รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2531. ดอกคำฝอย : พืชทนแล้งสำหรับเขตเกษตรน้ำฝน. เอกสารเศรษฐกิจเล่มที่ 83 โครงการผลิตสินค้าในเขตเกษตรน้ำฝน. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

มหาวิทยาลัยมหิดล. คณะเภสัชศาสตร์. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย. 2534. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

มหาวิทยาลัยมหิดล. คณะเภสัชศาสตร์. ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร. 2529. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. กรุงเทพมหานคร : ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

สถาปัตย์ ปรีดา. 2519. บ้านไร่-ปลายนา. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์คลังวิทยา.

สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2536. การกลายพันธุ์ของพืช. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุณี พณิชธารลิทธิ์. 2534. คู่มือเข้มข้นการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography. ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Anupan Kongbangkerd. 1995. Micropropagation of *Carthamus tinctorius* Linn.

by tissue culture to improve fatty acid production. Master's Thesis, Chulalongkorn University.

Brears, T., and Lonsdale, D.M. 1990. Induction of cytoplasmic male sterility and fertility reversion mutagenesis : negative evidence from a study on sugar beet. Euphytica. 46 : 169-173.

Chavan, V.M. 1961. Niger and Safflower. Bombay : Examiner Press. pp. 57-150.

Cobley, L.S. 1976. An introduction to the botany of tropical crops. New York : Longman Group. pp. 291-295.

Cummings, D.P., Stuthman, D.D., and Green, C.E. 1978. Morphological mutations induced with ethylmethanesulphonate in oats. Journal of Heredity. 69 : 3-7.

Dahmer, M.L., Collins, G.B. and Hildebrand, D.F. 1991. Lipid concentration and composition of zygotic embryos maturing *in vitro* and in planta. Crop Science. 31 : 735-740.

Evans, D.A. and Sharp, W.R. 1983. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. Science. 221 : 949-951.

Evans, D.A. , Sharp, W.R. and Medina-Filho, H.P. 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. American Journal of Botany. 71(6) : 759-774.

Fillippetti, A., and Deplace, C. 1986. Improvement of seed yield in *Vicia faba* L. by using experimental mutagenesis. II. Comparison of gamma – radiation and ethylmethanesulphonate (EMS) in production of morphological mutants. Euphytica. 35 : 49-59.

Fuller, G., Kohler, G.O. and Applewhite, T.H. 1966. High oleic acid of safflower oil : A new stable edible oil. Journal of the American Oil Chemists' Society. 43 : 477-478.

Furuya, T., Yoshikawa, T., Kimura, T. and Kaneko, H. 1987. Production of tocopherol by cell culture of safflower. Phytochemistry. 26(10) : 2741-2747.

Galston, A.W. and Davies, P.J. 1969. Hormonal regulation in higher plants. Science. 163 : 1288-1297.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. Experimental Cell Research. 50 : 151-158.

Gemrich, A.R. and Schraudolf, H. 1980. Fatty acid composition of lipids from differentiated tissues and cell cultures of *Euonymus europaeus*. Chemistry and Physics of Lipids. 26 : 259-264.

George, L., and Rao, P.S. 1982. *In vitro* multiplication of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) through tissue culture. Proceedings. Indian National Science Academy. 6 : 791-794.

Green, A.G., and Marshall, D.R. 1984. Isolation of induced mutations in linseed (*Linum usitatissimum*) having reduced linolenic acid content. Euphytica. 33 : 321-328.

Halder,T. and Gadgil, V.N. 1983 Distribution pattern of fatty acid in callus cultures and plant parts. In Sen, S K. and Giles, K.L. (eds.), Plant cell culture in crop improvement. New York : Plenum Press. pp. 53-55.

Hanagata, N., Ito, A., Fukuju, Y., and Murata, K. 1992. Red pigment formation in cultured cells of *Carthamus tinctorius* L. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 56(1) : 44-47.

IAEA. 1977. Manual on mutation breeding. Technical reports series no. 119. 2nd edition. Joint FAO/IAEA Division of Atomic Energy in Food and Agriculture. Vienna, Austria.

James, A.T. 1985. The biotechnology of oilseed crops. Journal of the American Oil Chemists' Society. 62(2) : 204-206.

James, D.W. and Dooner, H.K. 1990. Isolation of EMS - induced mutants in *Arabidopsis* altered in seed fatty acid composition. Theoretical Applied Genetics. 80 : 241-245.

Janick, J., Schery, R.W., Woods, F.W., and Ruttan, V.W. 1974. Plant science : An introduction to world crops. 2nd edition. San Fancisco : W.H. Freedman and Company. pp. 501-562.

Khadeer, M.A., and Anwar, S.Y. 1991. Induction and characterization of seed mutants for oil and fatty acid composition in safflower. Cytologia. 56 : 517-522.

Khalatkar, A.S., Gopal-Ayengar, A.R. and Bhatia, C.R. 1977. Correlation between EMS uptake by barley embryos under different treatment conditions and mutation frequency. Mutation Research. 43 : 45-56.

Knowles, P.F. 1969. Modification of quantity and quality of safflower oil through plant breeding. Journal of the American Oil Chemists' Society. 46 : 130-132.

Knowles, P.F. 1975. Recent research on safflower and cotton. Journal of the American Oil Chemists' Society. 52 : 374-376.

Kononowiez, A.K. and Janick, J. 1984. The influence of carbon source on growth and development of asexual embryos of *Theobroma cacao*. Physiologia Plantarum. 62 : 155-162.

Lal, R., and Lal, S. 1990. Crop improvement utilizing biotechnology. Florida : CRC Press. pp. 1-70.

Larkin, P.J., and Scowcroft, W.R. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theoretical Applied Genetics. 60 : 197-214.

Lee, C.K. and Halloran, G.M. 1982. The influence of ethylmethanesulphonate on abnormal chlorophyll development in the M_1 generation of soybean (*Glycine max*). Environmental and Experimental Botany. 22 : 75-79.

Linsmaier, E.M. and Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirement of tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 18 : 100-109.

Mandal, A.K.A., Chatterji, A.K. and Dutta–Gupta, S. 1995. Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledonary leaves of safflower. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 43 : 287-289.

Marizal, R., Simonson, L. and Baenziger, P.S. 1991. Response of different wheat tissues to increasing doses of ethylmethanesulfonate. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 26 : 141-146.

Medrano, E., Millo E., and Guerri. J. 1986. Ethylmethanesulphonate effect on anther culture of *Nicotiana tabacum*. Euphytica. 35 : 161-168.

Miquel, M. and Browse, J. 1992. *Arabidopsis* mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis. Journal of Biological Chemistry. 267(3) : 1502-1509.

Murashige, T. and Skoog. F. 1962. A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiologia Plantarum. 15 : 473-497.

Omar, M.S., Novak, F.J. and Brunner, H. 1989. In vitro action of ethylmethanesulphonate on banana shoot tips. Scientia Horticulturae. 40 : 283-295.

Omar, M.S. and Novak, F.J. 1990. In vitro plant regeneration and ethylmethanesulphonate (EMS) uptake in somatic embryos of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 20 : 185-190.

Orton, T.J. 1983. Experimental approaches to the study of somaclonal variation. Plant Molecular Biology Reports. 1 : 67-75.

Osorio, J., Fermandez-Martinez, J., Mancha, M., and Garces. 1995. Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. Crop Science. 35 : 739-742.

Pandey, B., Mandal, S. and Gadgil, D.R. 1986. A comparative fatty acid profile of seed rich in oleic and linoleic acid corresponding calli. Journal of the American Oil Chemists' Society. 64(3) : 541-543.

Pandey, B. and Gadgil, V.N. 1984. Fatty acids in callus cultures : Influence of growth factors on fatty acid composition of total lipid in callus cells. Phytochemistry. 23(1) : 51-53.

Prasad, B.R., Khadeer, M.A., Seeta, P., and Anwar. S.Y. 1991. *In vitro* induction of androgenic haploids in safflower (*Carthamus tinctorius*). Plant Cell Reports. 10 : 48-51.

Purseglove, J.W. 1974. Tropical seed crops of dicotyledon. New York : Longman Group. pp. 52-54.

Reisch, B. and Bingham, E.T. 1981. Plants from ethionine-resistant alfalfa tissue cultures : variation in growth and morphological characteristic. Crop Science. 21 : 783-788.

Rowland, G.G. and Bhatty, R.S. 1990. Ethylmethanesulphonate induced fatty acid mutations in flax. Journal of the American Oil Chemists' Society. 67(4) : 213-214.

Sadanandam, A. and Ashfaq-Farooqui, M. 1991. Induction and selection of lincomycinresistant plants in *Solanum melongena*. Plant Science. 79 : 237-239.

Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Adsule, R.N., and Kadam, S.S. 1992. World oil seeds chemistry technology and utilization. New York : Van Nostrand Reinhold. pp. 237-369.

Savin, V.N., Swaminathan, M.S. and Sharma, B. 1968. Enhancement of chemically-induced mutation frequency in barley through alteration in the duration of pre-soaking of seeds. Mutation Research. 6 : 101-107.

Schenk, R.U. and Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany. 50 : 199-204.

Sharp, W.R. 1985. Opportunities for biotechnology in the development of new edible vegetable oil products. Journal of The American Oil Chemists' Society. 63(5) : 594-598.

Skirvin, P.K. 1978. Natural and induced variation in tissue culture. Euphytica. 27 : 241-266.

Sung, Z.R. 1976. Mutagenesis of culture plant cells. Genetics. 8 : 51-57.

Tejovathi, G. and Anwar, S.Y. 1984. In vitro induction of capitula from cotyledon of *Carthamus tinctorius* (safflower). Plant Science. 36 : 165-168.

van den Bulk, R.W., Loffler, H.J.M., Lindhout, W.H. and Koornneef, M. 1990. Somaclonal variation in tomato : effect of explant source and comparison with chemical mutagenesis. Theoretical of Applied Genetics. 80 : 817-825.

Williams, N.D., Miller, J.D. and Klindworth, D.L. 1992. Induced mutations of a genetic suppressor of resistance to wheat stem rust. Crop Science. 32 : 612-616.

Wolf, S.J. and Earle, E.D. 1990. Inhibition of corn callus growth by *Helminthosporium carbonum* race 1 toxin. Crop Science. 30 : 728-734.

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.1 อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

NH_4NO_3	1650	มิลลิกรัม	$CuSO_4.5H_2O$	0.025	มิลลิกรัม
KNO_3	1900	มิลลิกรัม	$CoCl_2.6H_2O$	0.025	มิลลิกรัม
$CaCl_2.2H_2O$	440	มิลลิกรัม	Na_2-EDTA	37.25	มิลลิกรัม
$MgSO_4.7H_2O$	370	มิลลิกรัม	$FeSO_4.7H_2O$	27.85	มิลลิกรัม
KH_2PO_4	170	มิลลิกรัม	Glycine	2.0	มิลลิกรัม
H_3BO_3	6.2	มิลลิกรัม	Nicotinic acid	0.1	มิลลิกรัม
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	มิลลิกรัม	Pyridoxine-HCl	0.5	มิลลิกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	มิลลิกรัม	Thiamine-HCl	0.5	มิลลิกรัม
KI	0.83	มิลลิกรัม	Myo-inositol	100	มิลลิกรัม
$NaMoO_4.2H_2O$	0.25	มิลลิกรัม			

1.2 อาหารสูตร LS (Linsmaier and Skoog, 1965)

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

NH_4NO_3	1650	มิลลิกรัม	KI	0.83	มิลลิกรัม
KNO_3	1900	มิลลิกรัม	$NaMoO_4.2H_2O$	0.25	มิลลิกรัม
$CaCl_2.2H_2O$	440	มิลลิกรัม	$CuSO_4.5H_2O$	0.025	มิลลิกรัม
$MgSO_4.7H_2O$	370	มิลลิกรัม	$CoCl_2.6H_2O$	0.025	มิลลิกรัม
KH_2PO_4	170	มิลลิกรัม	Na_2-EDTA	37.25	มิลลิกรัม
H_3BO_3	6.2	มิลลิกรัม	$FeSO_4.7H_2O$	27.85	มิลลิกรัม
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	มิลลิกรัม	Thiamine-HCl	0.4	มิลลิกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	มิลลิกรัม	Myo-inositol	100	มิลลิกรัม

1.3 อาหารสูตร B5 (Gamborg *et.al.*, 1968)

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

KNO_3	2500	มิลลิกรัม	$NaMoO_4.2H_2O$	0.25	มิลลิกรัม
$CaCl_2.2H_2O$	150	มิลลิกรัม	$CuSO_4.5H_2O$	0.025	มิลลิกรัม
$MgSO_4.7H_2O$	250	มิลลิกรัม	$CoCl_2.6H_2O$	0.025	มิลลิกรัม
$(NH_4)_2SO_4$	134	มิลลิกรัม	Na_2-EDTA	37.25	มิลลิกรัม
$NaH_2PO_4.H_2O$	150	มิลลิกรัม	$FeSO_4.7H_2O$	27.85	มิลลิกรัม
H_3BO_3	3.0	มิลลิกรัม	Nicotinic acid	1.0	มิลลิกรัม
$MnSO_4.H_2O$	10.0	มิลลิกรัม	Pyridoxine-HCl	1.0	มิลลิกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	2.0	มิลลิกรัม	Thiamine-HCl	10.0	มิลลิกรัม
KI	0.75	มิลลิกรัม	Myo-inositol	100	มิลลิกรัม

1.4 อาหารสูตร SH (Schenk and Hildebrandt, 1972)

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

KNO_3	2500	มิลลิกรัม	$CuSO_4.5H_2O$	0.2	มิลลิกรัม
$CaCl_2.2H_2O$	200	มิลลิกรัม	$CoCl_2.6H_2O$	0.1	มิลลิกรัม
$MgSO_4.7H_2O$	400	มิลลิกรัม	Na_2-EDTA	20.0	มิลลิกรัม
$NH_4H_2PO_4$	300	มิลลิกรัม	$FeSO_4.7H_2O$	15.0	มิลลิกรัม
H_3BO_3	5.0	มิลลิกรัม	Nicotinic acid	5.0	มิลลิกรัม
$MnSO_4.4H_2O$	10.0	มิลลิกรัม	Pyridoxine-HCl	0.5	มิลลิกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	1.0	มิลลิกรัม	Thiamine-HCl	5.0	มิลลิกรัม
KI	1.0	มิลลิกรัม	Myo-inositol	1000	มิลลิกรัม
$NaMoO_4.2H_2O$	0.1	มิลลิกรัม			

2. การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution) ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ชั่งสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหารนำมาละลายด้วยน้ำขจัดไอออน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ตามต้องการ เก็บสารละลายในขวดสีชา ป้องกันแสงแดด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยอาหารแต่ละสูตรแบ่งกลุ่มสารละลายเข้มข้น ดังต่อไปนี้

2.1 สารละลายเข้มข้นของอาหารสูตร MS

ตารางที่ ก.1 แสดงการแบ่งกลุ่มสารเคมีในการเตรียมสารละลายเข้มข้นของอาหารสูตร MS

กลุ่มที่	ความเข้มข้น (เท่า)	สารเคมีในกลุ่ม	ปริมาณสาร (กรัม)	ปริมาตรสารละลายเข้มข้น (มิลลิลิตร)	ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตรต่อลิตร)
1	40	NH_4NO_3	66.0	1000	25.0
		KNO_3	76.0		
		KH_2PO_4	6.8		
		H_3BO_3	0.248		
		$MnSO_4.4H_2O$	0.892		
		KI	0.033		
		$ZnSO_4.7H_2O$	0.344		
		$NaMoO_4.2H_2O$	0.01		
		$CoCl_2.6H_2O$	0.001		
		$CuSO_4.5H_2O$	0.001		
2	40	$CaCl_2.2H_2O$	17.6	1000	25.0
3	40	$MgSO_4.7H_2O$	14.8	1000	25.0
4	40	Na_2-EDTA	1.492	1000	25.0
		$FeSO_4.7H_2O$	1.112		
5	40	Myo-inositol	0.4	1000	25.0
		Nicotinic acid	0.02		
		Pyridoxine-HCl	0.02		
		Thiamine-HCl	0.0004		
		Glycine	0.8		

2.2 สารละลายเข้มข้นของอาหารสูตร LS

ตารางที่ ก.2 แสดงการแบ่งกลุ่มสารเคมีในการเตรียมสารละลายเข้มข้นของอาหารสูตร LS

กลุ่มที่	ความเข้มข้น (เท่า)	สารเคมีในกลุ่ม	ปริมาณสาร (กรัม)	ปริมาตรสารละลายเข้มข้น (มิลลิลิตร)	ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตรต่อลิตร)
1	20	NH_4NO_3	33.0	1000	50.0
		KNO_3	38.0		
		KH_2PO_4	3.4		
		H_3BO_3	0.124		
		$MnSO_4.4H_2O$	0.446		
		KI	0.016		
		$ZnSO_4.7H_2O$	0.172		
		$NaMoO_4.2H_2O$	0.005		
		$CoCl_2.6H_2O$	0.005		
		$CuSO_4.5H_2O$	0.005		
2	20	$CaCl_2.2H_2O$	8.0	1000	50.0
3	20	$MgSO_4.7H_2O$	7.4	1000	50.0
4	20	Na_2-EDTA	0.746	1000	50.0
		$FeSO_4.7H_2O$	0.556		
5	40	Myo-inositol	2.0	500	25.0
		Thiamine-HCl	0.008		

2.3 สารละลายเข้มข้นของอาหารสูตร B5

ตารางที่ ก.3 แสดงการแบ่งกลุ่มสารเคมีในการเตรียมสารละลายเข้มข้นของอาหารสูตร B5

กลุ่มที่	ความเข้มข้น (เท่า)	สารเคมีในกลุ่ม	ปริมาณสาร (กรัม)	ปริมาตรสารละลายเข้มข้น (มิลลิลิตร)	ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตรต่อลิตร)
1	20	KNO_3	50.0	1000	50.0
		H_3BO_3	0.06		
		$MnSO_4.4H_2O$	0.2		
		KI	0.015		
		$ZnSO_4.7H_2O$	0.04		
		$NaMoO_4.2H_2O$	0.005		
		$CoCl_2.6H_2O$	0.0005		
		$CuSO_4.5H_2O$	0.0005		
		$(NH_4)_2SO_4$	2.68		
2	20	$CaCl_2.2H_2O$	3.0	1000	50.0
3	20	$MgSO_4.7H_2O$	5.0	1000	50.0
4	20	$NaH_2PO_4.H_2O$	3.0	1000	50.0
5	20	Na_2-EDTA	0.746	1000	50.0
		$FeSO_4.7H_2O$	0.556		
5	40	Myo-inositol	2.0	500	25.0
		Nicotinic acid	0.02		
		Pyridoxine-HCl	0.02		
		Thiamine-HCl	0.2		

2.4 สารละลายเข้มข้นของอาหารสูตร SH

ตารางที่ ก.4 แสดงการแบ่งกลุ่มสารเคมีในการเตรียมสารละลายเข้มข้นของอาหารสูตร SH

กลุ่มที่	ความเข้มข้น (เท่า)	สารเคมีในกลุ่ม	ปริมาณสาร (กรัม)	ปริมาตรสารละลายเข้มข้น (มิลลิลิตร)	ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตรต่อลิตร)
1	20	KNO_3	50.0	1000	50.0
		H_3BO_3	0.1		
		$MnSO_4.4H_2O$	0.2		
		KI	0.02		
		$ZnSO_4.7H_2O$	0.02		
		$NaMoO_4.2H_2O$	0.002		
		$CoCl_2.6H_2O$	0.002		
		$CuSO_4.5H_2O$	0.0004		
2	20	$CaCl_2.2H_2O$	4.0	1000	50.0
3	20	$MgSO_4.7H_2O$	8.0	1000	50.0
4	20	$NH_4H_2PO_4$	6.0	1000	50.0
5	20	Na_2-EDTA	0.4	1000	50.0
		$FeSO_4.7H_2O$	0.3		
5	40	Myo-inositol	20.0	500	25.0
		Nicotinic acid	0.4		
		Pyridoxine-HCl	0.04		
		Thiamine-HCl	0.4		

3. การเตรียมสารละลายเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต

เตรียมสารละลายเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA. IAA, IBA และ 2,4-D และกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA และ Kinetin ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร (100 ส่วนในล้านส่วน) โดยชั่งสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิด 0.01 กรัม นำมาละลายด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล ปริมาตร 0.2-0.5 มิลลิลิตร (ยกเว้น 2,4-D ละลายในเอทานอล 50.0%) ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำขจัดไอออน เก็บสารละลายในขวดพลาสติกสีขาว ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

มีขั้นตอนในการเตรียม ดังนี้

4.1 ปิเปตสารละลายเข้มข้นแต่ละกลุ่มของสูตรอาหารมารวมกัน โดยใช้ปริมาตรตามสัดส่วนของปริมาตรอาหารที่ต้องการเตรียม

4.2 เติมสารที่เป็นแหล่งของคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส หรือน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ตามแต่สูตรอาหารที่ใช้

4.3 ปิเปตสารละลายเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมลงในอาหาร โดยใช้ปริมาตรตามความต้องการของสูตรอาหาร

4.4 ปรับปริมาตรอาหารด้วยน้ำขจัดไอออนให้ได้ครบตามปริมาตรอาหารที่ต้องการเตรียม

4.5 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารด้วยกรดไฮโดรคลอริกและโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0 นอร์มอล ให้ได้ค่าตามที่กำหนด

4.6 เติมวุ้นในกรณีที่เตรียมอาหารแข็งหรืออาหารกึ่งแข็ง แล้วหลอมให้วุ้นละลายในอาหาร โดยนำไปอุ่นในตู้อบไมโครเวฟ

4.7 เทอาหารลงในขวดอาหารที่จะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามปริมาตรที่ต้องการ หลังจากนั้นนำไปนึ่งในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที ทิ้งให้อาหารเย็นลงก่อนนำไปใช้ต่อไป

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0

ชั่งสารไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 4.26 กรัม และสารโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (H_2NaPO_4) 3.12 กรัม นำมาละลายในน้ำขจัดไอออน แล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร เก็บบัฟเฟอร์ไว้ในขวดสีชา ป้องกันแสงแดด

2. สารละลายกรดซัลฟิวริก 2.5% ในเมทานอล

เติมกรดซิลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ลงในเมทานอลเข้มข้น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในในขวดสีชา ป้องกันแสงแดด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9%

ชั่งสารโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 4.5 กรัม ละลายในน้ำขจัดไอออน ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 500 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในในขวดสีชา ป้องกันแสงแดด

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานของกรดไขมัน

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดไขมันโดยวิธี Internal standard (สุณี พนิชธารสิทธิ์, 2534)

มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.1 เตรียมสารละลายกรดไขมันมาตรฐานที่อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์ ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่

Palmitic acid metyl ester (Hexadecanoic acid metyl ester ; C16:OME)

Stearic acid metyl ester (Octadecanoic acid metyl ester ; C18:OME)

Oleic acid metyl ester (9-Octadecenoic acid metyl ester ; C18:1ME)

Linoleic acid metyl ester (9,12-Octadecadienoic acid metyl ester ; C18:2ME)

โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 0.3, 0.15, 0.075 และ 0.0375 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรของเฮกเซน ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

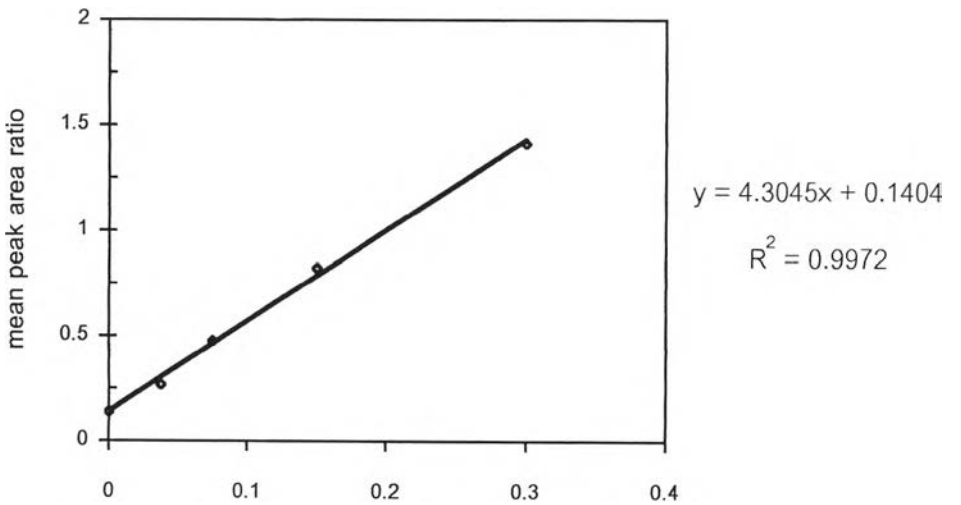
1.2 เติม Internal standard (I.S.) คือ Pentadecanoic acid methyl ester (C15:0ME) ปริมาณ 43 ไมโครกรัม ลงในสารละลายกรดไขมันมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น

1.3 นำสารละลายกรดไขมันมาตรฐานที่เติม Internal standard ไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี โดยฉีดครั้งละ 1 ไมโครลิตร เมื่อได้โครมาโทแกรมแล้ว นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดไขมันกับค่า mean peak area ratio ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่าง peak area ของกรดไขมันมาตรฐานกับ peak area ของ Internal standard การหาปริมาณกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ในตัวอย่างน้ำมันคำนวณได้จาก

$$\text{ปริมาณกรดไขมัน (ไมโครกรัมในน้ำมัน 1 มิลลิกรัม)} = \text{mean peak area ratio} \times \frac{1}{\text{ความชัน}} \times \text{ความเจือจาง}$$

2. กราฟมาตรฐานของกรดไขมัน

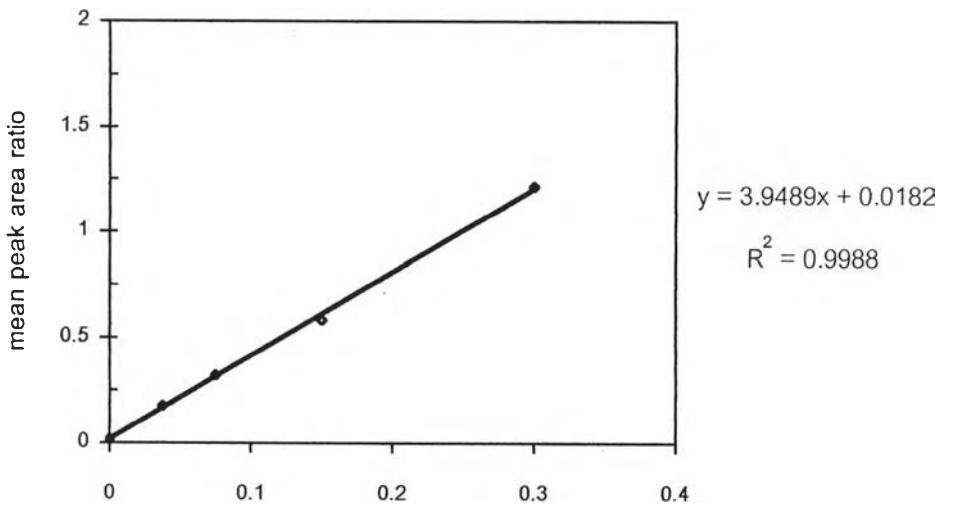
2.1 กราฟมาตรฐานของกรดปาล์มิติก (C16:0)



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดปาล์มิติก (C16:0) 0-0.3 ไมโครกรัม กับค่า mean peak area ratio

ปริมาณกรดปาล์มิติก (C16:0) (ไมโครกรัม)	mean peak area ratio (ค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)
0.0375	0.269±0.013
0.015	0.477±0.025
0.15	0.823±0.041
0.3	1.414±0.052

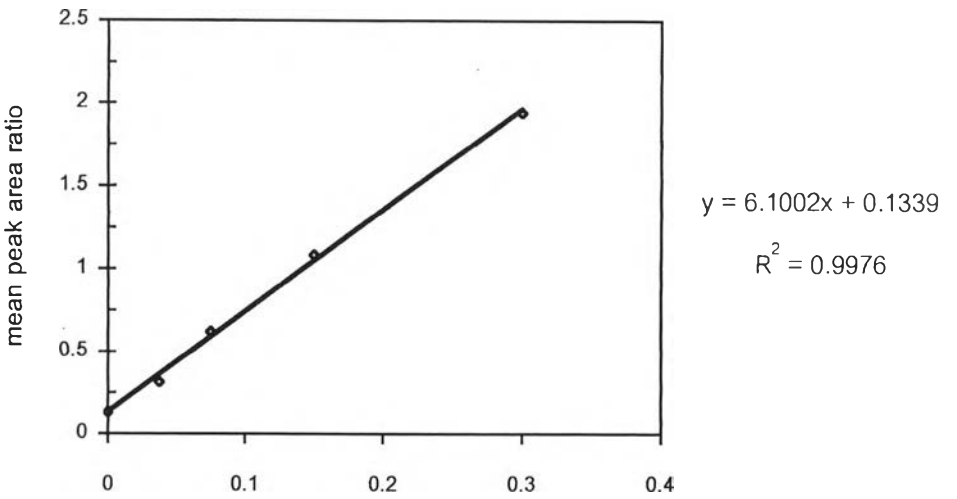
2.2 กราฟมาตรฐานของกรดสเตียริก (C18:0)



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดสเตียริก (C18:0) 0-0.3 ไมโครกรัม กับค่า mean peak area ratio

ปริมาณกรดสเตียริก (C18:0) (ไมโครกรัม)	mean peak area ratio (ค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)
0.0375	0.176±0.024
0.015	0.322±0.033
0.15	0.582±0.032
0.3	1.214±0.084

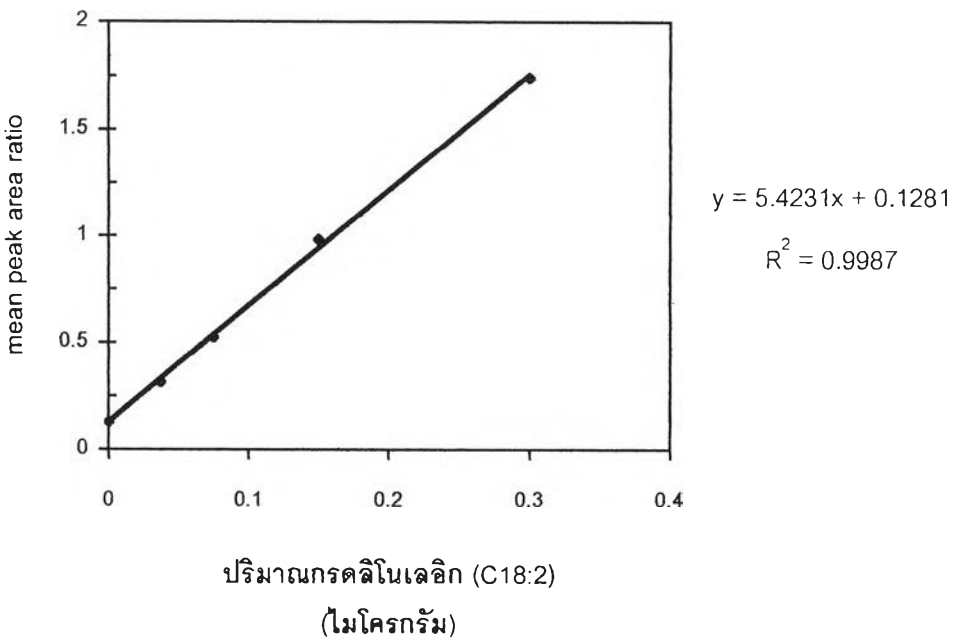
2.3 กราฟมาตรฐานของกรดโอเลอิก (C18:1)



รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดโอเลอิก (C18:1) 0-0.3 ไมโครกรัม กับค่า mean peak area ratio

ปริมาณกรดโอเลอิก (C18:1) (ไมโครกรัม)	mean peak area ratio (ค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)
0.0375	0.315±0.011
0.015	0.623±0.099
0.15	1.085±0.149
0.3	1.944±0.030

2.4 กราฟมาตรฐานของกรดลิโนเลอิก (C18:2)

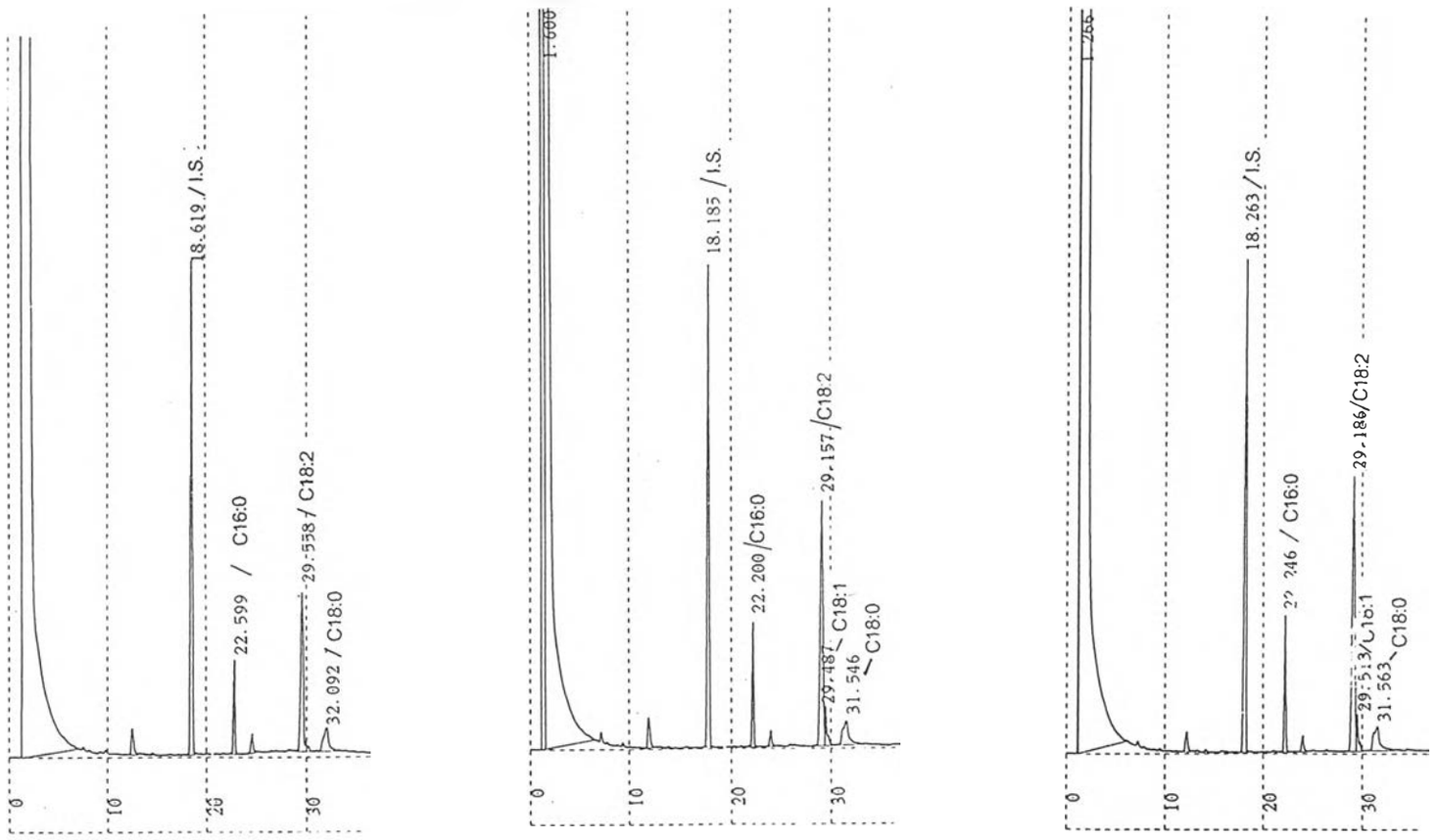


รูปที่ ค.4 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดลิโนเลอิก (C18:2) 0-0.3 ไมโครกรัม กับค่า mean peak area ratio

ปริมาณกรดลิโนเลอิก (C18:2) (ไมโครกรัม)	mean peak area ratio (ค่าเฉลี่ย±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน)
0.0375	0.316±0.060
0.015	0.526±0.031
0.15	0.982±0.180
0.3	1.739±0.052

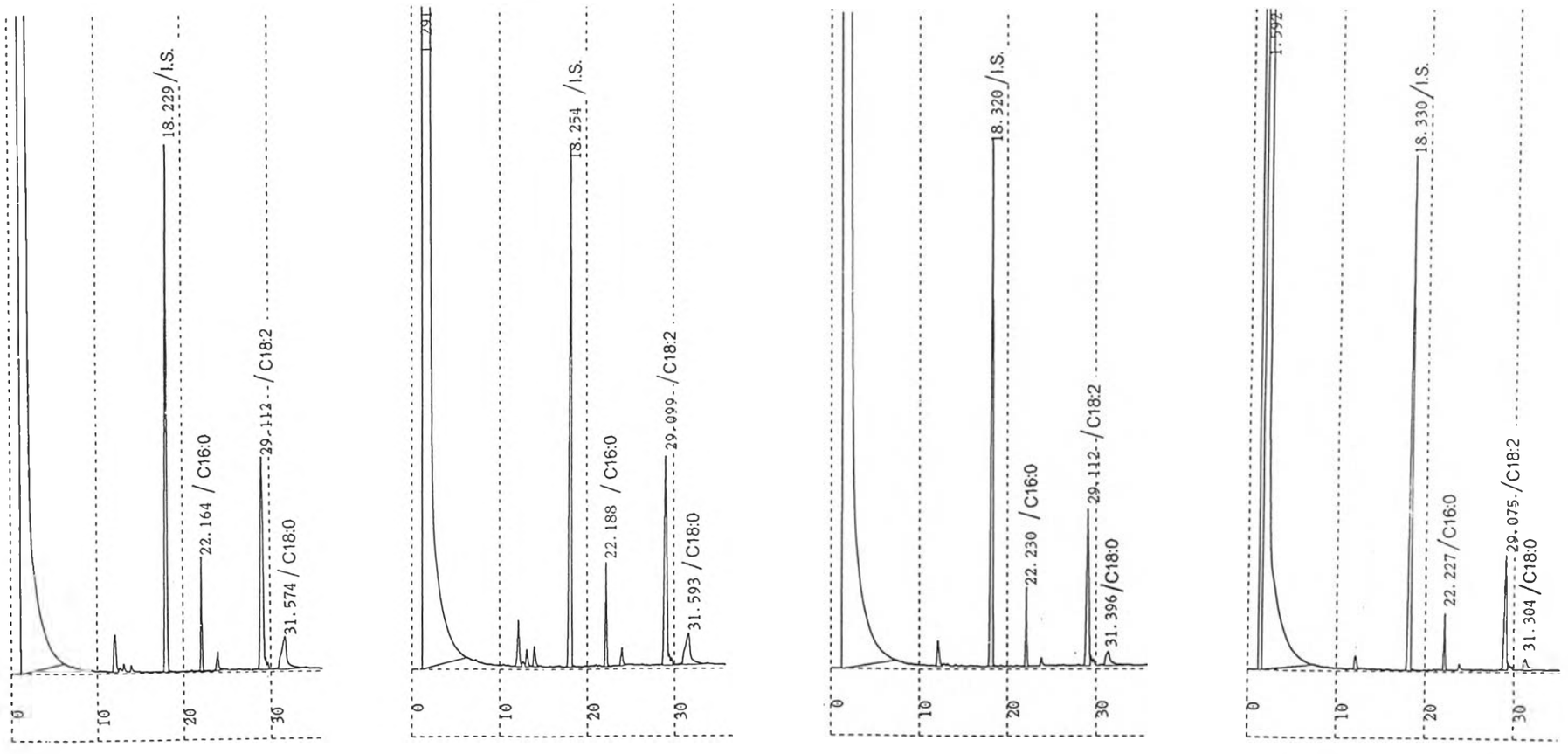
ภาคผนวก ง

โครมาโทแกรมของกรดไขมันในแคลลัสคำฝอย วิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี



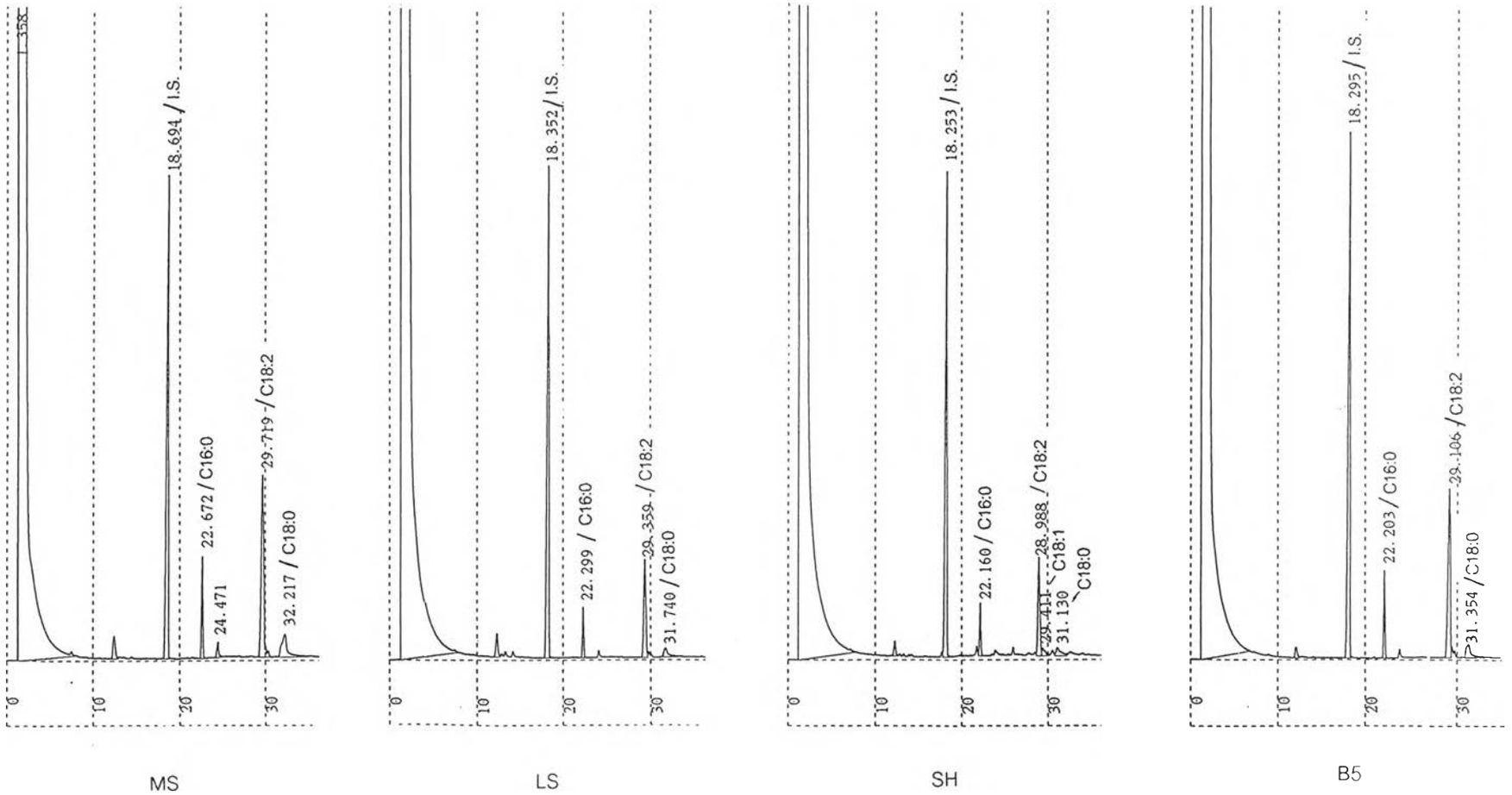
control EMS ความเสียหายระดับ 1 EMS ความเสียหายระดับ 2

รูปที่ ง.1 แสดงโครมาโทแกรมของกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยที่ได้จากการให้สาร EMS กับใบเลี้ยงตามภาวะที่เหมาะสม วิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี

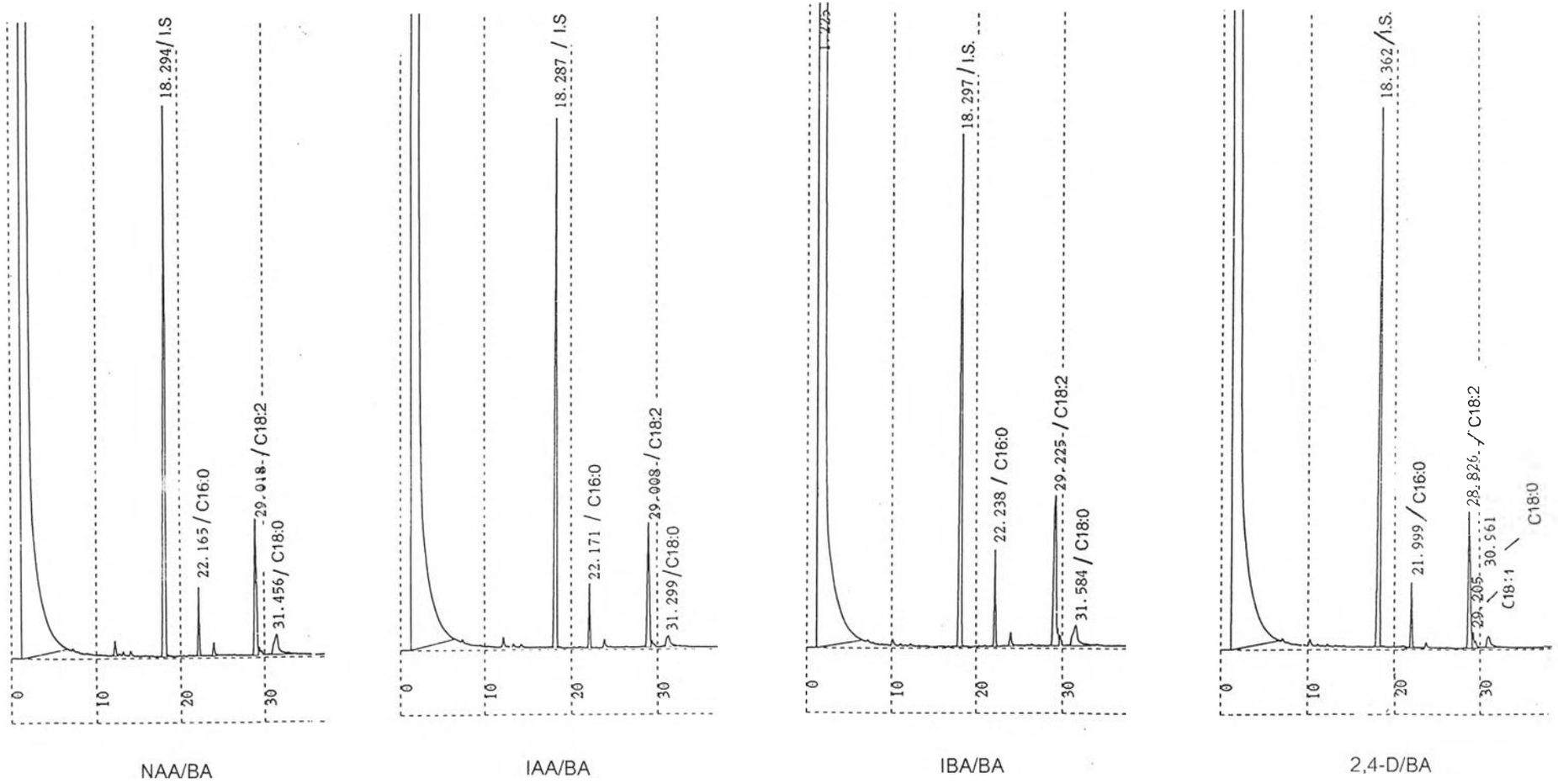


ใบเลี้ยงอายุ 1 สัปดาห์ ใบเลี้ยงอายุ 2 สัปดาห์ ใบเลี้ยงอายุ 3 สัปดาห์ ใบเลี้ยงอายุ 4 สัปดาห์

รูปที่ ง.2 แสดงโครมาโทแกรมของกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอายุ 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี



รูปที่ ง.3 แสดงโครมาโทแกรมของกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ที่เติม NAA และ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี



รูปที่ ง.4 แสดงโครมาโทแกรมของกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและไซโทไคนินชนิดต่าง ๆ วิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี

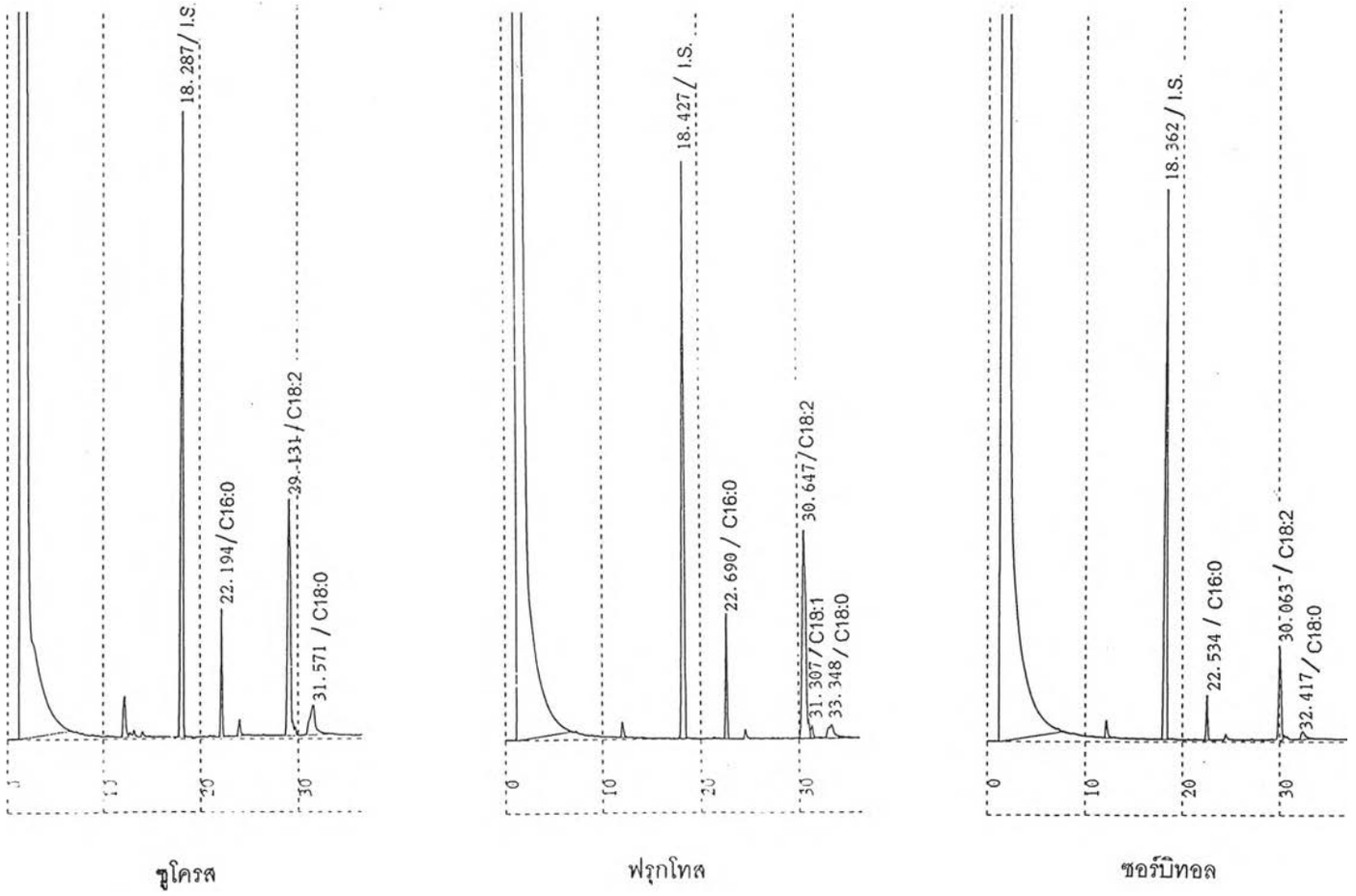
NAA/Kinetin

IAA/ Kinetin

IBA/ Kinetin

2,4-D/ Kinetin

รูปที่ ง 4 (ต่อ)



รูปที่ ง.5 แสดงโครมาโทแกรมของกรดไขมันในแคลลัสคำฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน วิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี

ประวัติผู้เขียน

นางสาวปวีณา นวมเจริญ เกิดวันที่ 15 มิถุนายน พ.ศ. 2517 ที่อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (โรคพืช) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปีการศึกษา 2537 และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2538