

## ภาคผนวก ค

### สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

#### สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

##### LSTB (Lauryl sulfate tryptose broth)

ทริฟโตส (tryptose)	20.0	g
แลคโทส (lactose)	5.0	g
ไดโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	2.75	g
โมโนโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ )	2.75	g
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	g
โซเดียมลอริลซัลเฟต (sodium lauryl sulfate)	0.1	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

ก่อนทำการนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับ pH ให้ได้ 6.8 บรรจุหลอดดักแก๊สลงในหลอดอาหารในลักษณะคว่ำ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 12 °C 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์

##### BGLB (Brilliant green lactose bile broth)

เปปโตน (peptone)	10	g
แลคโทส (lactose)	10	g
Oxgall (Bile salt )	20	g
Brilliant green (เกล็ดสีเขียว)	0.0133	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

ก่อนทำการนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับ pH ให้ได้ 7.2 บรรจุหลอดดักแก๊สลงในหลอดอาหารในลักษณะคว่ำหลอดแล้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 121 °C 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์

##### EC ( *E. coli* broth )

ทริฟโตน หรือทริฟติเคส (tryptone or trypticase)	20	g
แลคโทส (lactose)	5.0	g
bile salt no.3 หรือ bite salt mixture	1.5	g
ไดโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ )	4.0	g
โมโนโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ )	1.5	g
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

ก่อนทำการนึ่งฆ่าเชื้อปรับ pH ให้ได้ 6.9 บรรจุหลอดดักแก๊สลงในหลอดอาหาร ในลักษณะคว่ำหลอดแล้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 121 °C 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์

#### สูตรอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

### Bold's basal medium

1. ธาตุอาหารหลัก (macronutrient)

2. ธาตุอาหารที่จำเป็น (trace element)

**ธาตุอาหารหลัก (macronutrient) มีทั้งหมด 6 ชนิด**

โซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ )	10	g
แคลเซียมคลอไรด์ 2-ไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	1	g
แมกนีเซียมซัลเฟต 7-ไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	3	g
ไดโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	3	g
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	7	g
โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ )	1	g
นำเกลือแต่ละชนิดละลายในน้ำกลั่นอย่างละ	400	ml

**ธาตุอาหารที่จำเป็น (trace element) มีทั้งหมด 4 ชนิด**

ก. EDTA stock

ข. H-Fe stock

ค. Boron stock

ง. H-H5 stock

**EDTA stock ประกอบด้วย**

- EDTA	50.0	g
- โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ความบริสุทธิ์ 85 % (KOH)	31.0	g
นำส่วนประกอบทั้งสองละลายในน้ำกลั่น	1,000	ml

**H-Fe stock ประกอบด้วย**

- เฟอร์รัสซัลเฟต 7-ไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	4.98	g
ละลายเฟอร์รัสซัลเฟตในน้ำที่เป็นกรด 1 ลิตร (แทนการใช้น้ำกลั่นธรรมดา) เตรียมได้โดยเติมกรดซัลฟูริก ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) เข้มข้น 1 ml ลงในน้ำกลั่น 999 ml		

**Boron stock ประกอบด้วย**

- กรดบอริก ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	11.42	g
ละลายในน้ำกลั่น	1,000	ml

**H-H5 stock ประกอบด้วย**

- ซิงค์ซัลเฟต 7-ไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	8.82	g
- โมลิบดีนัมออกไซด์ ( $\text{MoO}_3$ )	0.71	g
- โคบอลท์ไนเตรท 6-ไฮเดรต [ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ]	0.49	g
- แมงกานีสคลอไรด์ 4-ไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	1.44	g
- คอปเปอร์ซัลเฟต 5-ไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	1.57	g
นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำที่เติมกรด (เตรียมเหมือนข้อ ข.) ปริมาตร 1,000 ml		

**วิธีเตรียมอาหาร**

ผสมสารละลายทั้ง 2 ประเภทเข้าด้วยกันดังนี้

- สารละลายธาตุอาหารหลักชนิดละ	10 ml (6 ชนิด)
-------------------------------	----------------

- สารละลายธาตุอาหารที่จำเป็นชนิดละ	1 ml (4 ชนิด)
- เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1,000 ml

### Modified Chu No.10 medium

ประกอบด้วยสารละลายของเกลือ 3 ประเภท ได้แก่

#### 1. สารละลายสต็อก (stock solution)

แคลเซียมคลอไรด์ 2-ไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	3.67	g
แมกนีเซียมซัลเฟต 7-ไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	3.69	g
โซเดียมไบคาร์บอเนต ( $\text{NaHCO}_3$ )	1.26	g
ไดโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0.87	g
โซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ )	8.5	g
โซเดียมเมตาซิลิเกต 9-ไฮเดรต ( $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )	2.84	g

นำเกลือแต่ละชนิดละลายในน้ำกลั่น 100 ml แล้วนำสารละลายไปฆ่าเชื้อ

#### 2. สารละลายเหล็ก (iron solution)

ละลายสารน้ำส้ม Acetic acid ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 3.35 g ในน้ำกลั่น 100 ml แล้วเติมเฟอร์ริกซิเตรต ( $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 3.35 g นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน รินสารละลายที่ฆ่าเชื้อแล้วใส่หลอดที่ปลอดเชื้อ หุ้มหลอดด้วยกระดาษตะกั่วแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

#### 3. สารละลายแร่ธาตุที่จำเป็น (trace element solution)

คอปเปอร์ซัลเฟต 5-ไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	19.6	g
ซิงค์ซัลเฟต 7-ไฮเดรต ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	44.0	g
โคบอลต์คลอไรด์ 6-ไฮเดรต ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	20.0	g
แมงกานีสคลอไรด์ 4-ไฮเดรต ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	36.0	g
โซเดียมโมลิบเดต 2-ไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	12.6	g
กรดบอริก ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	618.4	g

**วิธีเตรียมอาหาร** ผสมสารละลายทั้ง 3 ประเภทเข้าด้วยกัน ดังนี้

ผสมสารละลายสต็อก (ข้อ 1.) 6 ชนิดๆ 1 ml กับน้ำกลั่น 1,000 ml

เติมสารละลายเหล็ก (ข้อ 2.) 1 ml

เติมสารละลายแร่ธาตุที่จำเป็น (ข้อ 3.) 1 ml

### BG -11 medium

แมกนีเซียมซัลเฟต 7-ไฮเดรต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.075	g
โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	0.02	g
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต 7-ไฮเดรต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.04	g
แคลเซียมคลอไรด์ 2-ไฮเดรต ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.036	g
กรดซิตริก ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ )	0.006	g

ไดโซเดียมแมกนีเซียม EDTA	0.001	g
โซเดียมไนเตรท (NaNO <sub>3</sub> )	1.5	g
เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรท (ferric ammonium citrate)	0.006	g
Trace Metal Mix A5+Co	1	ml
Deionized water เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1,000	ml

#### วิธีการเตรียม Trace Metal Mix A5+Co

กรดบอริก (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	2.86	g
แมงกานีสคลอไรด์ 4-ไฮเดรต (MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O)	1.81	g
ซิงค์ซัลเฟต 7-ไฮเดรต (ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0.222	g
โซเดียมโมลิบเดต 2-ไฮเดรต (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)	0.390	g
คอปเปอร์ซัลเฟต 5-ไฮเดรต (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)	0.079	g
โคบอลท์ไนเตรท 6-ไฮเดรต [Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O]	0.049	g

#### Algal medium

โซเดียมไนเตรท (NaNO <sub>3</sub> )	1.0	g
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH <sub>4</sub> Cl)	50	mg
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl <sub>2</sub> )	58	mg
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO <sub>4</sub> )	0.513	mg
ไดโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนออร์โทฟอสเฟต (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.25	g
เฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl <sub>3</sub> )	0.3	mg
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1,000	ml

การเตรียมอาหารสูตร Bold' basal medium, Modified Chu No.10 medium และ BG-11 ร่วมกับน้ำทิ้งจากโรงอาหาร

สูตรอาหารพื้นฐาน	1	ส่วน
น้ำทิ้งจากโรงอาหาร (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ)	1	ส่วน

วิธีเตรียม นำอาหารทั้ง 2 ส่วนรวมกันในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C 15 นาที

#### การเตรียมอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. วิธีการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS,1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญโดยเติม naphthaleneacetic acid (NAA) และ N<sub>6</sub>- Benzyladenine (BA)

เตรียมอาหารสูตร MS จำนวน 2.4 ลิตร เพื่อศึกษาผลของอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญชนิด naphthaleneacetic acid (NAA) และ N<sub>6</sub>- Benzyladenine (BA) ในสูตรอาหารที่มีผลต่อการงอกและการเจริญพัฒนาของผลอ่อนมะนาวป่าสามารถเตรียมได้ดังนี้

1.1 ดูดสารละลายจาก Stock solution ต่าง ๆ มารวมกัน โดย

Stock solution I            48 มิลลิลิตร

Stock solution II           24 มิลลิลิตร

Stock solution III          2.4 มิลลิลิตร

Stock solution IV          24 มิลลิลิตร

Stock solution V           24 มิลลิลิตร

Stock solution VI          24 มิลลิลิตร

1.2 เติมน้ำตาลซูโครสจำนวน 72 กรัมต่อลิตร

1.3 ปรับปริมาตร 2,400 มิลลิลิตร

1.4 เทแบ่งใส่บีกเกอร์ละ 200 มิลลิลิตร

1.5 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.1 และ 0.5 ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.5 1.0 และ 2.0

1.6 ปรับปริมาตรให้แต่ละบีกเกอร์ครบ 200 มิลลิลิตร

1.7 นำไปปรับค่า pH ให้ได้ค่า 5.5-5.7

1.8 ชั่งวุ้น 2 กรัม ทั้งหมด 12 บีกเกอร์ แล้วค่อย ๆ เติมลงในบีกเกอร์คนให้เข้ากัน

1.9 หลอมวุ้นให้ละลายและบรรจุใส่ขวดอาหาร

1.10 นำขวดที่บรรจุอาหารแล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที