บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องผลิตลำไอออนไนโตรเจนพลังงานต่ำ (CMU 2)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วต่ำ
4. เครื่องผสม (Vortex)
5. เครื่องอิเลคโตรโฟเรซิส
6. เครื่อง UV
7. เครื่อง PCR
8. เครื่องชั่งไฟฟ้า
9. เครื่อง autoclave
10. โปรแกรม GelDoc
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
12. ตู้บ่ม (Incubator) 37 องศาเซลเซียส

3.1.2 อุปกรณ์ (ภาคผนวก ก)

3.1.3 สารเคมี (ภาคผนวก ก)

3.1.4 พืชทดลอง

1. ดาวเรือง (*Tagates erectra*)
2. เยอร์บีร่า (*Gerbera sp.*)
3. เทียนฝรั่ง (*Impatiens wallerana*)
4. แพงพวย (*Vinca catharanthus*)
5. หงอนไก่ (*Celosia cristata*)
6. สร้อยไก่ (*Celosia plumosa*)

จากบริษัท AFM FLOWER SEEDS (THAILAND) CO., LTD. ซึ่งเมล็ดเป็น F1 hybrid

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของดอกดาวเรือง ครั้งที่ 1 ปลูกช่วงเดือน เม.ย. - ก.ย. 49 และครั้งที่ 2 ปลูกช่วง เดือน ต.ค. 49 – ม.ค. 50 ซึ่งการชักนำการกลายพันธุ์จะใช้เงื่อนไขในการระดมยิง ดังตาราง 3.1

ตาราง 3.1 เงื่อนไขที่ใช้ในการชักนำการกลายพันธุ์ของดอกดาวเรืองครั้งที่ 1 โดยเลือกใช้ชนิดของธาตุคือ N ด้วยเงื่อนไขดังตารางต่อไปนี้

ตัวอย่างพืชทดลอง	พลังงาน (keV)	ชนิดของธาตุ	dose (ions/cm^2)	จำนวนเมล็ด
ดาวเรือง ครั้งที่ 1	50	N	8×10^{15}	250
			4×10^{16}	250
			8×10^{16}	250
ดาวเรือง ครั้งที่ 2	50	N	4×10^{16}	1000
			8×10^{16}	1000

3.2.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของดอกเยอร์บีร่า

ใช้เยอร์บีร่า (*Gerbera sp.*) เป็นพืชทดลองในการชักนำการกลายพันธุ์ ซึ่งในการชักนำการกลายพันธุ์จะใช้ลำไอออนของไนโตรเจนอะตอมในการระดมยิงเมล็ดของดอกเยอร์บีร่า ดังตาราง 3.2

ตาราง 3.2 เงื่อนไขที่ใช้ในการชักนำการกลายพันธุ์ดาวเยอร์บีร่าโดยเลือกใช้ชนิดของธาตุคือ N ด้วยเงื่อนไขดังตารางต่อไปนี้

ตัวอย่างพืชทดลอง	พลังงาน (keV)	ชนิดของธาตุ	dose (ions/cm^2)	จำนวนเมล็ด
เยอร์บีร่า ครั้งที่ 1	50	N	8×10^{15}	150
			4×10^{16}	150
			8×10^{16}	150
เยอร์บีร่า ครั้งที่ 2	50	N	4×10^{16}	400
			8×10^{16}	400

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของดอกสร้อยไก่ (*Celosia plumosa*) เทียนฝรั่ง (*Impatiens wallerana*), แพงพวย (*Vinca catharanthus*) และ หงอนไก่ (*Celosia cristata*) เป็นพืชทดลองในการชักนำการกลายพันธุ์ ดังตาราง 3.3

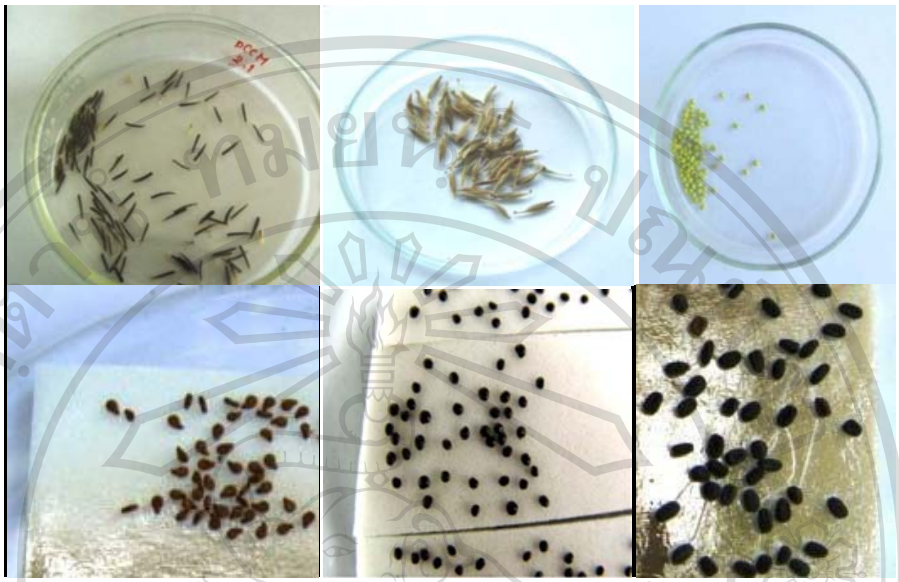
ตาราง 3.3 เงื่อนไขที่ใช้ในการชักนำการกลายพันธุ์ของดอกเทียนฝรั่ง แพงพวย หงอนไก่ โดยเลือกใช้ชนิดของธาตุคือ N ด้วยเงื่อนไขดังตารางต่อไปนี้

ตัวอย่างพืชทดลอง	พลังงาน (keV)	ชนิดของธาตุ	dose (ions/cm^2)	จำนวนเมล็ด
สร้อยไก่, เทียนฝรั่ง,	50	N	8×10^{15}	250
แพงพวยและหงอนไก่			4×10^{16}	250
ครั้งที่ 1			8×10^{16}	250
เทียนฝรั่ง และ แพงพวย	50	N	8×10^{16}	300
ครั้งที่ 2			2×10^{17}	300

3.2.4 ขั้นตอนการดำเนินการระดมยิงด้วยลำไอออน

1. นำเมล็ดของดอกทั้ง 6 ชนิด (ภาพ 3.1) แบ่งเป็นชุดควบคุมการทดลองในสภาพปกติ (control) และ ชุดควบคุมการทดลองในสภาวะสุญญากาศ (vac^+) และ ชุดการทดลองในแต่ละชุดการทดลอง แสดงในตาราง 3.1, 3.2 และ 3.3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.1 ลักษณะเมล็ดของดาวเรือง , เยอร์บีร่า, หงอนไก่, เทียนฝรั่ง, สร้อยไก่ และแพงพวย ตามลำดับ

2. เรียงเมล็ดของดอกดาวเรืองและดอกเยอร์บีร่า ใส่ลงใน holder โดย 1 หลุมสามารถใส่เมล็ดได้ 15- 20 เมล็ด (ดังภาพ 3.2) เรียงเมล็ดใส่หลุม ๆ ละ ประมาณ 250 เมล็ด

ภาพ 3.2 การเรียง Holder ของเมล็ดดอกดาวเรือง และเยอร์บีร่า

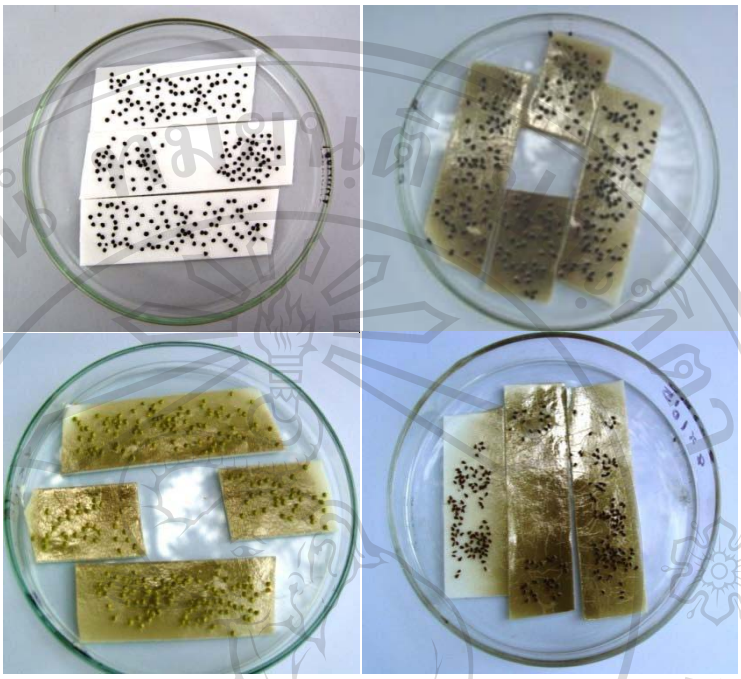
3. นำ holder แต่ละอันใส่ลงใน chamber ที่อยู่ในสภาพสุญญากาศ แล้วระดมยิงด้วยเงื่อนไขดังแสดงในตาราง 3.1 และ 3.2 ด้วยเครื่อง ion implanter CMU 2 (ภาพ 3.3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.3 เครื่อง ion implanter CMU 2 ณ ศูนย์วิจัยนิวตรอนพลังงานสูง ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4. นำเมล็ดของดอกสร้อยไก่ เทียนฝรั่ง หงอนไก่ และ แพงพวย มาวางบนกระดาษกาวที่แปะอยู่บน plate (ดังภาพ 3.4) โดยแบ่งเป็นชุดควบคุมการทดลอง 2 ชุด ชุดละ 100 เมล็ด และ 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 250 เมล็ด แล้วระดมยิงด้วยเงื่อนไขดังแสดงในตาราง 3.3 ด้วยเครื่อง ion implanter CMU 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.4 การเรียงเมล็ดดอกสร้อยไก่ แพงพวย หงอนไก่ และดอกเทียนฝรั่งใน plate

5. เตรียมวัสดุเพาะ peat moss (AFM) โดยผสมน้ำให้มีความชื้นที่พอเหมาะคือ เมื่อบีบแล้วสามารถปั้นเป็นก้อนได้แต่ไม่มีน้ำเยิ้มออกมา

ภาพ 3.5 การเตรียมวัสดุเพาะ peat moss

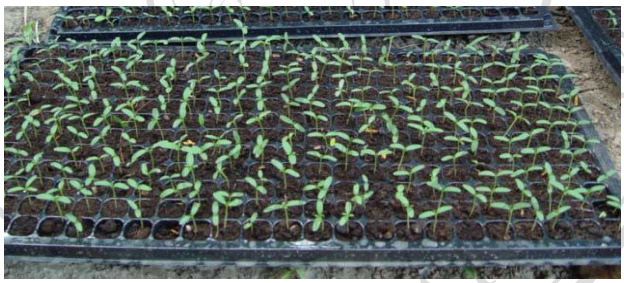
6. ใส่วัสดุเพาะลงในถาดหลุมขนาด 108 หลุม สำหรับ เยอร์บีร่า และ 228 หลุม สำหรับดอกดาวเรือง สร้อยไก่ หงอนไก่ เทียนฝรั่ง และ แพงพวย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.6 ใส่วัสดุเพาะลงในถาดหลุมขนาด 108 หลุม

7. นำเมล็ดที่ผ่านการยิงด้วยลำไอออนไปเพาะลงกระบะเพาะ หลุมละ 1 เมล็ด ลึกประมาณ 1 เซนติเมตร ทำการกลบเมล็ด และรดน้ำทุกวันวันละ 1 ครั้ง ตอนเย็น

8. นับจำนวนต้นอ่อนที่งอกหลังจากผ่านการเพาะเป็นเวลา 10 วัน นำผลที่ได้ไปคำนวณหา % การงอก (% germination)



ภาพ 3.7 ต้นอ่อนของดอกดาวเรืองที่งอกหลังจากผ่านการเพาะเป็นเวลา 10 วัน

9. บันทึกจำนวนต้นกล้าที่อยู่รอด ทุกอาทิตย์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งจำนวนต้นกล้าที่รอดชีวิตจะนำไปหา % การรอดชีวิต (% survival)

ภาพ 3.8 ต้นกล้าที่อยู่รอด ทุกอาทิตย์เมื่อครบเวลา 4 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. ย้ายต้นกล้าลงปลูกในแปลงดิน และในถุงดำขนาด 5 x 8 นิ้ว บันทึกผลความสูง ระยะเวลาที่ใช้ในการออกดอก หรือลักษณะ Phenotype อื่น ๆ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมการทดลอง ที่สังเกตได้ทุก ๆ 7 วัน

ภาพ 3.9 ลักษณะแปลงปลูกเมื่อทำการเพาะต้นกล้าดอกเยอร์บีร่าและดอกดาวเรือง

11. เมื่อต้นไม้ดอกอายุได้ประมาณ 2 เดือน เก็บตัวอย่างใบอ่อน ของต้นที่มีลักษณะฟีโนไทป์ที่แตกต่างจากชุดควบคุมการทดลอง และชุดควบคุมการทดลอง รวมทั้ง ชุดทดลองที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ ใส่ลงในถุงซิป ทำเครื่องหมาย แล้วรีบนำไปเก็บในตู้แช่เย็น –20 องศาเซลเซียส โดยเร็วที่สุด เพื่อนำไปทำการสกัด DNA

ภาพ 3.10 การเก็บตัวอย่างใบอ่อนเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ

12. สังเกตและบันทึกผลต่อไปอย่างต่อเนื่อง และทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ด้วยวิธีการทางสถิติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื่องจากเมล็ดที่ใช้เป็นเมล็ด F1 และเมล็ดของดอกบางชนิดพบลักษณะลีบเล็ก เช่น ดอกดาวเรือง ซึ่งไม่สามารถนำเมล็ดไปขยายพันธุ์ต่อได้ จึงต้องทำการเก็บรักษาต้นที่มีฟีโนไทป์ต่างจากชุดควบคุมการทดลอง ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture)

3.2.5 การเตรียม DNA จากไม้ดอก โดยใช้วิธีของ Doyle and Doyle (1990)

1. นำใบอ่อนของไม้ดอกที่แช่อยู่ในตู้ - 20 °C หรือ กลีบดอก หากต้นที่กลายพันธุ์มีความผิดปกติที่สีของดอก ออกมาตัดด้วยกรรไกรให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในโกร่ง
2. เทไนโตรเจนเหลวพอท่วม รอประมาณ 2-3 นาที แล้วบดอย่างรวดเร็วอย่างละเอียด หากยังไม่ละเอียดสามารถใส่ไนโตรเจนเหลวลงไปอีกรอบได้
3. ใช้ช้อนตักสารตักตัวอย่างที่บดเสร็จแล้วลงในอะลูมิเนียมฟอยล์ แล้วพับปิด และนำไปเก็บไว้ในถุงซิปที่ทำเครื่องหมายไว้ เก็บไว้ในตู้แช่เย็นเหมือนเดิม
4. เตรียม DNA extraction buffer (ภาคผนวก) 700 – 900 µl ใน eppendrof
5. ตักตัวอย่างที่ผ่านการบดแล้วประมาณ 5 กรัม ใส่ลงใน eppendrof ที่มี DNA extraction buffer แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม (vortex)
6. นำไปบ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พลิกทุกๆ 10 นาที
7. เติมคลอโรฟอร์ม 700 µl ในตู้ควัน พลิกไป-มาเบา ๆ (invert) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที
8. ดูด supernatant ใส่ใน eppendrof อันใหม่ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และ นำไปแช่ในตู้แช่เย็นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือ overnight
9. ปั่นเหวี่ยงที่ 13, 000 rpm เป็นเวลา 30 นาที แล้วเท supernatant ทิ้ง
10. เติมเอทานอล 70 % ที่เย็นจัด 200 µl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm , 4 เป็นเวลา 5 นาที แล้วเท supernatant ทิ้ง
11. นำ eppendrof ที่มี DNA ติดอยู่ตรงก้นหลอด ไปคว่ำไว้บนถาดที่มีทิชชู ให้เอทานอลระเหยออกให้หมด (air dry)
12. เติม deionized water 20 µl เขย่าเบา ๆ ให้ DNA ที่ติดอยู่ตรงก้นหลอดละลายจนหมด
13. ใส่ RNase 1 unit ลงไป 1 µl ใน สารละลาย DNA และนำไป incubate ที่ 37 °C overnight เพื่อย่อยสลาย RNA ให้หมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

14. ตรวจสอบคุณภาพ DNA โดยวิธี gel electrophoresis และ เก็บ DNA ไว้ในตู้แช่เย็นเพื่อนำมาใช้ในการทำ PCR ต่อไป

3.2.6 การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในระดับ genotype โดย High Annealing Temperature Random Amplified Polymorphism DNA : (HAT – RAPD) (Anuntalabhochai *et al*., 2001)

ตาราง 3.4 องค์ประกอบในหลอดทดลองสำหรับปฏิกิริยา PCR ต่อ 1 ปฏิกิริยา

Component	Stock	Final reaction
dH_2O		
buffer	10x	1x
$MgCl_2$	25 mM	2.5 mM
dNTP(mix)	25 mM	0.2 mM
Primer		0.5 μl / rxn
Taq polymerase	5 u / μl	0.5 u / rxn
Template		1 μl /rxn
Total volume		20 μl

1. เจือจางตัวอย่าง DNA ที่เตรียมได้ โดยใช้ deionized water ให้มีปริมาณ DNA 20-50 ng

2. ทำ PCR โดยใช้เงื่อนไขดังตาราง 3.4 โดยใส่สารต่างๆ ลงไปตามลำดับ

3. หลังจากนั้น เติม DNA template ของตัวอย่างแต่ละตัว จำนวน 1 μl ลงในแต่ละปฏิกิริยา แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex 2-3 วินาที แล้วปั่นตก (spindown) โดยใช้เครื่องเหวี่ยงความเร็วต่ำ 2-3 วินาที ซึ่งขั้นตอนข้อ 3 และ 4 ให้ทำอย่างรวดเร็ว

4. นำหลอดทดลองไปใส่ในเครื่อง PCR แล้วกดให้เครื่องเริ่มทำงาน โดยดำเนินปฏิกิริยาตามเงื่อนไขดังตาราง 3.5 เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด ใช้การตรวจสอบ PCR product โดยวิธี gel electrophoresis

ตาราง 3.5 เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR

Step	Temperature	Time
- heating	94	5 min

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- 3 step cycling		
● denaturation	94	30 s
● primer annealing	46-48	45 s
● primer extention	72	45 s
(30-40 cycle)		
- final extention	72	10 min

3.2.7 การตรวจสอบ PCR product โดยวิธี gel electrophoresis

1. เช็ดถาดและหวีด้วย เอทานอล 70 % ให้สะอาด และ ประกอบให้เรียบร้อย (ภาคผนวก)

2. เตรียม agarose gel โดยให้มีความเข้มข้น 1.4 % ของ TBE buffer 1x นำไปหลอมให้ละลายในเตาไมโครเวฟ จนละลายหมด รอให้เย็นลงจนอุณหภูมิ ประมาณ 50 °C

3. เติม ethidium bromide ให้มีความเข้มข้น 3.5 – 4.0 $x10^{-3}$ % v/v แกว่งให้เข้ากัน

4. เทวุ้นลงไปในถาดและหวีที่เตรียมไว้ ให้มีหนาประมาณ 4-5 มิลลิเมตร รอ ให้แข็ง แล้วเท TBE buffer 1x ลงบนวุ้นพอท่วม และใช้พลาสติกคลุมเจลไว้เพื่อป้องกันสิ่งสกปรกต่างๆ ทิ้งไว้อีกประมาณ 10 นาที

5. ดึงหวีออก นำถาดที่มีเจลอยู่ไปใส่ลงในเครื่องอิเลคโตรโฟเรซิส เท TBE buffer 1x ให้ท่วมเจล ประมาณ 2-3 มิลลิเมตร

6. นำ PCR product ที่ได้ในขั้นตอนที่ 3 ปริมาตร 20 μl (1rxn) ผสมกับ loading buffer ประมาณ 1-2 μl ด้วย autopipett แล้วค่อยๆ หยดลงในช่องของแผ่นเจลที่เตรียมไว้ โดยเว้นไว้ 1 ช่องในริมด้านใดด้านหนึ่งเพื่อใส่ Ladder

7. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเลคโตรโฟเรซิส ปรับให้มีค่าความตางศักย์ไฟฟ้า 90 โวลต์ เปิดสวิตซ์ให้เครื่องทำงานเป็นเวลา 5 นาที แล้วเปลี่ยนให้มีความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น 75 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

8. นำเจลไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วถ่ายภาพเก็บไว้ โดยใช้โปรแกรม GelDoc (ภาคผนวก)

9. ตรวจสอบแถบ DNA ที่ผ่านการแยกขนาด โดยเปรียบเทียบขนาดของชิ้นส่วน DNA ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.8 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture)

1. การเตรียมอาหาร

1. ใช้อาหารสูตร MS สำเร็จรูป จำนวน 4.43 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัม ฮอร์โมน ผสมกันใน น้ำกลั่น ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 5.7 - 5.8 เติมวุ้น 7.5 กรัม คนให้เข้ากัน

2. อุ่นสารละลายในข้อ 1 ด้วยเครื่องไมโครเวฟ 2 รอบ รอบที่ 1 ใช้เวลา 8 นาที และรอบที่ 2 ใช้เวลา 10 นาที

3. เทอาหารใส่ขวดแก้วและนำอาหารในขวดแก้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. นำอาหารออกมาทิ้งไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง

2. การฟอกฆ่าเชื้อ

1. ใช้สารเมอร์คิวริกคลอไรด์ ($MgCl_2$) 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร เป็นสารเคมีฟอกฆ่าเชื้อก่อนทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของดอกดาวเรือง และ เยอร์บีร่า

2. ตัดชิ้นส่วนของดอกดาวเรืองบริเวณลำต้นที่มียอดโผล่ออกมาที่ตาข้าง นำชิ้นส่วนมาเลาะเพื่อเอาใบออกให้เหลือแต่ชิ้นส่วนที่เป็นก้านและยอดอ่อนที่ติดอยู่ตรงตาข้าง

3. ล้างชิ้นส่วนด้วยน้ำที่ไหลแรง 1 ครั้ง และนำไปใส่ไว้ในขวดขนาด 100 มิลลิลิตร

4. นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ในขวด ไปใส่ในตู้ฆ่าเชื้อ เพื่อทำการฟอกฆ่าเชื้อ โดยเติมสารละลายแอลกอฮอล์ 70% ลงไปในขวดที่มีชิ้นส่วน ประมาณ 30 วินาที พร้อมทั้งเขย่าตลอดเวลา จากนั้นเทสารละลายทิ้ง

5. เติมสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ 1% ลงในขวดที่มีชิ้นส่วนอยู่ ใช้มือเขย่า 4 นาที

6. ล้างชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกจากข้อ 5 ด้วยน้ำกลั่น 3 รอบ

3. การตัดชิ้นส่วนเพื่อนำตัวอย่างไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. นำชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ มาตัดให้มีลักษณะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อมากที่สุด และวางลงบนอาหารวุ้น จากนั้นปิดฝาให้สนิท ทุกขั้นตอนต้องผ่านวิธีการปลอดเชื้อ (aseptic techniques)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. นำตัวอย่างที่ได้ไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนส์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4. สูตรอาหารที่ใช้กับไม้ดอกแต่ละชนิด

1. ดอกดาวเรือง

สูตรอาหารที่ใช้คือ อาหาร MS ที่ประกอบด้วยฮอร์โมนดังนี้

0.5 mg/l BA : 0.1 mg/l IAA

2. ดอกเยอร์บีร่า

สูตรอาหารที่ใช้ชักนำขั้นต้น (initiation) ประกอบด้วย

1.	Macro MS	
2.	Micro Healer	0.5 เท่า
3.	IAA	0.1 mg/l
4.	BA	10 mg/l
5.	Thiamin	0.5 mg/l
6.	Pyrodoxin	0.1 mg/l
7.	Nicotic acid	0.1 mg/l
8.	Inosital	100 mg/l
9.	NaSe EDTA	35 mg/l
10.	Sugar	30 g/l
11.	Agar	7.5 g/l

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved