ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมอาหารวุ้นสำหรับเพาะเมล็ดกล้วยไม้สูตร Vacin and Went (VW) (1949) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

1. เตรียมสารละลายเข้มข้น (Stock Solution) จากสารเคมีดังนี้

1.1 ธาตุอาหารหลัก (Macronutrient) สูตร VW (1949) ดัดแปลง โดยเตรียมสารละลายเข้มข้นมากกว่าสูตรมาตรฐาน 20 เท่า (ตาราง 30)

ตาราง 30 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร VW (1949)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร VW (1949) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาความเข้มข้น 20x (ก/ล)
$Ca(NO_3).4H_2O$	151	3.02
KH_2PO_4	250	5.00
KNO_3	525	10.50
$MgSO_4.7H_2O$	250	5.00
$(NH_4)_2SO_4$	500	10.00

1.2 ธาตุอาหารรอง (Micronutrient) สูตร MS (1962) ดัดแปลง โดยเตรียมสารละลายเข้มข้นมากกว่าสูตรมาตรฐาน 100 เท่า (ตาราง 31)

ตาราง 31 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาความเข้มข้น 100x (ก/ล)
$MnSO_4.H_2O$	22.30	2,230.0
KI	0.83	83
$CaCl_2.6H_20$	0.025	2.5
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60	860.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 31 (ต่อ) ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรองสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร Ms (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาความเข้มข้น 100x (ก/ล)
H_3BO_3	6.20	620.0
$Na_2MnO_4 . H_2O$	0.25	25.0
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.025	2.5

1.3 สารประกอบอินทรีย์สูตร MS (1962) ดัดแปลง โดยเตรียมสารละลายเข้มข้นมากกว่าสูตรมาตรฐาน 100 เท่า (ตาราง 32)

ตาราง 32 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของสารประกอบอินทรีย์สูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาความเข้มข้น 100x (ก/ล)
Glycine	2.00	200
Thimine.HCl	0.25	25
Pyridoxine.HCl	0.25	25
Nicotinic acid	0.25	25
Myo – inositol	100.00	10,000

1.4 สารละลายเหล็กสูตร MS (1962) ดัดแปลง ในรูป $FeSO_2EDTA$ โดยเตรียมสารละลายเข้มข้นมากกว่าสูตรมาตรฐาน 100 เท่า เตรียมโดยชั่งสารแต่ละชนิดดังแสดงไว้ในตาราง 33 ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายของแต่ละสารเป็น 500 มิลลิลิตร แล้วจึงนำมาผสมไว้ในขวดเดียวกัน โดยใส่ขวดสีชาเพื่อป้องกันแสง

ตาราง 33 ชนิดและปริมาณสารในสารละลายเข้มข้นของเหล็กสูตร MS (1962)

ชนิดสาร	ปริมาณสารในสูตร MS (1962) (มก/ล)	ปริมาณสารในน้ำยาความเข้มข้น 100x (ก/ล)
$FeSO_4 . 7H_2O$	27.8	2.78
Na_2EDTA	37.3	3.73

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. เติมน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ประมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายต่าง ๆ ดังนี้
    - สารละลายเข้มข้น (20 เท่า) ของธาตุอาหารหลัก (Macronutrient) สูตร VW (1949) ดัดแปลง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
    - สารละลายเข้มข้น (100 เท่า) ของธาตุอาหารรอง (Micronutrient) สูตร MS (1962) ดัดแปลง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
    - สารละลายเข้มข้น (100 เท่า) ของสารประกอบอินทรีย์สูตร MS (1962) ดัดแปลง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
    - สารละลายเข้มข้น (100 เท่า) ของสารละลายเหล็กสูตร MS (1962) ดัดแปลง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
    - สารละลายซูโครส (2 %) 20 กรัม
    - น้ำมะพร้าว (15 %) 150 มิลลิลิตร
3. ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำสารละลายมาปรับค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ให้มีค่า 5.7 โดยใช้เครื่อง pH meter
4. เติมวุ้นผง (0.8 %) 8 กรัม ลงไปในสารละลายแล้วคนให้เข้ากันอีกครั้ง ใช้พลาสติกปิดปากบีกเกอร์แล้วนำไปต้มให้เดือดโดยใช้เครื่องไมโครเวฟ
5. ค่อย ๆ เทอาหารลงในขวดรูปชมพู่หรือขวดแก้วปริมาตรขวดละ 25 – 30 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยพลาสติกทนร้อนและปิดทับด้วยกระดาษอีกครั้ง รัดปากขวดด้วยยางรัด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนเย็นก่อนนำไปใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี และสารละลายในการทำ RAPD

1. chloroform – isoamyl alcohol

ผสม chloroform กับ isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. CTAB buffer 2x หรือ extraction buffer (Doyle and Doyle, 1990)

2 M tris – HCl buffer (pH 8.0)	100 mM
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20 mM
NaCl	1.4 M
CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide, $C_{19}H_{42}NBr$)	2 %
PVP – 40 (polyvinylpyrrolidone)	1 %
น้ำกลั่น	ให้ครบปริมาตร

ผสมสารต่าง ๆ ลงไปแล้วคนให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ปล่อยให้สารละลายเย็นลง แล้วเติม 2 – mercaptaethanol 200 ไมโครลิตรต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ข้อสังเกตุ 2 – mercaptoethanol เป็นสารละลายที่ไม่เสถียร ดังนั้น CTAB buffer จึงไม่ควรเก็บไว้นาน

3. 0.5 M EDTA (pH 8.0)

ผสม EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid disodiumsalt, C H O Na .$2H_2O$) 186. 1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร กวนด้วย stirrer พร้อมกับปรับ pH โดยเติมเกล็ด NaOH (เมื่อ pH มีค่า 8.0 EDTA จะละลายได้หมดพอดี) จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. 75 % ethanol

ผสม 75 มิลลิลิตร ของ absolute ethanol กับน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. 1% ethidium bromide

ละลาย ethidium bromide 100 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด

ข้อควรระวัง สาร ethidium bromide เป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น strong mutagent ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคมะเร็ง ในการเตรียมสารจึงควรสวมถุงมือ และอย่าสูดหายใจเอาผงของ ethidium bromide เข้าไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. 6X loading dye

bromophenol blue	0.25 %
xylene cyanol FF	0.25 %
sucrose	40 %

น้ำกลั่น

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. 10 X TBE buffer

tris (hydroxy methyl) aminomethane	108 กรัม
boric acid	55 กรัม
0.5 M EDTA (pH 8.0)	40 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	ให้ครบปริมาตร
รวมปริมาตร	1,000 มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8. TE buffer

2 M tris – HCl buffer (pH 8.0)	500 ไมโครลิตร (10 mM)
0.5 M EDTA (pH 8.0)	200 ไมโครลิตร (1 mM)
น้ำกลั่น	ให้ครบ 100 มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9. 2 M tris – HCl buffer (pH 8.0)

ละลาย tris (hydroxy methyl) aminomethane 242.8 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วยการเติม HCl แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

10. wash buffer

amonium acetate (NH_4AOc)	10 mM
ethanol	75%

เก็บไว้ที่อุณภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 34 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

รหัสไพรเมอร์	5' ⟶ 3'
OPF01	ACGGATCCTG
OPF02	GAGGATCCCT
OPF03	CCTGATCACC
OPF04	GGTGATCAGG
OPF05	CCGAATTCCC
OPF06	GGGAATTCGG
OPF07	CCGATATCCC
OPF08	GGGATATCGG
OPF09	CCAAGCTTCC
OPF10	GGAAGCTTGG
OPF11	TTGGTACCCC
OPF12	ACGGTACCAG
OPF13	GGCTGCAGAA
OPF14	TGCTGCAGGT
OPF15	CCAGTACTCC
OPF16	GGAGTACTGG
OPF17	AACCCGGGAA
OPF18	TTCCCGGGTT
OPF19	CCTCTAGACC
OPF20	GGTCTAGAGG
OPD03	GTCGCCGTCA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล นางสาวศิริลักษณ์ อินทะวงศ์

วัน เดือน ปี เกิด 19 ตุลาคม 2521

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2533 สำเร็จการศึกษาชั้นประถมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนรังษีวิทยา อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

พ.ศ. 2539 สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนฝางชนูปถัมภ์ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

พ.ศ. 2543 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยม อันดับ 2) สาขาพืชศาสตร์ (พืชผัก) ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ประสบการณ์ในการทำงาน

- งานด้านการขยายพันธุ์พืช
- งานด้านอณูชีวโมเลกุล
- งานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

120 หมู่ 2 ตำบลแม่คะ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ 50110

โทรศัพท์ (053) 883117

E-mail : jupiter496 @ yahoo.com

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved