บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. พืชทดลอง กล้วยไม้พันธุ์ต่างๆจาก 4 สกุล คือ

1.1 Cattleya dowiana Batem.

1.2 Dendrobium crumenatum Sw., Den. pachyphyllum (Kze) Bakh.f. (syn. Den. pumilum), Den. x Jaquelyn Thomas.

1.3 Acriopsis indica Wight

1.4 Spathoglotis hybrid.

กล้วยไม้ทั้งหมดได้จากศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย

2. สารเคมี สารเคมีทั้งหมดนี้ใช้เกรด AR (analytical reagent) แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ สารประกอบอนินทรีย์ที่มีธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก (macroelement) ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย (microelement) และสารอินทรีย์พวกวิตามิน สารควบคุมการเจริญของพืช และสารอินทรีย์ที่ไม่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอน

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ คือ cellulase "onozuka" RS, cellulase "onozuka" R-10, และ macerozyme R-10 เอนไซม์ทั้งหมดเป็นของบริษัท Yakult Honsha (Japan) mannitol percoll

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำให้ปลอดเชื้อ คือ เอธิลแอลกอฮอล์ 70 และ 95เปอร์เซนต์ calcium hypochlorite คลอร็อกซ์ (5.25 % sodium hypochlorite) และ Tween-20

2.4 สารเคมีที่ใช้ในการย้อมโปรโตพลาสต์ คือ Calcofluor White

3. อุปกรณ์

3.1 เครื่องแก้ว

เครื่องแก้วมาตรฐานสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Pasteur pipette ขนาดยาว 15 เซนติเมตร

จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 และ 9 เซนติเมตร

เข็มฉีดยาขนาด 25 มิลลิลิตร

3.2 อุปกรณ์อื่นๆที่สำคัญ

ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อแบบ laminar flow

เครื่องวัด pH

หม้อนึ่งอัดความดัน

เครื่องเขย่า (shaker) แบบ reciprocal

ใบมีดผ่าตัดหมายเลข 11

ปากคีบปลายแหลม

เครื่อง centrifuge

millipore และแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน

ผ้ากรองที่มีรูขนาด 20-40 ไมครอน

กล้องจุลทรรศน์แบบinverted และแบบfluorescence พร้อมอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ

เครื่องนับเซลล์ (haemacytometer)

4. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

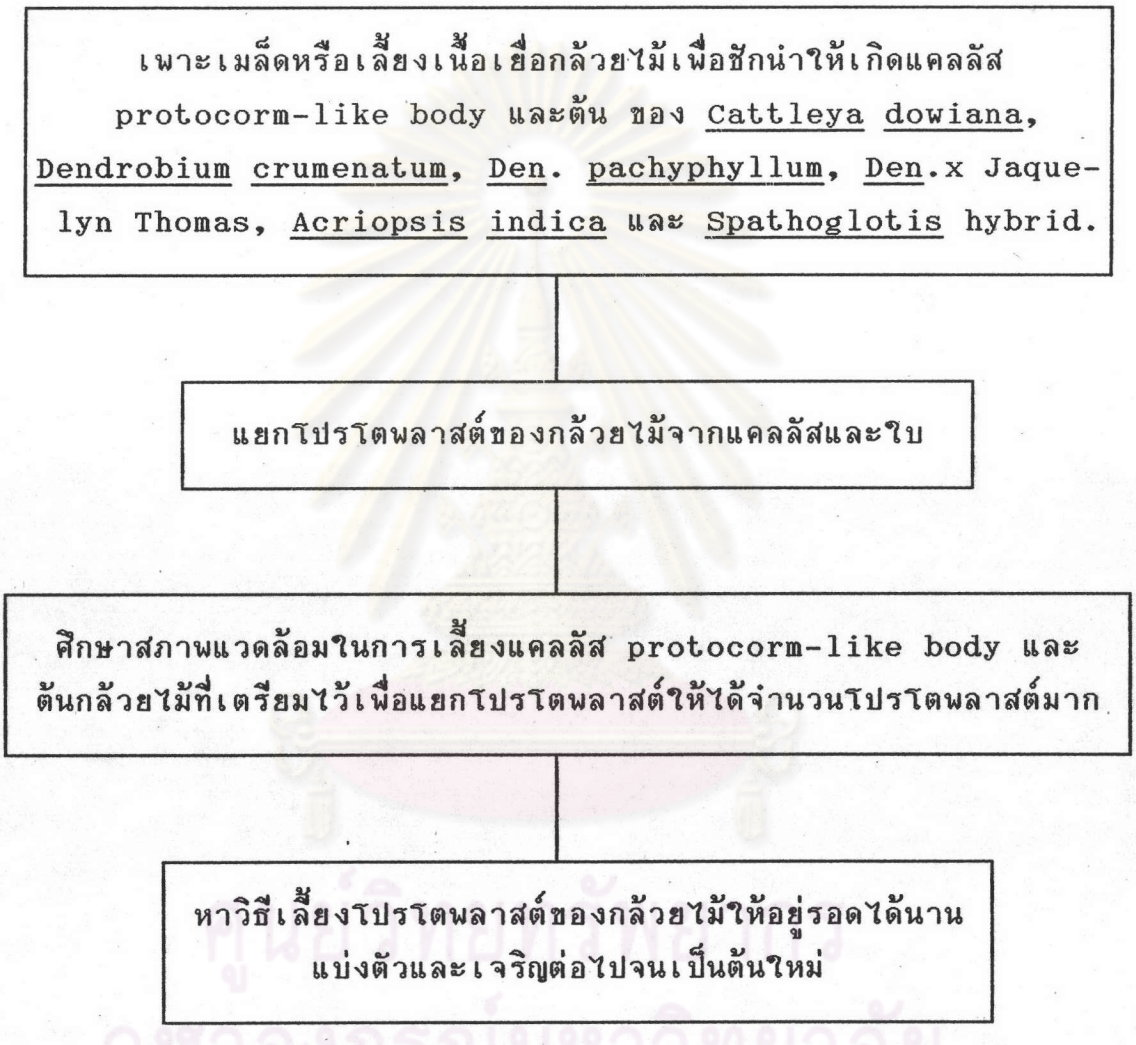
อุณหภูมิ 24-27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 60 เปอร์เซนต์ ช่วงแสง 16 ชม.ต่อวัน ใช้แสงสว่างจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ชนิด Philips TL 40 W/33 โดยใช้ความเข้มแสงประมาณ 1,200 ลักส์ และหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ ชนิด Crompton 40 WFL โดยใช้ความเข้มแสงประมาณ 1,200 ลักส์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการทดลอง

1. ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง แสดงในแผนภาพที่ 1

แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง



2. อาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

2.1 สูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส และ protocorm-like body ดังนี้

2.1.1 สูตรของ Schenk & Hildebrandt(1972) ในที่นี้เรียกว่าสูตร ก (ตารางที่ 1 ในภาคผนวก ข)

2.1.2 สูตรดัดแปลง Schenk & Hildebrandt

016289

(1972) ตามวิธีการของ ถาวร วัชราภัย และ มนทกานติ วัชราภัย (2519) ในที่นี้เรียกว่าสูตร ค (ตารางที่ 2 ในภาคผนวก ข)

2.2 สูตรอาหารชักนำให้เกิดต้น ดังนี้

2.2.1 สูตรของ Schenk & Hildebrandt(1972) ในที่นี้เรียกว่าสูตร ข (ตารางที่ 1 ในภาคผนวก ข)

2.2.2 สูตรดัดแปลง Schenk & Hildebrandt (1972) ตามวิธีการของ ถาวร วัชราภัย และ มนทกานติ วัชราภัย (2519) ในที่นี้เรียกว่าสูตร ง (ตารางที่ 2 ในภาคผนวก ข)

การเตรียมอาหารทั้ง 4 สูตร เมื่อผสมส่วนประกอบต่างๆเข้าด้วยกันแล้วจะได้อาหารในรูปของของเหลวหรืออาหารกึ่งแข็ง จากนั้นบรรจุอาหารลงในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 200 หรือ 250 มิลลิลิตร ประมาณ 30-50 มิลลิลิตรต่อขวด ปิดฝาด้วยกระดาษอะลูมิเนียมแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งในหม้อนึ่งอัดความดันที่ความดัน 1.1 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร และ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. <u>การเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้</u>

เลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ด้วยวิธีเลี้ยงตามถาวร วัชราภัย (2515) ดังต่อไปนี้

3.1 เลี้ยงเนื้อเยื่อจากเมล็ด

นำฝักกล้วยไม้ที่ยังไม่แตกล้างให้สะอาด จุ่มฝักในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ แล้วเผาผ่านเปลวไฟให้ติดสัก 1-2 ครั้ง เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวฝัก ใช้มีดปราศจากเชื้อผ่าฝักให้เปิดออก จากนั้นใช้ปากคีบเขี่ยเมล็ดให้ตกลงและกระจายสม่ำเสมอในอาหาร ถ้าเป็นฝักที่แตกแล้วนำเมล็ดฆ่าเชื้อด้วยสารละลายของ calcium hypochlorite 10 กรัมต่อน้ำกลั่น 140 มิลลิลิตร แล้วกรอง จากนั้นล้างเมล็ดให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง คีบเมล็ดลงในอาหารสูตร ข และ สูตร ง นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 24-27 องศาเซลเซียส ให้แสงวันละ 16 ชั่วโมง ความเข้มแสงประมาณ 1,200 ลักส์ เปลี่ยนอาหารทุก 1-4 สัปดาห์จะได้แคลลัส, protocorm-like body และต้นอ่อนมากพอกับความต้องการ

3.2 เลี้ยงเนื้อเยื่อจากตายอดและตาข้าง

ใช้หน่ออ่อนของกล้วยไม้ขนาดประมาณ 5-10 เซนติ-

เมตรล้างให้สะอาด ลอกเอากาบใบและใบออก แช่ในน้ำยาคลอร็อกซ์ 10เปอร์-เซนต์ ประมาณ 10-15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง ค่อยๆ ลอกกาบใบที่หุ้มตาออกทีละชั้น จนกระทั่งถึงเนื้อเยื่อของตายอดและตาข้าง ใช้มีดปราศจากเชื้อตัดเอาส่วนตายอดและตาข้างออกมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร ก และสูตร ค ประมาณ 4-8 สัปดาห์จะได้แคลลัส เปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์จนได้แคลลัส protocorm-like body และต้นอ่อน มากพอกับความต้องการ

4. <u>การแยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์</u>

4.1 เตรียมสารละลายเอนไซม์ซึ่งมีส่วนผสมของ cellulase RS, cellulase R-10 และ macerozyme R-10 ในสารละลายของกลูโคส mannitol และ $CaCl_2.2H_2O$ ที่ใช้เป็นสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิส ตามความเข้มข้น ดังนี้

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

cellulase RS 0.5% + macerozyme R-10 0.2%
cellulase RS 1.0% + macerozyme R-10 0.2%
cellulase RS 1.0% + macerozyme R-10 0.5%
cellulase RS 1.0% + macerozyme R-10 1.0%
cellulase R-10 0.5%+macerozyme R-10 0.2%
cellulase R-10 1.0%+macerozyme R-10 0.2%
cellulase R-10 1.0% macerozyme R-10 0.5%
cellulase R-10 1.0%+macerozyme R-10 1.0%

ชนิดและความเข้มข้นของสารรักษาความสมดุลย์ของออส-โมซิส

glucose 9.01%
mannitol 9.10% + $CaCl_2.2H_2O$ 0.019%
mannitol 9.50% + $CaCl_2.2H_2O$ 0.019%
mannitol 9.60% + $CaCl_2.2H_2O$ 0.019%
mannitol 9.70% + $CaCl_2.2H_2O$ 0.019%
mannitol 9.75% + $CaCl_2.2H_2O$ 0.019%
mannitol 9.80% + $CaCl_2.2H_2O$ 0.019%

จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์กรองผ่าน millipore ขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อกรองจุลินทรีย์ทิ้ง

4.2 นำแคลลัสหรือใบ มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆตามยาว หรือ ตามขวาง ขนาดประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ถ้าใบมีขนาดใหญ่ต้องลอกผิวใบด้านล่างออกก่อนแล้วจึงใส่ลงใน Petri dish ซึ่งมีสารละลายเอนไซม์ โดยใช้แคลลัสหรือใบ 1 กรัมต่อสารละลายเอนไซม์ 5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆเพื่อให้สารละลายเอนไซม์ท่วมส่วนของแคลลัสหรือใบโดยทั่วถึงกัน

4.3 บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 24-27 องศาเซลเซียส ประมาณ 12-14 ชั่วโมง

4.4 นำส่วนผสมของโปรโตพลาสต์ที่ย่อยแล้วกรองด้วยผ้ากรองที่มีรูขนาด 20-40 ไมครอนเพื่อแยกเอาเศษของเซลล์ออก นำสารละลายโปรโต-พลาสต์ที่กรองได้ใส่ลงในหลอด centrifuge

4.5 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 159-182 g (ความเร็ว 700-800 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 3-5 นาที โปรโตพลาสต์จะตกตะกอนที่ก้นหลอด

4.6 ใช้ Pasteur pipette ค่อยๆดูดเอาสารละลายเอมไซม์ทิ้ง เติมสารละลายสำหรับล้างโปรโตพลาสต์ (washing solution) ซึ่งมีความเข้มข้นของสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสที่เหมาะสม โดยใช้ความเข้มข้นของสารรักษาความสมดุลย์ของออสโมซิสในอัตราส่วนตามสารละลายเอนไซม์ซึ่งใช้ได้ผลดีที่สุด (ตารางที่ 2) ลงไป 5 มิลลิลิตร เพื่อให้โปรโตพลาสต์แขวนลอยใหม่ นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ 159-182 g เป็นเวลา 3-5 นาที

ตารางที่ 2 สารละลายสำหรับล้างโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้

ส่วนประกอบของสารละลายสำหรับล้างโปรโตพลาสต์	ความเข้มข้นของสารละลายสำหรับล้างโปรโตพลาสต์		
	สกุล Dendrobium	Acriopsis indica	Spathoglotis hybrid
mannitol	9.7 กรัม	9.7 กรัม	9.7-9.8 กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.019 กรัม	0.019 กรัม	0.019 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร	100.0 มิลลิลิตร	100.0 มิลลิลิตร

หมายเหตุ : - สารละลายสำหรับล้างโปรโตพลาสต์ทั้งหมด pH = 5.8

4.7 ดูดเอาสารละลายสำหรับล้างโปรโตพลาสต์ทิ้ง แล้วเติมสารละลายสำหรับล้างลงไปใหม่ 5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆเพื่อให้โปรโตพลาสต์แขวนลอย แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงใหม่อีกครั้ง

4.8 ดูดเอาสารละลายสำหรับล้างโปรโตพลาสต์ทิ้ง แล้วเติมสารละลายสำหรับล้างลงไป 5 มิลลิลิตร และค่อยๆเติม float solution (สารละลาย percoll) 8 มิลลิลิตรลงไป นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่งที่ 159-182 g เป็นเวลา 10 นาที

4.9 ใช้ Pasteur pipette ค่อยๆดูดเอาส่วนของโปรโตพลาสต์ซึ่งแขวนลอยอยู่ด้านบนใส่ลงไปในหลอด centrifuge หลอดใหม่ เติมสารละลายสำหรับล้างลงไป 5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 159-182 g เป็นเวลา 3-5 นาที โปรโตพลาสต์จะตกตะกอนที่ก้นหลอด

4.10 ดูดเอาสารละลายสำหรับล้างโปรโตพลาสต์ทิ้ง เหลือแต่โปรโตพลาสต์ที่ตกตะกอนไว้ เติมอาหารสำหรับเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (culture medium) ลงไป

วิธีเตรียม float solution (สารละลาย Percoll)

Percoll	20 มิลลิลิตร
สารละลายสำหรับล้างโปรโตพลาสต์	80 มิลลิลิตร

5. <u>ศึกษาสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงแคลลัสและต้นกล้วยไม้ที่จะนำมาแยกโปรโตพลาสต์</u>

5.1 ระยะเวลาในการเปลี่ยนอาหาร

ใช้ปริมาณของแคลลัสหรือใบ 1 กรัมต่อสารละลายเอนไซม์ 5 มิลลิลิตร ให้ความเข้มแสงประมาณ 1,200 ลักส์ เปลี่ยนอาหารทุก 1,2 และ 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบปริมาณของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้

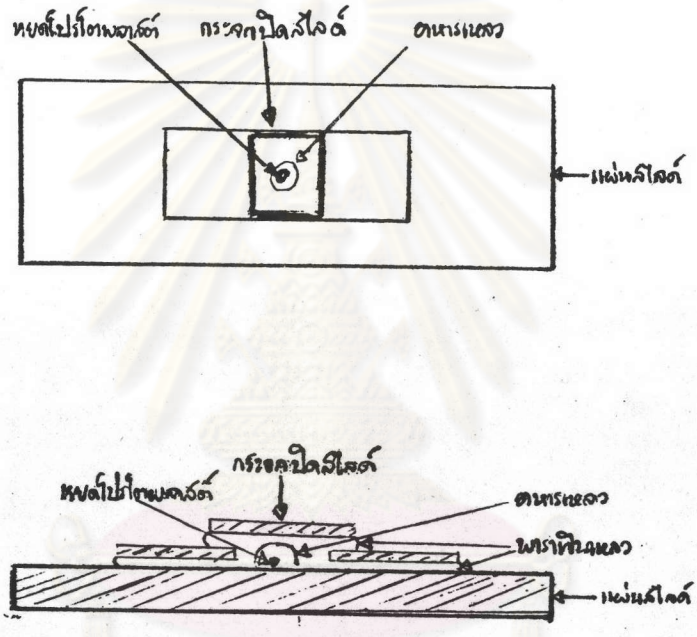
5.2 ความเข้มแสง 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์

ใช้ปริมาณของแคลลัสหรือใบ 1 กรัมต่อสารละลายเอนไซม์ 5 มิลลิลิตร ระยะเวลาในการเปลี่ยนอาหารที่ให้ผลดีที่สุดจากข้อ 5.1 ให้แสงความเข้ม 0, 1,200 และ 1,600 ลักส์ เปรียบเทียบปริมาณของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้

6. <u>การเลี้ยงโปรโตพลาสต์</u>

6.1 เลี้ยงบนแผ่นสไลด์แบบ microchamber technique

เตรียม microchamber โดยหยดพาราฟินเหลวลงบนแผ่นสไลด์ 2 จุด ห่างกันเล็กน้อย วางทับหยดพาราฟินด้วยกระจกปิดสไลด์ 2 แผ่น หยดพาราฟินบริเวณรอบช่องว่างระหว่างกระจกปิดสไลด์ 2 แผ่นนั้น และหยดโปรโต-พลาสต์ที่แยกได้ในข้อ 4 ลงไปที่ช่องว่าง ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร วางจานเลี้ยงเชื้อลงในกล่องพลาสติกที่มีกระดาษทิชชูชุบด้วยน้ำกลั่นรองอยู่



ภาพที่ 1 การเลี้ยงโปรโตพลาสต์บนแผ่นสไลด์แบบ microchamber technique

6.2 เลี้ยงในสภาพหยดขนาดเล็กแบบ microdrop technique

ใช้ Pasteur pipette หยดโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ในข้อ 4 ลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตรจำนวน 3 หยดต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ แล้วพันจานเลี้ยงเชื้อโดยรอบด้วยพาราฟิล์ม จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อใส่ลงในกล่องพลาสติกซึ่งมีกระดาษทิชชูชุบด้วยน้ำกลั่น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. การเก็บรวบรวมข้อมูลการทดลอง

ในการทดลองนี้ ได้ศึกษาจำนวน ลักษณะโปรโตพลาสต์ และสูตรอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์ดังนี้

7.1 นับจำนวนของโปรโตพลาสต์โดยใช้เครื่องนับเซลล์

7.1.1 เครื่องนับเซลล์ 1 ช่อง = .25x.25x.1 มม.^{3}

= .025x.025x.01 ซล.

= 6.25×10^{-6} มล.

7.1.2 นับจำนวนโปรโตพลาสต์จากช่องในตารางทั้งหมด 64 ช่อง

7.1.3 สูตรคำนวณความหนาแน่น ของโปรโตพลาสต์ต่ออาหารที่ใช้เลี้ยง 1 มิลลิลิตร คือ

$$\frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์}}{64\text{ช่อง}} = \text{จำนวนโปรโตพลาสต์/มิลลิลิตร}$$

6.25×10^{-6} มิลลิลิตร/ช่อง

7.2 ศึกษาการเจริญของโปรโตพลาสต์ คือ

7.2.1 การอยู่รอดและแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted

7.2.2 การสร้างผนังเซลล์ใหม่ ของโปรโตพลาสต์ ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted หรือโดยย้อมสีโปรโตพลาสต์ด้วย Calcofluor White แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescence โดยใช้แสงสีน้ำเงินกระตุ้นและฟิลเตอร์เขียว ถ้าโปรโตพลาสต์มี cellulose หลังจากอยู่ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต 5 นาที จะเห็นโปรโตพลาสต์เรืองแสงสีเหลือง-เขียว

วิธีเตรียมสี Calcofluor White

Calcofluor White 0.01 กรัมละลายในสารละลายสำหรับล้างโปรโตพลาสต์ (washing medium) 100 มิลลิลิตร

วิธีย้อมสีโปรโตพลาสต์

ใช้โปรโตพลาสต์ 1 หยด : สี Calcofluor White 1 หยด

8. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงโปรโตพลาสต์

สูตรอาหารในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้ทดลองดัดแปลงจากสูตรอาหารหลัก 3 สูตร คือ

ก. สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ตาม Gamborg B_5 (1985)

ข. สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ตาม Schenk & Hildebrandt (1972)

ค. สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ดัดแปลงตาม ถาวร วัชราภัย และ มนทกานติ วัชราภัย (2519)

ตารางที่ 3 สูตรต่างๆที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้

สูตรอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	B_5	B_5-1	B_5-2	B_5-3	SH	SH-1*	SH-2*	SH-3	SH-4	SH-5	SH-6	SH-7	SH-8	SH-9	SH-10	SH-11	SH-12
MAJOR ELEMENTS																	
$(NH_4)_2SO_4$	134	134	134	134	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$MgSO_4.7H_2O$	250	250	250	250	400	400	200	400	200	200	200	200	200	200	200	200	200
$NaH_2PO_4.7H_2O$	150	150	150	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KNO_3	2,500	2,500	2,500	2,500	2,500	2,500	1,250	2,500	1,250	1,250	1,250	1,250	1,250	1,250	1,250	1,250	1,250
$CaCl_2.2H_2O$	885	885	885	885	200	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800
$NH_4.H_2PO_4$	-	-	-	-	300	300	150	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5
MINOR ELEMENTS																	
H_3BO_3	6.2	6.2	6.2	6.2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
KI	0.83	0.83	0.83	0.83	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.25	0.25	0.25	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
$CoCl_2.6H_2O$	0.028	0.028	0.028	0.028	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
$MnSO_4.H_2O$	16.9	16.9	16.9	16.9	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	8.6	8.6	8.6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
$CuSO_4.5H_2O$	0.03	0.03	0.03	0.03	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

ตารางที่ 3 ต่อ

สูตรอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	B_5	B_5-1	B_5-2	B_5-3	SH	SH-1*	SH-2*	SH-3	SH-4	SH-5	SH-6	SH-7	SH-8	SH-9	SH-10	SH-11	SH-12
Fe-EDTA																	
$FeSO_4.2H_2O$	27.8	27.8	27.8	27.8	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Na_2EDTA	37.3	37.3	37.3	37.3	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
ORGANICS																	
folic acid	0.4	0.4	0.4	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.4	-
L-glutamine	200	200	200	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-
L-arginine	200	200	200	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-
L-asparagin	200	200	200	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-
casein hydrolysate	500	500	500	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	500	-
citric acid	20	20	20	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-
choline chloride	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
VITAMINS																	
Thiamine HCl	10	10	10	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	10	5
Nicotinamide	1	1	1	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1	5
Pyridoxine HCl	1	1	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0.5
myo-Inositol	100	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-
calcium pantothenate	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
biotin	0.01	0.01	0.01	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	-
riboflavin	0.2	0.2	0.2	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-
PABA	0.02	0.02	0.02	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02	-
ascorbic acid	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-
HORMONES																	
NAA	-	-	0.5	0.5	-	-	0.1	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2
2,4-D	0.5	0.5	1	1	0.5	0.5	-	0.5	-	-	-	0.1	0.1	-	0.1	0.1	0.1

ตารางที่ 3 ต่อ

สูตรอาหารเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	B_5	B_5-1	B_5-2	B_5-3	SH	SH-1*	SH-2*	SH-3	SH-4	SH-5	SH-6	SH-7	SH-8	SH-9	SH-10	SH-11	SH-12
pCPA	-	-	-		2	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
kinetin	0.1	0.1	-		0.1	0.1	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
coconut water	-	-	5%	5%	-	-	5%	-	5%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	-	10%
CARBOHYDRATES																	
sucrose	250	267	267	150	-	-	-	-	-	-	-	150	-	-	-	-	-
glucose	72100	76854	76854	36000	-	-	-	-	-	-	-	150	-	-	-	150	150
mannitol	-	-	-	27330	72880	72880	72880	72880	72880	80000	81000	54660	82000	82000	83000	83000	83000
ribose	-	-	-	125	125	125	125	125	125	125	125	150	150	150	150	150	150

หมายเหตุ สูตรทั้งหมด pH = 5.8

* หมายถึง อาหารเหลว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย