

## ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 สูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962)

ชื่อสารเคมี	สูตรสารเคมี	ปริมาณที่ใช้ในอาหาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
<i>macronutrients</i>		
Ammonium nitrate	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1,650
Potassium nitrate	$\text{KNO}_3$	1,900
Calcium chloride	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
Magnesium sulphate	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
Monopotassium phosphate	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
<i>micronutrients</i>		
Boric acid	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2
Manganese sulphate	$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6.14
Potassium iodide	KI	0.83
Sodium molybdate	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
Copper sulphate	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
Cobalt dichloride	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Ferrous sulphate	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
Sodium EDTA	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	37.25
Myo- Inositol		100
Glycine		2.0
Nicotinic acid		0.5
Pyridoxine-HCL		0.5
Thiamine-HCL		0.1
Sucrose		30,000
pH 5.7		

ตารางภาคผนวกที่ 2 สูตรอาหาร B<sub>5</sub> (Gamborg,1968) ที่ดัดแปลงโดย Keller (1984)

ชื่อสารเคมี	สูตรสารเคมี	ปริมาณที่ใช้ในอาหาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Potassium nitrate	KNO <sub>3</sub>	2,500
Magnesium sulphate	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250
Calcium chloride	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	750
Monosodium dihydrogen phosphate	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	150
Ammonium sulphate	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
Manganese sulphate	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10
Boric acid	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2
Zinc sulphate	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.35
Sodium molybdate	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.025
Copper sulphate	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
Cobalt chloride	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
Potassium iodide	KI	0.8
Nicotinic acid		10
Thiamine-HCL		10
Pyridoxine-HCL		1.0
Myo- Inositol		100
NaFeEDTA		40
L-glutamine		800
L- serine		100
NAA		0.1
2,4-D		0.1
Sucrose		10,000
pH 5.8		

ปรับอาหารให้มี pH 5.8 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ตารางภาคผนวกที่ 3 การเตรียม Washing solution ความเข้มข้น 0.50 โมลาร์ สำหรับใช้แยกโปรโตพลาสต์

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)
Mannitol	91
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.5

ปรับให้มี pH 5.7 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ตารางภาคผนวกที่ 4 การเตรียม Enzyme solution สำหรับใช้แยกโปรโตพลาสต์

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (ต่อ 100 มิลลิลิตร)
Macerozyme R10	0.3 กรัม
Cellulase	0.5 กรัม

เติม Washing solution ให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.2 ไมครอน

ตารางภาคผนวกที่ 5 การเตรียมสารละลาย sucrose สำหรับใช้แยกโปรโตพลาสต์

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (กรัมต่อมิลลิลิตร)
Saccharose	25
น้ำกลั่น (2 ครั้ง)	100

หลังจากปรับปริมาตรให้ได้ครบ 100 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 15 ปอนด์/ตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

ตารางภาคผนวกที่ 6 สูตรอาหาร PS medium (1981) ที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ลูกผสมระหว่าง  
คะน้ำจืดและบร็อกโคลี่

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (ต่อ 200 มิลลิลิตร)
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.3 กรัม
Saccharose	0.3 กรัม
Mannitol	12.75 กรัม
MES	4.5 มิลลิลิตร
Caseinhydrolysate	0.3 กรัม
NAA (Stock)	4.5 มิลลิลิตร
Zeatin (Stock)	1.8 มิลลิลิตร
Shephard (10X)	3.0 มิลลิลิตร
MSV <sub>2</sub> (100X)	1.5 มิลลิลิตร
Fe – EDTA (Stock)	0.75 มิลลิลิตร
Boric acid	2 เกล็ด

ปรับค่า pH 5.8 แล้วนำไปกรองผ่านทาง membrane filter ขนาด 0.2 ไมครอน

ตารางภาคผนวกที่ 7 รายละเอียดโปรแกรมการรวมโปรโตพลาสต์ของกะน้ำจีนและบร็อคโคลี่ด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้เครื่อง Shimadzu somatic hybridizer รุ่น SSH-10

Electrode distance	3.0 mm.
Frequency	1.0 MHz
Primary AcVoltage	10 V
Initial time	10 s
Pulse width	20 us
Pulse height (DC Voltage)	10 V
Electric field strength	0.03 kV/cm
Secondary AC Voltage (Vac)	10 V
Pulse repeat interval	1.5 s
Number of pulses	3
Pulse height (VAC) charge	+30 V
Final time	10 s
AC Voltage decrease rate	5%
Adhesion intensive	ON

ตารางภาคผนวกที่ 8 วิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับความเข้มข้นของ 2,4-D และ NAA ในอาหารสูตร B<sub>5</sub> (Gamborg, 1968) ที่ดัดแปลงโดย Keller (1984) ต่อจำนวนอับละอองเรณูคะน้ำจืดที่พัฒนาเป็นแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยง 30 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
NAA (A)	2	145.640	72.8202	2.80	0.0788
2,4-D (B)	2	663.580	331.790	12.74**	0.0001
AxB	4	1657.02	414.225	15.91**	0.0000
AxBxC	27	703.125	26.0417		
Total	35	3169.37			

CV = 36.14%

\*\* = significant at 99% level

ตารางภาคผนวกที่ 9 วิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับความเข้มข้นของ 2,4-D และ NAA ในอาหารสูตร B<sub>5</sub> (Gamborg, 1968) ที่ดัดแปลงโดย Keller (1984) ต่อจำนวนอับละอองเรณูบร็อกโคลี่ที่พัฒนาเป็นแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยง 30 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
NAA (A)	2	591.242	295.621	2.41	0.1089
2, 4-D (B)	2	1945.41	972.704	7.93*	0.0020
AxB	4	1008.87	252.218	2.06	0.1146
AxBxC	27	3311.63	122.653		
Total	35	6857.16			

CV = 66.9%

\*\* = significant at 95% level

ตารางภาคผนวกที่ 10 วิเคราะห์ความแปรปรวนของการเปรียบเทียบสูตรอาหารจำนวน 9 สูตร โดยใช้สูตรอาหาร B<sub>5</sub> (Gamborg, 1968) ที่ดัดแปลงโดย Keller (1984) เป็นสูตรอาหารหลักต่อจำนวนอับละอองเรณูคะน้ำจืดที่พัฒนาเป็นแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยง 30 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
T (A)	8	2466.24	308.280	11.84**	0.0000
A*B	27	703.125	26.0417		
Total	35	3169.37			

CV = 36.14%

\*\* = significant at 99% level

ตารางภาคผนวกที่ 11 วิเคราะห์ความแปรปรวนของการเปรียบเทียบสูตรอาหารจำนวน 9 สูตร โดยใช้สูตรอาหาร B<sub>5</sub> (Gamborg, 1968) ที่ดัดแปลงโดย Keller (1984) เป็นสูตรอาหารหลักต่อจำนวนอับละอองเรณูบร็อคโคลี่ที่พัฒนาเป็นแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยง 30 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
T (A)	8	3545.52	443.191	3.61*	0.0056
A*B	27	3311.63	122.653		
Total	35	6857.16			

CV = 66.9%

\* = significant at 95% level

ตารางภาคผนวกที่ 12 วิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อจำนวนอับละอองเรณูคะน้ำจืดที่พัฒนาเป็นแคลลัสบนอาหารสูตร B<sub>5</sub> ที่ดัดแปลงโดย Keller (1984) และเติม 2,4-D 0.1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล.

Source	DF	SS	MS	F	P
T (A)	4	706.597	176.649	3.61*	0.0297
A*B	15	733.507	48.9005		
Total	19	1440.10			

CV = 36.88%

\* = significant at 95% level

ตารางภาคผนวกที่ 13 วิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อจำนวนอับละอองเรณูของบร็อกโคลี่ที่พัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร B<sub>5</sub> ที่ดัดแปลงโดย Keller (1984) และเติม 2,4-D 0.5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล.

Source	DF	SS	MS	F	P
T (A)	4	1835.07	458.767	9.16**	0.0006
A*B	15	750.868	50.0579		
Total	19	2585.94			

CV = 30.59%

\*\* = significant at 99% level



ตารางภาคผนวกที่ 14 วิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการ pretreatment ดอกกะน้ำเงินที่อุณหภูมิ 4 °ซ ที่ระยะเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ต่อจำนวนยับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B<sub>5</sub> ที่คิดแปลงโดย Keller (1984) และเติม 2,4-D 0.1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 30 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
T(A)	3	820.312	273.437	7.31*	0.0052
A*B	12	460.069	38.3391		
Total	15	1280.38			

CV = 32.13%

\* = significant at 95% level

ตารางภาคผนวกที่ 15 วิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการ pretreatment ดอกบร็อกโคลี่โดยการแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 45 °ซ เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง และตามด้วย 40 °ซ 3 ชั่วโมง กับดอกที่ไม่ผ่านการ pretreat ต่อจำนวนยับละอองเรณูบร็อกโคลี่ที่พัฒนาเป็นแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร B<sub>5</sub> ที่คิดแปลงโดย Keller (1984) และเติม 2,4-D 0.5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. เป็นระยะ 30 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
T(A)	1	366.753	366.753	4.41	0.0805
A*B	6	499.132	83.1887		
Total	7	865.885			

CV= 60.38%

Ns= non significant

ตารางภาคผนวกที่ 16 วิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เฉลี่ยต่อเซลล์ปากใบของต้นคะน้ำจืดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละของเรณูเปรียบเทียบกับต้นปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด (diploid)

Source	DF	SS	MS	F	P
T (A)	4	2.35157	0.58789	1.87	0.1676
A*B	15	4.70755	0.31384		
Total	19	7.05912			

CV = 6.8549%

ns = non significant

ตารางภาคผนวกที่ 17 วิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์เฉลี่ยต่อเซลล์ปากใบของบร็อคโคลี่ที่ได้จากเลี้ยงอับละของเรณูเปรียบเทียบกับต้นปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด (diploid)

Source	DF	SS	MS	F	P
T (A)	3	85.2050	28.4017	77.65	0.0000
A*B	12	4.38895	0.36575		
Total	15	89.5939			

CV = 1.87%

\*\* = significant at 99% level

ตารางภาคผนวกที่ 18 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนโปรโตพลาสต์ของคะน้ำจืด  
บรีอคโคลี และโปรโตพลาสต์ลูกผสม

Source	DF	SS	MS	F	P
T (A)	2	338.000	169.000	9.15*	0.0068
A*B	9	166.250	18.4722		
Total	11	504.250			

CV = 6.8749%

\* = significant at 95% level

ตารางภาคผนวกที่ 20 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนโปรโตพลาสต์ของคะน้ำจืด  
บรีอคโคลี และโปรโตพลาสต์ลูกผสมที่เรืองแสง เมื่อดูภายใต้กล้อง Fluorescence

Source	DF	SS	MS	F	P
T (A)	2	883.500	441.750	17.95**	0.0007
A*B	9	221.500	24.6111		
Total	11	1105.00			

CV = 7.9355%

\*\* = significant at 99% level

ตารางภาคผนวกที่ 21 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรวจสอบความมีชีวิตของ  
โปรโตพลาสต์ของคะน้ำจืด บรีอคโคลี และโปรโตพลาสต์ลูกผสม

Source	DF	SS	MS	F	P
T (A)	2	174.361	87.1806	3.06	0.0969
A*B	9	256.552	28.5058		
Total	11	430.913			

CV = 7.35%

ns = non significant

ตารางภาคผนวกที่ 22 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ถูกผสมในอาหารตัดแปลงสูตร ๆ ต่าง ๆ โดยใช้อาหารสูตร PS (1981) เป็นสูตรอาหารหลัก

Source	DF	SS	MS	F	P
T (A)	3	110.321	36.7737	63.02	0.0000
A*B	12	7.00182	0.58349		
Total	15	117.323			

CV=1.1768%

\*\* = significant at 99% level

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Chiang Mai University

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวอัญชัญ วิรัชลาภ
วัน เดือน ปีเกิด	15 เมษายน 2514
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนอุตรดิตถ์ครุณี จ.อุตรดิตถ์ ปีการศึกษา 2531 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2535
ประสบการณ์การทำงาน	ตำแหน่งเลขานุการฝ่ายวิจัย มูลนิธิโครงการหลวง 2536-2538 ตำแหน่งนักวิจัยพืชผัก มูลนิธิโครงการหลวง 2539-ปัจจุบัน