สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วอาหารสัตว์

วิชุดา พิริยพลพงศ์
ศุภลักษณ์ มั่นไทย

ปพ.
QK571
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....83985
วัน,เดือน,ปี.....23 ก.ย. 2551

b.....11983267
i.....

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tissue Culture of Forage Pea

Wichuda Piriyapolpong

Supaluk Monthai

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Biotechnology Program

Department of Applied Biology, Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วอาหารสัตว์

นักศึกษา นางสาววิชุดา พิริยพลพงศ์ รหัส 47050159

นางสาวศุภลักษณ์ มั่นไทย รหัส 47050166

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี	
กรรมการ ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วอาหารสัตว์

นักศึกษา วิชุดา พิริยพลพงศ์ 47050159

ศุภลักษณ์ มั่นไทย 47050166

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2550

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงถั่วคาวาลเคดและถั่วฮามาต้าโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบว่าความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดถั่วคาวาลเคดและถั่วฮามาต้า คือ คลอรอกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที และ คลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที ตามลำดับ

ไฮโปคอทิลของถั่วคาวาลเคดและถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4 - D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าถั่วคาวาลเคด และถั่วฮามาต้า ที่ความเข้มข้น 2,4 - D 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสสีเขียวขนาดใหญ่ที่สุด การชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ของถั่วคาวาลเคด และถั่วฮามาต้า โดยนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าถั่วคาวาลเคด และถั่วฮามาต้า ที่ความเข้มข้นของ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสามารถในการชักนำให้เกิดเป็นต้นสูงคิดเป็นร้อยละ 70

การชักนำให้เกิดรากทำได้โดยเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย IBA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า IBA ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ในถั่วคาวาลเคด เมื่อนำต้นใหม่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อย้ายลงดิน พบว่าต้นใหม่ที่ได้สามารถมีชีวิตอยู่รอดในเรือนกระจก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special project Title Tissue Culture of Forage Pea

Student Wichuda Piriyapolpong 47050159

Suppaluk Monthai 47050166

Program Biotechnology

Department Applied Biology

Academic Year 2007

Special project Advisor Asst. Prof. Dr. Anurug Poeaim

ABSTRACT

Centrosema pascuorum cv. Cavalcade and *Stylosanthes hamata* cv. Verano were generated by Tissue Culture. Sterilization of their seeds with 15 percent of chlorox, 15 minutes for *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade and 10 percent of chlorox, 15 minutes for *Stylosanthes hamata* cv. Verano which were the best method.

Hypocotyls of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade and *Stylosanthes hamata* cv. Verano were subcultured on MS medium supplement with varying levels (0.5, 1, 3 and 5 mg/l) of 2,4-D. The best treatment for *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade and *Stylosanthes hamata* cv. Verano to produce big green callus were 0.5 mg/l and 1 mg/l of 2,4-D respectively. Regeneration with callus was tested varying levels (0.5, 1, 3 and 5 mg/l) of BA with MS medium. Callus on MS medium supplemented with 3 mg/l of BA was most effective for induced shoot and percent regeneration at 7 percent.

Root induction of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade callus was subcultured on MS medium supplement with varying levels (0.5, 1, 3 and 5 mg/l) of IBA. IBA 0.5 and 3 mg/l were most effective for induced root. The regeneration plant survived well in the greenhouse.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม เป็นอย่างยิ่งที่ได้ให้โอกาส คำแนะนำแนวทางในการค้นคว้าวิจัย การทำวิจัย การเขียนโครงงานพิเศษฉบับนี้ รวมทั้งการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์และการให้คำแนะนำปรึกษาทุกๆอย่าง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษที่ได้ช่วยตรวจทานแก้ไขในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้ รวมทั้งคำแนะนำในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพรักยิ่ง สำหรับโอกาส ความรัก คำแนะนำ และกำลังใจในการศึกษาและการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณ พี่รัน พี่ปุ๊ก และพี่ส้ม ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งช่วยเหลือในการศึกษาวิจัยโครงงานพิเศษมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณอาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และเพื่อนๆทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ ที่ได้ให้คำปรึกษา การสนับสนุน การช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำการศึกษาวิจัยมาโดยตลอด รวมถึงผู้ที่มีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

นางสาววิชุดา พิริยพลพงศ์
นางสาวศุภลักษณ์ มั่นไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ข
กิตติกรรมประกาศ ค
สารบัญ ง
สารบัญตาราง ช
สารบัญรูป ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ที่มาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ 3
2.1 ถั่วคาวาลเคด (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade) 3
2.2 ถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) 4
2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 5
2.3.1 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 7
2.3.2 อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 9
2.3.3 ข้อควรคำนึงในการเตรียมอาหาร 12
2.3.4 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 13
2.3.5 ขั้นตอนการเตรียมอาหาร 13
2.3.6 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อ 14
2.3.7 สารเคมีต่างๆที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างพืช 14
2.4 การเพาะเลี้ยงแคลลัส 15
2.4.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืชที่ใช้เพาะเลี้ยง 16
2.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส 17
2.4.3 ข้อควรพิจารณาในการเลี้ยงแคลลัส 18
2.4.4 ประโยชน์ของการเลี้ยงแคลลัส 18
2.5 การพัฒนาเป็นยอดและราก 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6 ขั้นตอนการปลูกและดูแลพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 20

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 21

3.1 พันธุ์พืช 21

3.2 สารเคมี 21

3.3 อุปกรณ์เครื่องแก้วและเครื่องมือต่างๆ 22

3.4 วิธีการทดลอง 23

3.4.1 การหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อ 23

3.4.2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำไฮโปคอทิลให้เป็นแคลลัสด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 23

3.4.3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เป็นต้นใหม่ด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 23

3.4.4 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำต้นใหม่ให้เกิดรากด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA 24

3.4.5 การย้ายออกปลูกพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 24

บทที่ 4 ผลการทดลอง 25

4.1 การหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อ 25

4.1.1 ถั่วดาวาลเดด 25

4.1.2 ถั่วฮามาต้า 28

4.2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำไฮโปคอทิลให้เป็นแคลลัสด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 32

4.2.1 ถั่วดาวาลเดด 32

4.2.2 ถั่วฮามาต้า 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เป็นต้นใหม่ด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 40

4.3.1 ถั่วคาวาลเคด 40

4.3.2 ถั่วฮามาต้า 43

4.4 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำต้นใหม่ให้เกิดรากด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA 46

4.4.1 ถั่วคาวาลเคด 46

4.5 การย้ายออกปลูกพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 49

4.5.1 ถั่วคาวาลเคด 49

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 50

5.1 การหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อ 50

5.2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำไฮโปคอทิลให้เป็นแคลลัสด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 50

5.3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เป็นต้นใหม่ด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 50

5.4 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำต้นใหม่ให้เกิดรากด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA 51

5.5 การย้ายออกปลูกพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 51

เอกสารอ้างอิง 52

ภาคผนวก ก 54

ภาคผนวก ข 61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของถั่วคาวาลเคดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ที่ความข้มข้นแตกต่างกัน ดังนี้ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาที่แตกต่างกัน ดังนี้ 5, 10, 15 และ 20 นาที	27
4.2	แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของถั่วฮามาต้าที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ที่ความข้มข้นแตกต่างกัน ดังนี้ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาที่แตกต่างกัน ดังนี้ 5, 10, 15 และ 20 นาที	31
4.3	การวิเคราะห์ผลความแปรปรวนของถั่วคาวาลเคดเพื่อทดสอบความแตกต่างที่ความเข้มข้นและเวลาต่างกัน	32
4.4	แสดงขนาดพื้นที่ (ตารางมิลลิเมตร) ของแคลลัสที่เกิดขึ้นในถั่วคาวาเคด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14, 28, 42 และ 56 วัน	33
4.5	การวิเคราะห์ผลความแปรปรวนของถั่วฮามาต้าเพื่อทดสอบความแตกต่างที่ความเข้มข้นและเวลาต่างกัน	36
4.6	แสดงขนาดพื้นที่ (ตารางมิลลิเมตร) ของแคลลัสที่เกิดขึ้นในถั่วฮามาต้า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14, 28, 42 และ 56 วัน	37
4.7	แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของถั่วคาวาลเคด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	40
4.8	แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของถั่วฮามาต้า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตร คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.9 แสดงจำนวนรากที่เกิดขึ้นในถั่วคาวาลเคด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง สูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตร คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 28 วัน 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ **หน้า**

2.1 ต้นและเมล็ดของถั่วคาวาลเคด 3

2.2 ต้นและเมล็ดของถั่วฮามาต้า 4

2.3 แคลลัสของถั่วคาวาลเคดและถั่วฮามาต้า 16

4.1 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของถั่วคาวาเคดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ที่ความข้มข้นแตกต่างกัน ดังนี้ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาที่แตกต่างกัน ดังนี้ 5, 10, 15 และ 20 นาที 28

4.2 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของถั่วฮามาต้าที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ที่ความข้มข้นแตกต่างกัน ดังนี้ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาที่แตกต่างกัน ดังนี้ 5, 10, 15 และ 20 นาที 31

4.3 กราฟเปรียบเทียบการเกิดแคลลัสของถั่วคาวาลเคด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14, 28, 42 และ 56 วัน 34

4.4 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสของถั่วคาวาลเคด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร 35

4.5 กราฟเปรียบเทียบการเกิดแคลลัสของถั่วฮามาต้า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14, 28, 42 และ 56 วัน 37

4.6 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสของถั่วฮามาต้าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.7 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของถั่วคาวาลเคด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร 41

4.8 แสดงการเปรียบเทียบการเกิดยอดของถั่วคาวาลเคด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตร คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร 42

4.9 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของถั่วคาวาลเคด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร 44

4.10 แสดงการเปรียบเทียบการเกิดยอดของถั่วฮามาต้า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร 45

4.11 แสดงการเปรียบเทียบการเกิดรากของถั่วคาวาลเคด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตร คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร 47

4.12 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดรากของถั่วคาวาลเคดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 28 วัน 48

4.13 แสดงการอยู่รอดของต้นใหม่ที่นำมาปลูกลงดิน 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของโครงงานพิเศษ

พืชอาหารสัตว์ เป็นอาหารหลักที่สำคัญสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง ได้แก่ โคเนื้อ โคนม กระบือ เป็นต้น ปัจจุบันเกษตรกรไทยได้ให้ความสนใจในการเลี้ยงสัตว์มากขึ้น จำนวนโคเนื้อและโคนมเพิ่มขึ้นทุกปี ขนาดของโคเนื้อและโคนมก็โตขึ้น ในขณะที่พื้นที่สาธารณะสำหรับเลี้ยงโค กระบือ มีจำนวนลดลง และในบางปี บางฤดู พืชอาหารสัตว์ที่มีตามธรรมชาติมีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับโค กระบือ ทำให้โค กระบือ ผอม เจริญเติบโตช้า ไม่ให้ลูก ทำให้ผู้เลี้ยงได้ผลตอบแทนจากสัตว์ต่ำ ดังนั้นในการเลี้ยงโคเนื้อ โคนม กระบือ หรือสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่น ๆ ให้มีการเจริญเติบโตและมีผลผลิตเป็นปกตินั้น เกษตรกรจำเป็นต้องปลูกพืชอาหารสัตว์ในพื้นที่ส่วนตัว โดยเลือกปลูกพืชอาหารสัตว์ที่เหมาะกับสภาพพื้นที่ มีการเจริญเติบโตดี ให้ผลผลิตต่อไร่สูง

พืชอาหารสัตว์ที่สำคัญมี 2 ชนิดคือ หญ้าอาหารสัตว์และถั่วอาหารสัตว์ ปัจจุบันเกษตรกรได้รับการส่งเสริมให้ปลูกทั้งหญ้าอาหารสัตว์และถั่วอาหารสัตว์ร่วมกัน เรียกว่า แปลงหญ้าผสมถั่ว เนื่องจากหญ้าโดยทั่วไปให้ผลผลิตสูง เป็นแหล่งพลังงานและสัตว์ชอบกิน ส่วนถั่วอาหารสัตว์นั้นสามารถใช้เลี้ยงสัตว์ได้ดีเกือบทุกชนิด มีโปรตีนสูง ใช้เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารของแปลงหญ้า และช่วยเพิ่มไนโตรเจนให้กับดิน ดังนั้นแปลงหญ้าผสมถั่วจึงเป็นแหล่งพืชอาหารสัตว์ที่สามารถตอบสนองความต้องการของสัตว์เลี้ยงได้เป็นอย่างดี

ถั่วอาหารสัตว์ที่ได้มีการทดลองปลูก ขยายพันธุ์ และกระจายพันธุ์ให้เกษตรกรปลูกได้ผลดีมีหลายชนิดแต่ละชนิดมีข้อดีข้อเสีย และเหมาะกับสภาพดิน ฟ้า อากาศ และการนำไปใช้ประโยชน์แตกต่างกัน เราสามารถแบ่งถั่วอาหารสัตว์เป็น 3 กลุ่มตามลักษณะทรงต้นและการเจริญเติบโต คือ

ก) ถั่วลำต้นเป็นเถาเลื้อย พันธุ์ที่นิยมปลูกได้แก่ ถั่วเซนโตร ถั่วเซอราโตร ซึ่งจะมีเถาเลื้อยพัน เมื่อปลูกร่วมกับหญ้า จะเลื้อยพันต้นหญ้าทำให้โค กระบือ กินหญ้าและถั่วไปพร้อม ๆ กัน

ข) ถั่วลำต้นเป็นทรงพุ่ม พันธุ์ที่นิยมปลูกได้แก่ เวอราโนสไตโล หรือถั่วฮามาต้า และถั่วแกรมสไตโล ซึ่งมีทรงพุ่มเตี้ย ๆ ต้นโตเต็มที่สูงเพียง 50 - 60 เซนติเมตร แตกกิ่งก้านและมีใบขนาดเล็ก ๆ จำนวนมาก เจริญเติบโตได้ในดินหลายชนิด และมักจะทนความแห้งแล้ง หรือทนการเหยียบย่ำได้ดี

ค) ไม้ยืนต้น พืชตระกูลถั่วบางชนิดเป็นไม้ยืนต้น เช่น กระถิน แคบ้าน แคฝรั่ง ไมยราบ ไมยราบยักษ์ มักจะมีใบเขียวตลอดปี สามารถใช้เลี้ยงสัตว์ได้ปัจจุบันเกษตรกรสนใจปลูกมากขึ้น เนื่องจากทนความแห้งแล้ง และใช้เลี้ยงสัตว์ในฤดูขาดแคลน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถั่วคาลวาเดค (*Centrosema pascuorum*) และ ถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata*) เป็นพันธุ์ถั่วอาหารสัตว์ที่สามารถปรับตัวได้ดีและให้ผลผลิตสูงในประเทศไทย ถั่วคาลวาเดค (*Centrosema pascuorum*) เป็นถั่วเถาเลื้อยที่มีอายุเพียงปีเดียว ปลูกได้ในดินหลายชนิด แต่ดินที่เหมาะสมที่สุด คือ ดินที่มีการระบายน้ำได้ดี ซึ่งกรมปศุสัตว์กำลังสนับสนุนให้เกษตรกรไทยปลูกถั่วชนิดนี้ เนื่องจากถั่วชนิดนี้เมื่อตากแดดให้แห้งใบจะไม่ร่วงหล่นมาก เหมาะสำหรับใช้ทำถั่วแห้งอัดฟ่อน และมีปริมาณโปรตีนค่อนข้างมาก (14-18 เปอร์เซ็นต์) เหมาะสำหรับใช้เสริมโปรตีน ส่วนถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata*) เป็นถั่วที่มีลำต้นเป็นทรงพุ่ม สามารถเจริญเติบโตได้ในดินหลายชนิด ประเทศไทยสามารถปลูกถั่วฮามาต้าได้ทั่วทุกภาค นิยมใช้ปลูกเป็นพืชคลุมดิน สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งได้ดี หรือทนต่อการเหยียบย่ำได้ดี ตรึงไนโตรเจนและให้ผลผลิตเมล็ดสูง มีปริมาณโปรตีนหยาบที่ค่อนข้างสูง (17.8 เปอร์เซ็นต์) เหมาะสำหรับใช้เลี้ยงโคและกระบือ ในรูปถั่วสดหรือแห้ง

ในปัจจุบันได้มีการทดลองปลูก และขยายพันธุ์ถั่วอาหารสัตว์ด้วยวิธีต่างๆ จากการค้นคว้าพบว่า ถั่วอาหารสัตว์ทั้ง 2 ชนิด ยังมีการวิจัยไม่แพร่หลายนัก ฉะนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการขยายพันธุ์พืช เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถเพิ่มปริมาณและผลผลิตในระยะเวลาอันสั้น และยังเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีการทางพันธุวิศวกรรม เช่น การย้ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรียม และการยิงอนุภาคดีเอ็นเอ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ตามที่ต้องการได้ ซึ่งจากการวิจัยข้างต้นมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงพื้นฐานของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดถั่วคาวาลเดค และถั่วฮามาต้า

1.2.2 เพื่อศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับชักนำการเจริญเติบโตของไฮโปคอทิลของถั่วคาวาลเดค และถั่วฮามาต้า เพื่อเจริญไปเป็นแคลลัส

1.2.3 เพื่อศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับชักนำแคลลัสของถั่วคาวาลเดค และถั่วฮามาต้าให้เจริญเติบโตเป็นต้นใหม่

1.2.4 เพื่อศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำต้นใหม่ให้เกิดราก และนำต้นใหม่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชย้ายออกปลูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ถั่วคาวาลเคด

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Centrosema pascuorum* Mart. ex Benth

ชื่อที่คล้ายกัน : *Bradburya pascuora* (Mart. ex Benth.) Kuntze

ชื่อวงศ์ : Fabaceae (alt. Leguminosae)

ชื่อสามัญ : centurion, centro

ชื่อที่รู้จักในบ้านเรา : คาวาลเคด (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade)

รูปที่ 2.1 ต้นและเมล็ดของถั่วคาวาลเคด

ที่มา : http://www.thaicattle.com

ถั่วคาวาลเคดมีถิ่นกำเนิดบริเวณเขตร้อนของอเมริกาใต้ เป็นพืชฤดูเดียว ลักษณะต้นเป็นแบบเถาเลื้อย นอนไปตามผิวดิน และมีรากอยู่ตามข้อเป็นแบบ top root system โดยที่ขนาดและความยาวของรากที่หยั่งลึกลงไปในดินจะขึ้นอยู่กับชนิดของดินที่ถั่วอาศัยอยู่ ใบดก มีสัดส่วนของใบมากกว่าลำต้น เป็นแบบ trifoliage leaf ประกอบด้วยใบย่อย 3 ใบ ใบมีสีเขียวเข้ม รูปใบคล้ายรูปไข่ แต่ค่อนข้างยาวและแคบกว่า ส่วนกว้างที่สุดอยู่ค่อนไปทางโคนใบ ปลายใบมนหรือเรียวเล็กแหลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือจำหน่ายในเชิงการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาด 4 x 2 – 2.5 เซนติเมตร มีขนปกคลุมโดยเฉพาะด้านล่างของใบ ดอกมีขนาดใหญ่ ช่อดอกเป็นแบบ Raceme เกิดอยู่ระหว่างมุนใบ มีดอก 3 – 5 ดอก มีสีม่วงเข้มหรืออ่อนขึ้นอยู่กับพันธุ์ ฝักมีขนาดยาว 7 – 15 เซนติเมตร แต่ละฝักมีเมล็ด 15 – 20 เมล็ด ฝักจะเริ่มแก่ประมาณเดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ ฝักแก่จะมีสีน้ำตาลแก่ (รูปที่ 2.1)

ถั่วคาวาลเคดสามารถทนต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี เจริญเติบโตได้ในดินหลายชนิดตั้งแต่ดินทรายที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำจนถึงดินเหนียว ทนต่อสภาพดินที่เป็นดินกรดและดินด่างได้ดีพอ สมควรไม่ทนต่อสภาพน้ำท่วมขัง (Teitzel และ Burt 1976) สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูง มีการสร้างปมที่รากโดยแบคทีเรียพวกไรโซเบียมและต้องการไรโซเบียม strain GB 1923 (Bowen 1959a) การสร้างปมจะมีอยู่ตลอดระยะการเจริญเติบโตของถั่ว (Bowen 1959) ปมถั่วจะทำหน้าที่ได้ดีในระยะที่ถั่วกำลังเจริญเติบโต ปมถั่วจะไม่มีประสิทธิภาพและหลุดหายไปเมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมหรือเมื่อส่วนใบของถั่วถูกทำลาย เช่น การตัด (defoliation) การสร้างปมจะลดลงในดินที่มีความชื้นต่ำ (Teitzel และ Burt 1976)

ผลผลิตถั่วคาวาลเคด ในหนึ่งฤดูปลูกสามารถตัดได้ 1-2 ครั้ง ใบจะไม่ร่วงหล่นง่ายเมื่อทำแห้ง เหมาะสำหรับใช้ทำถั่วแห้งอัดฟ่อนสำหรับใช้เลี้ยงโค กระบือ ถั่วชนิดนี้ยังมีปริมาณโปรตีนสูงถึง 14-18 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตน้ำหนักแห้งประมาณ 1.0 ตันต่อไร่ปี

2.2 ถั่วฮามาต้า

ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name): *Stylosanthes hamata* (L.) Taub. cv. Verano

ชื่อสามัญ (Common name): ถั่วฮามาต้า, ถั่วเวอราโนสไตโล, Caribean stylo, Verano เป็นต้น

รูปที่ 2.2 ต้นและเมล็ดของถั่วฮามาต้า

ที่มา : http://www.dld.go.th และ suwan.kps.ku.ac.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถั่วฮามาต้ามีถิ่นกำเนิดอยู่ที่หมู่เกาะอินเดียตะวันตกและแถบชายฝั่งของทวีปอเมริกาเหนือและอเมริกาใต้ แต่ชนิดที่นำมาปลูกในประเทศไทยมาจากประเทศออสเตรเลียในปี 2514 เป็นพืช 2 ฤดู ลำต้นเป็นพุ่มเตี้ยตั้งตรง สูงประมาณ 50 - 60 เซนติเมตร แตกกิ่งก้านสาขาได้มาก ลักษณะใบเป็นใบประกอบแบบ trifoliate leaf ใบย่อยรูปร่างคล้ายหอก ค่อนข้างยาวแต่แคบ ใบไม่มีขน ช่อดอกเป็นแบบ spike คล้ายรูปไข่ (oblong spike) ประกอบด้วย 8 - 14 ดอก สีเหลือง อยู่รวมที่ปลายกิ่ง เริ่มออกดอกตั้งแต่เดือนกันยายน - เดือนธันวาคม หลังจากออกดอกแล้วยังคงเจริญเติบโตต่อไปจนถึงปลายฤดู ฝักมีขอ (hook) โค้งงอที่ปลาย มีเมล็ดขนาดเล็กจำนวนมากอยู่ภายใน เมล็ดจะร่วงหล่นเมื่อสุกแก่ (รูปที่ 2.2) มีความสามารถในการงอกสูง เจริญเติบโตเร็ว ปลูกได้ง่าย เจริญเติบโตได้ในดินหลายชนิด โดยเฉพาะในพื้นที่และสภาพฝนปานกลางทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ทนต่อการแทะเล็มและการเหยียบย่ำของสัตว์ได้ดีมาก ทนสภาพแห้งแล้งได้ ไม่ทนต่อน้ำขัง ต้านทานโรคแมลงได้ดี สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้เป็นอย่างดี ควรปลูกต้นฤดูฝนระหว่างเดือนพฤษภาคม – กรกฎาคม

ถั่วฮามาต้ามีคุณค่าทางอาหารสูง จะมีโปรตีนสูงเมื่ออายุน้อยและจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อต้นถั่วมีอายุมากขึ้น ถ้าจะตัดให้สัตว์กินหรือตัดทำหญ้าแห้งควรตัด เมื่อต้นถั่วอายุระหว่าง 45-60 วัน และไม่ควรเกิน 60 วัน เพราะช่วงนี้เป็นช่วงที่เหมาะที่สุด เพื่อจะได้ต้นถั่วที่ให้โปรตีนสูงประมาณ 17-18 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลผลิตน้ำหนักแห้งระหว่าง 1,425 - 1,838 กิโลกรัมต่อไร่ จะได้ถั่วที่สัตว์สามารถย่อยไปใช้ได้ร้อยละ 50 - 55 และย่อยเอาส่วนของโปรตีนไปใช้ได้ร้อยละ 65 - 69 ถ้าถั่วอายุมากกว่านี้ปริมาณผลผลิตอาจจะสูง แต่ลำต้นจะแข็งสัตว์ไม่ชอบกิน ใบจะร่วงเหลือน้อย มีผลทำให้คุณค่าทางอาหารลดลง ถ้าตัดเมื่ออายุน้อยจะได้คุณค่าทางอาหารสูงแต่จะได้ผลผลิตต่ำ

รัฐบาลใช้ถั่วฮามาต้าหว่านในบริเวณที่เพาะเลี้ยงสัตว์สาธารณะและป่าเสื่อมโทรม เพื่อปรับปรุงคุณภาพของพืชอาหารสัตว์พื้นเมือง ปรับปรุงบำรุงดินและป้องกันการชะล้างหน้าดิน สามารถใช้ถั่วฮามาต้าปลูกปนกับหญ้าได้หลายชนิดเพื่อปรับปรุงคุณภาพของหญ้า และใช้สำหรับตัดหรือปล่อยให้สัตว์ลงแทะเล็มเพื่อใช้เป็นอาหารหลักของโคและกระบือโดยตรง

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หมายถึงการนำเอาชิ้นส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ปลายยอด (shoot tip) ปลายราก (root tip) เนื้อเยื่อเจริญ (meristem) ใบเลี้ยง (cotyledon) ใบ (leaf) เมล็ด (seed) เอ็มบริโอ (embryo) อับเรณู (anther) เรณู (pollen) รังไข่ (ovary) ตาข้าง (axillary bud) และดอก (flower) มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยแร่ธาตุอาหารต่างๆที่พืชต้องการ ในสภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลอดเชื้อจุลินทรีย์และควบคุมปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น แสง, อุณหภูมิ และความชื้น เพื่อชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นหรือออกราก

Ian และ คณะ (1987) ได้ทำการทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงต้นถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata*) โดยทำการเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4 - D ความเข้มข้น 0.5 - 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 1.0 - 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีการเติม BAP ที่ไม่มี kinetin การชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ทำได้โดยเติมไซโตไคนินลงในอาหารเพาะเลี้ยง อาหารสูตร MS ที่มีการเติม BAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นต้นใหม่สูง การชักนำให้เกิดรากทำได้โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

Anuradha และคณะ (2006) ได้ทำการเพาะเลี้ยงถั่วลิสงในอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ร้อยละผลได้ของการเกิดเป็นต้นใหม่และค่าเฉลี่ยการเกิดยอดสูงสุด การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนทดลองของพืช พบว่า ในอาหารสูตร MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการเกิดยอดหลายยอดสูง มีร้อยละการเกิดเป็นต้นใหม่และค่าเฉลี่ยการเกิดยอดสูง

ฉัตรนภา และ คณะ (2543) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเขียวเพื่อการถ่ายยีน ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการชักนำให้เกิดยอดหลายยอดในถั่วเขียวพันธุ์ กพส.1 โดยใช้ส่วนยอดและส่วนของข้อใบเลี้ยงที่ยังมีใบเลี้ยงติดอยู่ทั้งคู่ ได้จากการนำเมล็ดแก่ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือมี kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นเวลา 2, 3, 4 และ 5 วัน แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MB (เกลือจากสูตร MS + ไวตามินจากสูตร B5) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ 2iP ที่ระดับความเข้มข้น 0 - 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทุกระดับมีการเติมและไม่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 5 วัน แล้วย้ายลงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MB ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ทำให้เกิดยอดหลายยอดได้ดี การชักนำให้เกิดราก พบว่าอาหารสูตร ½MB ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ส่วนขั้นตอนในการถ่ายยีนใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301 ที่มียีนgus A และ hygromycin resistance อยู่เป็นพาหะสำหรับถ่ายยีน

กาญจนา และ คณะ (2531) ได้ทำการศึกษาเรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเขียว โดยการชักนำให้เกิดยอดหลายยอดจากส่วน cotyledon ของถั่วเขียว 7 สายพันธุ์ พบว่าอาหารสูตร B5 ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2, 4, 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกระดับความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดได้ ซึ่งในแต่ละสายพันธุ์จะให้จำนวนยอดหลายยอดที่แตกต่างกันและระดับความเข้มข้นของ BAP ที่เหมาะสม คือ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบอายุของเมล็ด คือ 3, 6 และ 8 วัน พบว่า cotyledon ที่ได้จากเมล็ดอายุ 3 วัน จะเกิดยอดหลายยอดได้ดีที่สุด คือ 88.88 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 18 วัน หลังจากเริ่มเลี้ยง ส่วนการเพาะเลี้ยง อับละอองเรณูของถั่วเขียว 7 สายพันธุ์นี้บนอาหารสูตร MS และ ½MS ที่เติม kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้นระดับต่างๆ คือ 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถเกิดแคลลัสได้บนอาหารที่เติม kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4 -D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหาร 1/2 MS ให้ผลดีกว่า MS

2.3.1 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (รังสฤษฎ์, 2540)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทอย่างมากทั้งในด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐาน เกษตรกรรม การแพทย์ และอุตสาหกรรม ซึ่งจำแนกได้อย่างกว้างๆ ดังนี้

2.3.1.1 การขยายพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น โดยอาศัยสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิดสามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชได้เป็นทวีคูณ จากตัวอย่างการเลี้ยงพืชเพียงต้นเดียวและย้ายเนื้อเยื่อเดือนละครั้ง หากสามารถเพิ่มจำนวนได้เป็น 10 ต้นแล้ว ในระยะเวลาเพียง 6 เดือน จะสามารถผลิตต้นพืชได้ถึง 1,000,000 ต้น

2.3.1.2 การผลิตพืชที่ปราศจากโรค ปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการผลิตพืช คือ การเกิดโรคพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไมโครพลาสมาที่ติดมากับเมล็ดหรือส่วนขยายพันธุ์ต่างๆ ต้นพืชที่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรคเหล่านี้ หากไม่แสดงอาการให้เห็นจะทราบได้ต่อเมื่อเกิดอาการเป็นโรคบนต้นพืชที่ได้ปลูกไปแล้ว เมื่อถึงเวลานั้นก็ยากที่จะแก้ไขหรือป้องกัน นอกจากจะกำจัดหรือทำลายพืชนั้นทิ้งไป การใช้สารเคมีคลุกเมล็ดหรือส่วนขยายพันธุ์ก่อนปลูก แม้จะช่วยลดปริมาณเชื้อที่อาจติดกับผิวของวัสดุปลูกได้ แต่ไม่อาจใช้ได้ผลดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกรณีการปนเปื้อนของเชื้อโรคที่ติดมาภายในเซลล์พืชได้ การผลิตพืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะให้ต้นพืชที่ปราศจากโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเชื้อราและแบคทีเรีย เพราะหากมีเชื้อเหล่านี้แล้วจะแสดงอาการปนเปื้อนในอาหารที่ใช้เลี้ยงทันที เนื่องจากแบคทีเรียและเชื้อราเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในอาหารที่ใช้เลี้ยง ทำให้สามารถกำจัดทิ้งได้ ส่วนในกรณีของไวรัสซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็กมากและดำรงชีวิตอยู่ได้ในเซลล์พืช จึงมักไม่แสดงอาการปนเปื้อนให้เห็น แม้จะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็ตาม ในทางปฏิบัติจะต้องคัดเลือกและตรวจสอบเนื้อเยื่อก่อนการเลี้ยงจนแน่ใจว่าปลอดภัยจากเชื้อไวรัสนั้น ชิ้นส่วนของพืชที่ปลอดจากเชื้อไวรัสมากที่สุด คือ เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด (apical meristem) และเนื้อเยื่อของดัพภะ (embryonic tissue) ที่อยู่ในเมล็ด เนื่องจากเนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีส่วนของท่อลำเลียง (vascular tissue) ได้แก่ท่อน้ำ (xylem) และท่ออาหาร (phloem) ที่ติดต่อกับส่วนอื่นๆของต้นพืชที่เชื้อไวรัสจะสามารถเคลื่อนย้ายมาปนเปื้อนได้

2.3.1.3 การปรับปรุงพันธุ์พืช ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ทนทาน (tolerant plants) หรือสายพันธุ์ที่ต้านทาน (resistant plants) ได้จากการจัดเงื่อนไขของอาหารและสภาวะแวดล้อมของการเลี้ยง หรือชักนำการกลายพันธุ์ (induced mutation) โดยใช้รังสี หรือสารเคมี เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็มจากการเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อในหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดเลือกสายพันธุ์ทนดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดเลือกสายพันธุ์ทนร้อนโดยเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง การสร้างสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารพิษของโรค แมลง และสารเคมีกำจัดวัชพืช นอกจากนั้น จากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีการตัดต่อดีเอ็นเอ (DNA recombination) และการถ่ายยีน (gene transformation) ยังเปิดโอกาสให้ใช้ประโยชน์ในการสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ (transgenic plants) ที่ต้องการในพืชบางชนิด

2.3.1.4 การผลิตยาและสารเคมีจากพืช พืชบางชนิดให้สารที่มีคุณสมบัติเป็นยา หรือสารเคมีที่มีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม แต่ในกรณีเนื้อเยื่อที่นำมาสกัดสารดังกล่าวมีปริมาณที่น้อยมาก ต้องใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มจำนวนและชักนำให้มีการสังเคราะห์สารที่ต้องการในปริมาณที่มากขึ้น

2.3.1.5 การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์ พืชที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สามารถติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงในด้านเหล่านี้ได้ง่าย ชัดเจน และถูกต้องแม่นยำ ทั้งในระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และพืชทั้งต้น เช่น การศึกษาการตอบสนองของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อสารเคมีป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช สารเคมีป้องกันกำจัดวัชพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่เกิดจากการกลายพันธุ์ เป็นต้น เนื่องจากการควบคุมตัวแปรต่างๆทำได้ดีกว่าในสภาพการปลูกปกติ

2.3.1.6 การเก็บรักษาพันธุ์พืช ในปัจจุบันพืชพรรณหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์พืชที่หายากและมีคุณค่าทางประวัติศาสตร์หลายชนิดได้สูญพันธุ์ไป หรือกำลังจะสูญพันธุ์ไปในไม่ช้า สาเหตุสำคัญอาจมาจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม หรือเกิดจากการกระทำของมนุษย์เอง นอกจากนั้นพืชบางชนิดยังยากที่จะขยายพันธุ์หรือเก็บรักษาพันธุ์ได้โดยวิธีปกติ ซึ่งอาจต้องใช้ระยะเวลาที่นานและไม่คุ้มค่า นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงได้คิดค้นวิธีเก็บรักษาพันธุ์พืชต่างๆไว้ในสภาพหลอดทดลอง โดยเลี้ยงไว้ในอาหารที่มีส่วนผสมของสารบางชนิดที่มีผลต่อการชะลอการเจริญเติบโต หรือมีสารที่ทำให้เกิดสภาพขาดน้ำ (water stess) เพื่อชักนำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามากๆ เป็นการประหยัดเวลา แรงงาน ค่าใช้จ่าย และสามารถคงสภาพมีชีวิตได้ยาวนาน เนื่องจากไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้งเช่นปกติ อีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย คือการเก็บรักษาเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชไว้ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อต้องการปลูกหรือเพิ่มปริมาณ ก็นำมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงปกติของพืชนั้นๆ

2.3.2 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมต่อชนิดของพืชตลอดจนชนิดและสภาพของชิ้นส่วนพืช (explant) ที่จะนำมาเลี้ยง อย่างไรก็ตามอาหารที่นิยมใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากที่สุด คือ อาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้ได้ดีในการเลี้ยงกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส เป็นกลุ่มของเซลล์ที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา (differentiated) มีช่องว่างในเซลล์จำนวนมาก (highly vacuolated) และเซลล์ยังไม่มีการจัดรูปร่างที่แน่นอน (unorganized) ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงแคลลัส (callus culture) และเซลล์แขวนลอย (cell-suspension culture) ของพืชส่วนใหญ่เกือบทุกชนิดทำได้ง่ายกว่าการเลี้ยงจากส่วนอื่นๆ แคลลัสเหล่านี้ได้จากการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium) ที่อย่างน้อยที่สุดต้องประกอบด้วยเกลือของธาตุอาหารที่ต้องพืชต้องการครบ คือ สารประกอบอนินทรีย์ (inorganic substances หรือ inorganic salts) และสารประกอบอินทรีย์ (organic substances) ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แม้พืชทุกต้นจะมีความต้องการขั้นพื้นฐานในการเจริญเติบโตไม่ซับซ้อนมากนักก็ตาม แต่การนำชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นั้น มีความต้องการธาตุอาหารสารบางอย่างที่จำเป็นที่มีความซับซ้อนมากกว่า และมีลักษณะเป็น seldom autotrophic กล่าวคือ ต้องใช้ทั้งธาตุและจุลธาตุที่ใช้ตามปกติในการเลี้ยงพืชในสารละลาย (hydropronic culture) นอกจากนั้นยังต้องการธาตุอาหารอื่นๆ เช่น แหล่งของธาตุคาร์บอน และวิตามิน ปกติแล้วเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่แยกออกมาเลี้ยงจะต้องการวิตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) ต่างๆ ซึ่งปกติสังเคราะห์ได้เองจากส่วนหนึ่งของต้น เพื่อไปสะสมไว้ยังอีกส่วนหนึ่งของต้นพืชแล้วเคลื่อนย้ายไปยังส่วนอื่นๆ เพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม อย่างไรก็ตามผลของแต่ละสารประกอบที่จำเป็นนี้ยังไม่เป็นที่ทราบชัดสมบรูณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของสารที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึม เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารที่ใช้มักถูกดัดแปลงไปตามความมุ่งหมาย เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงพัฒนาเป็นอวัยวะ (organogenesis) และการกำเนิดคัพภะ (embryogenesis) จึงทำให้ยากต่อการหาข้อสรุปพื้นฐานที่สอดคล้องไปในทางเดียวกัน โดยทั่วไปแล้วสามารถจำแนกสารเหล่านี้เป็นกลุ่มๆ ได้ดังนี้

2.3.2.1 ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์ (Inorganic substances) ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก (macronutrients) ได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และซัลเฟอร์ (S) แร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการในปริมาณมากและขาดไม่ได้ โดยทั่ว ไปพืชต้องการในปริมาณ 25 - 60 มิลลิโมลาร์ หรือมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย (micronutrients) ได้แก่ เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) โคบอลต์ (Co) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) โมลิบดินัม (Mo) และโบรอน (B) โดยทั่วไปพืชต้องการในปริมาณน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3.2.2 ธาตุอาหารพวกอินทรีย์ (organic substances) สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon source) ใช้เป็นแหล่งในการให้พลังงาน มักเป็นสารประกอบพวกน้ำตาลต่างๆ ปกติใช้น้ำตาล 20 - 40 กรัม หรือร้อยละ 2-4 สำหรับการเตรียมอาหาร 1 ลิตร น้ำตาลที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ส่วนใหญ่ได้แก่ กลูโคส (glucose) ฟรุกโตส (fructose) แมนนิทอล (mannital) ซูโครส (sucrose) และมอลโทส (maltose)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.3 วิตามิน (vitamin) ที่ใช้กันมาก ได้แก่ ไทอามีนไฮโดรคลอไรด์ (thiamine-HCl) อินโนสิทอล (inositol) ไนอะซิน (niacin) ไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์ (pyridoxine-HCl) ไบโอติน (biotin) กรดแพนโทเธอนิก (pantothenic acid) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) กรดฟอลิก (foric acid) แคลเซียมแพนโทเธอเนต (calcium pantothenate) ไซยาโนโคบาลามิน (cyanocobalamine) โคลีนคลอไรด์ (choline chloride) และไรโบฟลาวิน (riboflavin)

2.3.2.4 กรดอะมิโนและเอไมด์ (Amino acid and Amides) มีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช ความต้องการกรดอะมิโนของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงสามารถคำนวณได้โดยผันแปรกับปริมาณการเติมโปรตีนไฮโดรไลเซท (protein hydrolysate) เช่น เคซีนไฮโดรไลเซท (caseinhydrolysate) กรดอะมิโนและเอไมด์ที่ใช้แพร่หลายและได้ผลดี คือ อาร์จีนีน (L-argenin) กรดแอสปาร์ติค (L-aspartic acid) แอสปาราจีน (L-asparagine) กรดกลูตามิค (L-glutamic acid) และ กลูตามีน (L-glutamine)

2.3.2.5 ไนโตรเจนเบส (Nitrogen bases) สารประกอบพวกไนโตรเจนเบส กรดไซทิไดลิค (cytidylic acid) และกรดกัวไนลิค (guanylic acid) มีส่วนกระตุ้นการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เลี้ยง

2.3.2.6 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulators) ได้แก่ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่างๆ มีทั้งที่สังเคราะห์เองได้และมนุษย์สังเคราะห์ขึ้น ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตเหล่านี้ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช ช่วยเร่งการแบ่งเซลล์ และการขยายตัวของเซลล์ สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ได้ดังนี้

1 สารในกลุ่มออกซิน (auxin) มีส่วนช่วยชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์และการรวมเป็นกลุ่มของแคลลัส เช่น กรด 3-อินโดลอะเซติก (3-indolacetic acid) กรดแอลฟาแนพธาลีนอะเซติก (α- naphthalene acetic acid) กรด 2,4 - ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก (2,4 – dichlorophenoxyacetic acid) กรด 2,4,5 – ไตรคลอโรฟีนอกซีอะซีติก (2,4,5 – trichlorophenoxyacetic acid) และกรด 3-อินโดลบิวไทริค (3 – idolbutyric acid)

2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinin) เป็นอนุพันธ์ของอะดีนีน (adenine) สามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขณะที่มีออกซินผสมอยู่ด้วย และสามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในพืชที่กำลังเป็นโรคปุ่มปม สารพวกนี้ที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ 6 – ฟัลเฟอริลอะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิโนพิวรีน (6 - furferylaminopurine) 6 – เบนซิลอะมิโนพิวรีน (6 – benzylaminopurine) 2 – ไอโซเพนทีนิลอะมิโนพิวรีน (2 – isopenntenyl aminopurine) และซีเอทิน (zeatin)

3 สารในกลุ่มจิบเบอร์เรลลิน (gibberellins) สารกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้น้อย ที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ กรดจิบเบอร์เรลลิค (gibberellic acid) สังเคราะห์จากกรดเมวาโลนิค (mevalonic acid) ในเนื้อเยื่อพืชหรือในเอ็มบริโอที่มีการเจริญเกิดขึ้น

2.3.2.7 สารประกอบอื่นๆ เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน (coconut milk) น้ำมะเขือเทศ (tomato juice) และ น้ำมันฝรั่ง (potato juice) เป็นต้น

แม้พืชทุกชนิดโดยปกติต้องการธาตุอาหารหลักที่เหมือนกัน แต่จะต้องการในปริมาณความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช มีความต้องการที่แตกต่างกันอย่างมาก

2.3.3 ข้อควรคำนึงในการเตรียมอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.3.3.1 ชนิดและสายพันธุ์ (species and cultivars) พืชต่างชนิดและต่างสายพันธุ์ ส่วนใหญ่มักต้องการธาตุอาหารที่ไม่เหมือนกัน

2.3.3.2 อายุและระยะการพัฒนา (age and stage of development) แม้เป็นพืชชนิดและสายพันธุ์เดียวกัน ถ้าอายุและระยะการพัฒนาต่างกัน ก็อาจจะต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน

2.3.3.3 ชนิดของชิ้นส่วนพืช (explant materials) พืชชนิดเดียวกัน หรือแม้กระทั่งต้นเดียวกัน แต่ใช้ชิ้นส่วนของพืชจากส่วนต่างๆกัน เช่น ใช้ส่วนยอดมาเลี้ยงจะต้องใช้สูตรอาหารสูตรหนึ่งที่แตกต่างไปจากสูตรที่ใช้เลี้ยงชิ้นส่วนของรากหรือใบ

2.3.3.4 เป้าหมายของการเพาะเลี้ยง (target of culture) พืชชนิดเดียวกันและชิ้นส่วนเดียวกัน แต่มีเป้าหมายของการเลี้ยงที่แตกต่างกัน จำเป็นต้องใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกันด้วย เช่น ต้องการเลี้ยงให้เกิดเป็นยอดก็ใช้อาหารสูตรหนึ่งที่แตกต่างไปจากสูตรที่ต้องการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสหรือเกิดราก

2.3.3.5 สถานะของอาหาร (state of media) ชิ้นส่วนพืชเดียวกันที่เลี้ยงในอาหารแข็ง อาจได้ผลที่แตกต่างไปจากการเลี้ยงในอาหารเหลวหรืออาหารกึ่งแข็ง

2.3.4 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เนื่องจากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละสูตร ประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดซึ่งมีคุณสมบัติและข้อจำกัดแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องจัดแบ่งสารเหล่านี้ออกเป็นกลุ่ม ด้วยเหตุผลคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4.1 สารเคมีบางชนิดใช้ในปริมาณที่น้อยมาก ทำให้ต้องใช้เครื่องชั่งที่มีความละเอียดมากๆ และอาจมีความคาดเคลื่อนได้ง่าย ดังนั้นในทางปฏิบัติจะใช้วิธีเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าที่ใช้จริงหลายเท่า (ประมาณ 50 - 1,000 เท่า) ซึ่งทำให้เตรียมได้ง่ายขึ้น และเรียกสารละลายที่เตรียมได้นี้ว่า stock solution

2.3.4.2 สารเคมีบางชนิดอาจทำปฏิกิริยากับสารอื่น เกิดเป็นสารประกอบที่ไม่ต้องการหรือเป็นพิษ ดังนั้นในแต่ละกลุ่มของสารละลายเข้มข้น (stock solution) จึงต้องเป็นสารที่อยู่ร่วมกันได้

2.3.4.3 สารเคมีบางชนิด หากอยู่ร่วมกับสารอื่นๆจะไม่ละลาย ละลายได้เล็กน้อย หรือละลายได้ไม่หมด จึงจำเป็นต้องแยกกลุ่มออกต่างหาก

2.3.5 ขั้นตอนการเตรียมอาหาร

2.3.5.1 ดูดสารละลายจาก Stock solution ต่างๆมารวมกัน โดยใช้ปริมาตรที่คำนวณไว้

2.3.5.2 เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส แต่อาจดัดแปลงใช้กลูโคส หรือฟรุกโตส แล้วแต่สูตรอาหารที่ใช้

2.3.5.3 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือสารเคมีอื่นๆตามความต้องการของสูตรอาหาร

2.3.5.4 ปรับปริมาตรสารละลายอาหารให้ได้ครบตามที่ต้องการเตรียม

2.3.5.5 ปรับค่าความเป็นกรดและด่างด้วยกรดเกลือ (HCl) และ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ให้ได้ค่าความเป็นกรดและด่างประมาณ 5.6 - 5.8

2.3.5.6 เติมวุ้น (agar) ในกรณีเตรียมอาหารแข็งหรืออาหารกึ่งแข็ง

2.3.5.7 เคี่ยวอาหารเพื่อหลอมละลายวุ้น

2.3.5.8 เทอาหารลงในภาชนะที่จะใช้เลี้ยง เช่น ขวด หลอดทดลอง และ จานแก้ว เป็นต้น

2.3.5.9 นำภาชนะที่ใส่อาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็นลง

ทุกส่วนของพืชที่ประกอบด้วยเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ แต่ความสามารถในการเจริญเติบโตอาจแตกต่างกัน เพราะเซลล์แต่ละชนิดมีความตื่นตัว (active) ไม่เท่ากัน เนื้อเยื่อพืชที่มีเซลล์ตื่นตัวมากที่สุด คือ เนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.6 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อ (Sterilization techniques)

ปัญหาสำคัญอีกประการหนึ่งของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก็คือ การทำให้ชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาทำการเพาะเลี้ยงให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากในสภาพธรรมชาติแล้ว ส่วนต่างๆของพืชจะมีเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆติดอยู่ ไม่ว่าจะเป็นเชื้อรา หรือแบคทีเรีย อันเป็นตัวการสำคัญของการปนเปื้อน (contaminate) ในอาหารเพาะเลี้ยงเพราะเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวนั้น สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และจะทำให้อาหารเน่าเสียอย่างรวดเร็ว ชิ้นส่วนพืชก็จะเน่าตายไปด้วย

มีสารเคมีหลายชนิดและวิธีการต่างๆที่ใช้ในการทำความสะอาดตัวอย่างพืชให้มีความปลอดเชื้อ ซึ่งผู้ทำการเพาะเลี้ยงต้องใช้ดุลยพินิจในการเลือกใช้ให้เกิดความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชและประสิทธิภาพที่จะได้รับ ซึ่งมีแนวทางในการเลือกใช้ดังนี้

2.3.6.1 มีประสิทธิภาพดี ให้เปอร์เซ็นต์ความปลอดเชื้อสูง

2.3.6.2 ราคาไม่แพง และหาซื้อได้ง่าย

2.3.6.3 เตรียมได้ง่าย ไม่มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก

2.3.6.4 ไม่เป็นอันตราย หรือมีอันตรายน้อยที่สุดต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคนและชิ้นเนื้อเยื่อพืช

2.3.7 สารเคมีต่างๆที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างพืช มีดังนี้

2.3.7.1 แคลเซียมไฮโปคลอไรด์ ($Ca(OCl)_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 9 - 10 เวลาที่ใช้ประมาณ 5 - 30 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.3.7.2 โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 0.25 – 2.63 เวลาที่ใช้ประมาณ 5 - 30 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.3.7.3 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 10 - 12 เวลาที่ใช้ประมาณ 5 - 15 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

2.3.7.4 คลอรอกซ์ (Chlorox) เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้กันทั่วไปตามบ้านเรือน ที่จริงแล้วก็คือสารละลายที่มีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรด์นั่นเอง ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 5 - 10 เวลาที่ใช้ประมาณ 5 - 20 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.3.7.5 สารละลายโบรไมด์ (Bromide water) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 1 - 2 เวลาที่ใช้ประมาณ 2 - 10 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.3.7.6 ซิลเวอร์ไนเตรท ($Ag(NO_3)_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 1 เวลาที่ใช้ 5 - 30 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.7.7 สารละลายไอโอดีน (Iodine water) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 3 เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

2.3.7.8 เมอคิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 0.1 – 1.0 เวลาที่ใช้ประมาณ 2 - 10 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีพอสมควร

2.3.7.9 เมอคิวริกไอโอไดด์ (HgI_2) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 0.5 เวลาที่ใช้ 30 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

2.3.7.10 เมอคิวริกโบรไมด์ ($HgBr_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 0.5 เวลาที่ใช้ประมาณ 30นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

2.3.7.11 แอลกอฮอลล์ (Alcohol) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 70 - 95 เวลาที่ใช้ 2 - 5 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

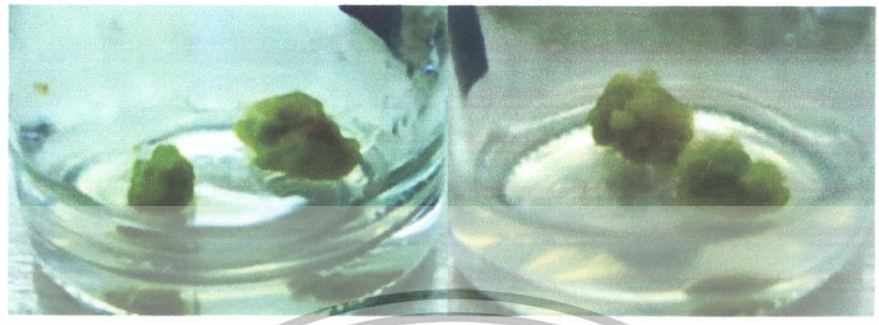
2.3.7.12 กรดกำมะถันหรือกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณร้อยละ 20 - 70 เวลาที่ใช้ 5 - 20 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

นอกจากนี้ยังมีเทคนิคอื่นๆ ในการฆ่าเชื้อโดยใช้สารเคมี เช่น การอาบด้วยแสงอัลตราไวโอเลต หรือที่เรียกกันว่าแสง UV การเผาไฟใช้กับตัวอย่างแข็งๆ เช่น เมล็ด ท่อนไม้ เป็นต้น

2.4 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (ประศาสตร์, 2538)

แคลลัส (callus) หมายถึง เซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) แต่เพียงอย่างเดียว มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอลจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ (carotenoids) และฟลาโวทีนอยด์ (flavotenoids) หรือสีม่วงจากแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมของเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสง แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น เรียกว่า compact callus แต่ถ้าเกาะกันอย่างหลวมๆ เรียกว่า friable callus (รังสฤษฎ์, 2541) ชิ้นส่วนพืชเกือบทุกชนิดจากอวัยวะต่างๆ สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่โดยทั่วไปแล้วเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูงสุดในพืชใบเลี้ยงคู่ได้จากส่วนของคัพภะ ใบเลี้ยง ส่วนที่อยู่เหนือใบเลี้ยง ส่วนที่อยู่ใต้ใบเลี้ยง และราก ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้จากส่วนของคัพภะ ใบอ่อน ปลายยอด ดอกอ่อน และส่วนของเมล็ดที่เริ่มงอกจะให้ผลดีที่สุด เนื้อเยื่ออื่นๆ ของพืชที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ คือ แคมเบียม (cambium) คอร์เทค (cortex) ไส้หรือแกนลำต้น (pith) ท่อลำเลียงอาหาร (pholoem vessels) ไซเลมพาเรนไคมา (xylem parenchyma) และเอ็นโดสเปิร์ม (endosperm) (รูปที่ 2.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 แคลลัสของถั่วคาวาสเคดและถั่วฮามาต้า

2.4.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืชที่ใช้เพาะเลี้ยง

ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ควรมีสภาพเหมาะต่อการชักนำการเกิดแคลลัส กล่าวคือเป็นชิ้นส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญจากเนื้อเยื่อที่มีอายุน้อย ในทางปฏิบัตินิยมใช้เนื้อเยื่อจากเมล็ดที่เพาะให้งอกในสภาพปลอดเชื้อให้เกิดส่วนราก ยอด และใบอ่อน ในกรณีของเนื้อเยื่อพิเศษ เช่น แคมเบียม เอ็น โดสเปิร์ม หรือไส้นั้น การเพิ่มจำนวนแคลลัสจะขึ้นอยู่กับเวลาของการแยกเนื้อเยื่อมาใช้ ส่วนของลำต้นของไม้เนื้อแข็งจะให้ชิ้นส่วนที่ยากต่อการชักนำการเกิดแคลลัส โดยทั่วไปแล้วเมล็ดเป็นแหล่งที่ดีที่สุดในการให้ชิ้นส่วนพืชเพื่อเลี้ยงเป็นแคลลัส เนื่องจากสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยตรง โดยเฉพาะเมล็ดบนอาหารวุ้นที่เติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเมล็ดให้งอกในอาหารวุ้นที่ปราศจากหรือมีสารกระตุ้นการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย จะชักนำให้เกิดส่วนของราก ยอด และใบที่ปลอดเชื้อ ซึ่งสามารถใช้เป็นชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงแคลลัสต่อไป และสามารถแยกเอาส่วนของรากและปลายยอดออกจากเมล็ดได้โดยตรง

จากแคลลัสที่เกิดขึ้นอาจเกิดเป็นแคลลัสไปเรื่อยๆ หรืออาจมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะต่างๆในภายหลัง แคลลัสที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีลักษณะที่ต่างกัน 2 แบบ

Friable callus เป็นแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ที่เกาะกลุ่มกันอย่างหลวมๆ มักไม่เปลี่ยนเป็นอวัยวะ สามารถแยกออกจากกันได้ง่าย เมื่อมีออกซิเจนในความเข้มข้นสูง หรือมีความเข้มข้นของไซโทไคนินที่ต่ำลง และยังสามารถนำไปทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

Dense หรือ Compact callus เป็นแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ที่เกาะกลุ่มกันแน่น มักเจริญต่อไปเป็นอวัยวะ

พืชที่เกิดจากแคลลัสมักมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงแคลลัสไปนานๆและการเปลี่ยนแปลงเป็นการถาวร ซึ่งเป็นลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปยังรุ่นลูกได้ ลักษณะนี้อาจเป็นทางกายภาพและสัณฐาน เช่น การเกิดสายพันธุ์กลายที่ไม่ต้องการสารเร่งการเจริญเติบโต ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรียกว่า habituation มีความอ่อนแอหรือต้องการสารเคมีบางอย่าง การเจริญเติบโตที่เปลี่ยนไป และมีองค์ประกอบภายในเซลล์ที่ผิดไป เช่น มีเม็ดสีเปลี่ยนไป เป็นต้น

หลังจากเลี้ยงแคลลัสในอาหารไปสักระยะหนึ่งจำเป็นต้องแบ่งย้ายเนื้อเยื่อ (subculture) เพราะว่าอาหารถูกใช้หมดไป นอกจากนี้เซลล์จะขับถ่ายของเสียออกมาและเป็นพิษต่อเซลล์เอง แคลลัสจะหยุดการเจริญเติบโต การเปลี่ยนอาหารใหม่ควรทำทุกๆ 4 – 6 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ถ้าเลี้ยงในอาหารเหลวอาจเปลี่ยนบ่อยกว่านี้ เช่น ทุกๆ 1 – 2 สัปดาห์ ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งต้องการย้ายอาหารประมาณทุกๆ 3 สัปดาห์ ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์อยู่ในระยะ deceleration phase

2.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัส

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือเอ็มบริโอให้เจริญเป็นแคลลัสมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

2.4.2.1 ขนาดและรูปร่าง (size and shape) ของชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้เลี้ยงในพืชทั่วไปมักจำเป็นต้องใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาดค่อนข้างเล็กแต่ไม่ถึงกับเล็กเกินไป ถ้าชิ้นส่วนมีขนาดเล็กเกินไปไม่สามารถชักนำทำให้เกิดแคลลัสได้ เนื่องจากเปอร์เซ็นต์การถูกกระทบกระเทือนขณะแยกเนื้อเยื่อจะสูง หากตัดชิ้นส่วนให้มีขนาดเล็กมากในพืชบางชนิด

2.4.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) โดยเฉพาะออกซินและไซโตไคนิน สัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองกลุ่มนี้มีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์ ถ้าสัดส่วนของออกซินมากกว่าไซโตไคนินชิ้นส่วนนั้นจะพัฒนาไปเป็นยอดหรือลำต้น ถ้าสัดส่วนของออกซิน ต่ำกว่าไซโตไคนินชิ้นส่วนนั้นพัฒนาไปเป็นราก และหากสัดส่วนของออกซินและไซโตไคนิน สมดุลกัน ชิ้นส่วนนั้นจะพัฒนาไปเป็นแคลลัส ความเข้มข้นของออกซินที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อต่างๆอยู่ใน ช่วง 0.01 – 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนความเข้มข้นของไซโตไคนินที่ใช้อยู่ในช่วง 0.01 – 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.4.2.3 ธาตุอาหาร (nutrients) นอกจากธาตุอาหารที่เป็นส่วนประกอบหลักๆทั่วไปของสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้ว อาหารเสริมของพวกกรดอะมิโน เช่น กลูตามิน กรดแอสปาติก สารพวกเคซีน ไฮโดรไซเลท และน้ำมันมะพร้าว มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดแคลลัสในพืชบางชนิดด้วย

2.4.2.4 แหล่งคาร์บอน (carbon sources) ที่สำคัญ ได้แก่ น้ำตาลซูโครส หรือแซคคาโรส ความเข้มข้นร้อยละ 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
83985

2.4.2.5 ปัจจัยสิ่งแวดล้อม (environmental facters) โดยเฉพาะแสงที่ต้องการความเข้มข้นต่ำหรือไม่ใช้แสงเลย อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังต้องการออกซิเจนเพื่อหายใจด้วย

2.4.2.6 สภาพอาหาร (media status) แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารแข็งหรืออาหารกึ่งแข็งมักจะเจริญเติบโตได้น้อยและช้ากว่าในอาหารเหลว เนื่องจากมีพื้นที่สัมผัสกับอาหารได้น้อยกว่าและตำแหน่งที่ชิ้นส่วนของแคลลัสสัมผัสกับอาหารที่มีของเสียจากเมตาบอลิซึม (metabolic waste) ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ จะมีผลต่อการเจริญเติบโต

2.4.3 ข้อควรพิจารณาในการเลี้ยงแคลลัส

ในการชักนำให้เกิดแคลลัส ชิ้นส่วนพืชที่ปลอดเชื้อถูกนำไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งและต้องการเทคนิคการกดเพียงเบาๆให้ชิ้นส่วนดังกล่าวจมลงไปในวุ้นเพียงเล็กน้อย เพื่อให้เนื้อเยื่อสัมผัสกับอาหารได้ดียิ่งขึ้น ถ้าเป็นส่วนปลายรากจะเกิดแคลลัสได้ดียิ่งขึ้น ถ้าวางแนวราบลงบนอาหาร ขณะที่ชิ้นส่วนที่ตัดมาจากลำต้นควรวางในแนวตั้งให้ปลายที่อยู่ตัดจมอยู่ในวุ้น ปิดฝาจานด้วยแผ่นพาราฟิลม์ เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำแต่อากาศที่มีออกซิเจนสามารถผ่านเข้าไปได้ ปกติควรเพาะเลี้ยงในที่มืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เหมาะสมชิ้นส่วนพืชจะสร้างแคลลัสมากพอสำหรับแบ่งและเปลี่ยนอาหารใหม่ ภายใน 3 – 8 สัปดาห์ ปกติการเปลี่ยนอาหารกระทำทุกๆ 4 สัปดาห์ และแคลลัสจากพื้นที่ประมาณ 4 ตารางเซนติเมตร ควรแยกออกได้ 8 -10 ชิ้น

2.4.4 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงแคลลัส

2.4.4.1 การขยายพันธุ์ (micropropagation) โดยชักนำให้เกิดเป็นต้นที่ปราศจากโรคจำนวนมาก

2.4.4.2 การผลิตโปรโตพลาสต์ (protoplast) แคลลัสเหมาะอย่างยิ่งในการนำไปย่อยผนังเซลล์ เนื่องจากมีสภาพปลอดเชื้ออยู่แล้วและเซลล์ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา

2.4.4.3 การผลิตสารเคมีที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึม (secondary metabolites) ซึ่งบางชนิดสามารถนำไปใช้งานทางการแพทย์และอุตสาหกรรมได้

2.4.4.4 ผลิตพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด (polyploids) โดยใช้สารโคลชิซินชักนำ

2.4.4.5 การผลิตพืชทนทานหรือพืชต้านทาน (tolerant and resistant plants) เช่น ทนทานต่อสภาพดินเค็ม ดินเปรี้ยว อากาศร้อนหรือหนาว หรือต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ต้านทานต่อโรคและสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส

2.4.4.6 การเก็บรักษาพันธุกรรมพืช (cryopreservation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การพัฒนาเป็นยอดและราก (ประศาสตร์, 2538)

โดยทั่วไปในกลุ่มเซลล์ของเนื้อเยื่อพืชจะมีสมบัติอย่างหนึ่งที่เรียกว่า totipotency ซึ่งจะหมายถึงความสามารถของเซลล์ทุกส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่จะสามารถเจริญเติบโตไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ซึ่งคุณสมบัติข้อนี้ไม่พบในเซลล์สัตว์

ในกรณีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยอาหารสังเคราะห์ในสภาวะที่เหมาะสม เช่น มีสารอาหารสังเคราะห์ที่สมบูรณ์ น้ำ แสงสว่าง ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และอุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นต้น จากคุณลักษณะที่ดีนี้สามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชได้อย่างรวดเร็ว และยังได้ต้นใหม่ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ทุกประการ

การเจริญของเนื้อเยื่อพืชสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดหรือรากได้ โดยแบ่งการพัฒนาไป เป็นยอดหรือรากได้ 2 กระบวนการ ดังนี้

กระบวนการเกิดออร์แกโนเจนเนซีส (Organogensis) คือ การพัฒนาไปเป็นยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆ โดยการรวมตัวกันของกลุ่มเซลล์พาเรนไคมาที่อยู่ใกล้เคียงกันเป็นเนื้อเยื่อเจริญ ซึ่งจะประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดเล็ก ช่องว่างภายในเซลล์เล็ก และมีไซโตพลาสซึมที่มีความหนาแน่นมาก กลุ่มเซลล์จะมีการแบ่งเซลล์อยู่ตลอดเวลา กลุ่มเซลล์เหล่านี้อาจเรียกว่า meristemoid ซึ่งสามารถเจริญต่อไปกลายเป็นจุดกำเนิดของยอดหรือราก (shoot or root primodia) และการเกิดเป็นยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆ จะเป็นอิสระต่อกัน ไม่มีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน ขึ้นอยู่กับว่าเนื้อเยื่อเจริญนั้นได้รับสิ่งกระตุ้นให้เจริญไปเป็นเนื้อเยื่อใด

กระบวนการเกิดเอ็มบริโอเจนเนซีส (Embryogenesis) คือ การพัฒนาไปเป็นยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆ โดยเกิดจากกลุ่มเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอ ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เป็นขั้นตอนเริ่มต้น เกิดจากไซโกตแบ่งเป็นเซลล์ 2 เซลล์ (proembryo) เซลล์ที่มีขนาดเล็กจะอยู่ด้านบน เรียกว่า apical cell ส่วนเซลล์ขนาดใหญ่อยู่ด้านล่าง เรียกว่า basil cell มีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า globular shaped embryo

ขั้นตอนที่ 2 กลุ่มเซลล์ globular shaped embryo มีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ heart shape embryo

ขั้นตอนที่ 3 กลุ่มเซลล์ heart shaped embryo มีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์ torpedo – shaped embryo

ขั้นตอนที่ 4 เป็นขั้นตอนสุดท้าย กลุ่มเซลล์ torpedo – shaped embryo จะมีการพัฒนาไปเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอ็มบริโอ ซึ่งในขั้นตอนนี้กลุ่มเซลล์สามารถจะเจริญเป็นยอดและรากพร้อมกัน โดยเนื้อเยื่อด้านบนของเอ็มบริโอจะเจริญไปเป็นยอด และเนื้อเยื่อด้านล่างของเอ็มบริโอ คือส่วนที่สัมผัสกับอาหารจะเจริญไปเป็นราก

2.6 ขั้นตอนการปลูกและดูแลพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ปริมาณมากในอาหารสูตรที่เหมาะสมแล้ว โดยทั่วไปต้นพืชเหล่านั้นจะออกรากและย้ายปลูกในโรงเรือนเพื่อให้พืชตั้งตัวได้ รอปลูกในกระถางหรือในแปลงต่อไป

1 นำต้นพืชที่ออกรากไว้ในโรงเรือนก่อนย้ายปลูกประมาณ 3-5 วัน
2 คลายฝาขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก่อนจะย้ายปลูกพืชประมาณ 1-2 วัน เพื่อให้ความชื้นสัมพัทธ์ในขวดลดลง
3 ใช้ปากคีบหรือลวดปลายงอดึงต้นพืชที่แข็งแรงและมีรากที่สมบูรณ์ออกจากขวด แต่ต้องระวังอย่าให้ต้นช้ำ
4 ล้างวุ้นออกจากรากพืชให้สะอาดและแช่ยาเพื่อป้องกันกำจัดเชื้อรา
5 ปลูกพืชในภาชนะปลูกที่บรรจุวัสดุปลูกไว้แล้ว วัสดุปลูกที่ใช้คือ ทราย : ขุยมะพร้าว : ขี้เถ้าแกลบ ประมาณ 1:1:1
6 รดน้ำเพื่อให้ความชื้นแก่ต้นพืชหลังปลูกเสร็จใหม่ๆ
7 นำต้นพืชที่เพิ่งย้ายปลูกเก็บในถุงพลาสติกห่อหุ้ม หรือกระโจมเพื่อรักษาความชื้นไว้ในระบบปิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 พันธุ์พืช

3.1.1 ถั่วคาวาลเคด (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade)

3.1.2 ถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata* cv. Verano)

ถั่วทั้งสองสายพันธุ์ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ จังหวัดชัยนาท

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog 1962)

3.2.2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS (Murashige and Skoog)

3.2.3 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายคลอรอกซ์ (Clorox) 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์

3.2.4 สารลดแรงตึงผิว ได้แก่ ทวีน-20 (Tween-20)

3.2.5 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), N^6 benzyladenine (BA) และ Indole-3-butyric acid (IBA)

3.2.6 แอลกอฮอลล์ (Alcohol) ร้อยละ 70 และ 95

3.2.7 วุ้น (Agar) 7 กรัมต่อลิตร

3.2.8 น้ำตาลซูโครส (Sucrose) 30 กรัมต่อลิตร

3.2.9 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 โมล หรือ 1 โมล

3.2.10 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 โมล หรือ 1 โมล

3.2.11 น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

3.2.12 ยาฆ่าเชื้อรา

3.2.13 ดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์ เครื่องแก้ว และเครื่องมือต่างๆ

3.3.1 บีกเกอร์ (Beaker)

3.3.2 ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร (Pipette)

3.3.3 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Bottle)

3.3.4 แท่งแก้วคน (Glass stirrer)

3.3.5 จานแก้ว และ จานแก้วที่มีกระดาษทิชชู (Petri dish)

3.3.6 กระบอกตวง (Cylinder)

3.3.7 มีดผ่าตัดและด้ามมีด (Knives and Scalpel)

3.3.8 ปากคีบ (Forceps)

3.3.9 อะลูมิเนียมฟลอยด์ (Aluminum foil)

3.3.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Bunsen burner)

3.3.11 ไมโครเวฟ (Microwave oven)

3.3.12 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air-flow carbinet)

3.3.13 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

3.3.14 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและหยาบ (Balance)

3.3.15 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

3.3.16 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.3.17 กล้องถ่ายรูปดิจิตอล (Digital camera)

3.3.18 โกร่งและที่บด (Mortar and Pestle)

3.3.19 ช้อนตักสารเคมี (Spatula)

3.3.20 ตะแกรงสแตนเลส (Rack)

3.3.21 ลูกยางสำหรับใช้กับปิเปต (Rubber bulb)

3.3.22 กระดาษชั่งสาร (Paper wax)

.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมะสมสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อ

ก่อนการฟอกฆ่าเชื้อของถั่วฮามาต้าให้นำมาบดเอาเปลือกหุ้มออก จากนั้นนำเอาเมล็ดถั่วฮามาต้าที่อยู่ภายในและเมล็ดถั่วคาวาลเคดมาล้างด้วยน้ำสะอาด ฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับทวีน - 20 ประมาณ 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลาต่างกัน คือ 5, 10, 15 และ 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตักเมล็ดถั่วใส่ในเพลทที่มีกระดาษทิชชูเพื่อทำให้แห้ง จากนั้นใช้ปากคีบลงอาหารเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้

3.4.2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำไฮโปคอทิลให้เจริญเป็นแคลลัสด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4 - D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

นำไฮโปคอทิลที่ได้จากต้นถั่วคาวาเคดและถั่วฮามาต้าที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยตัดแต่ละส่วนของไฮโปคอทิลเป็นท่อนๆ ยาวประมาณ 0.5 - 1 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลซูโครสปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร และวุ้นปริมาณ 7 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใส่ไฮโปคอทิลแล้วไปไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 – 28 องศาเซลเซียส นาน 10 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 14 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 14 วัน

3.4.3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.4.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลซูโครสปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร และวุ้นปริมาณ 7 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใส่แคลลัสแล้วไปไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีแสงสว่างจากหลอดฟลูออ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรสเซนต์ที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 – 28 องศาเซลเซียส นาน 10 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 14 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 14 วัน

3.4.4 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำต้นใหม่ให้เกิดรากด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

นำต้นใหม่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.4.3 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลซูโครสปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร และวุ้นปริมาณ 7 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใส่ต้นใหม่แล้วไปไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีแสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 – 28 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของรากทุกๆ 14 วัน

3.4.5 การย้ายออกปลูกพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ทำการคัดเลือกต้นที่อยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่พร้อมจะนำออกปลูก คัดเลือกต้นที่แข็งแรง มีใบมาก และระบบรากแข็งแรง ใช้ปากคีบคีบลำต้นออกจากขวด อย่างระมัดระวัง เพื่อป้องกันการขาดและบอบช้ำของระบบราก จากนั้นนำรากมาล้างวุ้นที่ติดอยู่ออกให้หมดในภาชนะที่มีน้ำ ระมัดระวังอันตรายที่จะเกิดกับราก นำรากมาแช่ในยาฆ่าเชื้อราหรือยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียนาน 5 - 10 นาที ย้ายมาปลูกลงดินที่นึ่งฆ่าเชื้อและรดด้วยอาหารเหลว MS ที่ปราศจากน้ำตาล สังเกตการเจริญเติบโตของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อ

4.1.1 ถั่วคาวาลเคด(*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade)

ในการทดลองนี้ได้หาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อถั่วคาวาลเคด ซึ่งนำผลที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นมาเปรียบเทียบกัน โดยจากการทดลองสารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอรอกซ์ ที่มีปริมาณความเข้มข้นแตกต่างกัน 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และเวลาที่แตกต่างกัน 5, 10, 15 และ 20 นาที จำนวน 5 ขวดขวดละ 5 เมล็ด พบว่า

เมื่อนำถั่วคาวาลเคดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วคาวาลเคดสามารถเจริญเติบโตได้เพียง 4 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 16 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.1)

เมื่อนำถั่วคาวาลเคดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วคาวาลเคดสามารถเจริญเติบโตได้เพียง 5 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.1)

เมื่อนำถั่วคาวาลเคดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วคาวาลเคดสามารถเจริญเติบโตได้เพียง 7 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.1)

เมื่อนำถั่วคาวาลเคดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วคาวาลเคดสามารถเจริญเติบโตได้เพียง 7 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 35 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.1)

เมื่อนำถั่วคาวาลเคดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วคาวาลเคดสามารถเจริญเติบโตได้เพียง 10 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำถั่วคาวาลเคดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วคาวาลเคดสามารถเจริญเติบโตได้เพียง 15 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.1)

เมื่อนำถั่วคาวาลเคดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วคาวาลเคดสามารถเจริญเติบโตได้เพียง 18 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 72 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.1)

เมื่อนำถั่วคาวาลเคดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วคาวาลเคดสามารถเจริญเติบโตได้เพียง 20 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.1)

เมื่อนำถั่วคาวาลเคดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วคาวาลเคดสามารถเจริญเติบโตได้เพียง 18 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 72 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.1)

เมื่อนำถั่วคาวาลเคดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วคาวาลเคดสามารถเจริญเติบโตได้เพียง 20 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.1)

เมื่อนำถั่วคาวาลเคดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วคาวาลเคดสามารถเจริญเติบโตได้เพียง 23 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 92 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.1)

เมื่อนำถั่วคาวาลเคดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วคาวาลเคดสามารถเจริญเติบโตได้เพียง 20 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.1)

เมื่อนำถั่วคาวาลเคดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วคาวาลเคดสามารถเจริญเติบโตได้เพียง 5 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.1)

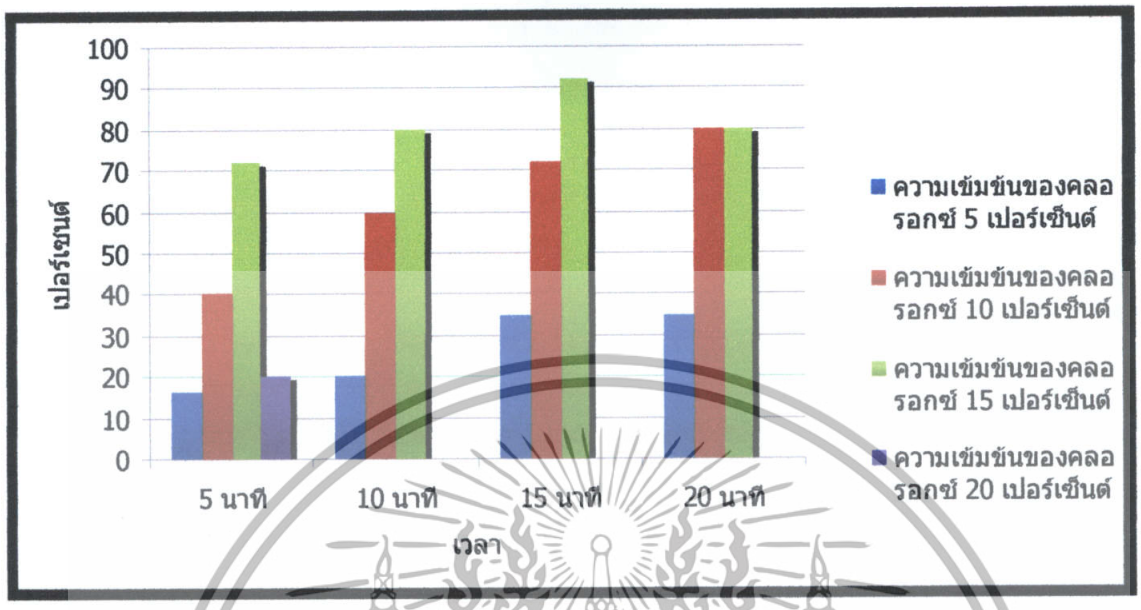
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำถั่วคาวาลเคดที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10-20 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วคาวาลเคดไม่สามารถเจริญเติบโตได้เนื่องจากเมล็ดเปื่อยยุ่ยจากการฟอกฆ่าเชื้อ (ตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของถั่วคาวาลเคดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ที่ความข้มข้นแตกต่างกันที่ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาที่แตกต่างกัน 5, 10, 15 และ 20 นาที

เวลา / ความเข้มข้นคลอรอกซ์ (เปอร์เซ็นต์)	5 (นาที)	10 (นาที)	15 (นาที)	20 (นาที)
5	4/25 (16)	5/25(20)	7/25(35)	7/25(35)
10	10/25(40)	15/25(60)	18/25(72)	20/25(80)
15	18/25(72)	20/25(80)	23/25(92)	20/25(80)
20	5/25(20)	0	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของถั่วคาวาลเคดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาที่แตกต่างกัน 5, 10, 15 และ 20 นาที

4.1.2 ถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata* cv. Verano)

ในการทดลองนี้ได้หาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อถั่วฮามาต้า ซึ่งนำผลที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นมาเปรียบเทียบกัน โดยจากการทดลองสารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอรอกซ์ ที่มีปริมาณความเข้มข้นแตกต่างกันที่ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และเวลาที่แตกต่างกัน 5, 10, 15 และ 20 นาที จำนวน 5 ขวดขวดละ 5 เมล็ด พบว่า

เมื่อนำถั่วฮามาต้าที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วฮามาต้าสามารถเจริญเติบโตได้ 10 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2)

เมื่อนำถั่วฮามาต้าที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วฮามาต้าสามารถเจริญเติบโตได้ 12 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 48 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำถั่วฮามาต้าที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วฮามาต้าสามารถเจริญเติบโตได้ 16 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 64 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2)

เมื่อนำถั่วฮามาต้าที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วฮามาต้าสามารถเจริญเติบโตได้ 19 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 76 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2)

เมื่อนำถั่วฮามาต้าที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วฮามาต้าสามารถเจริญเติบโตได้ 18 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 72 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2)

เมื่อนำถั่วฮามาต้าที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วฮามาต้าสามารถเจริญเติบโตได้ 24 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 88 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2)

เมื่อนำถั่วฮามาต้าที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วฮามาต้าสามารถเจริญเติบโตได้ 22 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 96 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2)

เมื่อนำถั่วฮามาต้าที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วฮามาต้าสามารถเจริญเติบโตได้ 18 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 72 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2)

เมื่อนำถั่วฮามาต้าที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วฮามาต้าสามารถเจริญเติบโตได้ 15 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2)

เมื่อนำถั่วฮามาต้าที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วฮามาต้าสามารถเจริญเติบโตได้ 20 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำถั่วฮามาต้าที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วฮามาต้าสามารถเจริญเติบโตได้ 17 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 68 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2)

เมื่อนำถั่วฮามาต้าที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วฮามาต้าสามารถเจริญเติบโตได้ 13 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 52 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2)

เมื่อนำถั่วฮามาต้าที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วฮามาต้าสามารถเจริญเติบโตได้ 2 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 8 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2)

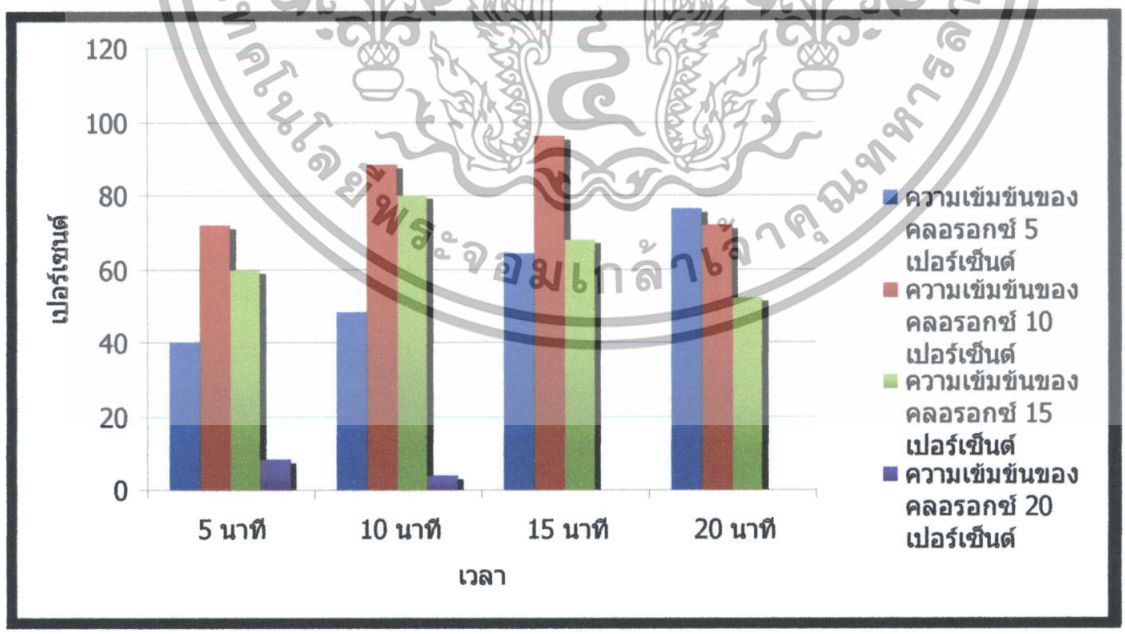
เมื่อนำถั่วฮามาต้าที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วฮามาต้าสามารถเจริญเติบโตได้ 1 เมล็ด ซึ่งคิดเป็น 4 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2)

เมื่อนำถั่วฮามาต้าที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15-20 นาที ไปเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่า ถั่วฮามาต้าไม่สามารถเจริญเติบโตได้เนื่องจากเมล็ดเปื่อยยุ่ยจากการฟอกฆ่าเชื้อ (ตารางที่ 4.2 และ รูปที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของถั่วฮามาต้าที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ที่ความข้มข้นแตกต่างกันที่ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาที่แตกต่างกัน 5, 10, 15 และ 20 นาที

ความเข้มข้นคลอรอกซ์ (เปอร์เซ็นต์) \ เวลา	5 (นาที)	10 (นาที)	15 (นาที)	20 (นาที)
5	10/25(40)	12/25(48)	16/25(64)	19/25(76)
10	18/25(72)	22/25(88)	24/25(96)	18/25(72)
15	15/25(60)	20/25(80)	17/25(68)	13/25(52)
20	2/25(8)	1/25(4)	0	0



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของถั่วฮามาต้าที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ที่ความข้มข้นแตกต่างกันที่ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และเวลาที่แตกต่างกัน 5, 10, 15 และ 20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำไฮโปคอทิล (Hypocotyl) ให้เจริญเป็นแคลลัสโดยการใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

การทดลองนี้จะทำการการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำนำไฮโปคอทิลให้เกิดเป็นแคลลัสและนำผลที่ได้ในแต่ละสูตรอาหารมาเปรียบเทียบกัน โดยได้ทดลองเปรียบเทียบในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตร คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14, 28, 42 และ 56 วัน พบว่า

4.2.1 ถั่วคาวาลเคด (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade)

ถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS (รูปที่ 4.4) ทุกสูตรมีเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นแคลลัส และเมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS ได้ผลดังตาราง

ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์ผลความแปรปรวนของถั่วคาวาลเคดเพื่อทดสอบความแตกต่างของการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสที่ความเข้มข้นและเวลาต่างกัน

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (a)	3	31538.200	10512.733	378.588	< 0.05
เวลาในการเพาะเลี้ยง (b)	3	24490.029	8163.343	293.981	< 0.05
อิทธิพลร่วมระหว่าง a*b	9	5638.028	626.448	22.560	< 0.05
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	304	8441.564	27.768		
รวม	319	70107.821			

จากตารางที่ 4.3 พบว่า ความเข้มข้นของ 2,4-D และเวลาในการเพาะเลี้ยงส่งผลต่อการเจริญของถั่วคาวาลเคดให้เกิดเป็นแคลลัส โดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยที่มีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อน เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous Test ดังตารางที่ 4.4

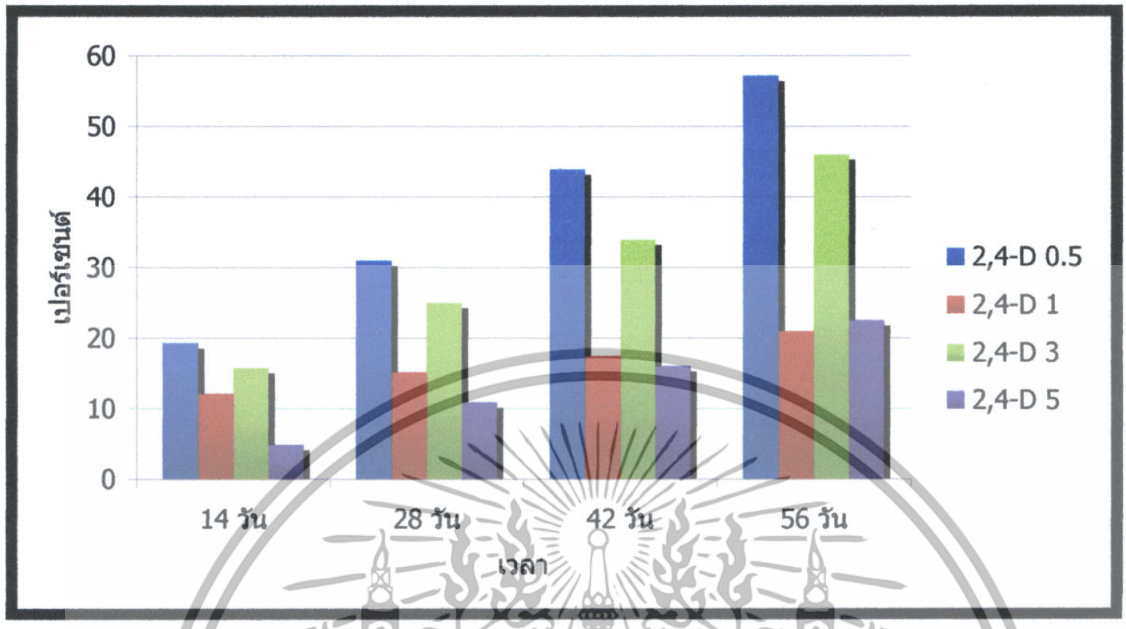
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงขนาดพื้นที่ (ตร.มม.) ของแคลลัสที่เกิดขึ้นในถั่วคาวาลเคดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14, 28, 42 และ 56 วัน

2,4-D (มก./ลิตร)	14 วัน	28 วัน	42 วัน	56 วัน
0.5	19.25^{de}	30.9^{c}	43.8^{b}	57.09^{a}
1	12.03^{ef}	15.09^{def}	17.44^{def}	20.92^{de}
3	15.75^{def}	25^{cd}	33.87^{c}	45.93^{b}
5	4.84^{g}	10.86^{ef}	15.97^{def}	22.42^{d}

หมายเหตุ ขนาดพื้นที่ (ตร.มม.) ของแคลลัสที่เกิดขึ้นที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05

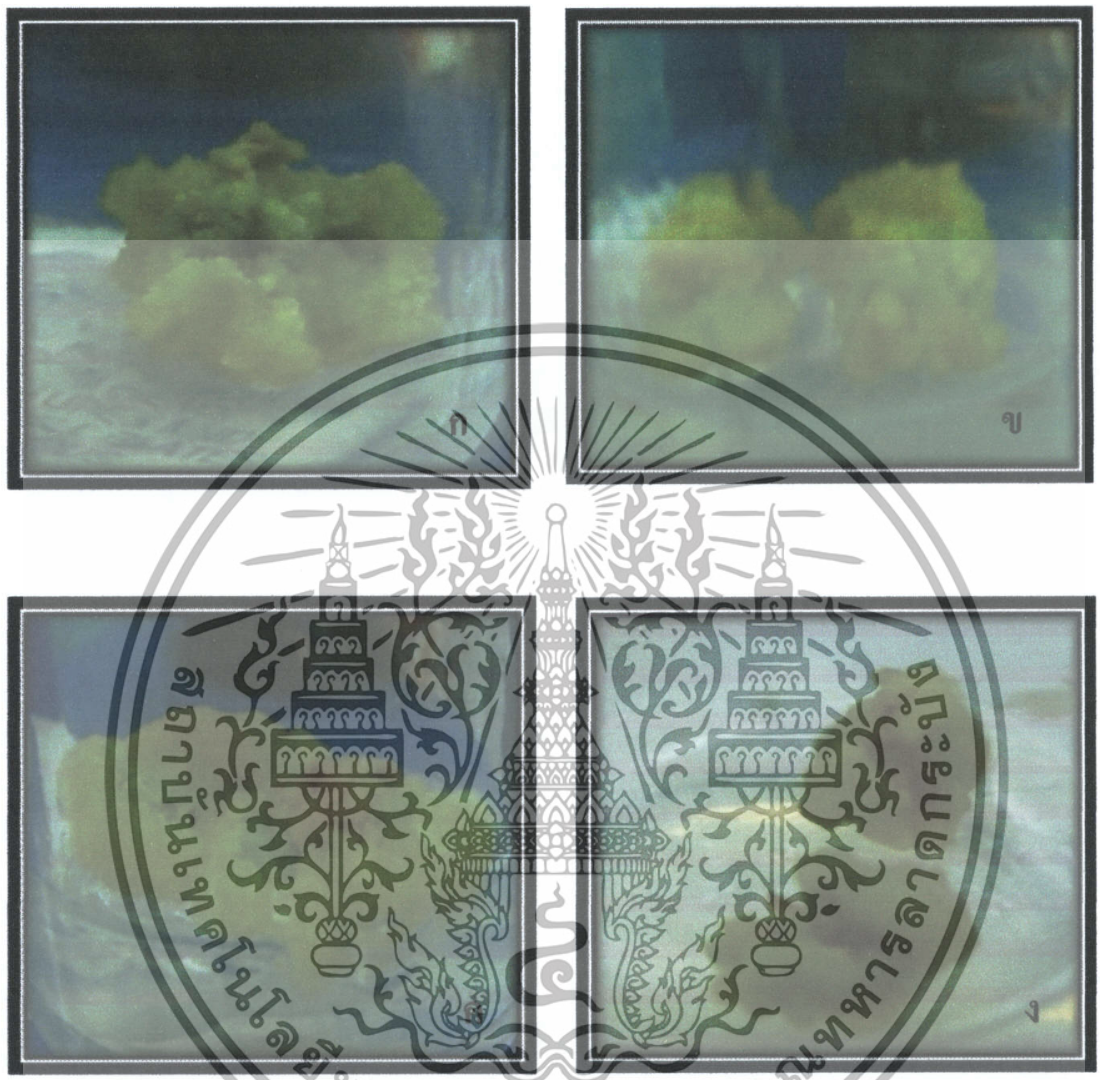
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 กราฟเปรียบเทียบการเกิดแคลลัสของถั่วควาวสเคดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14, 28, 42 และ 56 วัน

พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มความเข้มข้นของ 2,4-D และเวลาของการเพาะเลี้ยงได้ตามความสามารถในการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสออกเป็น 7 กลุ่ม โดยเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด 57.09 ตารางมิลลิเมตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 56 วัน (ตารางที่ 4.4 และ รูปที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสของถั่วคาวาลเคดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก) 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข) 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค) 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง) 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata* cv. Verano)

ถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS (รูปที่ 4.6) ทุกสูตรมีเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นแคลลัส และเมื่อนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS ได้ผลดังตาราง

ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์ผลความแปรปรวนถั่วฮามาต้าเพื่อทดสอบความแตกต่างของการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสที่ความเข้มข้นและเวลาต่างกัน

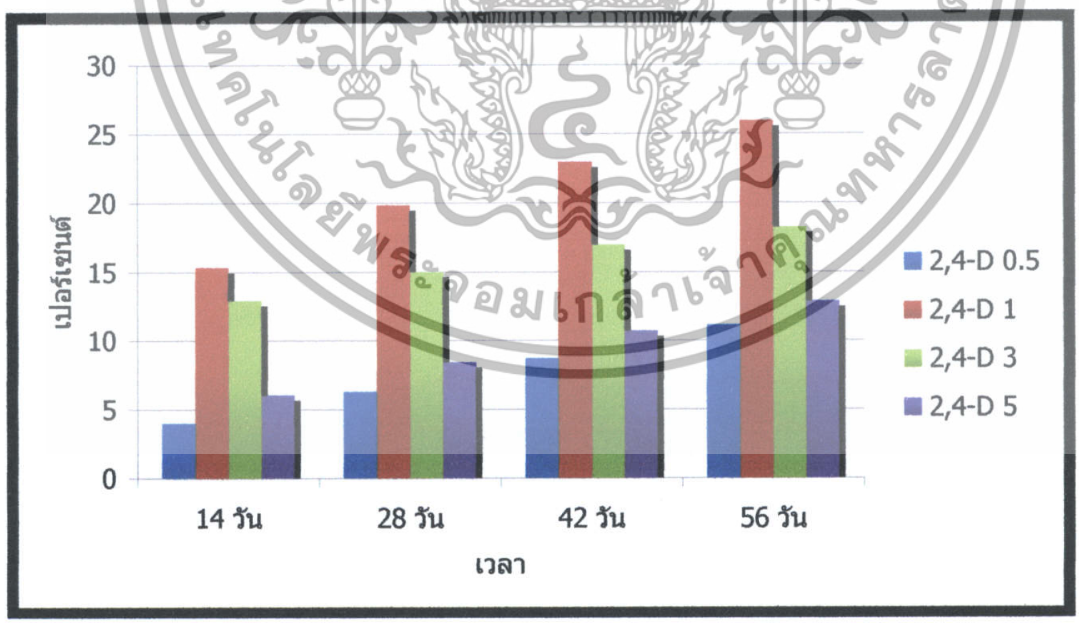
แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P-value
ความเข้มข้นของ 2,4-D (a)	3	9053.505	3017.835	308.855	< 0.05
เวลาในการเพาะเลี้ยง (b)	3	2475.846	825.282	84.462	< 0.05
อิทธิพลร่วมระหว่าง a*b	9	167.509	18.612	1.905	0.051
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	304	2970.400	9.771		
รวม	319	14667.260			

จากตารางที่ 4.5 พบว่า ความเข้มข้นของ 2,4-D และเวลาในการเพาะเลี้ยงไม่ส่งผลต่อการเจริญของถั่วฮามาต้าให้เกิดเป็นแคลลัส โดยดูได้จากค่า P-value ของอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัยที่มีค่ามากกว่า 0.05 ซึ่งแต่ละความเข้มข้นและเวลามีมีค่าน้อยกว่า 0.05 โดยเมื่อนำมาทดสอบด้วย Scheffe แล้วจะเห็นได้ว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทุกค่า (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงขนาดพื้นที่ (ตร.มม.) ของแคลลัสที่เกิดขึ้นในถั่วฮามาต้า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14, 28, 42 และ 56 วัน

2,4-D (มก./ลิตร)	14 วัน (ตร.มม.)	28 วัน (ตร.มม.)	42 วัน (ตร.มม.)	56 วัน (ตร.มม.)
0.5	3.953	6.242	8.697	11.11
1	15.29	19.8	22.91	25.91
3	12.91	15	16.95	18.17
5	6.005	8.397	10.69	12.82

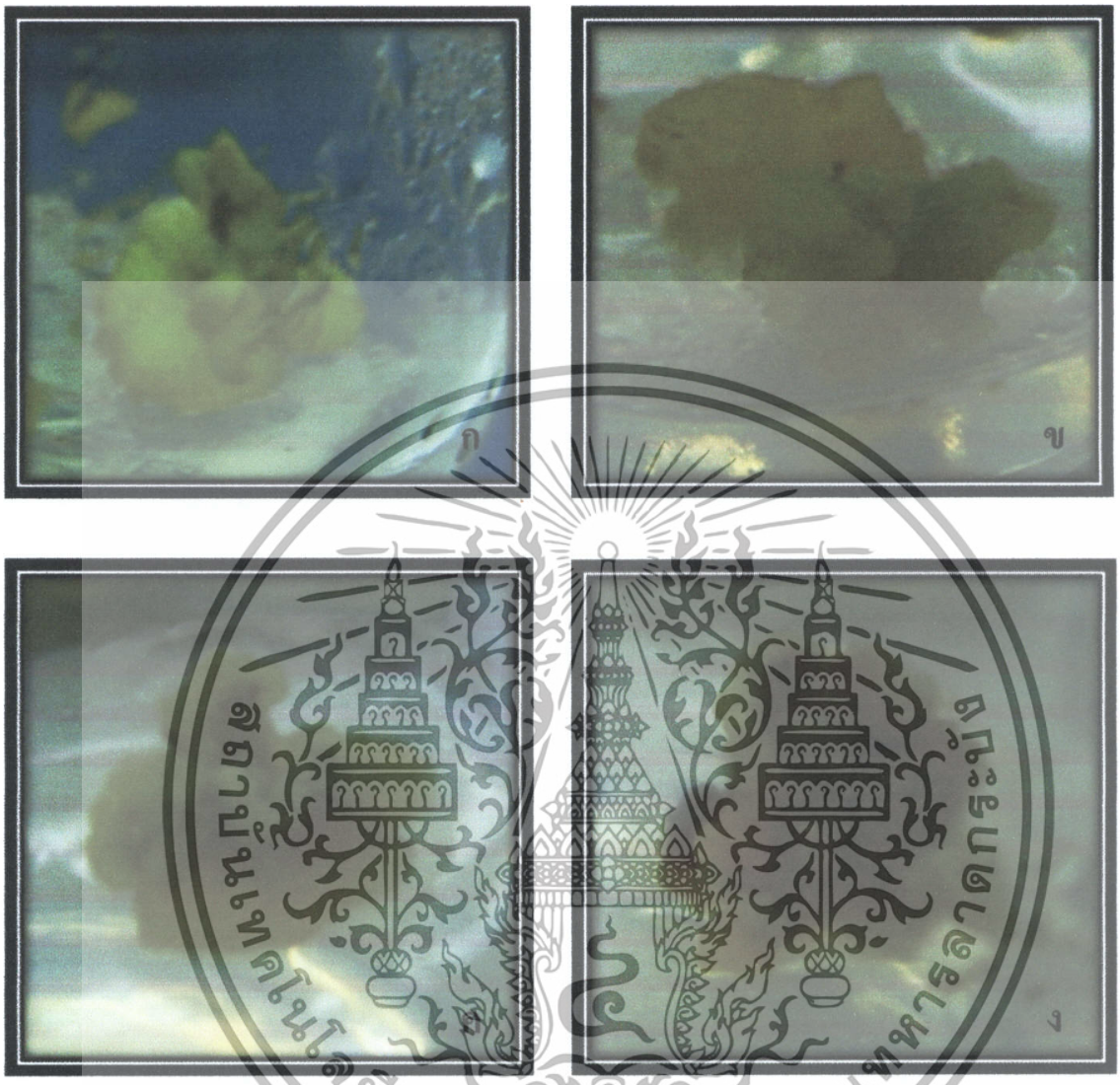


รูปที่ 4.5 กราฟเปรียบเทียบการเกิดแคลลัสของถั่วฮามาต้า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14, 28, 42 และ 56 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด 25.91 ตารางมิลลิเมตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 56 วัน (ตารางที่ 4.6 และ รูปที่ 4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสของถั่วฮามาต้า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก) 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข) 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค) 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง) 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่โดยการใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

การทดลองนี้จะทำการการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ และนำผลที่ได้ในแต่ละสูตรอาหารมาเปรียบเทียบกันโดยได้ทดลองเปรียบเทียบในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 และ 28 วัน พบว่า

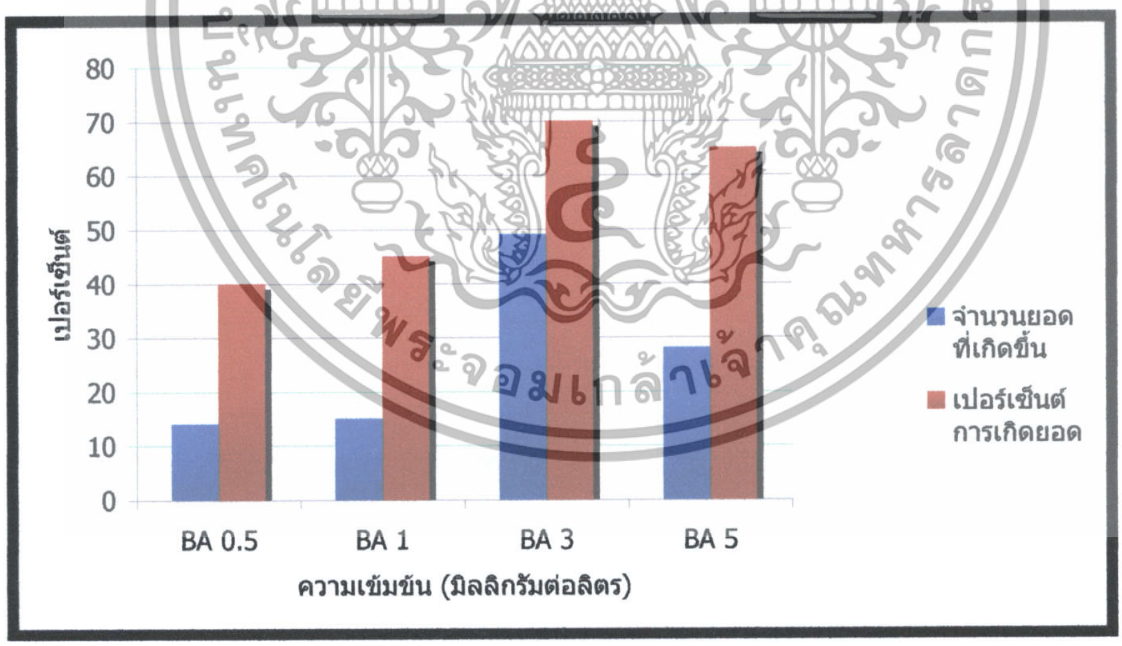
4.3.1 ถั่วคาวาลเคด (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade)

ถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS (รูปที่ 4.8) ทุกสูตรมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด แต่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 14 แคลลัสจากทั้งหมด 20 แคลลัส และเกิดยอดได้ถึง 49 ยอด ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมากที่สุดเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.7 และ รูปที่ 4.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

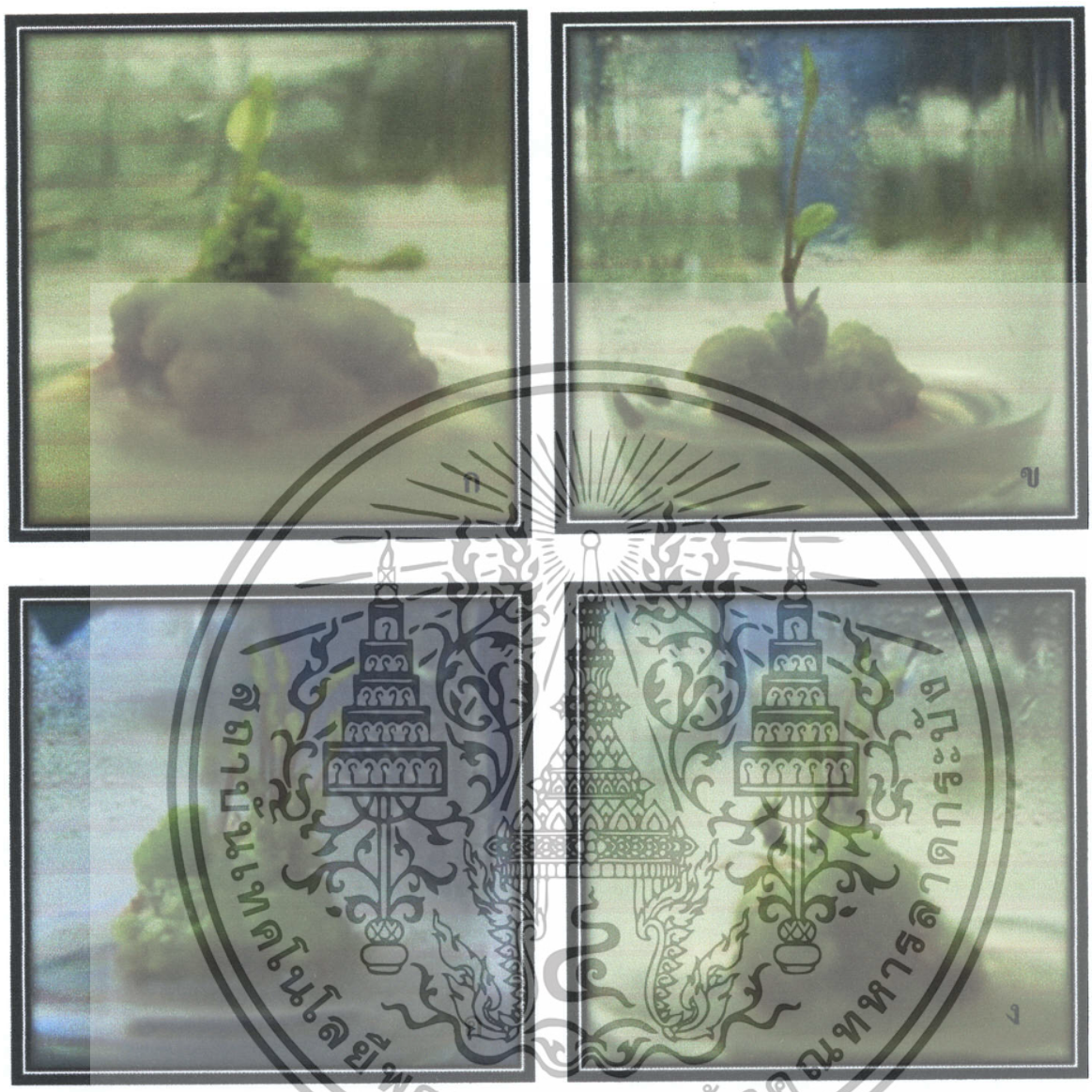
ตารางที่ 4.7 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของถั่วคาวาลเคด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตร คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

BA (มก./ลิตร)	จำนวนแคลลัส (ชิ้น)	การเกิดยอด (ชิ้น)	จำนวนยอดที่เกิดขึ้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด
0.5	20	8	14	40
1	20	9	15	45
3	20	14	49	70
5	20	13	28	65



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของถั่วคาวาลเคด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แสดงการเปรียบเทียบการเกิดยอดของถั่วคาวาลเคดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก) BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข) BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค) BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง) BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

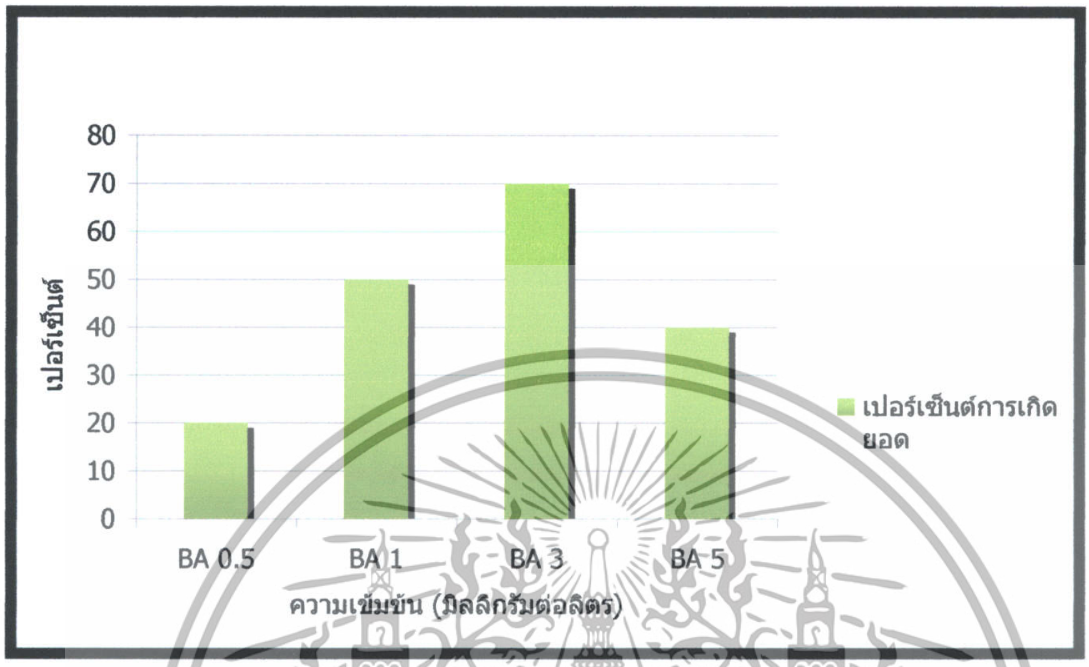
4.3.2 ถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata* cv. Verano)

ถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS (รูปที่ 4.10) ทุกสูตรมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดแต่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมากที่สุดที่ 70 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.8 และ รูปที่ 4.10)

ตารางที่ 4.8 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของถั่วฮามาต้า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

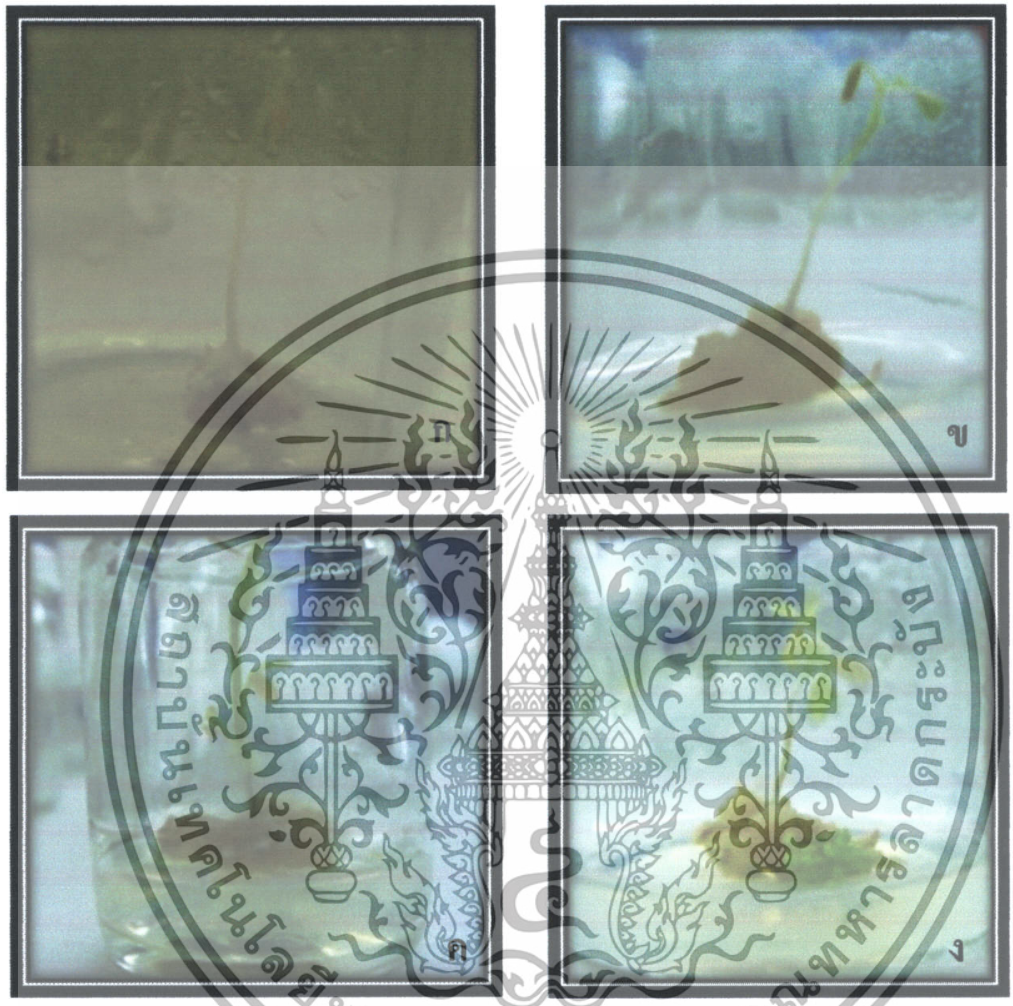
BA (มก./ลิตร)	จำนวนแคลลัส (ชิ้น)	การเกิดยอด (ชิ้น)	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด
0.5	20	5	20
1	20	10	50
3	20	14	70
5	20	8	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของถั่วฮามาต้า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 แสดงการเปรียบเทียบการเกิดยอดของถั่วฮามาต้า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก) BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข) BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค) BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง) BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำต้นใหม่ให้เกิดรากโดยการใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

การทดลองนี้จะทำการการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำต้นใหม่ให้เกิดราก และนำผลที่ได้ในแต่ละสูตรอาหารมาเปรียบเทียบกันโดยได้ทดลองเปรียบเทียบในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 และ 28 วัน พบว่า

4.4.1 ถั่วคาวาลเคด(*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade)

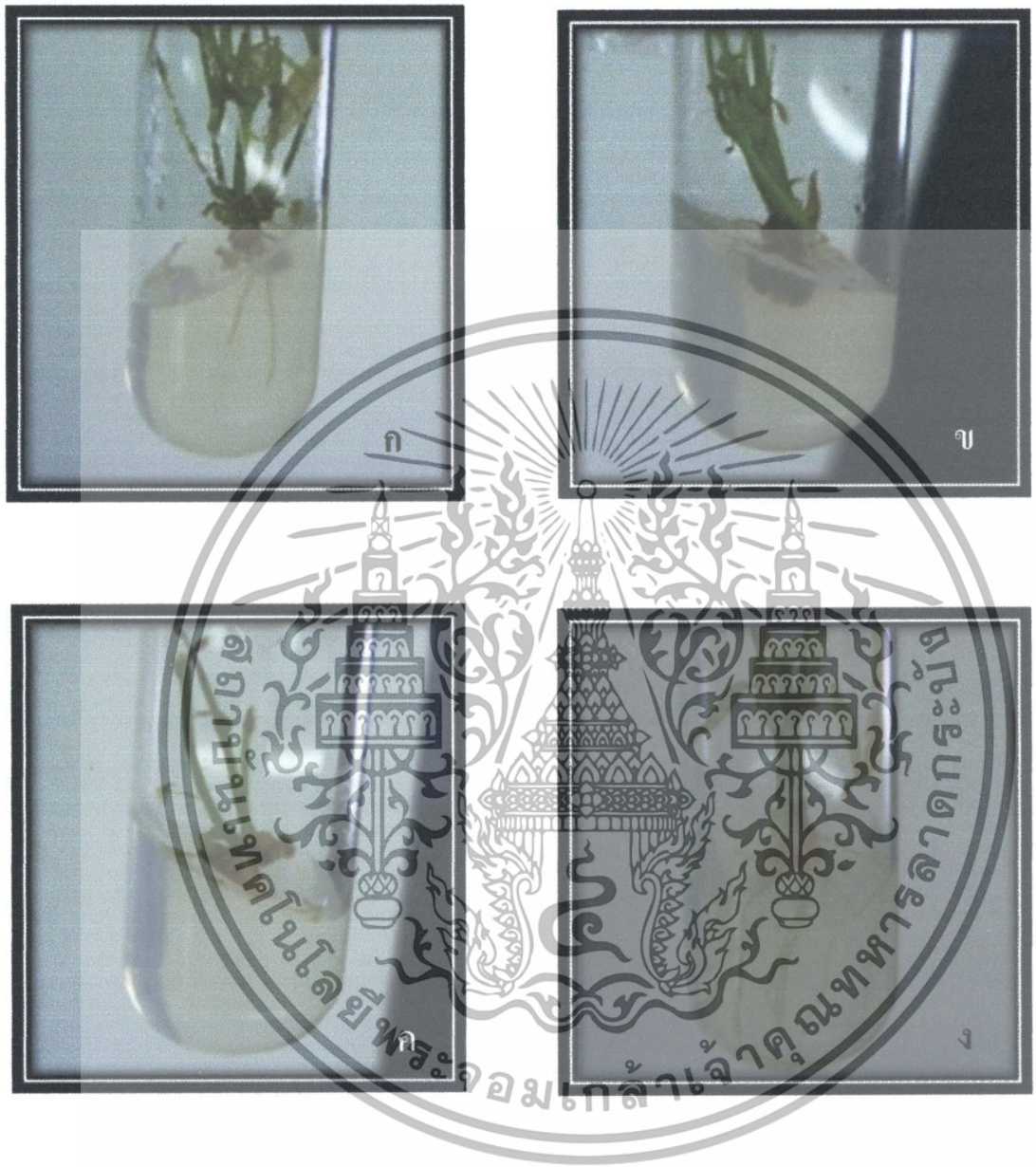
เมื่อนำต้นใหม่มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้เกิดรากที่สั้นและมีจำนวนน้อย (ตารางที่ 4.9 และ รูปที่ 4.11ก)

เมื่อนำต้นใหม่มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ซึ่งจะเกิดเป็นปมมีลักษณะคล้ายแคลลัส (ตารางที่ 4.9 และ รูปที่ 4.11ข)

เมื่อนำต้นใหม่มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ IBA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำให้เกิดรากที่ยาวและมีจำนวนมาก (ตารางที่ 4.9 และ รูปที่ 4.11ค)

เมื่อนำต้นใหม่มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของ IBA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ซึ่งจะเกิดเป็นปมมีลักษณะคล้ายแคลลัส (ตารางที่ 4.9 และ รูปที่ 4.11ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 แสดงการเปรียบเทียบการเกิดรากของถั่วคาวาลเคดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตร คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก) IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข) IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

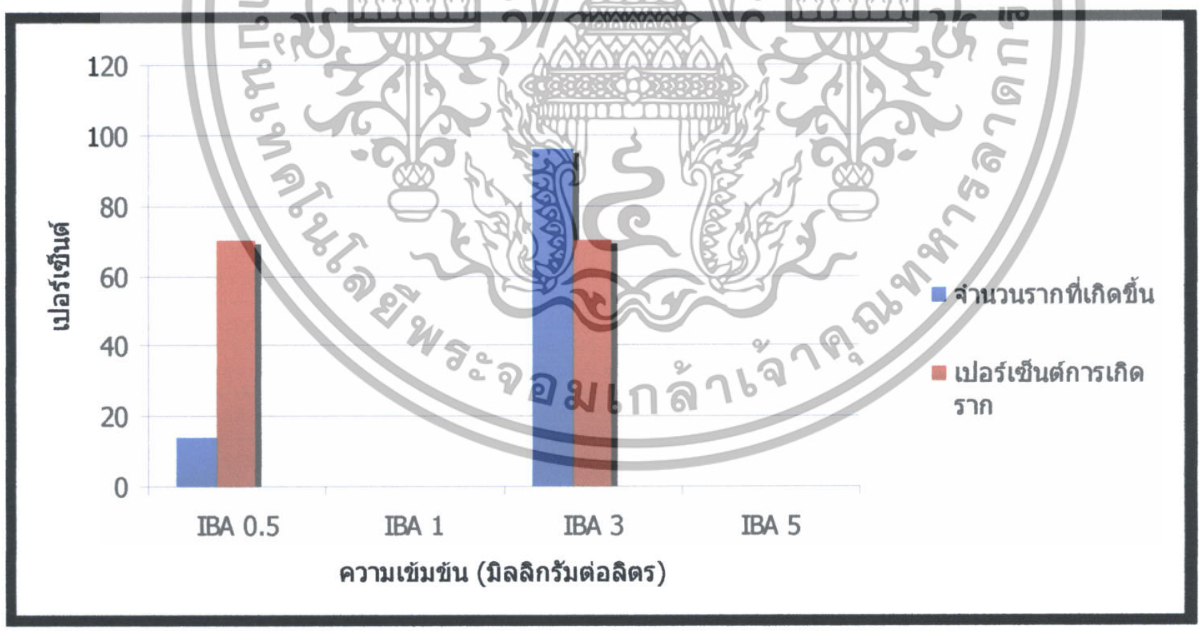
ค) IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง) IBA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดรากของถั่วคาวาลเคดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 28 วัน

IBA (มก./ลิตร)	จำนวนต้นที่เพาะเลี้ยง (ต้น)	จำนวนต้นที่เกิดราก (ต้น)	จำนวนรากที่เกิดขึ้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก
0.5	10	7	14	70
1	10	0	0	0
3	10	7	96	70
5	10	0	0	0



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์และจำนวนรากที่เกิดขึ้นของ ถั่วคาวาลเคดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 28 วัน

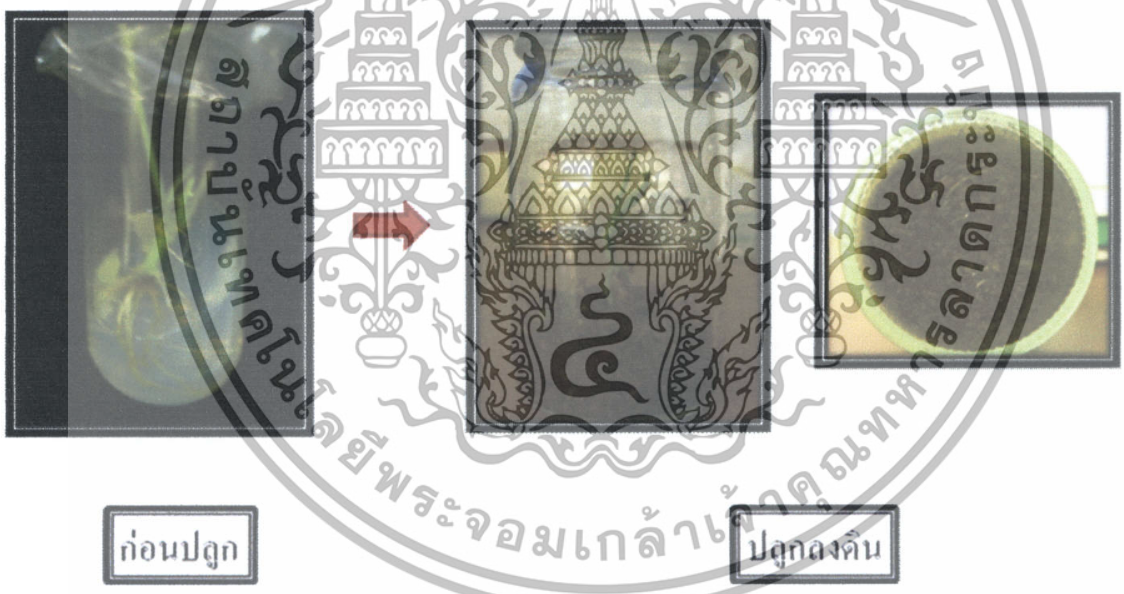
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การย้ายพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูก

การทดลองนี้ได้นำต้นใหม่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาปลูกลงในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพื่อตรวจสอบการอยู่รอดของต้นที่ทำการเพาะเลี้ยง พบว่า

4.5.1 ถั่วคาวาลเคด(*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade)

เมื่อทำการย้ายต้นใหม่ลงในดิน ต้นใหม่สามารถอยู่รอดได้ (รูปที่ 4.13)



รูปที่ 4.13 แสดงการอยู่รอดของต้นใหม่ที่นำมาปลูกลงดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 การหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อ

จากการทดลองหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อถั่วคาวาลเคดและถั่วฮามาต้า โดยใช้คลอรอกซ์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาต่างกัน คือ 5, 10, 15 และ 20 นาที พบว่าความเข้มข้นคลอรอกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ เวลา 15 นาทีเหมาะสมสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อถั่วคาวาลเคด ถ้าใช้ความเข้มข้นมากกว่านี้เมล็ดของถั่วคาวาลเคดจะเปื่อยยุ่ย ทำให้เมล็ดเจริญเติบโตได้ไม่ดี ส่วนถั่วฮามาต้าพบว่าที่ความเข้มข้นคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ เวลา 15 นาทีเหมาะสมสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อ เนื่องจากเมล็ดของถั่วฮามาต้ามีขนาดเล็กและมีเปลือกหุ้มอยู่ ก่อนนำมาฟอกฆ่าเชื้อต้องเอาเปลือกออกก่อน เมล็ดภายในจึงไม่มีไม่มีการปนเปื้อนมากนัก

5.2 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำไฮโปคอทิลให้เจริญเป็นแคลลัส โดยการใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากการทดลองเพาะเลี้ยงถั่วคาวาลเคดและถั่วฮามาต้าบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยศึกษาจากการชักนำไฮโปคอทิลให้เจริญเป็นแคลลัส พบว่า ถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสสีเขียวที่มีขนาดใหญ่ที่สุดที่ 57.09 ตารางมิลลิเมตร และถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสสีเขียวที่มีขนาดใหญ่ที่สุดที่ 25.96 ตารางมิลลิเมตร

5.3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ โดยการใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากการทดลองเพาะเลี้ยงถั่วคาวาลเคดและถั่วฮามาต้าบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยศึกษาจากการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่ พบว่า ถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดถึง 49 ยอด ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คิดเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ และถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวมากที่สุดที่ 70 เปอร์เซ็นต์

5.4 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำต้นใหม่ให้เกิดราก โดยการใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากการทดลองเพาะเลี้ยงต้นใหม่ของถั่วคาวาลเคดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 3 และ5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยศึกษาจากการชักนำให้เกิดราก พบว่า ถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 และ3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ แต่ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากยาวจำนวนมากถึง 96 รากจากจำนวนทั้งหมด 10 ต้น เมื่อเลี้ยงไปได้ 28 วัน

5.5 การย้ายออกปลูกพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

จากการทดลองนำต้นใหม่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของถั่วคาวาลเคดมาทำการย้ายออกปลูกลงดิน พบว่า สามารถอยู่รอดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์, อรุณี วงศ์ปิยะสถิต และสิรนุช ลามศรีจันทร์. 2531. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเขียว.**มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

กลุ่มงานวิจัยพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2546. **พืชอาหารสัตว์พันธุ์ดี.** พิมพ์ครั้งที่ 3. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ [Online].Available : http://www.sut.ac.th/e-texts/Agri/My%20Webs/ตอนที่_5.2.htm

กองอาหารสัตว์. 2530. **หญ้าสำหรับเลี้ยงสัตว์ เอกสารวิชาการ รหัส 13-0102-30.** กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2549. [Online].Available : http://www.dld.go.th/nutrition/exhibision/FORAGE/Centrosema_pascuorum.htm

จีระวัชร์ เข็มสวัสดิ์ และคณะ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2545. **ถั่วคาวาลเคด.** พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ.

ฉัตรนภา ข่มอาวุธ, สนธิชัย จันทร์เปรม และพีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเขียวเพื่อการถ่ายยีน.** ในรายงานการประชุมวิชาการถั่วเขียวแห่งชาติ ครั้งที่ 8. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม, 18-20 ม.ค. 2543, 41-46 หน้า

เฉลิมพล แซมเพชร. 2530. **หญ้าและถั่วอาหารสัตว์เมืองร้อน.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัลลภ สันติประชา และ ประวิตร โสภโณดร. 2524. **พืชอาหารสัตว์.** ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, หาดใหญ่.

สถาบันสุวรรณวาจกกสิกิจเพื่อการค้นคว้าและพัฒนาการผลิตปศุสัตว์และผลิตภัณฑ์. [Online].Available : http://suwan.kps.ku.ac.th

สิทธิศักดิ์ นุกูลกิจ, พัชรี น้ำแก้ว และอัญชลี อยู่ชา. 2549. **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** กรุงเทพฯ: Journal Club สวพ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. **เทคโนโลยีชีวภาพของพืช.** ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ.

อรดี สหวัชรินทร์. 2539. **หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Anuradha T S, Jami S K, Datla R S and Kirti P B. 2006. **Genetic transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) using cotyledonary node as explant and a promoterless *gus::npt*II fusion gene based vector.** J. Biosci. 31(2), 236 – 245

Ian D. Godwin, Geoffrey H. Gordon and Donald F. Cameron. 1987. **Plant regeneration from leaf-derived callus cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes scabra* Vog.** Volume 9, Number 1/January, 3 – 8 [Online].Available : http://www.springerlink.com/content/h3g10117417g136r/

Murashige T. and Skoog F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures.** Physiologia Plantarum. 15 473-497

THAICATTLE BREEDING. [Online].Available : http://www.thaicattle.com/plant/plant9.php

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสารเคมีที่ใช้ในสูตรอาหาร MS 1962 และ VW 1949

สารเคมี	Murashige and Skoog (MS) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Vacin and Went (มิลลิกรัมต่อลิตร)
แอมโมเนียมไนเตรท : NH_4NO_3	1650	-
แอมโมเนียมซัลเฟต : $(NH_4)_2SO_4$	-	500
บอริคแอซิด : H_3BO_3	6.2	-
แคลเซียมคลอไรด์ : $CaCl_2.2H_2O$	440	-
แคลเซียมฟอสเฟต : $Ca_3(PO_4)_2$	-	200*
โคบอลซ์คลอไรด์ : $CoCl_2.6H_2O$	0.025	-
คิวปริคซัลเฟต : $CuSO_4.5H_2O$	0.025	-
เฟอริคตาร์เตต : $Fe_2(C_4H_4O_6)_3$	-	28*
เฟอรัสซัลเฟต : $FeSO_4.7H_2O$	27.8	-
แมกนีเซียมซัลเฟต : $MgSO_4.7H_2O$	370	250
แมงกานีสซัลเฟต : $MnSO_4.H_2O$	16.9	-
แมงกานีสซัลเฟต : $MnSO_4.4H_2O$	-	7.5
โปแตสเซียมไอโอไดด์ : KI	0.83	-
โปแตสเซียมไนเตรท : KNO_3	1900	525
โปแตสเซียมฟอสเฟต : KH_2PO_4	170	250
โซเดียมเอธธีลีนไดอามีนเตตราอซิติค แอซิค	37.3	-
โซเดียมโมลิบเดท : $Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	-
ซิงค์ซัลเฟต : $ZnSO_4.7H_2O$	8.6	-
ไกลซีน : glycine	2.0	-
นิโคตินิค แอซิค : nicotinic acid	0.5	-
ไพริดอกซีน : pyridoxine-HCl	0.5	-
ไธอามีน : thiamine-HCl	0.1	-
อินโนซิตอล : inositol	100	-
น้ำตาล : Sucrose	30,000	20,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำมะพร้าวอ่อน	-	150 มล.
ความเป็นกรด-ด่าง : pH	5.7-5.8	4.8-5.0

หมายเหตุ * $Ca_3(PO_4)_2$ ละลายด้วยกรดเกลือความเข้มข้น 1 นอร์มอล

** ใช้ $FeSO_4.7H_2O$ และ Na_2.EDTA ของสูตร MS แทนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

รวม stock สารเคมีต่างๆ

สารประกอบอื่นๆที่ต้องการ เช่น กรดอะมิโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

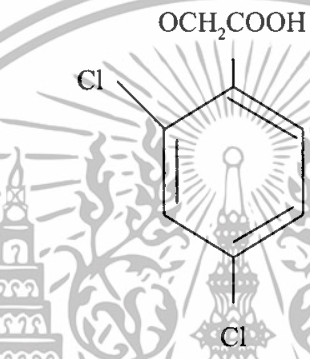
ตารางที่ 2 องค์ประกอบในสูตรอาหาร MS ดัดแปลง

สูตรอาหาร MS	ชื่อสารเคมี	ความเข้มข้น (เท่า)	จำนวนที่ใช้ (กรัม)	ปริมาณที่เตรียม (มิลลิลิตร)
Stock 1	NH_4NO_3	100 X	165	1000
	KNO_3		190	
	$MgSO_4.7\ H_2O$		37	
	KH_2PO_4		17	
Stock 2	$CaCl_2.2\ H_2O$	100 X	44	1000
Stock 3	H_3BO_3	1000 X	3.1	500
	KI		0.415	
	$Na_2MoO_4.2\ H_2O$		0.125	
	$CoCl_2.6\ H_2O$		0.0125	
Stock 4	$MnSO_4.4\ H_2O$	100 X	2.23	1000
	$ZnSO_4.7\ H_2O$		0.86	
	$CuSO_4.5H_2O$		0.0025	
Stock 5	$Na_2EDTA.2H_2O$	100 X	3.73	1000
	$FeSO_4.7H_2O$		2.78	
Stock 6	Inositol	100 X	5	500
	Nicotinic acid		0.025	
	Pyridoxine HCl		0.025	
	Thiamine HCl		0.005	
	Glycine		0.1	

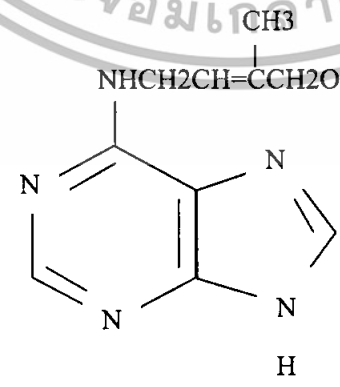
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารควบคุมการเจริญเติบโต

1. กรด 2,4 ไดคลอโรฟีนอกซีอะซิติก (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) หรือเรียกย่อๆว่า 2,4-D สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_6Cl_2O_3$($Cl_2C_6H_3OCH_2CO_2H$) น้ำหนักโมเลกุล 221.04 สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์ เป็นสารที่เกิดจากการสังเคราะห์ อยู่ในกลุ่มของออกซิน (auxin) ซึ่งช่วยในการชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์และรวมเป็นกลุ่มของแคลลัส พบมากในใบอ่อนที่กำลังงอก และในเมล็ดที่กำลังพัฒนาในขณะที่มีการงอก

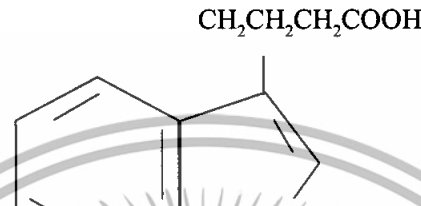


2. 6- เบนซิลอะมิโนเพียวรีน (6-benzylaminopurine) หรือเรียกย่อยว่า BA หรือ BAP สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{11}N_5$ น้ำหนักโมเลกุล 225.26 สามารถละลายในเมทานอลและเอทานอลได้ เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของไซโตคินิน (cytokinin) สามารถชักนำให้มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในพืชที่เกิดเป็นปุ่มปม กระตุ้นการเจริญทางด้านข้างของพืช กระตุ้นการเจริญของตาข้าง และชะลอการแก่ของพืช



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. **กรดอินโดล-3- บิวทีริก** (3-idole butyric acid) **หรือเรียกย่อยว่า** IBA **สูตรทางเคมี ประกอบด้วย** $C_{12}H_{13}NO_2$ **น้ำหนักโมเลกุล** 203.24 **สามารถละลายในแอลกอฮอล์ อีเทอร์ และอะซิโตนได้ เป็นสารที่เกิดจากการสังเคราะห์ อยู่ในกลุ่มของออกซิน กระตุ้นการเกิดรากบริเวณลำต้นที่ถูกตัด และพัฒนาการเกิดรากแขนงให้สมบูรณ์**



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 การเตรียม Stock solution ของสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละกลุ่ม

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ตัวย่อ	น้ำหนักโมเลกุล	วิธีเตรียม
กลุ่มออกซิน			ชั่งสารควบคุมการเจริญเติบโต 100 มก. ละลายในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ หรือ NaOH 0.5โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจะได้ stock เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	2,4-D	221	
2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid	2,4,5-T	255.5	
Naphthaleneacetic acid	NAA	186.2	
Indolebutyric acid	IBA	203.2	
Indoleacetic acid	IAA	175.2	
กลุ่มไซโตไคนิน			ชั่งสารควบคุมการเจริญเติบโต 100 มก. ละลายในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ หรือ HCl 0.5 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจะได้ stock เข้มข้น 1 มก./ลิตร
6-Benzylaminopurine	BA	225.2	
Isopentenylaminopurine	2-iP	203.2	
Kinetin	K	215.2	
Zeatin	Z	219.2	
Gibberellic acid	GA	364.4	ชั่งจิบเบอเรลลิน 100 มิลลิกรัม ละลายใน 0.5 โมลาร์ NaOH แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่นจะได้ stock เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติในการชักนำไฮโปคอทิลให้กลายเป็นแคลลัสของถั่วฮามาต้าที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน

time

ANOVA

Hama

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2475.846	3	825.282	21.391	.000
Within Groups	12191.414	316	38.580		
Total	14667.260	319			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hama
Scheffe

(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
14	28	-2.82300(*)	.98209	.043	-5.5833	-.0627
	42	-5.27213(*)	.98209	.000	-8.0324	-2.5118
	56	-7.46313(*)	.98209	.000	-10.2234	-4.7028
28	14	2.82300(*)	.98209	.043	.0627	5.5833
	42	-2.44913	.98209	.104	-5.2094	.3112
	56	-4.64013(*)	.98209	.000	-7.4004	-1.8798
42	14	5.27213(*)	.98209	.000	2.5118	8.0324
	28	2.44913	.98209	.104	-.3112	5.2094
	56	-2.19100	.98209	.176	-4.9513	.5693
56	14	7.46313(*)	.98209	.000	4.7028	10.2234
	28	4.64013(*)	.98209	.000	1.8798	7.4004
	42	2.19100	.98209	.176	-.5693	4.9513

- The mean difference is significant at the .05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hamata

Scheffe

time	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
14	80	9.5386		
28	80		12.3616	
42	80		14.8108	14.8108
56	80			17.0018
Sig.		1.000	.104	.176

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 80.000.

concentrate **ANOVA**

Hama

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9053.505	3	3017.835	169.875	.000
Within Groups	5613.755	316	17.765		
Total	14667.260	319			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hama
Scheffe

(I) con	(J) con	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0.5	1.0	-13.47850(*)	.66643	.000	-15.3516	-11.6054
	3.0	-8.25800(*)	.66643	.000	-10.1311	-6.3849
	5.0	-1.97975(*)	.66643	.033	-3.8528	-.1067
1.0	0.5	13.47850(*)	.66643	.000	11.6054	15.3516
	3.0	5.22050(*)	.66643	.000	3.3474	7.0936
	5.0	11.49875(*)	.66643	.000	9.6257	13.3718
3.0	0.5	8.25800(*)	.66643	.000	6.3849	10.1311
	1.0	-5.22050(*)	.66643	.000	-7.0936	-3.3474
	5.0	6.27825(*)	.66643	.000	4.4052	8.1513
5.0	0.5	1.97975(*)	.66643	.033	.1067	3.8528
	1.0	-11.49875(*)	.66643	.000	-13.3718	-9.6257
	3.0	-6.27825(*)	.66643	.000	-8.1513	-4.4052

* The mean difference is significant at the .05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hamata

Scheffe

con	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
0.5	80	7.4991			
5.0	80		9.4789		
3.0	80			15.7571	
1.0	80				20.9776
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 80.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้