บทปฏิบัติการ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ศ.ดร.อารีย์ วรัญญูวัฒก์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำนำ

ปทปฏิบัติการ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นคู่มือที่เตรียมขึ้นเพื่อให้นักศึกษาใช้ประกอบการฝึกปฏิบัติการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของพืช เช่น เมล็ด ตา ใบ คัพภะ และอับเรณู เพื่อให้เกิดผลตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ พืชตัวอย่างที่ใช้ในการปฏิบัติ อาจมีความแตกต่างจากพืชชนิดอื่น แต่หลักการที่กล่าวถึงนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับพืชชนิดอื่นได้ แต่อาจต้องดัดแปลงสูตรอาหาร และวิธีการปลีกย่อยให้เหมาะสมกับชนิดและพันธุ์พืชนั้นๆ

อารีย์ วรัญญวัฒก์
กันยายน ๒๕๔๕

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
อ. เมือง จ. นครราชสีมา ๓๐๐๐๐

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

		หน้า
คำนำ		
บทปฏิบัติการที่ 1	หลักปฏิบัติและการใช้ห้องปฏิบัติการ	1
บทปฏิบัติการที่ 2	การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง	6
บทปฏิบัติการที่ 3	การเพาะเลี้ยงแคลลัส	15
บทปฏิบัติการที่ 4	การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอ	18
บทปฏิบัติการที่ 5	การเพาะเลี้ยงตายอดและตาข้าง	21
บทปฏิบัติการที่ 6	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบ	26
บทปฏิบัติการที่ 7	การเพาะเลี้ยงเมล็ด	29
บทปฏิบัติการที่ 8	การเพาะเลี้ยงอับเรณู	33
บทปฏิบัติการที่ 9	การชักนำให้เกิดต้นอ่อน	37
บทปฏิบัติการที่ 10	การย้ายต้นอ่อนออกปลูก	41
ภาคผนวก	รายชื่อสารเคมีบางชนิดพร้อมน้ำหนักโมเลกุล	45
	สารเคมีบางอย่างที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	49
	ตารางค่าแปลงจากมิลลิกรัมต่อลิตรเป็นไมโครโมลาร์	50

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ ๑
หลักปฏิบัติและการใช้ห้องปฏิบัติการ

ก. ระเบียบปฏิบัติทั่วไป

การใช้ห้องปฏิบัติจะต้องยึดหลักปฏิบัติเดียวกันเพื่อความเป็นระเบียบปลอดภัย และให้เกิดผลตามวัตถุประสงค์ ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งอาจตั้งกฎระเบียบไว้ให้ทุกคนปฏิบัติ เพื่อประโยชน์ของส่วนรวมและของผู้ ปฏิบัติเอง

- ทุกคนต้องนึกถึงความปลอดภัยที่จะเกิดจากการทำงานในห้องปฏิบัติการซึ่งอาจเกิดจากไฟ สารเคมี เครื่องแก้ว สารกัมมันตรังสีและอื่น ๆ
- ทุกคนต้องช่วยกันรักษาความสะอาด ต้องเช็ดทำความสะอาดทุกครั้งหลังจากที่ทำงานเสร็จสิ้นในวันนั้นแล้ว อย่าทิ้งภาระที่ตนเองทำไว้ให้คนอื่น
- ต้องช่วยกันประหยัด ใช้วัสดุ หรือพลังงานด้วยความประหยัด เช่น สารเคมี น้ำ ไฟฟ้า ฯลฯ
- เก็บ และล้างภาชนะทุกชิ้นที่ตนเองใช้ และวางไว้ในที่อันเหมาะสม
- น้ำที่ใช้ล้างภาชนะ เครื่องแก้วครั้งสุดท้าย ควรเป็นน้ำกลั่น
- หลังล้างเสร็จแล้ว ให้วางคว่ำภาชนะทุกชิ้นให้แห้งก่อนเก็บเข้าที่ในตู้เก็บที่มิดชิด เพื่อป้องกันฝุ่นละอองตกเข้าไปภายใน
- ก่อนใช้อุปกรณ์ทุกชนิด จะต้องเข้าใจและรู้วิธีใช้จากผู้รู้ก่อน การใช้ผิดวิธีจะทำให้เกิดผลเสียกับอุปกรณ์นั้น ๆ ได้ เช่น เครื่องชั่ง เครื่องวัด pH ฯลฯ
- ตามปกติ สารเคมีจะถูกจัดวางไว้ตามลำดับอักษรเพื่อความสะดวกในการค้นหา ดังนั้นหลังใช้แล้วควรเก็บเข้าที่เดิมทันทีหลังชั่งเสร็จ
- การชั่งสารเคมี ควรตักใส่ภาชนะหรือกระดาษไข <u>ห้าม</u> วางสารเคมีบนแท่นชั่งโดยตรง ให้เทสารเคมีทีละน้อยจนครบตามต้องการ
- วัสดุ อุปกรณ์ทุกชนิดเป็นสมบัติของห้องปฏิบัติของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ไม่สมควรที่ใครจะหยิบฉวยเอาออกไปจากห้องโดยพลการ

ข. ข้อปฏิบัติในการใช้ตู้ปลอดเชื้อ

- ให้เปิดไฟ UV ทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที พร้อมเปิดพัดลมก่อนที่จะใช้งาน
- หลังจากปิดไฟ UV ให้ฉีดแอลกอฮอล์ 70% ให้ทั่วภายในตู้
- ควรฉีดพ่นแอลกอฮอล์กับอุปกรณ์ทุกชิ้นก่อนนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ
- หลังจากใช้เสร็จแล้ว ควรเช็ดให้สะอาด
- ไม่ควรทิ้งอะไรไว้ในตู้ เพราะจะกีดขวางการปฏิบัติงานของผู้อื่นที่จะใช้ทีหลัง

- ไม่ควรแช่อุปกรณ์ เช่น ปากคีบ มีดผ่าตัดไว้ในแอลกอฮอล์ เพราะอาจเกิดการกัดกร่อนกับโลหะได้

- ตรวจความเรียบร้อยภายในตู้ก่อนจากไป เช่น ปิดไฟ ปิดพัดลม ปิดประตูตู้ (ถ้ามี) ปิดแก๊ส (กรณีใช้เตาแก๊ส) ถอดปลั๊กอุปกรณ์ทุกชนิดเพื่อประหยัดพลังงาน

- ควรสังเกตแรงพัดลมของตู้ปลอดเชื้อเป็นครั้งคราว เพราะอาจเกิดการอุดตันของไส้กรองจากฝุ่นละออง เพื่อเจ้าหน้าที่จะได้ให้บริการหรือเปลี่ยนไส้กรองใหม่

ค. ข้อปฏิบัติในการใช้สารกัมมันตภาพรังสี

ผู้ที่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี (radioisotopes) ต้องคำนึงถึงความปลอดภัยทั้งต่อตนเองและผู้อื่นอย่างเคร่งครัด ต้องบันทึกปริมาณการใช้และที่เหลืออย่างรัดกุม ทิ้งส่วนที่ใช้แล้วอย่างระมัดระวังอย่าให้ตกหล่นในบริเวณที่ปฏิบัติงาน การกำจัดเศษซากที่ใช้แล้วจะต้องกระทำโดยเจ้าหน้าที่ที่รับผิดชอบเรื่องนี้โดยตรง

สารกัมมันต์ที่ยังไม่ได้ใช้ควรเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ -20 หรือ -70 องศาเซลเซียส สารกัมมันต์ที่มักจะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทางเทคโนโลยีชีวภาพมีหลายชนิด ซึ่งผู้ที่เกี่ยวข้องควรทราบแนวทางปฏิบัติดังนี้

^{3}H (Tritium)

^{3}H มีพลังงานต่ำ (เฉลี่ย 7 KeV) ที่ปลดปล่อยสารกัมมันต์ beta มีอายุครึ่งชีวิต 12 ปี ผู้ใช้ไม่จำเป็นต้องมีสิ่งปกป้องร่างกาย เพราะแม้จะกระเด็นถูกผิวหนังก็ไม่ซึมผ่านเข้าไปได้ แต่ระวังอย่าให้เข้าตา ปาก หรือรอยแผล

^{14}C

เป็นสารมีพลังงานต่ำเช่นเดียวกัน มีค่าเฉลี่ยประมาณ 50 Ke V หรือเกือบ 10 เท่าของ ^{3}H และต่ำกว่า ^{32}P ประมาณ 10 เท่า สารกัมมันต์ที่ปลดปล่อยมาจาก ^{14}C จะถูกดูดซับไว้ในอากาศโดยรอบ 1 ฟุต ดังนั้นจึงมีเพียง 10% ที่สามารถซึมผ่านผิวหนัง จึงอาจไม่จำเป็นต้องมีสิ่งปกป้องร่างกาย การสวมถุงมือก็เป็นการปลอดภัยครึ่งอายุขัยของ ^{14}C คือ 5730 ปี

ภาชนะที่ตรวจพบมีสารกัมมันต์นี้น้อยกว่า 0.05 microcuries/ml สามารถทิ้งในถังขยะธรรมดาได้

^{32}P

สารนี้มีพลังงานค่อนข้างสูง (เฉลี่ย 700 Ke V) มีครึ่งอายุขัยเพียง 14.3 วัน สารกัมมันต์ที่ปลดปล่อยออกมาสามารถป้องกันได้โดยสารตะกั่ว ไม้หรือกระจกหนาประมาณ 1.2 นิ้ว ถ้าหากใช้สารกัมมันต์นี้ตั้งแต่ 5 millicuries ขึ้นไป ควรสวมเสื้อคลุมและแว่นตา เครื่อง Geiger counter สามารถใช้ตรวจสอบสารกัมมันต์นี้ได้อย่างดี ถ้ามีการใช้สารกัมมันต์ชนิดนี้ควรมีวัสดุปูพื้นโต๊ะทำงานที่สามารถดูดซับเมื่อมีการกระเด็นหรือหก และควรตรวจสอบด้วยเครื่องเสมอหลังจากเสร็จสิ้นการทำงานแล้ว

เนื่องจากมีครึ่งอายุขัยสั้น จึงสามารถเก็บเศษซากหลังใช้แล้วไว้นานประมาณ 7 เท่า ของครึ่งอายุขัย คือ 3.5 เดือน ก่อนที่จะทิ้งถังขยะธรรมดาได้อย่างปลอดภัย

^{32}S

สารนี้ปลดปล่อยพลังงานออกมาเท่ากับ ^{14}C วิธีการปฏิบัติเหมือนกันทุกประการ การสวมเสื้อคลุมและถุงมือยางก็เป็นการเพียงพอ ครึ่งอายุขัยของสารกัมมันต์ 90 วัน

ส่วนที่เป็นของเหลวของสารกัมมันต์นี้ควรทำปฏิกิริยากับ $CaSO_4$ ก่อนที่จะทิ้ง ส่วนที่บรรจุในหลอดแก้ว จะต้องเก็บไว้ 2 ปี ก่อนทิ้ง

ง. อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ

1. ชั้นวางภาชนะเพาะเลี้ยงที่มีไฟฟ้าให้แสงสว่าง โดยปกติใช้หลอดนีออน ควรมีสวิทช์ปิดเปิดแยกอิสระแต่ละชั้น ควรใช้วัสดุปูพื้นชนิดเป็นฉนวนกันความร้อน เพื่อไม่ให้เกิดการกลั่นตัวเป็นหยดน้ำภายในภาชนะ

2. เครื่องเขย่า (shaker) อาจจำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบางชนิดที่ต้องเลี้ยงในอาหารเหลว สามารถปรับความเร็วของการเขย่าได้ระหว่าง 100-130 รอบต่อนาที การเหวี่ยงของการเขย่าอาจเป็นแบบวงกลม (orbital) หรือไป - กลับ (reciprocating) ขึ้นกับชนิดของพืช ส่วนใหญ่เป็นประเภทแรก

3. หม้อนึ่งความดัน (autoclave) อาจเป็นหม้อนึ่งโลหะขนาดเล็กที่มีระบบควบคุมความดัน หรือเป็นขนาดใหญ่ที่เป็นระบบอัตโนมัติ

4. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow cabinet) ซึ่งมีระบบลมเป่าผ่านไส้กรองขนาดเล็กมาก ซึ่งสามารถดักจับอนุภาคเล็ก ๆ ของเชื้อจุลลินทรีย์ได้ ดังนั้น ภายในตู้จึงปลอดเชื้อปนเปื้อน

5. ตู้เย็น ใช้สำหรับเก็บสารเคมีบางชนิดที่ต้องเก็บในที่เย็น และใช้เก็บสารละลายหัวเชื้อ (stock solutions) เพื่อใช้เตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

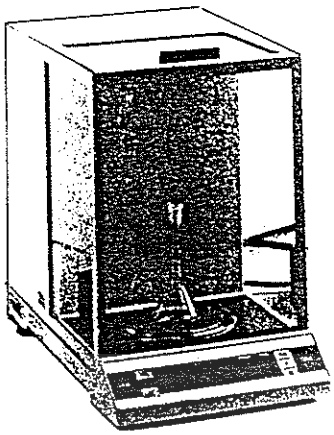
6. เครื่องชั่ง อย่างน้อย 2 ชุด คือชนิดชั่งละเอียด (analytical balance) สามารถชั่งได้ในปริมาณน้อยถึง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง และชนิดชั่งหยาบ มีทศนิยม 2 ตำแหน่ง

7. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ควรเป็นชนิดที่สามารถให้ความร้อนได้ด้วย บางกรณีจำเป็นต้องต้มสารละลายขณะที่กวนตลอดเวลา

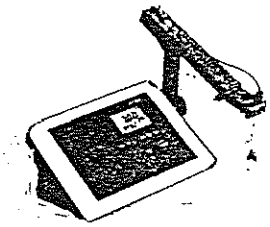
8. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

9. ภาชนะเครื่องแก้วหลายชนิด เช่น กระบอกตวง (cylinder) volumetric flasks, beakers, Erlenmeyer flasks, จานแก้วหรือพลาสติก (petri dish), หลอดตวง (pipette) และหลอดหรือขวดเพาะเลี้ยง เป็นต้น

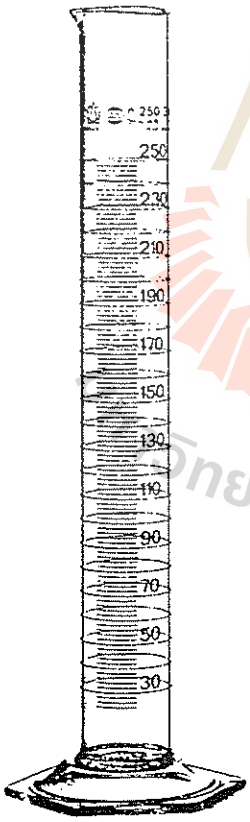
10. ยังมีอุปกรณ์อีกหลายชนิดที่ต้องใช้ประกอบ เช่น เครื่องบด (blender) ปากคีบขนาดความยาวต่างกัน กล้องจุลทรรศน์ จำเป็นสำหรับงานบางชนิด เป็นต้น



เครื่องชั่ง



เครื่องวัด pH



กระบอกตวง

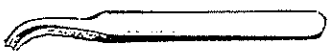
จานแก้ว

บีกเกอร์

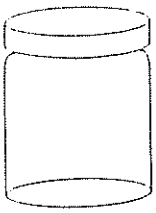
ฟลาสก์

ช้อนตัก

คีมยาว



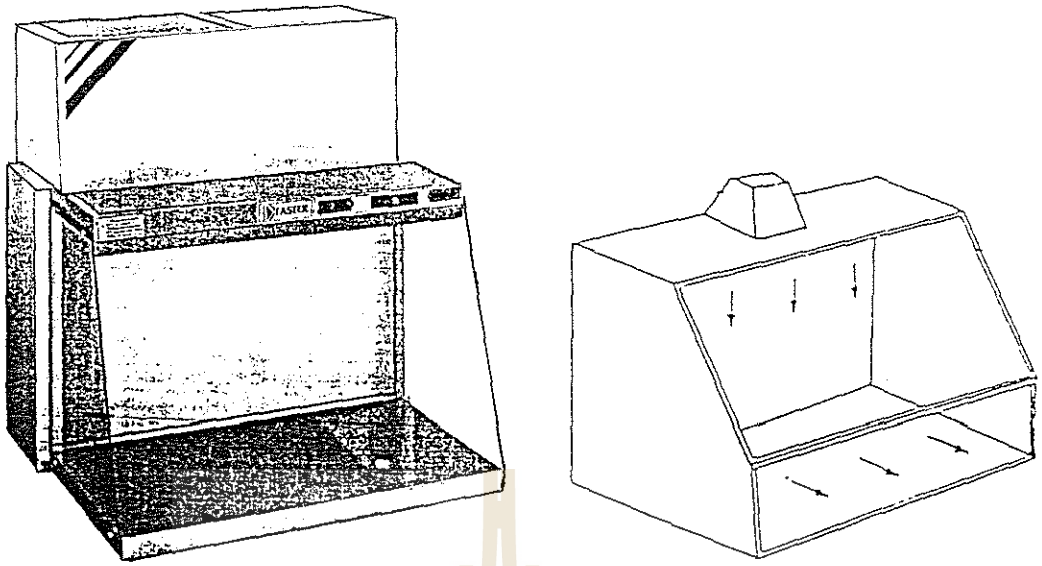
คีมปลายโค้ง



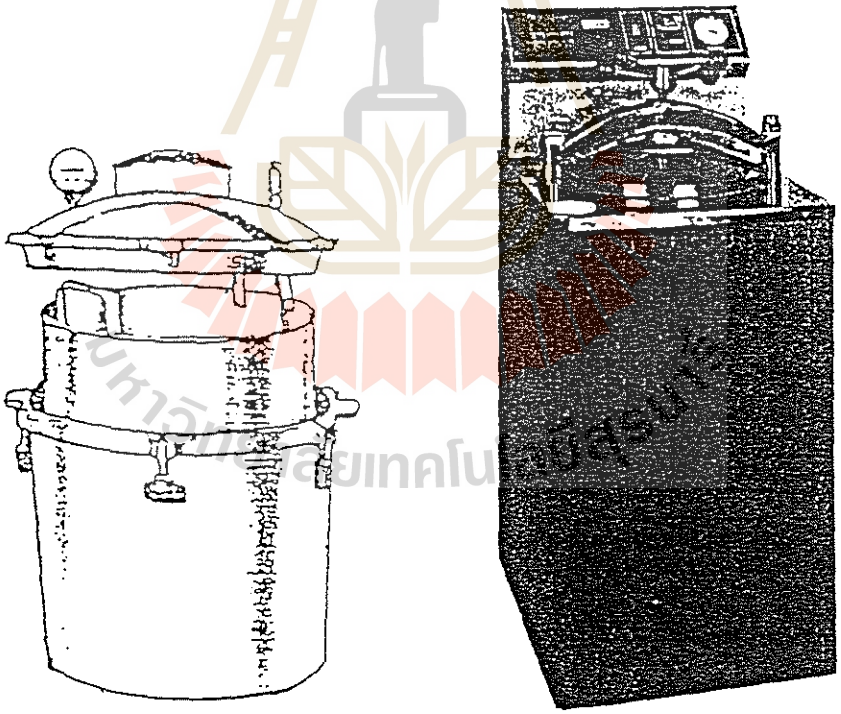
ขวดเพาะเลี้ยง

ภาพแสดงอุปกรณ์ที่จำเป็นบางชนิดที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ตู้ถ่ายย้ายเนื้อเยื่อชนิดดี (ซ้าย) และแบบง่าย (ขวา)



หม้อนึ่งความดันขนาดเล็ก

หม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ

บทปฏิบัติการที่ ๒
การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

วัตถุประสงค์ เพื่อให้รู้ถึงชนิดและวิธีการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

วัสดุอุปกรณ์

1. สารเคมีบริสุทธิ์ชนิดต่าง ๆ
2. เครื่องชั่ง
3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
4. หม้อนึ่งความดัน
5. ภาชนะเครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ

วิธีการ

ก. การเตรียมหัวเชื้อ (stock solutions)

ข. ชนิดของอาหาร (media)

ก. การเตรียม stock solutions

เพื่อความสะดวกในการเตรียมอาหาร องค์ประกอบส่วนใหญ่จะต้องเตรียมไว้ในรูปของ stock solution มักจะเตรียมไว้ครั้งละ 1 ลิตร ขึ้นอยู่กับปริมาณของการใช้ บางชนิดอาจเก็บไว้ได้นานโดยการแช่แข็ง

การเตรียม stock solution ทุกชนิดที่กล่าวถึงในที่นี้มีหลักเกณฑ์อยู่ว่าให้ใส่สารเคมีลงในภาชนะ ปกติจะเป็น Erlenmeyer flask ขนาด 1-2 ลิตร ทีละชนิด ในขณะที่ภาชนะตั้งอยู่บน magnetic stirring plate ที่คนอยู่ตลอดเวลา รอให้สารเคมีละลายหมด จึงเติมชนิดอื่นตามลงไป เมื่อใส่ครบทุกชนิดแล้ว จึงปรับปริมาตรให้ได้ตามที่ต้องการ stock solutions ที่เป็นไวตามิน ฮอร์โมน และ cytokinins จะต้องปรับปริมาตรด้วย volumetric flask เสมอ (น้ำที่ใช้ในที่นี้จะต้องเป็น double deionized distilled water)

ก. **Macronutrient Stocks** (ปริมาณเป็นกรัมต่อลิตร) ที่จำเป็นจะใช้ในคู่มือนี้มี 4 ชนิด

	MSI	**B5III**	**N6A**	**YPI**
NH_4NO_3	16.50	6.00	-	1.65
KNO_3	19.00	19.00	-	25.0
$CaCl_2.2H_2O$	4.40	6.00	1.66	1.76
$MgSO_4.7H_2O$	3.70	3.00	1.86	3.70

KH_2PO_4	1.70	1.70	4.0	5.10
KCl	-	3.00	-	-
$(NH4)_2SO_4$	-	-	4.62	-

ข. Micronutrient Stocks (ปริมาณเป็นกรัมต่อลิตร) ให้ปรับปริมาตรใน volumetric flask ที่ใช้ในคู่มือนี้มี 3 ชนิดคือ

	MSII	**B5II**	**N6B**
H_3BO_3	00.6200	0.300	0.32
$MnSO_4.H_2O$	1.5640	1.000	0.67 (หรือ $MnSO_4.4H_2O$ = 0.88 กรัม)
$ZnSO_4.7H_2O$	0.8600	0.200	0.30
KI	0.0830	0.0750	0.16
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.0250	0.0250	-
$CuSO_4.5H_2O$	0.0025	0.0025	-
$CoCl_2.6H_2O$	0.0025	0.0025	-

ค. Vitamin Stocks (ปริมาณเป็นกรัมต่อลิตร) ให้เตรียมใน volumetric flask

	MB^+	**SBIII***	**N6MB**	**YP**
Glycine	0.200	-	0.400	0.770
Thiamine.HCl	0.010	1.000	0.200	0.025
Nicotinic acid	0.050	0.100	0.100	0.130
Pyridoxine.HCl	0.050	0.100	0.100	0.025
Myo-inositol	10.000	10.000	-	-
D-Pantothenic acid	-	-	-	0.025

ให้เก็บโดยการแช่แข็ง ก่อนใช้ต้องทิ้งให้ละลายจนหมดเสียก่อนหรือแช่น้ำร้อนให้ละลาย พวก solution stock ทุกชนิดที่เก็บแช่แข็ง อาจแบ่งใส่ขวดพลาสติกปริมาณน้อยซึ่งนอกจากจะไม่แตกเมื่อแช่แข็งแล้ว ยังสะดวกในการนำมาใช้แต่ละครั้งด้วย

ง. อื่น ๆ

NaFeEDTA (0.1M)

ถ้าใช้ $Na_2EDTA.2H_2O$ ให้ใช้ 37.22 กรัม (ถ้าไม่มีน้ำใช้ 33.5 กรัม) กับ $FeSO_4.7H_2O$ จำนวน 27.8 กรัม ใส่รวมกันใน Erlenmyer flask ขนาด 2 ลิตร เติมน้ำ 1 ลิตร แล้วต่อสายยาง ตรงกลางมีที่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กรองอากาศ โดยมีสำลีอัดไม่แน่นเกินไปในหลอดแก้วที่ต่อเชื่อมสายยางด้านหนึ่งกับ pipet จุ่มอยู่ในสารละลาย ปลายสายยางอีกด้านหนึ่งต่อเข้ากับท่อลม สำลีมีไว้ดักเศษผงที่อาจผ่านมากับอากาศ ปิดฝาด้วย foil โดยให้มีช่องสำหรับอากาศออกได้ ปล่อยอากาศผ่านเข้าไปในของเหลวขณะที่คนตลอดเวลา ปรับอากาศที่เป่าให้แรง แต่ไม่ให้ของเหลวกระเด็นขึ้นข้างบน ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 5-6 ชม. หรือจนสารละลายใสกลายเป็นสีสนิมเหล็ก แล้วปรับปริมาตรด้วย volumetric flask ให้ครบ 1 ลิตร แบ่งใส่ภาชนะสีชาเก็บในตู้เย็น ถ้าใช้น้อยอาจเตรียมเพียงครึ่งลิตรก็พอ

2, 4-D (100 mg/l)

ชั่ง 2, 4-D 100 mg เทลงใน beaker 400 ml ละลายด้วย 95% alcohol ประมาณ 2 ml เติมน้ำร้อน 50-100 ml ลงใน beaker แล้วเทลงใน volumetric flask ขนาด 1000 ml ล้าง beaker หลาย ๆ ครั้ง เพื่อให้ 2,4-D ออกให้หมด ปรับ pH เป็นประมาณ 5.0 แล้วเติมน้ำจนครบ 1000 ml เทใส่ขวดแก้วจุกเกลียว เก็บในตู้เย็น

ABA (10 mM)

ชั่ง abscisic acid 264 mg ละลายด้วย 0.1-1 N KOH ประมาณ 2 ml เมื่อละลายหมดแล้ว เติมน้ำประมาณ 80 ml ปรับ pH เป็น 5.8 แล้วปรับปริมาตรใน volumetric flask ให้ได้ 100 ml จะได้ ABA stock 10 mM เก็บโดยการแช่แข็งให้หลีกเลี่ยงการถูกแสงนาน ๆ อาจหุ้มภาชนะบรรจุด้วย aluminum foil ปล่อยให้ละลายก่อนใช้ แล้ว filter sterilize ลงอาหาร

6BA (หรือ BAP = 20 mg/l)

ชั่ง 6-benzyladenine (หรือ benzylaminopurine) 20 mg ละลายด้วย 0.1 N HCl ประมาณ 2-3 ml ใน beaker อาจเติม 1 N HCl 1-2 หยด เพื่อละลายดีขึ้นหรืออาจอุ่นให้ร้อนก็ได้ เติมน้ำลงใน beaker 50-100 ml ปรับ pH เป็น 5 และปรับปริมาตรใน volumetric flask 1000 ml เก็บในขวดแก้วในตู้เย็น

IAA (100 mg/l)

เตรียมวิธีเดียวกับ 2,4-D โดยใช้ indoleacetic acid 100 mg แบ่งเก็บในหลอดพลาสติกแช่แข็ง ให้ filter sterilize ลงในอาหาร เนื่องจากใช้น้อยอาจเตรียมเพียง 200 มล.

IBA (1 mM)

ชั่ง indolebutyric acid 21.3 mg ละลายด้วย 2-5 ml 70% alcohol อาจอุ่นให้ร้อนเล็กน้อยเพื่อให้ละลายได้ดีขึ้น ปรับ pH ประมาณ 5 แล้วปรับปริมาตรใน volumetric flask ให้ได้ 100 ml แบ่งเก็บในหลอดพลาสติก ถ้าเป็นขวดแก้วอาจจะแตกเมื่อแช่แข็ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

NAA (100 mg/l)

เตรียมวิธีเดียวกับ 2,4-D โดยใช้ naphthaleneacetic acid 100 mg เก็บในขวดแก้วใน ตู้เย็น

Dicamba (175 mg/l)

ละลาย dicamba 175 mg ในน้ำร้อน หรืออาจใช้ 70% alcohol ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ใน volumetric flask เก็บในขวดแก้วในตู้เย็น

Kinetin (20 mg/l)

เตรียมวิธีเดียวกับ 6BA โดยใช้ kinetin (6-furfurylamino purine) 20 mg เก็บในขวดแก้วในตู้เย็น

Thiamine.HCl (100 mg/l)

ละลาย thiamine.HCl 100 mg ในน้ำ ปรับปริมาตรใน volumetric flask ให้ครบ 1 ลิตร เก็บในขวดแก้วในตู้เย็น

Thidiazuron (TDZ) Stock (0.1 mg/ml)

เตรียม 100 ml โดยใช้ TDZ 10 mg ละลายใน volumetric flask ด้วย DMSO (dimethyl sulfoxide) จำนวน 2-3 หยด ถ้ายังไม่ละลายอาจใช้ 5N KOH 1-2 หยด เติมน้ำให้ครบ 100 ml จะได้สารละลายใส เก็บไว้ในตู้เย็น

TIBA (100 mg/l)

ละลาย 2,3,5-triiodobenzoic acid จำนวน 25 mg ด้วยแอลกอฮอล์ 70% ประมาณ 1-2 ml แล้วเติมน้ำให้ครบ 250 ml ใน volumetric flask เก็บในขวดแก้วในตู้เย็น

RT vitamins

อาจเตรียมไว้ครั้งละ 1 ลิตร แบ่งเก็บโดยการแช่แข็ง เมื่อนำมาใช้ให้แช่ภาชนะบรรจุในน้ำเย็นจนละลายหมดก่อน จะต้อง filter sterilize เท่านั้น เตรียมโดยใช้สารต่อไปนี้ (ปริมาณ mg/l)

Nicotinic acid	200
Pyridoxine. HCl	200
D-Biotin (vitamin H)	100
Choline chloride	100
D-Pantothenic acid	100
Thiamine. HCl	100
Folic acid	50
P-Aminobenzoic acid	50

Riboflavin	50
Cyanocobalamin (B12)	0.15

หมายเหตุ การเตรียม RT vitamins อาจจำเป็นต้องทำให้สารละลายเป็นด่าง pH สูง 7-9 เพื่อให้ folic acid ละลาย แล้วปรับ pH ให้เหลือ 7 ได้สารละลายสีเหลืองอ่อน

8P organic acids (mg/100 ml)

Pyruvic acid (sodium salt)	200
Citric acid (anhydrous)	400
Malic acid	400
Fumaric acid	400
Rhamnose	2.5
Cellobiose	2.5
Sorbitol	2.5

8P sugars & sugar alcohol (g/100 ml)

Fructose	2.5
Ribose	2.5
Xylose	2.5
Mannose	2.5
Mannitol	2.5
Sucrose	2.5

หมายเหตุ โปรดสังเกตว่าปริมาณเป็น mg และ g ต่อน้ำ 100 ml ทั้ง 2 ชนิดนี้ให้เก็บโดยการแช่แข็ง ก่อนใช้ต้องทำให้ละลายหมดเสียก่อน สามารถใส่ในอาหารก่อนการนึ่งได้

8P vitamins (mg/l)

Inositol	10,000
L-ascorbic acid	200
Vitamin A (retinol)	1
Vitamin D3 (cholecalciferol)	1

HCl stock (สำหรับเครื่องวัด pH)

ให้เตรียมใน hood โดยใส่น้ำใน volumetric flask แล้วแช่ไว้ในน้ำแข็งให้เย็น นำไปตั้งบน stirring plate และคนตลอดเวลา ค่อย ๆ เติม conc.HCl (เข้มข้น 37%) จำนวน 416.5 มล. ลงไป ช้า ๆ แล้วปรับปริมาตรหลังจากเย็นแล้วให้ครบ 1 ลิตร จะได้ 5N HCl

การเตรียม 1N HCl ให้ใช้ 200 ml HCl เข้มข้น 5N ผสมน้ำ 800 ml

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การเตรียม 0.1N HCl ให้ใช้ 20 ml HCl เข้มข้น 5N ผสมน้ำ 980 ml

KOH stock

เตรียม 10 N KOH ให้ใช้ KOH บริสุทธิ์ 85 % จำนวน 660.12 g หรือใช้ KOH 86.4% จำนวน 659.42 g ค่อย ๆ เติมเกล็ด KOH ทีละน้อยลงใน flask ขนาด 2 ลิตรที่ตั้งบน stirring plate ที่คนตลอดเวลา เมื่อละลายหมดแล้วปล่อยไว้ให้เย็น จึงปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ใน volumetric flask

การเตรียม 5N KOH ให้ใช้ 10N KOH 500 ml กับน้ำ 500 ml

การเตรียม 1N KOH ให้ใช้ 10N KOH 100 ml กับน้ำ 900 ml

การเตรียม 0.1N KOH ให้ใช้ 10N KOH 10 ml กับน้ำ 990 ml

Alcohol 70%

ใช้ alcohol 95% จำนวน 737 ml ผสมกับน้ำ 263 ml

ข. ชนิดของอาหาร

ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในหลอดหรือภาชนะในห้องเพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ที่สำคัญยิ่งอย่างหนึ่งคือการเลือกใช้อาหารที่เหมาะสมกับชนิดของเนื้อเยื่อและชนิดพืช องค์ประกอบของอาหารที่สำคัญคือแร่ธาตุอาหารที่ได้จากสารเคมี แหล่งของธาตุคาร์บอน ไวตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต อาจมีบางชนิดเพิ่มเติมจากที่กล่าวนี้อีกเพื่อวัตถุประสงค์บางอย่าง

ชนิดของอาหารที่ใช้กันมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้องการให้เนื้อเยื่อพัฒนาเป็นต้นพืช คือ MS (Murashige and Skoog, 1962) และ LS (Linsmaier and Skoog, 1965) นอกจากนี้ก็มี B_5 (Gamborg et al. 1968), N6 (Chu et., 1975), SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) และ WPM (woody plant medium ของ Lloyd and McCown, 1980) ชนิดหลังสำหรับเพาะเลี้ยงพวกไม้ยืนต้น อาหารเพาะเลี้ยงกล้วยไม้มีหลายชนิด เช่น VW (Vacin and Went, 1949) Knudson (1922) และสูตรดัดแปลงจากอาหาร MS เป็นต้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

แร่ธาตุต่าง ๆ

1. แหล่งธาตุคาร์บอน

แหล่งของสารอาหารที่ให้คาร์บอนที่นิยมใช้มากคือ น้ำตาล sucrose หรือ glucose บางกรณีอาจใช้ fructose, maltose, lactose และ galactose แต่ sucrose ให้ผลดีในอาหารส่วนมาก

2. แร่ธาตุจากสารเคมี (inorganic salts)

ปริมาณแร่ธาตุที่ต้องการในอาหารสูตรต่าง ๆ อาจผิดแผกกันตามชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ มีแร่ธาตุที่ต้องการมาก (macronutrients) ประกอบด้วย N, P, K, Ca, Mg และ S ส่วนธาตุอาหารที่ใช้น้อย

(micronutrients) ที่จำเป็นมี Fe, Mn, Zn, B, Cu และ Mo อาหารบางชนิดอาจต้องใส่ Co, I, Na และ Cl

3. แร่ธาตุจากสารอินทรีย์ (organic source)

แหล่งสำคัญของธาตุไนโตรเจน คือ สารประกอบโปรตีน เช่น casein hydrolysate, casamino acids นอกจากนี้อาจใส่ glutamine, asparagine, adenine และ proline

4. กรดอินทรีย์ (organic acids)

บางกรณีจำเป็นสำหรับการเติบโตของเซลล์พืชที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมเป็นแหล่งของไนโตรเจน จึงต้องใส่กรดอินทรีย์บางชนิด เช่น citrate, succinate หรือ malate เป็นต้น

ฮอร์โมน

สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) มีความจำเป็นในอาหารทุกชนิด และมักจะมีส่วนประกอบระหว่าง auxin และ cytokinin ในอัตราส่วนที่เหมาะสม ซึ่งจะมีผลถึงการเกิดยอดและราก สารพวก cytokinin (หรือที่มีผลคล้ายคลึง) จะกระตุ้นให้เกิดยอด แต่ถ้ามีสารพวก auxin มากจะกระตุ้นให้เกิดราก สารที่เป็น cytokinin ที่ใช้กันมาก เช่น zeatin, kinetin, และ 6BAP (6-benzylaminopurine) พวกที่ใช้เป็น auxin เช่น 2,4-D, NAA, IBA และ IAA เป็นต้น สารสังเคราะห์อื่นที่นำมาใช้มี 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid), dicamba (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid), และ picloram (4-amino-3,5,6,-trichloropicolinic acid) เป็นต้น

ไวตามิน

ปกติพืชสังเคราะห์ไวตามินต่าง ๆ ได้เอง แต่การใส่ไวตามินช่วยให้เซลล์เจริญเติบโตดีขึ้น เช่น ไวตามินบี 1 (thiamine) ไวตามินบี 6 (pyridoxine) nicotinic acid และ myo-inositol เป็นต้น (ดู Gamborg et al. 1968)

อื่น ๆ

อาหารเพาะเลี้ยงบางชนิดสำหรับเฉพาะพืชอาจต้องการส่วนประกอบของอาหารอย่างอื่นอีก เช่น activated charcoal ซึ่งจะช่วยดูดซับสารประกอบบางอย่างที่เนื้อเยื่อขับออกมาในอาหาร เป็นการช่วยให้เซลล์เติบโตดีขึ้น แต่ก็อาจดูดซับสารประกอบบางอย่างที่ใส่ลงในอาหารได้ด้วย จึงกลับมีผลเสียได้

อาหารที่ใช้ควรรู้องค์ประกอบที่แน่นอน เพื่อผลลัพธ์ที่คงที่ อย่างไรก็ตาม บางกรณีองค์ประกอบบางอย่างไม่สามารถรู้ส่วนประกอบที่แน่นอน เช่น น้ำมะพร้าว และวุ้นที่ใช้เตรียมอาหารแข็ง สูตรอาหารทั่ว ๆ ไป ที่มีน้ำมะพร้าวซึ่งอาจมีสารอาหารบางอย่างที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต มักจะใช้น้ำมะพร้าว 10-15% โดยปริมาตร วุ้นที่ใช้ควรจะบริสุทธิ์เท่าที่จะเป็นไปได้ การเปลี่ยนชนิดของวุ้นอาจมีผลถึงผลลัพธ์ที่จะได้

น้ำคั้นผลไม้อาจจำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงพืชบางชนิด เห็ดหูหนูที่ใส่ลงในอาหารเพาะเมล็ดกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี ช่วยให้ได้ผลดีกว่าการไม่ใช้ เป็นต้น

ตารางที่ 1 stock solutions สำหรับสูตรอาหาร MS B5 และ VW

สารเคมี	MS	B5	VW
Macronutrients (g/l)	**(MSI)**	**(B5I)**	**(VWI)**
KNO_3	19.0	25.0	5.25
NH_4NO_3	16.5	-	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	1.5	5.0
$MgSO_4 .7H_2O$	3.7	2.5	2.5[1]
$CaCl_2 . 2H_2O$	4.4	1.5	-
KH_2PO_4	1.7	-	2.5
$NaH_2PO_4 . H_2O$	-	1.5	-
Micronutrients (mg/l)	**(MSII)**	**(B5II)**	
$Mn SO_4 . H_2O$	-	1000	-
$Mn SO_4 . 4H_2O$	2230	-	0.075[2]
$H_3 BO_3$	620	300	-
$Zn SO_4 . 7H_2O$	860	200	-
$Na_2 MoO_4 . 2H_2O$	25	25	-
$Cu SO_4 . 5H_2O$	2.5	2.5	-
$Co Cl_2 . 6H_2O$	2.5	2.5	-
Vitamins (mg/l) เก็บแช่เย็น			
Glycine	200	-	-
Nicotinic acid	50	100	-
Pyridoxine.HCl	50	100	-
Thiamine.HCl	10	1000	-
Myo – inositol	10,000	10,000	-
อื่น ๆ*	-	-	-
KI (mg/l)	83	75	-

* สารนี้สามารถเตรียมรวมกับ micronutrient ได้เลย

หมายเหตุ

1. บางคนเตรียมสารละลายนี้แยกต่างหากเดี่ยว ๆ เป็น VWII
2. บางคนเตรียมสารนี้ร่วมกับ macronutrients
3. อาหาร LS เหมือน MS ยกเว้นไวตามิน ซึ่งมีเพียง thiamine 0.4 มก. และ inositol 100 มก.

โรงเรียนเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2 Composition of MS (Murashige and Skoog, 1962), B5 (Gamborg et al., 1968), N6 (Chu et al. 1975), NN (Nitsch and Nitsch, 1969) SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) and WPM (Lloyd and McCown, 1980) basal media.

Component	MS[a]	B5	N6	NN	SH	WPM
Major salts, mg/l						
NH_4NO_3	1650	-	-	720	-	400
KNO_3	1900	2500	2830	950	2500	-
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	150	166	166	200	96
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	250	185	185	400	370
KH_2PO_4	170	-	400	68	-	170
$(NH_4)_2SO_4$	-	150	463	-	-	-
$NH_4H_2PO_4$	-	-	-	-	300	-
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	-	150	-	-	-	-
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	-	-	-	-	-	556
K_2SO_4	-	-	-	-	-	990
Minor salts, mg/l						
KI	0.83	0.75	0.8	-	1.0	-
H_3BO_3	6.2	3.0	1.6	10	5.0	6.2
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3	-	3.3	19	-	-
$MnSO_4 \cdot H_2O$	-	10	-	-	10	22.3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6	2.0	1.5	10	1.0	8.6
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	0.25	0.25	0.25	0.1	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	0.025	0.025	0.025	0.2	0.25
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	0.025	-	0.025	0.1	-
$Na_2 \cdot EDTA$[b]	37.2	37.2	37.2	37.2	20	37.2
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$[b]	27.8	27.8	27.8	27.8	15	27.8
Vitamins and organics, mg/l						
myo-Inositol	100	100	-	100	1000	100
Nicotinic acid	0.5	1.0	0.5	5.0	5.0	0.5
Pyridoxine HCl	0.5	1.0	0.5	0.5	0.5	-
Thiamine HCl	0.1	10	1.0	0.5	5.0	1.6
Glycine	2.0	-	40	5.0	-	-
Hormones, mg/l						
Auxin	0.1-5.0	0.1-5.0	0.2-2.0		0.5	0.1-5.0
Cytokinin	0.01-2	0.01-2	1		0.1	0.1-3.0
Sucrose	30 g	20 g	50 g	20 g	25 g	20 g
pH	5.8	5.5	5.8	5.5	5.8	5.6

[a] Linsmaier and Skoog (1965) medium มีองค์ประกอบธาตุอาหารเหมือน MS, แต่มี thiamine 0.4 มก/ลิตรและ inositol 100 มก/ ลิตร โดยไม่มี MS vitamins และ glycine.

[b] Ferric Na EDTA หรือ Sequestrene 300 Fe อาจใช้แทนสารเคมีนี้ได้

หมายเหตุ การใช้สารทดแทน อาจคำนวณได้จากสูตรข้างล่างนี้

$$SW = \frac{OW \times FWS}{FWO}$$

(SW=น้ำหนักสารทดแทน OW=น้ำหนักสารเดิม FWS= น้ำหนักโมเลกุลสารทดแทน FWO= น้ำหนักโมเลกุลสารเดิม)

ตัวอย่าง จะต้องใช้ $MgSO_4$ เท่าใด เพื่อแทน $MgSO_4 .7H_2O$ จำนวน 250 มก.

แทนค่าในสูตร SW= 250 x 120.37 / 246.47

นั่นคือต้องใช้ $MgSO_4$ จำนวน 122.09 มก. แทน $MgSO_4 .7H_2O$ 250 มก.

บทปฏิบัติการที่ ๓
การเพาะเลี้ยงแคลลัส

วัตถุประสงค์ เพื่อสามารถเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของพืชให้เกิดเป็นแคลลัส ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์หรือปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

วัสดุอุปกรณ์

1. เมล็ดข้าวเปลือก
2. อาหารเพาะเลี้ยง
3. สารละลายฟอกฆ่าเชื้อ 30% (ปริมาตร/ปริมาตร)
4. อื่น ๆ

วิธีการ

ก. การเตรียมอาหารชักนำแคลลัสข้าว (เตรียม 1 ลิตร)

- เติมน้ำกลั่นใน flask ขนาด 1 ลิตร จำนวน 800 มิลลิลิตร ตั้งภาชนะบนเครื่องกวนตลอดเวลา
- ใส่ส่วนประกอบดังนี้ MSI stock 100 มล., MSII stock 10 มล. 2,4-D 1 มก., น้ำตาล 30 กรัม สารละลายเหล็ก 1 มล., MS vitamin stock (MB+) 10 มล., ไคเนติน 0.01 มก. และ NAA 1 มก.
- ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร และปรับ pH เป็น 5.7
- แบ่งอาหารเป็น 2 ส่วน ใส่ใน ภาชนะ ขนาด 1 ลิตร
- ใส่วุ้น 3.5 กรัม แล้วนำไปหลอมให้วุ้นละลายใน microwave (ถ้าใช้ Gelrite 1 กรัม ไม่ต้องหลอมก่อนก็ได้)
- นำมาแบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยง ขนาด 4 ออนซ์ ใส่ประมาณ 20 มล. ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ถ้าหากใส่ flask นึ่ง หลังจากนึ่งเสร็จ และอาหารเย็นลง (แต่ยังไม่แข็ง) อุณหภูมิประมาณ 45 °ซ (ถ้าแช่ใน water bath ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 45 °ซ) นำมาเทแบ่งใน petridish หรือใส่ขวดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ประมาณใบละ 20 มล.
- ทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ปลอดเชื้อจนอาหารแข็งตัว จึงนำไปใช้

ข. การเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าว

- กะเทาะเปลือกเมล็ดข้าว จำนวน 50 เมล็ด ใส่ใน flask ที่สะอาด
- แช่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารฟอก ปริมาณ 100 มล. พร้อมใส่ Tween 20 1 หยด และแท่งกวนแม่

เหล็ก พร้อมปิดภาชนะ

- วางภาชนะบนเครื่องกวนแม่เหล็ก นาน 30 นาที (อาจทำการฟอกซ้ำอีก เพื่อฆ่าเชื้อ ถ้าหากเมล็ดไม่ค่อยสะอาด หรือเก็บเมล็ดไว้นาน ซึ่งอาจมีเชื้อปนเปื้อนมาก)
- นำภาชนะเข้าตู้ปลอดเชื้อ รินสารละลายออก
- ใช้ช้อนที่สะอาดตักเมล็ดข้าวใส่ภาชนะใหม่ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
- ล้างด้วยน้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้ง ควรเขย่าล้างครั้งละ 1 นาที โดยใช้มือจับก้นภาชนะเขย่าเป็นวงกลม
- ลนปากภาชะนะด้วยเปลวไฟ ก่อนรินน้ำทิ้ง หลังจากนั้นใช้ปากคีบที่ปลอดเชื้อคีบเมล็ดไปวางบน
  กระดาษซับน้ำ แล้ววางบนอาหารแข็ง จำนวน 25 เมล็ดต่อจาน (หรือ 8 เมล็ดต่อขวด)
- ผนึกภาชนะด้วยพาราฟิล์ม (หรือปิดฝาให้แน่น) แล้วนำไปวางในห้องเพาะเลี้ยงในที่มืด

บันทึกผล (ให้บันทึกความเปลี่ยนแปลงทุก 7 วัน)

ชนิดพืช/พันธุ์	วันที่เพาะเลี้ยง	จำนวนเพาะเลี้ยง	จำนวนชิ้นที่เกิดแคลลัส	% เกิดแคลลัส	ข้อสังเกต

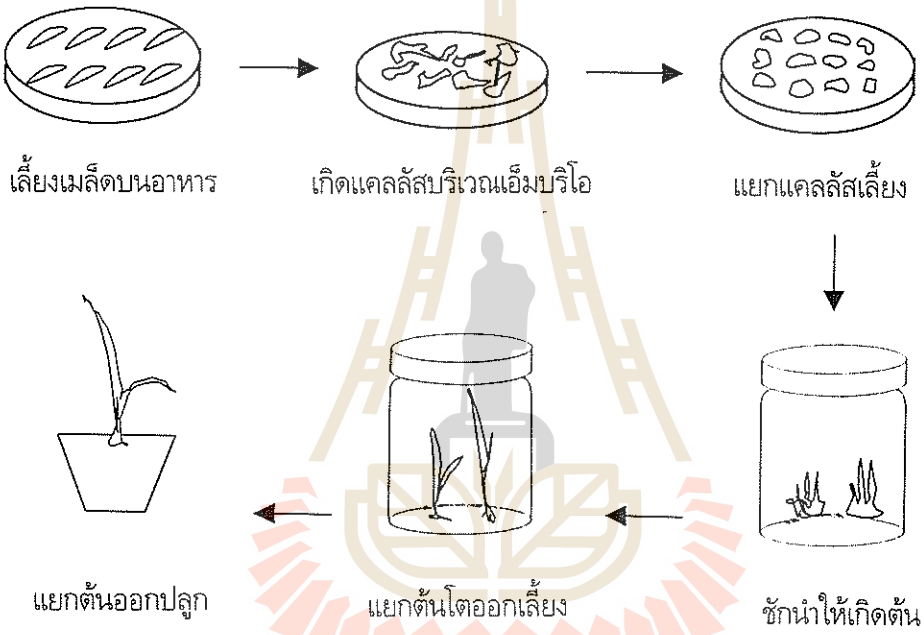
ข้อแนะนำ

- ใช้ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เพราะเกิดแคลลัสได้ดี
- ไม่ควรใช้เมล็ดข้าวเก่า เพราะนอกจากมักมีปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อราแล้ว ส่วนใหญ่จะเกิดแต่ยอด อัตราการเกิดแคลลัสน้อย
- ถ้าพบการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียหรือเชื้อราในระยะ 2-3 วันแรก ควรรีบย้ายเมล็ดที่สะอาด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ลงวางบนอาหารจานใหม่

- แคลลัสข้าวจะเกิดภายในเวลา 2 สัปดาห์ ควรย้ายส่วนที่เป็นแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารจานใหม่ ทุก ๆ 3 สัปดาห์ โดยใช้อาหารสูตรเดิม
- ถ้าแบ่งก้อนแคลลัส ต้องใช้อาหารสูตรใหม่ เพื่อไม่ให้เกิดอาการสีน้ำตาล คือMS เหมือนเดิม แต่ใส่ 2,4-D 2 มก. โปรลีน 1 กรัม casein hydrolysate 100 มก. NAA 1 มก. และน้ำตาล 20 กรัม



ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ ๔
การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอ

วัตถุประสงค์ เพื่อชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ โดยการเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม เอ็มบริโอที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์อื่นต่อไป

วัสดุอุปกรณ์

1. อาหารเพาะเลี้ยง
2. ฝักอ่อนถั่วเหลือง
3. สารละลายฟอกฆ่าเชื้อ
4. อื่น ๆ

วิธีการ

ก. อาหาร MSD 40

- ใส่น้ำกลั่นบริสุทธิ์จำนวน 400 มล. ลงใน flask ขนาด 1 ลิตร ที่ตั้งอยู่บนเครื่องกวนตลอดเวลา
- ใส่น้ำตาล 30 กรัม
- ใส่สารละลายจาก stock solutions ดังนี้ : MS I 100 มล., MS II 10 มล. SB III 10 มล. NaFeEDTA 1 มล. และ 2,4-D 400 มล.
- ปรับ pH เป็น 7 และปรับปริมาตรครบ 1 ลิตร
- แบ่งอาหารเป็น 2 ส่วน ๆ ละ 500 มล. ใส่ flask ขนาด 1 ลิตร
- ใส่วุ้น Gelrite 1 กรัม (หรือวุ้นธรรมดา 3.5 กรัม) ลงในแต่ละ flask
- ปิดปากภาชนะด้วยแผ่นอลูมินัม ก่อนนำไปนึ่งที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- หลังจากอาหารเย็นลง (ก่อนแข็งตัว) แบ่งใส่จานแก้วละ 30 มล.
- นำไปใช้หลังจากอาหารแข็งตัว

ข. การเพาะเลี้ยง

- ล้างฝักถั่วเหลืองที่อ่อน (มีเมล็ดประมาณ 1/3 ของช่องว่างในฝัก) ด้วยน้ำก๊อก เพื่อเอาเศษฝุ่นออก
- แช่ฝักในแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 30 วินาที
- เทแอลกอฮอล์ทิ้ง แล้วแช่ฟอกในสารละลายฟอกฆ่าเชื้อที่มีโซเดียมไฮโปคลอไรต์เข้มข้น 1% (หรือใช้ Clorox หรือ ไฮเตอร์ 20% ปริมาตร/ปริมาตร) พร้อมใส่ Tween 20 (อัตรา 1-2 หยดต่อสารฟอก 100 มล.) ขณะที่ตั้งอยู่บนเครื่องกวนตลอดเวลา 15 นาที
- ยกภาชนะเข้าตู้ปลอดเชื้อ รินสารละลายทิ้ง
- ใช้คีมยาวที่สะอาดย้ายฝักลงล้างในน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยการเขย่าภาชนะรอบ ๆ นาน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประมาณ 1 นาที รินน้ำทิ้ง

- เติมน้ำสะอาดลงล้างอีก 2 ครั้ง
- ใช้คีมคีบฝักใส่จานแก้วที่สะอาด
- ทำการตัดฝักตามรอยตะเข็บข้างฝักด้วยใบมีดคม ๆ ปลายแหลม (ใช้ใบมีดเบอร์ 11 ดีที่สุด)
- ใช้ปากคีบนำเมล็ดออกวางในจานแก้วใหม่ จนได้จำนวนที่ต้องการ
- ใช้มือซ้ายจับปากคีบเพื่อตรึงเมล็ดไว้กับที่ มือขวาใช้ปลายมีดกรีดเปลือกหุ้มเมล็ดตามแนวยาวเพียงตื้น ๆ จากนั้นใช้ปากคีบและปลายมีดช่วยกันนำเมล็ดออกจากเปลือก แล้วตัดแยกบริเวณที่เป็น embryo axis ออก (ส่วนนี้นำไปเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่เหมาะสม จะได้ยอดอ่อนจำนวนมาก) ใช้ปลายมีดเขี่ยช้อนเอาใบเลี้ยงแต่ละใบไปวางหงายบนอาหาร แต่ละจานวางได้ 25 ชิ้น เป็นรูปสี่เหลี่ยม เพื่อสะดวกในการจดบันทึก
- ปิดฝาจานแก้ว พร้อมผนึกด้วยพาราฟิล์ม บันทึกวันที่ทำ ชื่อพันธุ์ ก่อนนำไปวางเลี้ยงใน growth chamber ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 23°ซ ให้มีแสงสลัว 23-24 ชม.
- บันทึกผลภายใน 3-4 สัปดาห์

บันทึกผล (ให้บันทึกความเปลี่ยนแปลงทุก 7 วัน)

ชื่อพันธุ์	วันที่	จำนวนชิ้นที่เลี้ยง	การเกิดเอ็มบริโอ			ข้อสังเกต
			จำนวนที่เกิด	จำนวนไม่เกิด	%	

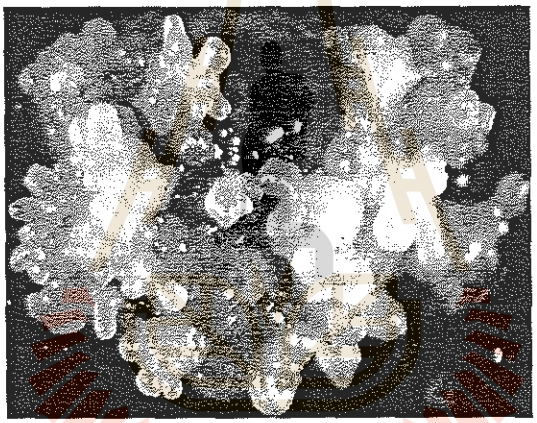
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิง

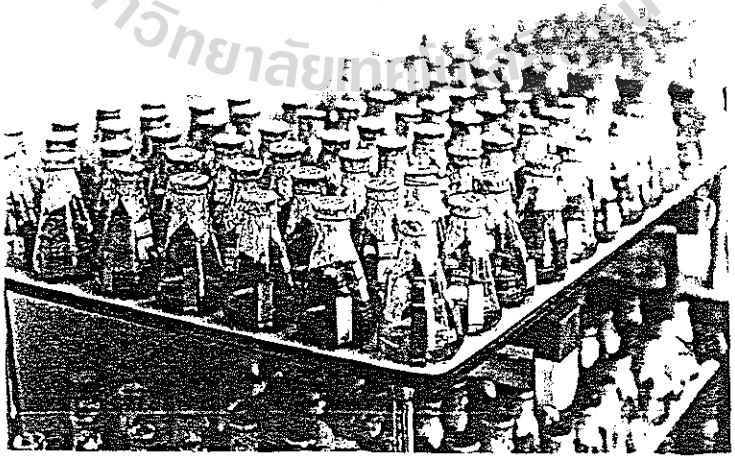
Finer, J.J. and A. Nagasawa. 1988. Development of an embryogenic suspension culture of soybean. Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 15:125-136.

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอถั่วเหลือง

นำฝักอ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อ



เลี้ยงชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ



เลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าเพื่อเพิ่มจำนวน

บทปฏิบัติการที่ ๕
การเพาะเลี้ยงตายอดและตาข้าง

วัตถุประสงค์ เพื่อเพาะเลี้ยงให้เกิดยอดใหม่โดยตรงจากตายอด (shoot bud) และตาข้าง (axillary bud) เพื่อการขยายพันธุ์โดยเฉพาะไม้ดอกไม้ประดับ

วัสดุอุปกรณ์

1. อาหารเพาะเลี้ยง
2. ตายอดและตาข้างของกุหลาบ และ/หรือ เบญจมาศ
3. สารละลายฟอกฆ่าเชื้อ 15%
4. อื่น ๆ

วิธีการ

การเตรียมอาหารกุหลาบ

1. ***อาหารชักนำยอด*** (สูตรที่ 1)
   - ใส่น้ำกลั่นใน flask ขนาด 1 ลิตร จำนวน 800 มล. ตั้งภาชนะบนเครื่องกวนตลอดเวลา
   - ใส่ส่วนประกอบต่อไปนี้ :- น้ำตาล 30 กรัม , MSI stock 100 มล. , MS II stock 10 มล. , MS vitamins (MB^+) 10 มล., NaFeEDTA 1 มล. , BA 100 มล. และ NAA 1 มล.
   - เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร และปรับ pH เป็น 5.8
   - แบ่งสารละลายอาหารนี้เป็น 2 ส่วน ใส่ flask ขนาด 1 ลิตรใบละ 500 มล.
   - ใส่วุ้น flask ละ 3.5 กรัม ต้มให้วุ้นละลาย
   - นำไปนึ่งความดันที่ 121 °C นาน 15 นาที
   - เมื่ออาหารอุ่น (ก่อนแข็งตัว) ให้เทแบ่งใส่จานแก้ว (หรือขวด) ที่อบฆ่าเชื้อแล้วใบละ 25 มล.
2. ***อาหารยืดยอด*** (สูตรที่ 2)
   - เตรียมเหมือนอาหารชักนำยอด แต่ใส่ GA_3 1 มก./ลิตร (โดยวิธีกรอง) แทน BA (ห้ามใส่ GA_3 ก่อนการนึ่งอาหาร)
   - เมื่ออาหารเย็นลง (ก่อนเทใส่ขวด) ต้องเติม silver nitrate อัตรา 3.4 มก./ลิตร ด้วยวิธีกรองปลอดเชื้อ
3. ***อาหารชักนำให้เกิดยอดหลายยอด*** (สูตรที่ 3)
   - เตรียมเหมือนอาหารชักนำยอด (สูตรที่ 1) แต่ใส่ TDZ (thidiazuron) อัตรา 1 μM แทน BA (ใส่ TDZ ก่อนนำอาหารไปนึ่งได้)

4. *อาหารชักนำให้เกิดราก* (สูตรที่ 4)

- เตรียมเหมือนสูตรที่ 1 แต่ใส่ออกซิน 3 ชนิดคือ NAA 0.5 มก./ลิตร IAA 1 มก./ลิตร และ IBA 0.5 มก./ลิตร (2 ชนิดหลังควรกรองใส่หลังจากอาหารเย็นลงแล้ว เพราะสลายตัวด้วยความร้อน)
- ใส่ activated charcoal 200 มก./ลิตร (ก่อนปรับ pH)
- ใส่น้ำตาล 40 กรัม/ลิตร
- ใส่ GA_3 0.5 มก./ลิตร และ silver nitrate 3.4 มก./ลิตร (โดยการกรองใส่หลังอาหารเย็นแล้ว)

หมายเหตุ อาหารสูตรที่ 4 ไม่มี BA และ TDZ

การเพาะเลี้ยง

ระยะที่ 1

- ตัดกิ่งกุหลาบยาวประมาณ 15 ซม. จากยอด เลือกกิ่งที่สมบูรณ์
- ตัดใบทิ้งพร้อมดึงก้านใบออก และตัดให้เป็นชิ้นยาวประมาณ 4 ซม. (2 ซม. เหนือและใต้ข้อ)
- ฟอกล้างด้วยสารละลายฟอกฆ่าเชื้อเข้มข้น 15% และใส่ Tween 1 หยดต่อสารละลาย 100 มล. กวนด้วยเครื่องกวนนาน 15 นาที
- นำตัวอย่างเข้าตู้ปลอดเชื้อ คีบกิ่งออกล้างด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง
- อาจฟอกอีกครั้งในตู้ด้วย Clorox 10% นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง
- นำกิ่งออกวางในจานแก้ว แล้วใช้ใบมีดเฉือนตาบาง ๆ ยาวประมาณ 0.5-1 ซม. นำไปวางบนอาหารสูตรที่ 1 ที่เตรียมไว้ในขวด พร้อมปิดฝาพอแน่น
- นำภาชนะไปวางให้ได้รับแสงในห้องเพาะเลี้ยง

ระยะที่ 2

- ประมาณ 3-4 สัปดาห์ ถ้าตายอดเจริญ ให้ย้ายลงอาหารสูตรที่ 2 ไม่เช่นนั้นยอดจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุดเพราะแก๊สเอธีลีน
- เมื่อยอดโตขึ้นต้องเปลี่ยนอาหารเพื่อขยายปริมาณ

ระยะที่ 3

- ถ้ามีหลายยอดให้แบ่งแต่ละยอดลงบนอาหารสูตรที่ 3 เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสบริเวณโคนยอด
- หลังจากถ่ายย้ายเปลี่ยนอาหารใหม่ แคลลัสจะเกิดยอดหลายยอด

ระยะที่ 4

- เมื่อยอดโตขึ้น ให้แยกยอดออกเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ 4 เพื่อชักนำให้เกิดราก
- เมื่อระบบรากแข็งแรง ให้ย้ายออกปลูกในดินผสมที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

- คลุมภาชนะด้วยพลาสติกเพื่อรักษาความชื้น และส่งเสริมให้พืชตั้งตัว ก่อนนำออกปลูกในโรงเรือน

การเตรียมอาหารเบญจมาศ (1 ลิตร)

- ใส่น้ำกลั่นใน flask ขนาด 1 ลิตร จำนวน 800 มล. ตั้งภาชนะบนเครื่องกวนตลอดเวลา
- ใส่ stock solution ต่อไปนี้ :- น้ำตาล 30 กรัม, MSI 100 มล., MSII 10 มล., MS vitamins (MB+) 10 มล., Na FeEDTA 1 มล., BA 100 มล. (20 มก./ลิตร stock)
- เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร แล้วปรับ pH เป็น 5.7
- แบ่งสารละลายเป็น 2 ส่วน ๆ ละ 500 มล. ใส่ในภาชนะขนาด 1 ลิตร
- ชั่งวุ้น 3.5 กรัม 2 ส่วน แล้วใส่แต่ละส่วนในอาหารที่แบ่งไว้
- หลอมวุ้นให้ละลายด้วยเตาแก๊ส หรือไมโครเวฟ (โดยใช้ภาชนะแก้วหรือพลาสติกที่ใช้ในไมโครเวฟได้
- ตักแบ่งอาหารลงขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ ใบละประมาณ 20 มล.
- ปิดฝาหลวม ๆ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- นำขวดออกวางบนโต๊ะ ให้อาหารแข็งตัวก่อนนำไปใช้

การเพาะเลี้ยง

- นำกิ่งยอดเบญจมาศที่เตรียมไว้มาล้างด้วยน้ำก๊อกเอาเศษฝุ่นออก
- ค่อย ๆ ดึงใบออก โดยลอกอย่าให้เป็นแผลฉีกขาดมาก
- ตัดกิ่งให้ยาวประมาณ 5 ซม. เพื่อใส่ภาชนะฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% นานครึ่งนาที (30 วินาที)
- แล้วนำลงฟอกในสารละลายฟอกฆ่าเชื้อที่เตรียมไว้ (เข้มข้น 20%) นาน 15 นาที
- นำภาชนะเข้าตู้ปลอดเชื้อ เพื่อนำเอากิ่งออกล้างในน้ำสะอาดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง
- นำกิ่งออกวางในจานแก้ว
- เฉือนตาให้เป็นรูป ∇ โดยใช้ใบมีดที่คมตัดเหนือและใต้ตา
- นำไปวางเลี้ยงบนอาหารขวดละ 1 ชิ้น
- ปิดฝาขวดให้แน่น ก่อนนำไปวางเลี้ยงในห้องให้ได้รับแสง

สำนักวิทยบริการเทคโนโลยีสุรนารี

บันทึกผล (ให้บันทึกความเปลี่ยนแปลงทุก 7 วัน)

ชื่อพืช/พันธุ์	วันที่	จำนวนตา				ข้อสังเกต
		ที่เลี้ยง	ที่เกิด	ที่ตาย	%เกิด	

ข้อแนะนำ

- สูตรอาหารเลี้ยงตาเบญจมาศที่ใช้ได้อีกคือ MS ดัดแปลงที่ใช้ฮอร์โมนต่างกัน เช่น MS salts และไวตามิน + BA 1.5 มก./ลิตร + IAA 0.5 มก./ลิตร หรือ MS salts + ไวตามิน + ไคเนติน 2 มก./ลิตร + NAA 0.02 มก./ลิตร
- สามารถใช้กลีบดอกเบญจมาศเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ใส่ BA 10 มก./ลิตร
- อาหารชักนำรากให้ใช้ MS + น้ำตาล 20 กรัม + IBA 0.25 มก./ลิตร
- การเพาะเลี้ยงตาข้างและตายอดของพืชหลายชนิดใช้หลักการคล้ายคลึงกัน ต่างกันที่อาหารที่เหมาะสมสำหรับพืชแต่ละชนิด
- ชิ้นส่วนที่จะนำมาเพาะเลี้ยง อาจเป็นจากหน่อ (เช่น กล้วยไม้, ขิง ฯลฯ) หัว (เช่น มันฝรั่ง, แกลดิโอลัส ฯลฯ)

เอกสารอ้างอิง

Rosu, A. et al. 1995. The development of putative adventitious shoots from a chimeral thornless rose *(Rosa multiflora)* in vitro. J. Hort. Sci. 70:901-907.

ยอดอ่อนกุหลาบจากการเพาะเลี้ยงตาข้าง

ยอดแกลดิโอลัสจากการเลี้ยงตาบนหัว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ ๖
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบ

วัตถุประสงค์ เพื่อชักนำให้เนื้อเยื่อใบพืชเกิดเป็นเนื้อเยื่อชนิดใหม่ เช่นแคลลัสหรือโซมาติกเอ็มบริโอ

วัสดุอุปกรณ์

1. อาหารเพาะเลี้ยง
2. ใบอัฟริกันไวโอเลต
3. สารละลายฟอกฆ่าเชื้อ
4. อื่น ๆ

วิธีการ

ก. อาหาร (ปริมาตร 1 ลิตร)

- ใส่น้ำกลั่นบริสุทธิ์ 700 มล. ใน beaker ขนาด 1 ลิตร ที่ตั้งอยู่บนเครื่องกวนตลอดเวลา
- ใส่น้ำตาลทราย 30 กรัม
- ใส่สารละลายจาก stock solution ดังนี้:- MS I 100 มล. , MS II 10 มล. , MS vitamins 10 มล., thiamine 0.4 มก., สารละลายเหล็ก (NaFeEDTA) 1 มล. , NAA 0.1 มก./ลิตร, BA 0.1 มก./ลิตร และ inositol 100 มก./ลิตร
- เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร พร้อมปรับ pH เป็น 5.7
- ใส่วุ้น 7 กรัม แล้วอุ่นให้วุ้นละลายก่อนแบ่งใส่ขวดละ 25 มล. นำไปนึ่งความดันที่ 121^{0}ซ นาน 15 นาที

ข. การเพาะเลี้ยง

- เลือกใบบริเวณยอดที่คลี่เต็มที่แล้ว นำมาล้างด้วยน้ำสบู่ ตามด้วยน้ำสะอาด
- ฟอกด้วยสารละลายฟอกฆ่าเชื้อเข้มข้น 15% ซึ่งใส่ Tween 20 2 หยด ต่อสารละลาย 100 มล.
- ล้างด้วยน้ำสะอาดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ
- ใช้คีมคีบนำใบออกวางในจานแก้วที่มีกระดาษซับน้ำให้แห้ง
- ตัดแผ่นใบในจานแก้วที่สะอาดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ตร.ซม.
- วางชิ้นใบบนอาหาร ให้ด้านใต้ใบแตะอาหาร ใส่ขวดละ 1 ชิ้น
- วางขวดให้ได้รับแสงในห้องเพาะเลี้ยง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บันทึกผล (บันทึกความเปลี่ยนแปลงทุก 7 วัน)

ชื่อพันธุ์	วันที่	จำนวนชิ้นที่เลี้ยง	จำนวนชิ้นที่เกิด	จำนวนยอดที่เกิด	ข้อสังเกต

ข้อแนะนำ

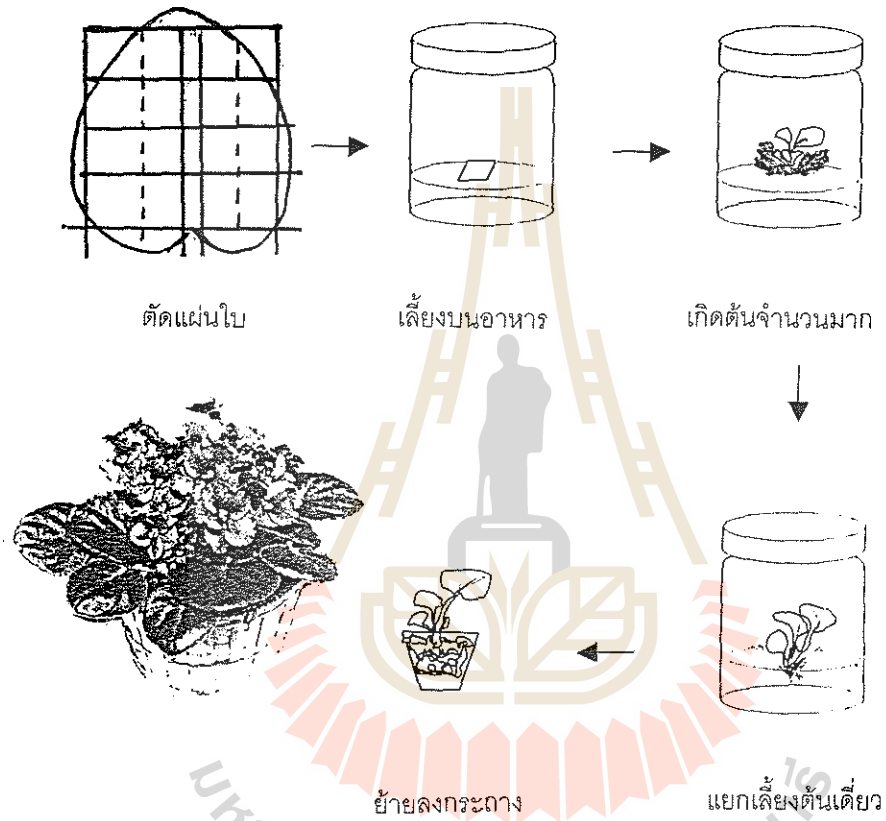
- อาหารสูตรนี้เหมาะสำหรับเพาะเลี้ยงอัฟริกันไวโอเลตใบลายเพื่อให้ตรงตามพันธุ์เพราะมีออกซินปริมาณต่ำ จึงเกิดยอดโดยตรงจากแผ่นใบโดยไม่ผ่านแคลลัส
- อาหารระยะที่ 2 ที่ใช้เลี้ยงขยายต้นอ่อนจากอาหารสูตรแรกไม่ต้องใส่ฮอร์โมนอื่นใดเลย แต่ใส่น้ำตาล 20 กรัม

เอกสารอ้างอิง

สุภาวรัตน์ ชาญยุทธ และ อารีย์ วรัญญวัฒก์. 2544. สูตรอาหารสำหรับการผลิตอัฟริกันไวโอเลตจำนวนมาก. ว. เทคโนโลยีสุรนารี 8:149-153.

Smith, R.H. and R.E. Norris. 1983. In vitro propagation of African violet chimeras. HortSci. 18:436-437.

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงใบอัฟริกันไวโอเลต



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ ๗
การเพาะเลี้ยงเมล็ด

วัตถประสงค์ เพื่อรู้วิธีการเพาะเลี้ยงเมล็ดของพืชในสภาพปลอดเชื้อ

วัสดุอุปกรณ์

1. ฝักกล้วยไม้
2. อาหารเพาะเลี้ยง
3. สารฟอกฆ่าเชื้อ
4. อุปกรณ์อื่นๆ

วิธีการ

ก. การเตรียมอาหาร VW (Vacin and Went)

- ใส่น้ำกลั่นบริสุทธิ์ 500 มล. ใน flask ขนาด 1 ลิตร ตั้งบนเครื่องคนตลอดเวลา
- ใส่ stock solutions ดังนี้ : VWI 100 มล., VWII 100 มล., สารละลายเหล็ก 1 มล. น้ำมะพร้าว 150 มล.
- น้ำตาลทราย 20 กรัม
- ชั่งและละลาย $Ca_3(PO_4)_2$ จำนวน 0.2 กรัมในกรดเกลือเข้มข้น 1 N จำนวน 0.5-1 มล. แล้วเทลงรวมกันใน flask
- เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร พร้อมปรับ pH เป็น 4.9 ถึง 5
- ใส่วุ้น 7 กรัม แล้วต้มวุ้นให้ละลาย
- แบ่งใส่ภาชนะ (ขวดเล็ก) ประมาณ 20 มล. (หรืออาจนำ flask ที่มีอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำมาเทใส่จานแก้วจานละ 20 มล.) อาหาร 1 ลิตร เตรียมได้ประมาณ 50 ขวด
- ปิดฝาขวดพอหลวม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน 15 นาที
- ปิดฝาให้แน่นหลังอาหารเย็นแล้ว พร้อมจะนำไปใช้ได้

หมายเหตุ ถ้าหากต้องใส่กล้วยหอม 100 กรัม และมันฝรั่งสับละเอียด 100 กรัม ต่อลิตร และผงถ่าน 2 กรัม ให้ทำก่อนการปรับปริมาตรและ pH

ข. การเพาะเลี้ยง

- นำฝักกล้วยไม้ที่สมบูรณ์ และยังไม่แก่จัดจนแตก (อายุของฝักขึ้นกับชนิด เช่น หวาย ต้องอายุอย่างน้อย 2 เดือนเศษขึ้นไป) มาล้างด้วยน้ำสบู่ให้สะอาด แล้วล้างด้วยน้ำ สะอาด
- แช่ฝักในแอลกอฮอล์ 70% นาน 5-10 นาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายเข้มข้น 20% พร้อมใส่ Tween 1-2 หยดต่อสารฟอก 100 มล. เป็นเวลา 15-20 นาที ในขณะฟอกควรคนสารละลายตลอดเวลา
- ขั้นตอนต่อไปให้ทำในตู้ปลอดเชื้อ คือล้างด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง (อาจจุ่มฝักในแอลกอฮอล์ แล้วลนไฟด้วยก็ได้ แต่ไม่จำเป็นถ้าการฟอกดี)
- ใช้มีดผ่าตัดที่คม สะอาด กรีดตามยาวเพียงตื้นๆ พอให้เปิดฝักได้ (ภายในฝักจะสะอาดโดยปราศจากเชื้ออยู่แล้ว ถ้าหากฝักไม่แตก)
- ใช้ปลายมีดที่สะอาดเขี่ยเอาเมล็ดที่เป็นขุยลงวางกระจายบางๆ ในขวด (อย่าใส่มาก เพราะเมล็ดมีขนาดเล็กมาก จะทำให้แน่นเกินไปเมื่อเมล็ดงอกขึ้นมา)
- ปิดฝาภาชนะให้แน่น แล้วนำไปวางไว้ให้ได้รับแสงในห้องเพาะเลี้ยง
- หลังจากเกิดต้นอ่อน (protocorm) สามารถถ่ายย้ายลงอาหารใหม่เพื่อให้เกิดเป็นต้น

บันทึกผล (บันทึกความเปลี่ยนแปลงทุก 7 วัน)

ชนิด/พันธุ์	ชนิดอาหาร	วันที่เพาะเลี้ยง	วันที่เกิด	ข้อสังเกต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ข้อแนะนำ

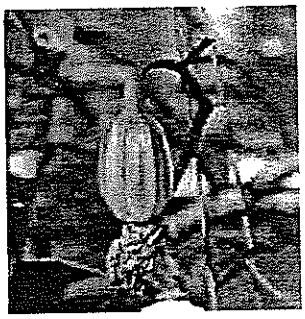
วิธีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดพืชแตกต่างกัน เมล็ดที่ใหญ่มีเยื่อหุ้มแข็งแรง การฟอกย่อมแตกต่างจากเมล็ดขนาดเล็ก เมล็ดที่เล็กมากอาจต้องห่อด้วยผ้าขาวบางหลวมๆ แล้วใส่ลงในสารฟอก เวลาที่ใช้และความเข้มข้นของสารฟอกอยู่ระหว่าง 15-20 นาที และ 15-20% ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

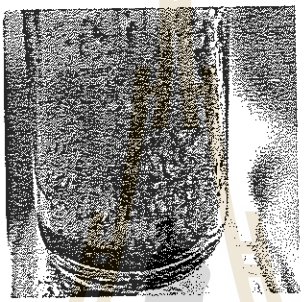
Vacin, E. and F.W.Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 100:605-613.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ขั้นตอนการเพาะเมล็ดกล้วยไม้

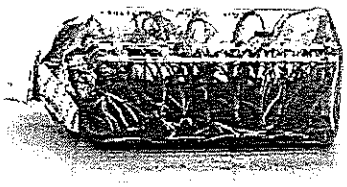


นำฝักมาฟอกฆ่าเชื้อ



เพาะเลี้ยงเมล็ดในอาหาร VW

กระจายโปรโตคอร์ม



เรียงต้นในขวด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ ๘
การเพาะเลี้ยงอับเรณู

วัตถุประสงค์ เพื่อให้รู้วิธีการนำอับเรณูของพืชมาเพาะเลี้ยงในอาหารให้ได้เนื้อเยื่อพืชที่มีโครโมโซมเพียงครึ่งหนึ่ง และการเพิ่มชุดโครโมโซมเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์

วัสดุอุปกรณ์

1. ช่อดอกอ่อนข้าวโพด
2. อาหารเพาะเลี้ยง
3. สารละลายฟอกฆ่าเชื้อ
4. กล่องพลาสติกทึบแสง
5. อื่น ๆ

วิธีการ

ก. เตรียมอาหาร

- อาหารเหลวเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวโพดคือ YP (Yu Pei) medium ในปริมาณ 1 ลิตร ใส่ส่วนผสมดังนี้

Sucrose	60	กรัม
Casein hydrolysate	0.5	กรัม
YP I stock	100	มล.
N6B	5	มล.
YP vitamins	10	มล.
NaFeEDTA	1	มล.
TIBA (0.1 มก./มล. stock)	1	มล.
Activated charcoal	5	กรัม

- ปรับ pH เป็น 5.8 ก่อนนำไปนึ่ง
- หลังอาหารเย็นลง ให้ดูดอาหารเหลวที่ใส จำนวน 10 มล. ใส่ในขวดแก้วที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

ข. การเพาะเลี้ยง

- 3 ขั้นตอนที่กล่าวถึงข้างล่างต้องดำเนินการก่อน คือ เก็บช่อดอกข้าวโพดจากต้นในระยะที่ยังอยู่ภายในกาบใบ ซึ่งละอองเกสรอยู่ในระยะ late uninucleate หรือ early binucleate โดยตัดยอดข้าวโพดมาทำในห้องปฏิบัติการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

- ลอกกาบใบหุ้มช่อดอกออก แล้วห่อด้วยกระดาษเพาะเมล็ดที่ชุ่มชื้นพอหมาด แล้วห่อด้วย foil ให้มิดอีกชั้นหนึ่ง
- วางช่อที่ห่อแล้วไว้ในกล่องพลาสติก เก็บไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน
- นำช่อดอกที่ครบกำหนดมาแช่ในสารละลายฟอกฆ่าเชื้อเข้มข้น 10% นาน 20 นาที ควรฟอกแต่ละช่อแยกกันในขวดแก้วขนาด 250 มล. (ขั้นตอนต่อไปนี้ให้ทำในตู้ปลอดเชื้อ)
- รินสารฟอกทิ้ง แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง โดยแช่ทิ้งไว้ครั้งละประมาณ 5-10 นาที
- นำช่อดอกออกวางบนพื้นรองที่สะอาด เช่น แผ่นกระจกที่เช็ดด้วยอัลกอฮอล์ฆ่าเชื้อแล้ว
- เลือกดอกย่อยบริเวณกลาง ๆ ช่อ ซึ่งจะมีสีเหลืองสด (ดอกที่มีสีเขียวจะแก่เกินไป หรือดอกที่เหลืองอ่อนมากก็จะยังอ่อนเกินไป)
- ตัดโคนดอกด้วยมีดที่คม แล้วใช้ปากคีบดึงอับเรณูอันใหญ่ 3 อัน ออกใส่ในอาหารเหลว โดยใส่ขวดละ 30 อัน
- ปิดฝาขวด แล้ววางไว้ในกล่องทึบแสง ก่อนนำไปเลี้ยงในห้องที่อุณหภูมิ 14 ° ซ เป็นเวลา 7 วัน
- ย้ายกล่องไปวางไว้ในห้องเพาะเลี้ยงธรรมดา (อุณหภูมิ 28 ° ซ)
- ประมาณ 4-5 สัปดาห์ จะเกิด ELS (embryo-like structure) โผล่ออกมาจากอับเรณู
- อีก 2-3 สัปดาห์ ต่อมาสามารถย้ายเนื้อเยื่อลงเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ใช้เพาะเลี้ยง แคลลัส ข้าวโพด (ดูบทที่ 3) เพื่อเพิ่มปริมาณ

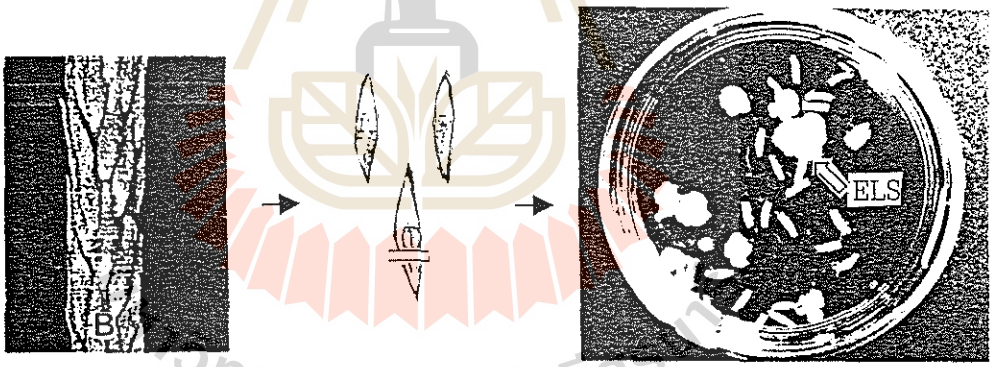
บันทึกผล (บันทึกความเปลี่ยนแปลงทุก 7 วัน)

พันธุ์	วันที่	จำนวนอับเรณู	อับเรณูที่เกิด ELS	% เกิด ELS	ข้อสังเกต

การเพิ่มชุดโครโมโซม

เนื่องจาก ELS ที่ได้เกิดจากละอองเกสร จึงเป็น haploid ถ้าจะชักนำให้เกิดต้นข้าวโพดที่ผลิตเมล็ดได้ จะต้องมีโครโมโซมเป็น $2n$ วิธีการทำ doubled haploid มีดังนี้

- เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัสตามบทที่ 3 แต่ไม่ใส่วุ้นเพื่อทำเป็นอาหารเหลว ที่มีสารเคมี เช่น colchicine 0.05 % หรือ pronamide 10 μM (โดยการกรองใส่อาหารทีหลัง)
- นำชิ้นแคลลัสที่ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 มม. วางบนกระดาษกรองขนาด 7 ซม. ซึ่งวางอยู่บนตะแกรงอีกชั้นหนึ่งที่วางอยู่ในอาหารในจานแก้วขนาด 10 ซม. เพื่อไม่ให้เนื้อเยื่อจมน้ำ แต่ได้รับอาหารผ่านกระดาษกรอง ใช้เนื้อเยื่อประมาณ 1 กรัมต่อจาน
- ผนึกจานแก้วด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปไว้ในที่มืดในห้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน
- นำมาถ่ายของเหลวออก แล้วล้าง 3 ครั้ง ด้วยอาหารเหลวที่ไม่มี colchicine หรือ pronamide
- นำเนื้อเยื่อลงเลี้ยงบนอาหารแข็งธรรมดาที่ใช้เลี้ยงแคลลัส เพื่อเพิ่มปริมาณตามต้องการ ก่อนที่จะชักนำให้เกิดเป็นต้นต่อไป (ดูบทที่ 9)



ช่อดอก ตัดดอกย่อย เกิด ELS ใน 3-4 สัปดาห์

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอับเรณูข้าวโพด

ข้อแนะนำ

- พันธุ์ข้าวโพดมีศักยภาพในการเกิด ELS ต่างกัน
- ELS ที่ได้ส่วนใหญ่เป็น haploid จึงต้องเพิ่มชุดโครโมโซมก่อนชักนำให้เกิดต้นด้วยสารเคมี ไม่เช่นนั้นต้นที่ได้จะเป็นหมัน

- เนื่องจากอาจเกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ ซึ่งจะได้ลักษณะใหม่ การเพาะเลี้ยงอับเรณูจะได้เนื้อเยื่อ haploid ในลักษณะนั้น เมื่อทำการเพิ่มชุดโครโมโซม ก็จะได้พันธุ์แท้ (inbred) ทันที โดยใช้เวลาสั้น จึงเป็นการปรับปรุงพันธุ์พืชอีกวิธีหนึ่ง
- การเพาะเลี้ยงอับเรณู (หรือละอองเรณู) ของพืชชนิดอื่นมีหลักการเดียวกัน แต่ต่างกันในเรื่องอาหารและวิธีการที่เหมาะสมกับพืชนั้น ๆ

เอกสารอ้างอิง

Wan, Y. et al. 1991. The use of antimicrotubule herbicide for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. Theor. Appl. Genet. 81:205-211

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทปฏิบัติการที่ ๙
การชักนำให้เกิดต้นอ่อน

วัตถุประสงค์ เพื่อให้รู้วิธีและเทคนิคการชักนำให้เนื้อเยื่อพืช เช่น แคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ เกิดเป็นต้นอ่อน

วัสดุอุปกรณ์

1. อาหารชนิดที่จำเป็น
2. Embryogenic callus ข้าวโพดและ somatic embryo ของถั่วเหลือง
3. อื่น ๆ

วิธีการ

ก. เตรียมอาหาร

อาหารข้าวโพด มี 2 ชนิด

1. อาหารชักนำยอด (induction medium) ปริมาณ 1 ลิตร
   - เตรียมวิธีเดียวกับอาหารข้าวโพดในบทที่ 3 แต่ให้ใส่น้ำครั้งแรกเพียง 700 มล. แล้วใส่องค์ประกอบดังนี้ : น้ำตาล 20 กรัม proline 1.38 กรัม, casamino acid 0.1 กรัม, KNO_3 2.83 กรัม, N6A 100 มล., B5 II 10 มล., thiamine. HCl 3.5 มล., NaFeEDTA 1 มล. และ 6BA stock 175 มล. (หรือ 3.5 มก./ลิตร)
   - หลังปรับปริมาตรครบ 1 ลิตร และ pH 5.8 ให้แบ่งอาหารบางส่วนไว้ เพื่อใส่ RT vitanins และ glucose โดยทำวิธีเดียวกับที่กล่าวถึงในบทที่ 3
   - หลังใส่วุ้น 7 กรัม ต้มให้ละลาย แล้วนำไปนึ่ง
   - เมื่ออาหารอุ่นให้กรองอาหารที่แบ่งไว้ใส่รวมก่อนเทแบ่งใส่จานแก้ว
   - หลังอาหารแข็งก็นำไปใช้ได้
2. อาหารต้นอ่อน (regeneration medium) ปริมาณ 1 ลิตร
   - เตรียมวิธีเดียวและองค์ประกอบเดียวกับอาหารชักนำยอดเพียงแต่ไม่ใส่ 6BA เท่านั้น ภาชนะที่ใส่อาหารควรมีขนาดใหญ่และสูงกว่า เพื่อให้มีพื้นที่สำหรับต้นยืดตัว

อาหารถั่วเหลือง เป็น regeneration media 2 ชนิด

1. **อาหาร FRCG** (Finer's regeneration) ปริมาณ 1 ลิตร
   - ใส่น้ำ 800 มล. ใน flask ที่ตั้งอยู่บนเครื่องกวน
   - ใส่น้ำตาล maltose 60 กรัม

- ใส่ MSI stock 100 มล., MS II 10 มล., SB III (Gamborg's vitamins) 10 มล. และ NaFeEDTA 1 มล.
- ใส่ activated charcoal 5 กรัม
- ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร และ pH 5.7
- ใส่วุ้น Gelrite 2 กรัม
- นึ่งที่ 121°ซ นาน 20 นาที
- เทใส่จานแก้วหลังเย็นลง จานละ 20 มล.
- หลังจากแข็งตัว นำไปใช้ได้

2. อาหาร FRSG ปริมาณ 1 ลิตร

- เตรียมเหมือน FRCG แต่ใช้ sucrose 30 กรัม แทน maltose และไม่ต้องใส่ activated charcoal

ข. การเพาะเลี้ยง

ข้าวโพด

- แบ่งแคลลัสข้าวโพดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4-5 มม.
- วางแคลลัสบนอาหารชักนำยอด (ที่มี 6BA) ในจานแก้วใบละ 30-40 ชิ้น วางชิ้นให้กระจายพอควร
- ปิดผนึกจานแก้วด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปวางในห้องเพาะเลี้ยงให้ได้รับแสง
- หลัง 5 วัน ให้ย้ายแคลลัส (ซึ่งจะมียอดสีเขียว) ไปวางเลี้ยงบนอาหารซึ่งไม่มี 6BA โดยใส่จานละ 15-20 ชิ้น
- ปิดผนึกจานแก้วด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปวางในห้องเพาะเลี้ยงให้ได้รับแสง
- ประมาณ 3 สัปดาห์ ให้แยกต้นอ่อนออกเลี้ยงเดี่ยว ๆ ในหลอดเพาะเลี้ยง (ปกติ อาหารชนิดนี้เหมือนกับอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัสในบทที่ 3 เพียงแต่ไม่ใส่ dicamba และไม่ใส่ RT vitamins และ glucose)
- หลังจากอยู่ในหลอดเลี้ยง 7-10 วัน จะมีรากแข็งแรง สามารถนำออกปลูกในดินได้ (ดูบทที่ 10)

ถั่วเหลือง

- นำโซมาติกเอ็มบริโอ (ปกติจะมาจากการเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเหลว) มาเลี้ยงบนอาหาร FRCG โดยวางชิ้นส่วนให้กระจายบนอาหาร
- ปิดผนึกภาชนะด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปวางเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงให้ได้รับแสง

- อาจต้องเปลี่ยนอาหารอีก 1 ครั้ง หลังจากเลี้ยงได้ 3 สัปดาห์ เพื่อให้เอ็มบริโอพัฒนามีขนาดยาวประมาณ 0.5-1 ซม.
- นำเนื้อเยื่อที่โตแล้วใส่ในจานแก้ว วางกระจายห่าง ๆ ไม่ต้องปิดผนึกหรือปิดบ้างบางส่วน แล้วนำไปผึ่งให้แห้งในภาชนะที่มีสารละลาย NaCl เข้มข้นจัด (saturated) หรืออาจจะวางจานแก้วโดยมีฝาครอบไว้ในตู้ปลอดเชื้อ ประมาณ 3-5 วัน ชิ้นส่วนจะเหี่ยว มีสีซีด (แต่ไม่ถึงกับแห้ง)
- ให้ย้ายลงเลี้ยงบนอาหาร FRSG โดยการปักด้านรากลงในอาหาร ขั้นตอนนี้อาจจะเลี้ยงในภาชนะที่ใหญ่ขึ้นได้ วางไว้ให้ได้รับแสง
- ต้นอ่อนจะเกิดรากภายใน 5-10 วัน และจะมียอดเกิดขึ้นมาทีหลัง
- หลังยอดพัฒนาดีแล้วจนมีใบจริง สามารถย้ายออกปลูกต่อไป (ดูบทที่ 10)

บันทึกผล (บันทึกความเปลี่ยนแปลงทุก 7 วัน)

ชนิด/พันธุ์	วันที่	จำนวนเพาะเลี้ยง	จำนวนเกิดยอด	% การเกิด	ข้อสังเกต

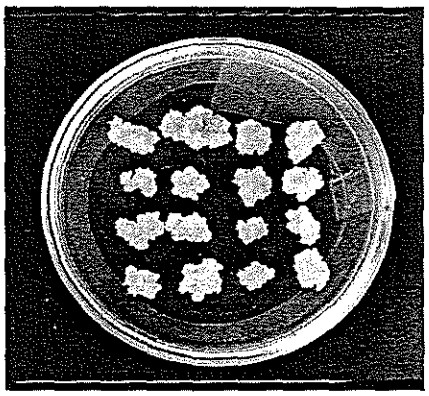
ข้อแนะนำ

- โซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลืองควรได้รับการขยายปริมาณในอาหารเหลว ตามวิธีของ Finer
- อัตราการชักนำให้เกิดยอดจะต่ำมาก ถ้าไม่มีการทำให้เนื้อเยื่อเหี่ยวก่อน
- อัตราการเกิดต้นจะลดลงเมื่ออายุของ culture มากขึ้น
- ข้าวโพดต่างพันธุ์ให้อัตราการเกิดต้นอ่อนต่างกัน
- แคลลัสอายุมาก (เช่นตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป) อัตราการเกิดต้นจะลดลงมาก

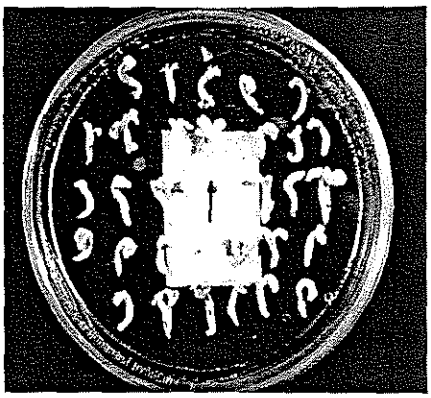
เอกสารอ้างอิง

Duncan, D.R. et al. ดูท้ายบทที่ 3

Finer, J.J. and A. Nagasawa. 1988. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill). Plant Cell Tiss Org. Cult. 15:125-136.



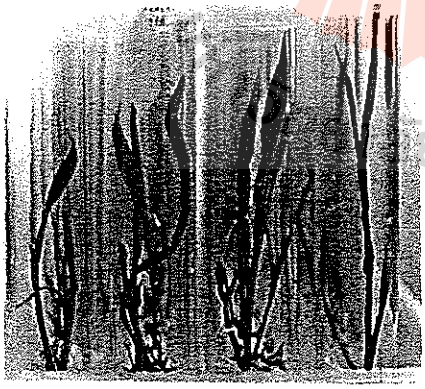
แคลลัสข้าวโพด



โซมาติกเอ็มบริโอถั่วเหลืองบนอาหาร F RSG

ชักนำให้เกิดต้น

ต้นอ่อนเกิดยอดและราก



แยกต้นออกเลี้ยงในหลอด

ต้นถั่วเหลืองที่สมบูรณ์

ขั้นตอนการชักนำให้เกิดต้น

บทปฏิบัติที่การที่ ๑๐
การย้ายต้นอ่อนออกปลูก

วัตถุประสงค์ เพื่อให้รู้วิธีปฏิบัติและเทคนิคการย้ายต้นอ่อนที่ได้จากกระบวนการเพาะเลี้ยงพืชในสภาพปลอดเชื้อออกปลูก

วัสดุอุปกรณ์

1. ต้นอ่อนของข้าวโพด
2. ต้นอ่อนของกล้วยไม้
3. วัสดุปลูก (ควรอบฆ่าเชื้อแล้ว)

วิธีการ

ข้าวโพด

- ใช้ปากคีบยาวนำต้นอ่อนของข้าวโพดที่เลี้ยงอยู่ในหลอด (หรือขวด) ซึ่งมีระบบรากที่แข็งแรง (จะเห็นรากขนาดใหญ่เกิดจากบริเวณโคนต้น ไม่ใช่รากฝอยที่เกิดบนแคลลัส) และมีใบเจริญดีออกล้างน้ำให้เศษวุ้นหลุดออก
- ใช้ spatula เจาะรูในดินผสมที่อบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งเตรียมไว้ในกระถางกระดาษขนาดเล็ก (เช่น Jiffy pot) แล้วค่อย ๆ หย่อนต้นอ่อนให้รากลงไปในดิน ระวังอย่าให้รากหัก
- ใช้ spatula กดดินกลบโคน พร้อมรดน้ำให้ชุ่ม
- คลุมภาชนะปลูก (แนะนำให้วาง Jiffy pot ไว้ในกล่องพลาสติก Magenta เพื่อความสะดวกในการปฏิบัติ) ด้วยถุงพลาสติก เพื่อรักษาความชื้นซึ่งจะช่วยให้ต้นอ่อนตั้งตัวได้เร็วขึ้น
- นำต้นอ่อนวางไว้ในห้องเพาะเลี้ยง ให้ได้รับแสง
- หลังจาก 7-10 วัน เมื่อต้นอ่อนตั้งตัวดีแล้ว ต้องนำออกไปวางในโรงเรือนเพื่อให้ได้รับแสงธรรมชาติ เพื่อพืชจะได้ปรับตัว ให้เปิดถุงพลาสติกออก
- ประมาณ 5-7 วัน ต้องย้ายต้นที่เจริญดี มีระบบรากแข็งแรง (จะสังเกตเห็นรากแทงโผล่ออกจากข้างกระถาง) ออกปลูกในกระถางใหญ่ หรือแปลงปลูกนอกโรงเรือนต่อไป

กล้วยไม้

- ใช้ปากคีบยาวหรือลวดงอค่อย ๆ ดึงเอาต้นอ่อนที่โตออกจากภาชนะเพาะเลี้ยงด้วยความระมัดระวัง
- วางต้นอ่อนในภาชนะที่ใส่น้ำไว้ เพื่อล้างเอาเศษวุ้นออก

- ย้ายต้นชำในวัสดุปลูกที่เตรียมไว้ในกระถาง ซึ่งอาจจะเป็นกาบมะพร้าว ออสมันดา หรือสแฟกนัมมอสหรือวางเรียงในตะกร้าพลาสติก ในที่มีแสงรำไร จนต้นแข็งแรงจึงย้ายปลูกในกระถาง
- พยายามจัดให้รากอยู่ในวัสดุปลูก สามารถใส่ได้จำนวนหลายต้นต่อกระถาง เรียกว่า community pot ซึ่งจะช่วยให้มีความชื้นภายในกระถาง และไม่สิ้นเปลืองกระถางระยะแรกที่กล้วยไม้ยังมีขนาดเล็ก
- การย้ายลงกระถางหมู่ครั้งที่ 2 เมื่อต้นอ่อนโตขึ้นมากแล้ว มักให้มีจำนวนต้นน้อยลง เพื่อให้ต้นสามารถเจริญเติบโตได้ดี
- เมื่อต้นโตมากแล้ว ซึ่งมักจะมี 3-4 ใบขึ้นไป ก็สามารถย้ายลงปลูกในภาชนะปลูกที่เหมาะสมสำหรับกล้วยไม้แต่ละชนิดต่อไป

บันทึกผล (บันทึกการเปลี่ยนแปลงทุก 7 วัน)

ชนิด/พันธุ์	วันที่	จำนวนต้นที่ย้าย	จำนวนต้นที่เจริญ			ข้อสังเกต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

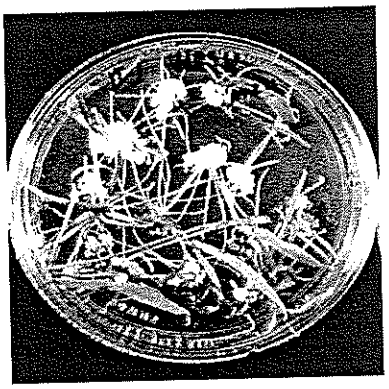
ข้อแนะนำ

- ให้ตัดแบ่งต้นอ่อนข้าวโพดให้มีแคลลัสติดมาด้วยเมื่อย้ายลงหลอดเลี้ยง
- ไม่ควรเลี้ยงต้นอ่อนในหลอดไว้นานเกิน 10 วัน ต้นที่เจริญไม่ดีทั้งใบและรากไม่ต้องย้ายลงปลูกในดิน
- การอบฆ่าเชื้อในดินควรอบเปียกใน Jiffy pot ที่วางอยู่ใน Magenta box และมีฝาปิดเพื่อปลอดเชื้อ
- ดินที่ใช้ควรเป็นดินผสมให้โปร่งและอุ้มน้ำได้ดี เช่น ดินร่วนผสมทรายอัตราส่วน 1 : 1 หลังบรรจุในภาชนะต้องรดน้ำให้ชุ่ม
- ควรเจาะด้านบนของถุงพลาสติกที่คลุมต้นพืช เพื่อความสะดวกในการให้น้ำ

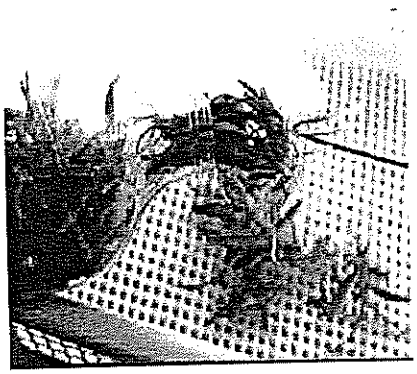
- ต้องระลึกอยู่เสมอในการปฏิบัติรักษาต้นอ่อนว่า สภาพแวดล้อมจะต้องเหมาะสมกับพืชแต่ละชนิดไม่ว่าจะย้ายต้นอ่อนของพืชใด ๆ ก็ตาม จะต้องตระหนักเสมอว่า การย้าย ต้นอ่อนของพืชออกจากห้องเพาะเลี้ยงซึ่งมีสภาพแวดล้อมอย่างหนึ่ง ซึ่งไม่เหมือนธรรมชาติ เช่น แสงไฟอ่อน ทำให้พืชมีความบอบบางจึงต้องการการปรับตัวให้เข้ากับสภาพข้างนอกอย่างช้า ๆ โรงเรือนจึงเป็นเสมือนสภาวะแวดล้อมกึ่งกลาง (ที่สามารถปรับสภาพได้) ก่อนที่นำต้นพืชออกปลูกในแปลงหรือสภาพเพาะปลูกจริงต่อไป
- ตามปกติแล้ว ต้นอ่อนกล้วยไม้จะถูกนำออกเรียงไว้ในกระจาดพลาสติกหรือไม้ วางไว้ให้ได้แสงรำไร จนมีรากใหม่เกิดขึ้น และแข็งแรงดีแล้ว จึงนำออกปลูกในกระถาง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การย้ายต้นออกปลูก

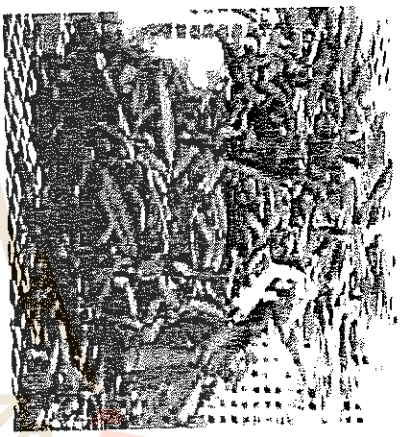


แคลลัสข้าวโพดบนอาหารชักนำ



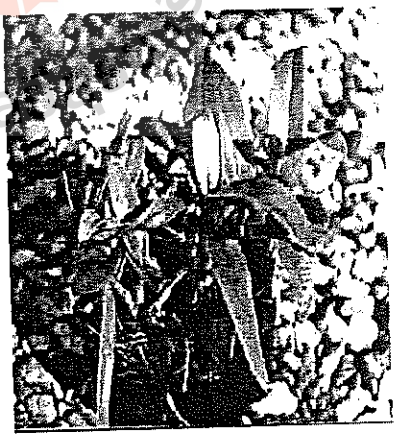
นำกล้วยไม้ออกจากขวด

แยกต้นออกเลี้ยงในหลอด



พักฟื้นในกระจาด

นำออกปลูกในดิน



ปลูกต้นเดี่ยวในวัสดุปลูก

ภาคผนวก

รายชื่อสารเคมีบางชนิดพร้อมน้ำหนักโมเลกุล

ชื่อ	สูตรเคมี	น้ำหนักโมเลกุล
ammonium dihydrogen phosphate	$NH_4H_2PO_4$	115.03
ammonium monohydrogen phosphate	$(NH_4)_2HPO_4$	132.1
ammonium chloride	NH_4Cl	53.49
ammonium hydroxide	NH_4OH	35.05
ammonium nitrate	NH_4NO_3	80.04
ammonium sulfate	$(NH_4)_2SO_4$	132.14
boric acid	H_3BO_3	61.83
calcium chloride	$CaCl_2.2H_2O$	147.02
calcium nitrate	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	236.15
citric acid, anhydrous	$C_6H_8O_7$	192.13
monohydrate	$C_6H_80_7.H_2O$	210.14
cobalt chloride	$CoCl_2.6H_2O$	237.93
cobalt nitrate	$Co(NO_3)_2.6H_2O$	291.8
cobalt sulfate	$CoSO_4$	155.0
cupric chloride	$CuCl_2.2H_2O$	170.5
cupric sulfate, anhydrous	$CuSO_4$	159.6
cupric sulfate	$CuSO_4.5H_2O$	249.68
EDTA, disodium salt	$Na_2EDTA.2H_2O$	372.24
EDTA, sodium ferric salt (13% Fe)		366.85
Ferrous chloride	$FeCl_2.4H_2O$	198.8
ferrous sulfate	$FeSO_4.7H_2O$	278.01
glucose (dextrose)	$C_6H_{12}O_6$	180.16
HEPES	N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid	238.3
inositol	$C_6H_{12}O_6$	180.16
kinetin	6-furfuryl aminopurine	215.20

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ชื่อ	สูตรเคมี	น้ำหนักโมเลกุล
magnesium chloride	$MgCl_2.6H_2O$	203.3
magnesium nitrate	$Mg(NO_3)_2.6H_2O$	256.4
magnesium sulfate, anhydrous	$MgSO_4$	120.4
magnesium sulfate	$MgSO_4.7H_2O$	246.48
manganese sulfate, anhydrous	$MnSO_4$	151.0
manganese sulfate	$MnSO_4.H_2O$	169.01
manganese sulfate	$MnSO_4.4H_2O$	223.01
maltose, anhydrous	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.3
mannitol	$C_6H_{14}O_6$	182.17
MES	2-N-morpholino-ethane sulfonic acid	195.20
potassium chloride	KCl	74.56
potassium dihydrogen phosphate	KH_2PO_4	136.1
potassium ferricyanide	$K_3Fe(CN)_6$	329.3
potassium ferrocyanide	$K_4Fe(CN)_6.3H_2O$	422.4
potassium iodine	KI	166.0
potassium nitrate	KNO_3	101.1
potassium hydroxide	KOH	56.1
potassium sulfate	K_2SO_4	174.1
silver nitrate	$AgNO_3$	169.9
sodium chloride	NaCl	58.4
sodium dihydrogen phosphate	$NaH_2PO_4.H_2O$	138.0
sodium monohydrogen phosphate	$Na_2HPO_4.7H_2O$	268.1
sodium molybdate	$Na_2MO_4.2H_2O$	241.95
sodium hydroxide	NaOH	40.01
sodium sulfate	Na_2SO_4	142.06
sorbitol	$C_6H_{14}O_6$	182.17
sucrose	$C_6H_{22}O_{11}$	342.31
zinc chloride	$ZnCl_2$	136.28
zinc sulfate	$ZnSO_4.7H_2O$	287.54

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Amino acids	Abbreviation	Molecular Weight
Alanine	ALA	89.09
Arginine	ARG	174.20
Asparagine	ASN	132.12
Aspartic acid	ASP	133.10
Cysteine	CYS	121.16
Glutamic acid	GLU	147.13
Glutamine	GLN	146.20
Glycine	GLY	75.10
Histidine	HIS	155.16
Isoleucine	ILE	131.17
Leucine	LEU	131.17
Lysine	LYS	146.19
Methionine	MET	149.21
Phenylalanine	PHE	165.19
Proline	PRO	115.13
Serine	SER	105.09
Threonine	THR	119.12
Tryptophan	TRP	204.22
Tyrosine	TYR	181.19
Valine	VAL	117.15

Sugars	Molecular Weight
Fructose	180.16
Galactose	180.16
Glucose	180.16
Lactose	360.30
Maltose	360.13
Mannitol	182.17
Ribose	150.13
Sorbitol	182.17
Sucrose	342.30
Xylose	150.13

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Vitamins	Molecular Weight
p-Aminobenzoic acid	137.13
Ascorbic acid	176.12
Biotin	244.30
Choline chloride	139.63
Folic acid	441.40
myo-Inositol	180.16
Nicotinamide (niacinamide)	122.12
Nicotinic acid (niacin)	123.11
Pantothenate, calcium salt	476.53
Pyridoxine hydrochloride	205.64
Riboflavin	576.40
Thiamine hydrochloride	337.28
Vitamin A (retinol)	286.44
Vitamin B_{12}	1355.40
Vitamin D_3 (cholecalciferol)	384.62

Plant hormones and growth regulators	Abbreviation	Molecular Weight
Abscisic acid	ABA	264.3
Adenine	ADE	135.1
Adenine hemisulfate		184.2
Ancymidol	ANC	256.3
N^6-Benzyladenine [6-benzylaminopurine]	BA	225.3
Chlorocholine chloride	CCC	158.1
p-Chlorophenoxyacetic acid	CPA	186.6
Dicamba [3,6-dichloro-*o*-anisic acid]	DCA	221.0
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	2,4-D	221.0
6-(γ,γ -Dimethylallylamino) purine [2-isopentenyladenine]	2iP	203.2
Gibberellic acid	GA_3	330.0
Indole-3-acetic acid	IAA	175.2
Indole-3-butyric acid	IBA	203.2
Jasmonic acid	JA	210.3
Kinetin [6-furfurylaminopurine]	KIN	215.2
α-Naphthaleneacetic acid	NAA	186.2
Picloram [4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid]	PIC	241.5
Silver nitrate	$AgNO_3$	169.9
Thidiazuron [N-phenyl-N′ -(1,2,3-thiadiazol-5-yl) urea]	TDZ	220.2
2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid	2,4,5-T	255.5
Zeatin	ZT	219.2

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารเคมีบางอย่างที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ชื่อสาร	อักษรย่อ	น้ำหนักโมเลกุล	เก็บที่ °ซ
1. Benzyladenine	BA	225	5
2. Isopentenyl adenine or Dimethylallylamino purine	2iP	203	0
3. Kinetin	KIN	215	0
4. Zeatin, trans isomer	ZT*	219	0
5. 2,4-Dichlorophenoxy-acetic acid	2,4-D	221	5
6. Naphtaleneacitic acid	NAA	186	5
7. Indolebutyric acid	IBA*	203	5
8. Indoleacetic acid	IAA*	175	0
9. Gibberellic acid	GA*	346	0
10. Dicamba	DCA	221	5
11. Picloram	PIC	240	5
12. Abscisic acid	ABA*	264	0

หมายเหตุ 1. สารเคมีที่มีเครื่องหมาย * จะต้อง filter sterilize เท่านั้น ลงในอาหารที่อุ่น

2. การเตรียมหมายเลขที่ 1-4 ให้ละลายใน 1N HCl จำนวน 1-3 ml หรืออาจอุ่นเล็กน้อย แล้วปรับ pH เป็นประมาณ 5.8

การเตรียมหมายเลขที่ 5-10 ให้ละลายใน 70% alcohol 1-3 ml อาจอุ่นด้วย แล้วปรับ pH เป็น 5.8

การเตรียมหมายเลขที่ 11-12 ให้ละลายใน 1N KOH 1-3 ml ปรับ pH เป็น 5.8

ค่าแปลงจากมิลลิกรัมต่อลิตรเป็นไมโครโมลาร์ของฮอร์โมนบางชนิด (จาก Dixon and Gonzales, 1994)

ชนิดของฮอร์โมน	NAA	2, 4-D	IAA	IBA	BAP	Kinetin	2iP	Zeatin
น้ำหนักโมเลกุล	186.2	221.0	175.2	203.2	225.2	215.2	203.2	219.2
มิลลิกรัม/ลิตร (mg/l)	ไมโครโมลาร์ (µM)							
0.0001	0.0005	0.0004	0.0005	0.0005	0.0004	0.0005	0.0005	0.0005
0.001	0.005	0.0045	0.006	0.005	0.004	0.005	0.005	0.005
0.005	0.027	0.023	0.028	0.025	0.022	0.023	0.025	0.023
0.01	0.054	0.045	0.057	0.049	0.044	0.046	0.049	0.046
0.05	0.27	0.226	0.285	0.246	0.222	0.232	0.246	0.228
0.10	0.54	0.452	0.570	0.492	0.444	0.465	0.492	0.456
0.25	1.34	1.13	1.43	1.23	1.11	1.16	1.23	1.14
0.50	2.69	2.26	2.85	2.46	2.22	2.32	2.46	2.28
1.0	5.37	4.52	5.71	4.92	4.44	4.65	4.92	4.56
5.0	26.85	22.62	28.54	24.61	22.20	23.23	24.61	22.81
10.0	53.71	45.25	57.08	49.21	44.40	46.47	49.21	45.62
25.0	134.26	113.12	142.69	123.03	111.01	116.17	123.03	114.05
50.0	268.53	226.24	285.39	246.06	222.02	232.34	246.06	228.10

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี