

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1. แสดงองค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ ที่ใช้เพาะเลี้ยงหน้าวัว

องค์ประกอบ (มก/ล)	สูตรอาหาร			
	MS	MMS	NN	WPM
ธาตุอาหารหลัก				
CaCl ₂	-	-	25.00	-
CaCl ₂ ·H ₂ O	-	-	-	96.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440.00	440.00	-	-
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	-	-	55.60
KCl	-	-	1500.00	-
KH ₂ PO ₄	170.00	85.00	-	170.00
KHO ₃	1900.00	950.00	2000.00	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.00	-	250.00	-
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	-	250.00	-
NH ₄ NO ₃	1650.00	825.00	-	400.00
ธาตุอาหารรอง				
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.25	-	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.25	0.025	6.25
H ₃ BO ₃	6.20	6.20	0.50	6.20
KI	0.83	0.83	-	-
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.30	22.30	-	16.90
MnSO ₄ ·4H ₂ O	-	-	3.00	-
K ₂ SO ₄	-	-	-	990.00
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.025	0.25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60	8.60	0.50	8.60
Adenine sulphate	-	0.10	-	-

ตารางภาคผนวกที่ 1. (ต่อ)

องค์ประกอบ (มก/ล)	สูตรอาหาร			
	MS	MMS	NN	WPM

ธาตุเหล็ก				
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.80	13.90	-	27.80
N ₂ EDTA	37.30	18.65	-	37.30
สารอินทรีย์				
Myo-inosital	100.00	100.00	2.00	100.00
Nicotinia acid	0.50	0.50	0.50	0.50
Pyridoxine HCl (B6)	0.50	0.50	0.50	0.50
Thiamine HCl (B1)	0.10	0.10	0.50	1.00
Glycine	2.00	2.00	5.00	2.00
Biotin	-	-	0.05	-
Folic acid	-	-	0.50	-

ตารางภาคผนวกที่ 2. สารเคมีเชื่อมสีเอนไซม์ 7 ระบบ

ระบบเอนไซม์	ส่วนประกอบ
เปอร์ออกซิเดส (peroxidase; PER)	3-Amino-9-ethylcarbazole, β -Naphthol, Acetone, Tris-HCl, Acetic acid และ Hydrogen peroxide 3%
แอลฟาเอสเตอเรส (α -esterase; EST)	Phosphate buffer (monobasic sodium phosphate และ dibasic sodium phosphate), Fast blue B Salt และ α -Naphthyl acetate
แอซิดฟอสฟาเทส (acid phosphatase; ACP)	Na acetate 50 mM (pH 5.5), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1 M, Fast black K salt และ α -naphthyl acid phosphate
แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase; ADH)	Tris- HCl 0.1 M (pH 7.5), β -nicotinamide adenine dinucleotide monohydrate (NAD^+), 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-1)-2, 5- diphenyltetrazoliumbromide (MTT), Phenazine methosulfate (PMS) และ Ethanol

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

ระบบเอนไซม์	ส่วนประกอบ
แลคเตสดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase; LDH)	Tris- HCl 0.2 M (pH 8.0), DL- Lactic acid 0.5 M, Nitroblue tetrazolium (NBT) และ PMS
มาเลทดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase; MDH)	Tris- HCl 0.1 M (pH 7.5), DL-Malate 1 M pH 7.5, NAD^+ , MTT และ PMS
ซิกิเมทดีไฮโดรจีเนส (acid phosphatase; ACP)	Tris-Hcl 0.1 M (pH 7.5), Shikimic acid, $NADP^+$, MTT และ PMS

ตารางภาคผนวกที่ 3. ส่วนประกอบของเจลตอนบน (stacking gel) และเจลตอนล่าง (separating gel)
สำหรับเจล 2 แผ่น

สารเคมี	ความเข้มข้น(%)	
	เจลตอนล่าง	เจลตอนบน
1. 30% acrylamide gel (ml.)	3	0.30
2. 1.5 M Tris-HCl (pH 8.9) (ml.)	1.45	-
3. 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) (ml.)	-	0.375
4. น้ำกลั่น (ml.)	4.435	2.265
5. TEMED (μl)	5	5
6. 10%APS (μl)	225	120
ปริมาตรรวม	9.115	3.065

ที่มา: ดัดแปลงมาจากคู่มือ (2545)

ภาคผนวกที่ 1 ส่วนประกอบสารเคมี

1.1. Extraction buffer

- Tris-HCl 0.5 M pH 7.5	6.05	กรัม
- PVP 2%	2	กรัม
- Na ₂ EDTA 2Mm	0.074	กรัม
- น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
- 2 Mercapthoetanol 1% (เติมเมื่อבודตัวอย่างพืช)		

1.2. Electrode buffer

- Tris-HCl 0.5 M pH 8.3	3.03	กรัม
- Glycine	14.04	กรัม

หมายเหตุ นำ Tris-HCl และ Glycine ละลายในน้ำ 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH 8.3

1.3. ระบบสีย้อมเอนไซม์

1.3.1 เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase) (Thom and Maretzki, 1970) (E .C . 1 . 11 .1. 7)

สารเคมี Stock A

1. 3-Amino-9-ethylcarbazole	210	มิลลิกรัม
2. β- Naphthol	145	มิลลิกรัม

3. Acetone	100	มิลลิลิตร
------------	-----	-----------

หมายเหตุ ละลายสารเคมีข้อ 1 และ 2 ใน ข้อ 3 ให้เป็นเนื้อเดียวกันและเก็บในขวดสีชา

สารเคมี Stock B

1. Tris-HCl	1.50	กรัม
2. Acetic acid	1.70	มิลลิลิตร
3. น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

หมายเหตุ ละลายสารเคมีข้อ 1 และ 2 ในข้อ 3 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน

สารเคมี Stock C

1. Hydrogen peroxide 3% (H ₂ O ₂)	1	มิลลิลิตร
--	---	-----------

วิธีผสม ผสม Stock A : B : C ในอัตราส่วน 20 : 80 : 1 เท่า ให้เป็นเนื้อเดียวกัน

วิธีย้อม เขย่าข้อมในที่มีดเป็นเวลา 30-60 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

1.3.2 แอลฟาเอสเตอเรส (α -Esterase) (Thom and Marezki, 1970) (E .C . 3 . 1 . 1. 2)

1. Phosphate buffer 0.1 M pH 6.0	100	มิลลิลิตร
----------------------------------	-----	-----------

สารเคมี Stock A

- Solution of monobasic sodium phosphate 0.1 M	43.8	มิลลิลิตร
--	------	-----------

สารเคมี Stock B

- Solution of dibasic sodium phosphate 0.1 M	6.15	มิลลิลิตร
--	------	-----------

หมายเหตุ นำ Stock A ผสม Stock B ปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร และปรับ pH 6.0

2. Fast blue B Salt	150	มิลลิลิตร
3. α - Naphthyl acetate in absolute alcohol	3	มิลลิลิตร

วิธีผสม ละลายสารเคมีข้อ 2 ในข้อ 1 ให้เป็นเนื้อเดียวกันกรองในที่มีดและเติมสารข้อ 3 เมื่อข้อมสี

วิธีย้อม เขย่าข้อมในที่มีดจนกว่าเจลดิสซัลดเจน ที่อุณหภูมิห้อง

1.3.3 มาเลทดีไฮโดรจีเนส (Malate dehydrogenase)

(Brown *et al.*, 1978 อ้าง โดย Tanksley and Orton, 1985) (E .C . 1 . 1 . 1 . 37)

1. Tris- HCl 0.1 M pH 7.5	100	มิลลิลิตร
2. DL-Malate 1 M pH 7.5	3	มิลลิลิตร
3. NAD ⁺	30	มิลลิลิตร
4. MTT	20	มิลลิลิตร
5. PMS	4	มิลลิลิตร

วิธีผสม ละลายสารเคมีข้อ 3-5 ในข้อ 1 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเติมสารข้อ 2 เมื่อจะย้อมสีเจด
วิธีย้อม เข้าย้อมในที่มืดเป็นเวลา 30-60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

1.3.4 แอซิดฟอสฟาเทส (Acid phosphatase)

(Scandalios, 1969 อ้างโดย Tanksley and Orton, 1985) (E .C .3 .1 .3 . 2)

1. Na acetate 50 Mm pH 5.5	100	มิลลิลิตร
2. MgCl ₂ ·6H ₂ O 1M	1	กรัม
3. Fast black K salt หรือ Fast garnet GBC salt	100	มิลลิกรัม
4. 1% Naphthyl acid phosphate (in 50% acetone)	3	มิลลิลิตร

วิธีผสม ละลายสารเคมีข้อ 3 ในข้อ 1 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเติมสารข้อ 2 และ 4 เมื่อจะย้อมสีเจด
วิธีย้อม เข้าย้อมในที่มืดเป็นเวลา 1-5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

1.3.5 ชิคิเมทดีไฮโดรจีเนส (Shikimate dehydrogenase)

(Tanksley and Rick, 1980 อ้างโดย Tanksley and Orton, 1985) (E .C .1 . 1 .1 .25)

1. Tris-Hcl 0.1 M pH 7.5	100	มิลลิลิตร
2. Shikimic acid	100	มิลลิกรัม
3. NADP ⁺	15	มิลลิกรัม
4. MTT	20	มิลลิกรัม
5. PMS	4	มิลลิกรัม

วิธีผสม ละลายสารเคมีข้อ 3-5 ในข้อ 1 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเติมสารข้อ 2 เมื่อจะย้อมสีเจด
วิธีย้อม เข้าย้อมในที่มืด เป็นเวลา 30-60 ที่อุณหภูมิห้อง

1.4. Marker dye solution

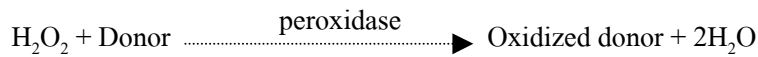
- Bromophenol blue	125	มิลลิกรัม
- Xylene cyanol FF	125	มิลลิกรัม
- Glycerol	15	มิลลิลิตร

หมายเหตุ นำ Bromophenol blue Xylene cyanol FF และ Glycerol ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ
ปริมาตร ให้ได้ 50 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวกที่ 2 การเกิดปฏิกิริยาเคมีของสีย้อมแต่ละระบบเอนไซม์

2.1. ระบบเปอร์ออกซิเดส (peroxidase; POX)

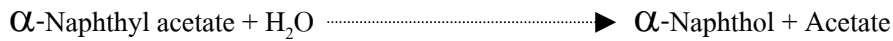
เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาทางเคมีดังนี้



อาศัยหลักการเปลี่ยนสีของ aromatic amides เช่น O-dianisidine เมื่อมี H_2O_2 และ peroxidase เร่งปฏิกิริยาในสภาพมืดเกิดแถบสีน้ำตาลส้มบนแผ่นเจล

2.2 .ระบบแอลฟาเอสเตอเรส (α -esterase; EST)

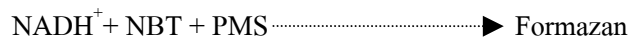
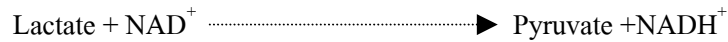
เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาทางเคมีดังนี้



เร่งปฏิกิริยาในสภาพมืด เกิดแถบสีม่วงหรือม่วงดำบนแผ่นเจล

2.3. ระบบแลคเตทดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase; LDH)

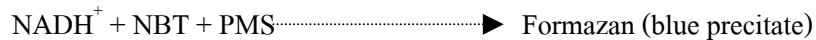
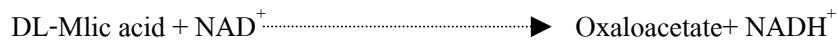
เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาทางเคมีดังนี้



เร่งปฏิกิริยาในสภาพมืด เกิดแถบสีน้ำเงินบนแผ่นเจล

2.4. ระบบมาเลทดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase; MDH)

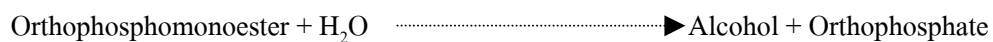
เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาทางเคมีดังนี้



เร่งปฏิกิริยาในสภาพมืด เกิดแถบสีน้ำเงินบนแผ่นเจล

2.5. ระบบแอซิดฟอสฟาเทส (acid phosphatase; ACP)

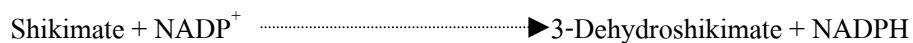
เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาทางเคมีดังนี้



เร่งปฏิกิริยาในสภาพมืด เกิดแถบสีแดงบนแผ่นเจล

2.6. ระบบชิคิเมทดีไฮโดรจีเนส (shikimic dehydrogenase; SKD)

เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาทางเคมีดังนี้



เร่งปฏิกิริยาในสภาพมืด เกิดแถบสีน้ำเงินบนแผ่นเจล

ตารางภาคผนวกที่ 4. ผลของการชักนำแคลสจากชิ้นส่วนต่างๆของหน้าวัว 3 พันธุ์ บนอาหารสูตร

MMS ที่เติม TDZ และ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล

สายพันธุ์ชิ้นส่วนพืช

Source	Df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	8	13282.90	1660.36	15.46	0.0001
พันธุ์	2	12866.13	6433.06	59.91	0.0001
ชิ้นส่วนพืช	2	268.43	134.21	1.25	0.2987
พันธุ์ชิ้นส่วนพืช	4	148.33	37.083	0.35	0.8455
Error	36	3865.60	107.37		
Total	44	17148.50			
C.V. (%)	14.94				

ตารางภาคผนวกที่ 5. ผลสร้างบาดแผลในชิ้นส่วนใบต่อการสร้างแคลลัสของหน่่าวัว บนอาหาร
 สูตร MMS ที่เติม TDZ และ BA ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล

พินิจการสร้างบาดแผล

Source	Df	SS	MS	F-Valus	Pr>F
Model	5	6422.24	1284.44	71.01	0.0001
พินิจ	2	1394.71	697.35	38.55	0.0001
การสร้างบาดแผล	1	3466.87	3466.87	191.67	0.0001
พินิจ x การสร้าง บาดแผล	2	1560.65	780.32	43.14	0.0001
Error	24	434.10	18.08		
Total	29	6856.34			

C.V. (%) = 8.83

ตารางภาคผนวกที่ 6 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ต่อการสร้างแคลลัสและ
ลักษณะแคลลัสหน้าวุ้นพันธุ์วาเลนติโน

6.1 ชั้นส่วนใบ

Source	Df	SS	MS	F-Valus	Pr>F
ใบ	20	49914.61	3119.66	421.58	0.0001
Error	38	503.20	7.40		
Total	58	50417.80			

C.V.(%) = 22.21

6.2 ชั้นส่วนข้อ

Source	Df	SS	MS	F-Valus	Pr>F
ข้อ	20	52650.05	2632.50	422	0.0001
Error	38	524.0	6.23		
Total	58	53174.05			

C.V.(%) = 21.26

ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลของการชักนำยอดจากโนดูลาแคลลัสของในอาหารแข็งและอาหารเหลว
อาหารแข็งและอาหารเหลว

Source	Df	SS	MS	F-Value	Pr>F
Model	7	2788.90	309.87	36.63	0.0001
อาหาร	2	503.20	7.40	1.25	0.0001
สารควบคุมการ เจริญเติบโต	5	524.0	6.23	0.35	0.0001
Error	40	338.37	8.45		
Total	54	4154.47			

C.V.(%) = 29.99

ตารางภาคผนวกที่ 8 ผลของการอัตราการรอดชีวิตของโนคูตาเคลสต์ที่จุ่มแช่ในสารละลาย EMS
ความเข้มข้นต่างๆ

8.1 จุ่มแช่นาน 90 นาที

Source	Df	SS	MS	F-Valus	Pr>F
Model	4	27660.74	6915.18	196.88	0.0001
Error	20	702.47	35.12		
Total	24	28363.21			

C.V.(%) = 9.71

8.2 จุ่มแช่นาน 60 นาที

Source	Df	SS	MS	F-Valus	Pr>F
Model	4	5012.16	1253.04	55.73	0.0001
Error	20	449.70	22.48		
Total	24	5461.86			

C.V.(%) = 5.59