpukdee A (2006) *In vitro* seed culture of *Phalaenopsis* hybrids (*Phalaenopsis* Cygnus ‘Silky Moon’). *The Sixth National Horticulture Congress*, Lotus Hotel Pang Suan Kaew, Chaingmai, Thailand, 7-10 November, (Abstract), P215, p 329

Rojanawong T, Thepsithar C, Thongpukdee A (2006) Micropropagation of *Phalaenopsis*

Cygnus ‘Silky Moon’ from leaf segments. *Proceeding: 32nd Congress on Science and Technology of Thailand — Science and Technology for Sufficiency Economy to Celebrate the 60th Anniversary of the Majesty the King’s Accession to the Throne*. Sirikit Convention Hall, Bangkok, Thailand, 10-12 October, F_0006

Rojanawong T, Channuntapipat C, Boonyakitjinda V (2003) Effect of vinegar vapor on postharvest of papaya. *2nd National Technical Seminar on Postharvest/Post Production Technology*. KhonKhan, Thailand, p 88

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์