# ภาคผนวก

**1. การเตรียมสารละลาย MS stock ความเข้มข้น 10 เท่า (10XMS)**

1.1 ชั่งสารต่างๆ ดังนี้

| | กรัม |
|---|---|
| 1) $NH_4NO_3$ | 66.0 |
| 2) $KNO_3$ | 76.0 |
| 3) $CaCl_2.2H_2O$ | 17.6 |
| 4) $MgSO4.7H_2O$ | 14.8 |
| 5) $KH_2PO_4$ | 6.8 |
| 6) KI | 0.0332 |
| 7) $H_3BO_3$ | 0.248 |
| 8) $MnSO_4.H_2O$ | 0.676 |
| 9) $ZnSO_4.7H_2O$ | 0.344 |
| 10) $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0.01 |
| 11) $CuSO_4.5H_2O$ | 0.001 |
| 12) $CoCl_2.6H_2O$ | 0.001 |
| 13) Glycine | 0.08 |
| 14) Nicotinic acid | 0.02 |
| 15) Pyridoxine-HCl | 0.02 |
| 16) Thiamine-HCl | 0.004 |
| 17) Myo-inosital | 4.0 |
| 18) $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ | 1.492 |
| 19) $FeSO4 \cdot 7H2O$ | 1.112 |

1.2 ละลายสารตัวที่ 1–17 ในน้ำกลั่น (RO) ปริมาตร 3 ลิตร ตามลำดับ โดยเติมสารทีละชนิดจนละลายหมดทีละชนิด แล้วจึงเติมสารชนิดต่อไป

1.3 นำ $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ มาละลายแยกในน้ำกลั่น (RO) 20 มิลลิลิตร คนให้สารละลายจนหมดแล้วจึงเติม $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ลงไป คนให้สารละลายจนหมด จะได้สารละลายสีเหลือง ไม่มีตะกอนของ (Fe-EDTA)

1.4 นำสารละลาย Fe-EDTA มาเทใส่รวมกับสารละลายที่เตรียมไว้

1.5 ปรับปริมาตรเป็น 4 ลิตร

1.6 ตวงสารละลายที่ได้เก็บเป็น Stock ใส่ถุงซิป ถุงละ 50 และ100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**2. การเตรียม** สารละลาย 50 ppm BAP

2.1 เตรียมน้ำกลั่น และ ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1 ลิตร

2.2 เติมน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร

2.3 ชั่ง BAP 50 มิลลิกรัม ละลายใน Ethanol 95% (Analytical Grade) 2 มิลลิลิตร จนละลายหมด

2.4 เทสารละลายที่ได้ใส่ขวดวัดปริมาตร แล้วทำการปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

**3. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**

3.1 นำ MS stock 100 มิลลิลิตรที่แช่แข็งไว้ มาละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 700 มิลลิลิตร

3.2 เติมน้ำตาล 30 กรัม (อาจใช้มากกว่าได้) คนให้น้ำตาลละลายจนหมด

3.3 หากต้องการเติมฮอร์โมน ให้เติมลงไปตามปริมาตรที่ต้องการ

3.4 ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

3.5 ปรับ pH เป็น 5.7- 5.75 ด้วย KOH หรือ HCl

3.6 ให้ความร้อนจนเดือด จากนั้นค่อยๆ เติม Agar 7$\pm$0.2 กรัม (แล้วแต่ชนิดและยี่ห้อของAgar) รอจนวุ้นนละลายจนใส

3.7 ตักอาหารใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื้อ รอให้อาหารแข็งแล้วปิดฝาขวด

3.8 นำขวดที่เติมอาหารแล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อในตู้ Autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15ปอนด์ / ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.9 นำอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้วออกจากตู้ Autoclave ตั้งไว้รอให้อาหารแข็งตัว แล้วจึงนำไปเก็บในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารที่เตรียมเสร็จแล้วควรทิ้งไว้นาน 1-3 วัน เพื่อดูการปนเปื้อนของอาหารก่อนนำมาใช้ และอาหารสามารถเก็บไว้ได้นาน 1 เดือน ในห้องเพาะเลี้ยง

**4. การเตรียมอุปกรณ์สำหรับใช้ในการเปลี่ยนถ่ายอาหาร**

4.1 ใช้ aluminium foil พันปลาย Forceps แต่ละด้ามไว้ แล้วบรรจุใส่ถุงร้อนรวมกับด้ามมีด หลอดทดลอง (ใส่สำลีไว้กันหลอด) ผูกปากถุงให้แน่น

4.2 จานเลี้ยงเชื้อให้หงายจานแล้วเรียงกันใส่ถุงร้อน ผูกปากถุงให้แน่น

4.3 ผ้าสำหรับเช็ดพื้นตู้ปลอดเชื้อใส่ถุงร้อน ผูกปากถุงให้แน่น

4.4 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อในตู้ Autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 30 นาที

**5. การเตรียมตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow)**

5.1 เปิดตู้และทำการเช็ดตู้ด้วย Ethanol 70% (ใช้ผ้าสะอาดหรือกระดาษทิชชู่ธรรมดา)

5.2 นำอุปกรณ์ที่ทำการฆ่าเชื้อไปเตรียมไว้ในตู้ และจัดให้เป็นระเบียบ

5.3 ปิดฝาตู้และทำการเปิด UV นานอย่างน้อย 30 นาที และใช้วัสดุทึบแสงปิดด้านหน้าของตู้ไว้เพื่อกันอันตรายจากรังสี

5.4 เปิด Blower และทำการเช็ดพื้นของตู้อีกครั้งด้วย Ethanol 70% (ใช้ผ้าที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว)

5.5 ควรล้างมือให้สะอาดก่อนทำงานในตู้ปลอดเชื้อ และ วัสดุหรืออุปกรณ์รวมทั้งมือควรสเปรย์ฆ่าเชื้อด้วย Ethanol 70% ทุกครั้ง ก่อนนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ