รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วคาวาลเคดให้ต้านทานโรคไวรัสด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Improvement of *Centrosema pascuorum* cv Cavalcade for virus resistance by tissue culture

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ศาสตราจารย์ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ

นางสาว จันทกานต์ อรณนันท์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วคาวาลเคดให้ต้านทานโรคไวรัส ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Improvement of *Centrosema pascuorum* cv Cavalcade for virus resistance by tissue culture

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
ศาสตราจารย์ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ
นางสาว จันทกานต์ อรณนันท์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b 00274035
i
สชหมู่
เลขทะเบียน 142895
วันเดือนปี - 6 มิ.ย. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การปรับปรุงพันธุ์ถั่วคาวาลเคดให้ต้านทานโรคไวรัส ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

(ภาษาอังกฤษ) Improvement of *Centrosema pascuorum* cv Cavalcade for virus resistance by tissue culture

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555 จำนวนเงิน 730,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2554 ถึง 30 กันยายน 2556

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 60 %
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อ-สกุล ผู้ร่วมโครงการวิจัย

ศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 20 %
ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นางสาวจันทกานต์ อรณนันท์ สัดส่วนที่ทำงานวิจัย 20 %
กลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์
ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

คำสำคัญ ถั่วคาวาลเคด, แคลลัส, เซลล์แขวนลอย, ค่าอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ การเจริญเป็นต้นใหม่ และ อาร์เอพีดี

keywords *Centrosema pascuorum* cv Cavalcade , callus, suspension, LD_{50} , regeneration and RAPD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

การชักนำให้เกิดแคลลัสของถั่วคาวาลเคด (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade จากส่วนของ เมล็ด ใบเลี้ยง และข้อ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige และ Skoog, 1962) ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) พบว่าสามารถ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดได้มากที่สุด 87.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ส่วน 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงได้มากที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ และชั่งน้ำหนักแคลลัสได้มากที่สุด 2.17 มิลลิกรัม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 70 วัน ส่วน 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัสจากข้อได้มากที่สุด 85 เปอร์เซ็นต์ และชั่งน้ำหนักสดได้ 2.17 มิลลิกรัม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

การชักนำแคลลัสให้เป็นต้นใหม่บนอาหารสูตร ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดให้เกิดได้มากที่สุด 6.71 ยอด และมีความสูงมากที่สุดง 5.09 มิลลิเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 56 วัน นำแคลลัสที่พัฒนายอดแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสที่มียอดที่มีความสูง 7.42 มิลลิเมตร และสามารถชักนำให้เกิดรากพบว่า IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำจำนวนรากเฉลี่ยได้มากที่สุด 16 รากต่อต้น

การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากเมล็ดบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 6-benzyladenine (BA) พบว่าพบว่าสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มียอดจำนวนมากที่สุดคือ 5.29 ยอดต่อเมล็ด และมีความสูงของยอดเท่ากับ 30.99 มิลลิเมตร ในระยะเวลา 28 วัน

การชักนำยอดจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักให้เกิดยอดได้มากที่สุด 90 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 6.71 ยอดต่อแคลลัส และความสูงเฉลี่ย 5.09 มิลลิเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 56 วัน จากนั้นนำต้นที่มียอดมาเพาะเลี้ยงบน gibberellic acid (GA_3) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ยอดมีความยาวมากที่สุด 7.42 มิลลิเมตร ย้ายต้นอ่อนไปเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดได้ 16 รากต่อต้น

การเจริญของเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 3-12 วัน ซึ่งเป็นระยะ log phase จากนั้นจะเข้าสู่ stationary phase ในช่วง 12-21 วัน และ death phase ในช่วง 21-30 วัน ในวันที่ 15 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงสุด 1.1674 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร และ 0.0220 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหาร

การชักนำการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสีแกมมา นำแคลลัสฉายรังสีแกมมาที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 กิโลแรด พบว่าปริมาณรังสีที่ทำให้แคลลัสถั่วคาวาลเคดมีเปอร์เซ็นต์การตาย 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ (LD50) มีค่าเท่ากับ 6.3 กิโลแรด ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ และแคลลัสเจริญจากเซลล์แขวนลอยมีเปอร์เซ็นต์การตาย 50 เปอร์เซ็นต์ 5.8 กิโลแรด ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีเปรียบเทียบต้นควบคุม พบว่าสามารถนำเทคนิคอาร์เอพีดีมาตรวจสอบการกลายพันธุ์ของถั่วคาวาลเคดได้

ABSTRACT

Callus induction from *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade were induced from seed cotyledons and node on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The result showed that, the percentage of embryogenic callus induction from seed were 87.5 % from 1 mg/l 2,4-D for 60 days, embryogenic callus induction from leaf were 100% and fresh weigh 2.17 mg from 0.5 mg/l 2,4-D for 70 days and embryogenic callus induction from node were 85% and fresh weigh 2.17 mg from 3 mg/l 2,4-D for 60 days.

Callus were transferred to shoot regeneration medium supplemented with concentrations of 3 mg/l BA and 3 mg/l TDZ. The regenerated number of shoots per callus piece was 6.71 shoots. The average highest shoots were 5.09 mm for 56 days.

The regenerated shoots were elongated on MS medium containing 5 mg/l gibberellic acid (GA_3). We found that shoot were highest multiple shoot average 7.42 mm. Shoot were transferred to rooting media containing MS medium supplemented with IBA. We found cavalcade of the optimal rooting level was 3 mg/l of IBA, producing average 16 roots per explant.

Multiple shoot regeneration from mature seed on MS medium with concentrations of 6-benzyladenine (BA). The highest shoots initiation were MS medium containing 1 mg/l BA for 28 days Cavalcade were induced shoot length 30.99 mm and average shoots 5.29 shoots per seed.

Fresh weight and dry weight of cell suspension with the best growth for 15 days of 1.1674 g/25 ml fresh weight and 0.0220 g/25 ml respectively. Cell suspension has grown rapidly during the period of 3-12 days, log phase in 3-12 days, stationary phase in 12-21 days and and 21-30 days during the death phase.

Mutation was induced using physical gamma rays. Callus were treated with 0, 0, 4, 6, 8 and 10 kilorad of gamma ray irradiation. The result showed that, cavalcade were dose rate 63 kilorad and suspension dose rate 5.8 kilorad of gave 50 % survival

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

rate of irradiated callus (LD50) for 8 weeks. RAPD analysis was used to determine polymorphism within and among different control plant and mutation plant. These result suggested that RAPD markers were useful in detecting mutation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2555-2557 และสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการวิจัย

ขอขอบคุณคุณ ศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำอย่างดียิ่ง

ขอขอบคุณนางสาวจันทกานต์ อรณนันท์ กลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัด ประทุมธานี ได้ความอนุเคราะห์พันธุ์ของถั่วคาวาลเคด จาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหาร ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ รวมทั้งสถานที่ปลูกในการทดลอง

ขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องฉายรังสีแกมมมา ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขอบคุณเพื่อนๆ พี่ น้องๆ รวมทั้งลูกศิษย์ทุกคนที่มีร่วมในการวิจัย ครอบครัวที่กำลังใจ และทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบรูณ์ จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ

นางสาวจันทกานต์ อรณนันท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	V
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญภาพ	IX
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
1.5 คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	5
2.1 ถั่วคาวาลเคด	5
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture)	6
2.2.1 ส่วนต่างๆของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง	6
2.2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	7
2.2.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture)	10
2.2.4 ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลลัส	10
2.2.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension culture)	11
2.2.6 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	11
2.2.7 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช	19
2.2.8 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนของเนื้อเยื่อพืชมีดังต่อไปนี้	20
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	21
2.4 การกลายพันธุ์	26
2.5 การปรับปรุงพันธุ์พืชวงศ์ถั่วโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์	31
2.6 หลักการสกัดดีเอ็นเอ	32
2.7 การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส	33
2.8 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลโดยเทคนิคอาร์เอพีดี	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	V
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญภาพ	IX
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
1.5 คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	5
2.1 ถั่วคาวาลเคด	5
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture)	6
2.2.1 ส่วนต่างๆของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง	6
2.2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	7
2.2.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture)	10
2.2.4 ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลลัส	10
2.2.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension culture)	11
2.2.6 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	11
2.2.7 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช	19
2.2.8 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนของเนื้อเยื่อพืชมีดังต่อไปนี้	20
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	21
2.4 การกลายพันธุ์	26
2.5 การปรับปรุงพันธุ์พืชวงศ์ถั่วโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์	31
2.6 หลักการสกัดดีเอ็นเอ	32
2.7 การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส	33
2.8 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลโดยเทคนิคอาร์เอพีดี	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญต่อ หน้า

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 36

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 36

3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง 38

3.2.1. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำถั่วคาวาลเคดให้เจริญเป็นแคลลัส 38

3.2.1.1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนเมล็ดของถั่วคาลวาเคดให้เจริญเป็นแคลลัส 38

3.2.1.2 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำใบของถั่วคาลวาเคดให้เจริญเป็นแคลลัส 39

3.2.1.3 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำข้อของถั่วคาลวาเคตให้เจริญเป็นแคลลัส 39

3.2.2. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำถั่วคาวาลเคดให้เจริญเป็นต้นใหม่ 39

3.2.2.1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้พัฒนาไปเป็นต้นใหม่ 39

3.2.2.2 การชักนำแคลลัสให้พัฒนายอด 40

3.2.2.3 การชักนำยอดจากแคลลัสให้ยืดยาว 40

3.2.2.4 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำรากที่สมบูรณ์ 40

3.2.3. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วคาวาลเคดให้เกิดยอดจำนวนมาก (multiple shoot) 41

3.2.4. การศึกษาการผลของรังสีแกมมากับแคลลัสของถั่วคาวาลเคด 41

3.2.4.1 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของแคลลัสของถั่วคาวาลเคด 41

3.2.4.2 การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากแคลลัสที่ผ่านการ ฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ 41

3.2.5. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด 42

3.2.5.1 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด 42

3.2.5.2 การศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด 42

3.2.5.3 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด 43

3.2.6 การสกัดดีเอ็นเอ การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอจากถั่วปกติและถั่วที่ผ่านการฉายรังสี 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.6.1 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากถั่วปกติและถั่วที่ผ่านการฉายรังสี 43
3.2.6.2 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี 44
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการทดลอง 48
4.1. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำถั่วคาวาลเคดให้เจริญเป็นแคลลัส 48
4.1.1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนเมล็ดของถั่วคาลวาเคดให้เจริญเป็นแคลลัส 48
4.1.2 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำใบของถั่วคาลวาเคดให้เจริญเป็นแคลลัส 50
4.1.3 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำข้อของถั่วคาลวาเคตให้เจริญเป็นแคลลัส 53
4.2. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำถั่วคาวาลเคดให้เจริญเป็นต้นใหม่ 55
4.2.1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้พัฒนาไปเป็นต้นใหม่ 55
4.2.2 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำต้นจากแคลลัสให้มีลักษณะยืดยาวการชักนำต้นจากแคลลัสให้มีลักษณะยืดยาว 58
4.2.3 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำราก 59
4.3. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วคาวาลเคดให้เกิดยอดจำนวนมาก (multiple shoot) 61
4.4. การศึกษาการผลของรังสีแกมมา กับแคลลัสของถั่วคาวาลเคด 62
4.4.1 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของแคลลัสของถั่วคาวาลเคด 62
4.4.2 การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ 65
4.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย 66
4.5.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด 66
4.5.2. การศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด 68
4.5.3 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของแคลลัสที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด 70
4.5.4 การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากแคลลัสที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ 70
4.6 การตรวจสอบต้นถั่วปกติ และต้นกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี 74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญต่อ

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	77
บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย	79
ภาคผนวก ก	80
เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย	81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2.1 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโตจากตัวทำละลายและสภาวะเก็บรักษา 18

3.1 แสดงชื่อและลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี 44

3.2 แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในเทคนิค PCR 44

3.3 ส่วนประกอบสารเคมีในเทคนิค RAPD ต่อ 1 ตัวอย่าง 45

4.1 แสดงจำนวนแคลลัสของถั่วคาวาลเคดจากเมล็ดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30, 45 และ 60 วัน 47

4.2 แสดงจำนวนแคลลัสของถั่วคาวาลเคดจากส่วนใบเลี้ยงอ่อนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตร คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 21, 42 และ 70 วัน 51

4.3 แสดงจำนวนแคลลัสของถั่วคาวาลเคดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30, 45 และ 60 วัน 53

4.4 ผลการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจากแคลลัส สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัม ต่อลิตร อายุ 56 วัน และ 84 วัน 56

4.5 ผลการเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจากแคลลัสของถั่วคาวาลเคดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม ต่อลิตรร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร 57

4.6 ผลการชักนำต้นจากแคลลัสให้มีลักษณะยืดยาวของถั่วคาวาลเคดอายุ 42 วัน 58

4.7 ผลการชักนำรากของถั่วคาวาลเคดอายุ 28 วัน 60

4.8 ผลการชักนำให้เกิดยอดและความยาวจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของของถั่วคาวาลเคดในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ อายุ 7 ถึง 28 วัน 61

4.9 ผลของจำนวนรอดชีวิตของแคลลัสของถั่วคาวาลเคด เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และค่าเฉลี่ยความสูงยอดหลังจากฉายรังสีแกมมาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 0, 2, 4, 6, 8, และ 10 กิโลแรด 63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง หน้า

ตารางที่

4.11 ผลการชักนำต้นอ่อนจากเซลล์แขวนลอย 69

4.12 ผลของจำนวนรอดชีวิตของแคลลัสที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และค่าเฉลี่ยความสูงยอดหลังจากฉายรังสีแกมมาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 0, 2, 4, 6, 8, และ 10 กิโลแรด ระยะเวลา 8 สัปดาห์ 71

4.13 ชุดของไพรเมอร์ชนิดต่างๆ ที่มีลำดับเบส 10 เบส สามารถเกิดแบนดีเอ็นเอขึ้นได้ และไม่สามารถเกิดแบนดีเอ็นเอขึ้นได้ 74

4.14 แสดงต้น และจำนวนแถบที่แตกต่างจากต้นควบคุมเมื่อใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบต้นถั่วที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมาโดยใช้ไพรเมอร์ 6 ชนิด 75

ตารางที่ ก-1 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Murashige and Skoog (1962) 80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ต้นและเมล็ด และ ดอก ของถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv.	5
4.1	กราฟเปรียบเทียบการเกิดแคลลัสของถั่วคาวาลเคดจากเมล็ดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 45 และ 60 วัน	49
4.2	แสดงการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสของถั่วคาวาลเคดจากเมล็ดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตร คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	50
4.3	กราฟเปรียบเทียบการเกิดแคลลัสของถั่วคาวาลเคดจากส่วนใบเลี้ยงอ่อนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 21, 42 และ 77 วัน	52
4.4	การเจริญเติบโตเป็นแคลลัสจากส่วนใบเลี้ยงอ่อนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	52
4.5	กราฟเปรียบเทียบการเกิดแคลลัสของถั่วคาวาลเคดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30, 45 และ 60 วัน	54
4.6	การเจริญเติบโตเป็นแคลลัสของถั่วคาวาลเคดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตร คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	54
4.7	แคลลัสของถั่วคาวาลเคดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร	56
4.8	แคลลัสของถั่วคาวาลเคดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	57
4.9	แคลลัสของถั่วคาวาลเคดที่ผ่านการชักนำยอดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร สูตรอาหาร MS เพิ่มความสูงของยอด เป็นระยะเวลา 42 วัน	59
4.10	ถั่วคาวาลเตดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

รูปที่

4.11 การเกิดยอดจำนวนมากและความยาวจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของของถั่วคาวาลเคด ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ อายุ 7 ถึง 28 วัน 62

4.12 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของแคลลัสถั่วคาวาลเคดหลังได้รับรังสีแกมมา 0, 2, 4, 6, 8, และ10 กิโลแรด ระยะเวลา 8 สัปดาห์ 64

4.13 การเปลี่ยนแปลงของ แคลลัสที่รอดชีวิต หลังจากการฉายรังสี 64

4.14 ถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8, และ10 กิโลแรด 65

4.15 ลักษณะของต้นต้นถั่วคาวาลเคดที่ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจากการฉายรังสีแกมมา ปริมาณ ต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8, และ10 กิโลแรด 66

4.16 เซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคดในสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อายุเวลา 30 วัน 67

4.17 ผลของเซลล์แขวนลอยในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน 68

4.18 การพัฒนาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย 69

4.19 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของแคลลัสที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยถั่วคาวาลเคดหลังได้รับรังสี แกมมา 0, 2, 4, 6, 8, และ10 กิโลแรด ระยะเวลา 8 สัปดาห์ 71

4.20 การพัฒนาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยหลังจากการฉายรังสี 72

4.21 ถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากแคลลัสที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา ปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8, และ10 กิโลแรด 73

4.22 ลักษณะการเกิดแถบแบนของดีเอ็นเอ ในไพรเมอร์ชนิดต่างๆ 76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ถั่วคาวาลเคดเป็นสายพันธุ์ในสกุลเดียวกับถั่วเซนโตรซีม่า มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Centrosema pascuorum* cv Cavalcade สามารถขึ้นได้ดีในสภาพดินฟ้าอากาศทั่วไป และในดินหลายชนิด เป็นพืชล้มลุก มีลำต้นเลื้อยพันยาวประมาณ 2 เมตร มีใบย่อยแต่ละใบยาวประมาณ 5–10 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน *C. pascuorum* (ไม่ได้ระบุสายพันธุ์) เป็นหนึ่งในถั่วอาหารสัตว์จำนวนไม่น้อยกว่า 15 สกุล ที่มหาวิทยาลัยขอนแก่นนำเข้ามาทดสอบระหว่างปี 2519-2525 ซึ่งปรากฏว่าระยะเวลาทดสอบ 3 ปี คือระหว่าง 2523 - 2525 นั้น *C. pascuorum* สามารถให้ผลผลิตน้ำหนักแห้งได้มากกว่า 800 กิโลกรัมต่อไร่ (Topark-Ngam,1977) และในปี 2528 นายมงคล หาญกล้า ได้นำ *C. pascuorum* cv. Calvacade จากประเทศออสเตรเลียเข้ามาปลูกในประเทศไทย (กลุ่มงานวิจัยพืชอาหารสัตว์, 2533) ข้อดีของถั่วคาวาลเคดคือ เมื่อทำถั่วแห้ง ใบถั่วจะไม่ร่วงหล่นง่ายเหมือนถั่วอื่น ๆ จึงใช้ทำถั่วแห้งอัดฟ่อนได้ดี ชิตและคณะ (2538) รายงานว่าถั่วคาวาลเคดปลูกในพื้นที่ทุ่งกุลาร้องไห้ ให้ผลผลิตน้ำหนักแห้งเฉลี่ย 2 ปี 522 กิโลกรัมต่อไร่ ถั่วทั้งต้นมีโปรตีน 15.3 เปอร์เซ็นต์ มี NDF และ ADF เท่ากับ 56.5และ 41.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในปี 2543 ได้มีการศึกษาถั่วคาวาลเคด พบว่า ถั่วคาวาลเคดแห้งจะมีโปรตีนอยู่ระหว่าง 15-18 เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง ถั่วคาวาลเคดแห้งมีไขมันและเถ้าคิดเป็นร้อยละของวัตถุแห้งเท่ากับ 1.58 และ 9.55 ตามลำดับ มี NDF ADF Cellulose และ ADL มีค่าใกล้เคียงกับถั่วอาหารสัตว์อื่น ๆ เช่น ถั่วเวอราโน และถั่วลิสงนา ที่พิมพาพรและคณะ (2537) กองอาหารสัตว์ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรผลิตเมล็ดถั่วคาวาลเคดและปลูกทำถั่วแห้งเลี้ยงสัตว์ พบว่าถั่วคาวาลเคดแห้งอายุตัดที่ 90 วัน มีวัตถุแห้ง 91.96 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประกอบทางเคมีคิดเป็นวัตถุแห้ง มีค่าโปรตีน 17.07 เปอร์เซ็นต์ไขมัน 1.58 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใยในรูปของ NDF ADF ADL และ Cellulose เท่ากับ 59.03 39.09 8.72 และ 28.53 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สัมประสิทธิ์การย่อยสลายได้โดยวิธีใช้ถุงไนล่อน (ที่48 ชั่วโมง) ของวัตถุแห้ง อินทรียวัตถุ โปรตีน และ NDF เท่ากับ 64.33 63.85 83.83 และ 49.42 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้งตามลำดับ ค่าพลังงานโดยการคำนวณในรูปของ TDN DE และ ME มีค่าเท่ากับ 53.73 เปอร์เซ็นต์ 2.36 Mcal/kg หรือ 8.16 MJ /kg และ 1.95 Mcal/kg หรือ 9.20 MJ/kg ตามลำดับ และมีแนวโน้มว่าการใช้หญ้าแพงโกล่ากับถั่วคาวาลเคดแห้ง 75 และ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักจะมีประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารค่อนข้างดีกว่าการใช้อาหารข้นเสริมซึ่งจะมีประสิทธิด้อยกว่า แสดงว่าการใช้หญ้าแพงโกล่าแห้งกับถั่วคาวาลเคดทั้ง 2 ระดับ ทำให้อาหารหยาบมีระดับโปรตีนเพิ่มขึ้นและสามารถเพิ่มน้ำหนัก1กิโลกรัมได้ไม่ต่างกับการใช้อาหารข้นเสริม และยังมีแนวโน้มว่าปริมาณการใช้อาหาร ในการเพิ่มน้ำหนัก 1 กิโลกรัมดีกว่าการใช้อาหารข้นเสริม ซึ่งในทางปฏิบัติเกษตรกรควรจะปลูกถั่วอาหารสัตว์ปนกับหญ้าหรือปลูกถั่วแยกต่างหากและตัดถั่วมาในโคกินร่วมกับหญ้าจะเป็นทางหนึ่งที่จะเพิ่มโภชนะให้โคได้และให้ผลไม่แตกต่างจากการเพิ่มโภชนะให้โคโดยการใช้อาหารข้นเสริม จะเห็นว่าคุณภาพของอาหารหยาบซึ่งเป็นอาหารหลักของโค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเป็นสิ่งที่สำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งถ้าอาหารหยาบคุณภาพดีจะช่วยลดต้นทุนในส่วนของการใช้อาหารข้นเสริมได้เนื่องจากโคจะได้รับโภชนะที่พอเพียงจากอาหารหยาบ ความจำเป็นในการใช้อาหารข้นจะน้อยลงหรืออาจไม่ต้องใช้เลย (จินดาและคณะ, 2546)

จากรายงานความก้าวหน้าของโครงการพัฒนาการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชอาหารสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียง เหนือ ที่ได้มีการทดสอบที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์นครราชสีมา พบว่า ต้นถั่วเกิดโรคอย่างรุนแรง โดยพบ 3 กลุ่มอาการ คือ ลักษณะใบไหม้ มีแผลเป็นลักษณะเป็นรูและขอบแผลมีรอยไหม้ เกิดจากโรคแอนแทรคโนส ลักษณะใบหงิกผิดรูปร่าง ใบเล็กหงิกเป็นฝอย เกิดจากเชื้อไวรัสจำพวก Gemini virus และ อาการใบไหม้ทั้งใบ (leaf bright) เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia* ในส่วนของโรคที่เกิดจากไวรัสนั้น ผู้เชี่ยวชาญจากประเทศญี่ปุ่นได้ทำการจำแนกเชื้อ พบว่า เป็น peanut strip virus และพบว่าถั่วคาวาลเคดมีความแปรปรวนด้านความต้านทานโรคและแมลงน้อยมาก โอกาสที่จะคัดพันธุ์จากแหล่งพันธุกรรมที่มีอยู่นั้นค่อนข้างต่ำ (จีระวัชร์, 2544 และ สมจิตร และธำรงศักดิ์, 2545)

ในการวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยต้องการที่จะปรับปรุงพันธุ์ของถั่วคาวาลเคด โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้รังสีแกมมา เพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์ และนำต้นที่ได้ไปปลูกทดสอบ เพื่อคัดเลือกพันธุ์ที่สามารถต้านทานต่อการเกิดโรคจากเชื้อไวรัส และนำต้นพันธุ์ที่ได้มาขยายพันธุ์ ต่อไป ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ และอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ในอนาคตต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ด ใบ และข้อ ให้เกิดเป็นแคลลัส และชักนำให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์

2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ด ให้เกิดเป็นยอดหลายยอด และชักนำให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์

3. ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย และชักนำเซลล์แขวนลอยให้กลายเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์

4. ศึกษาค่าอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแคลลัสของถั่วคาวาเคดโดยการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ

5. ศึกษาค่าอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคดโดยการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ

6. การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ

7. การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ

8. ตรวจสอบต้นที่ผ่านการฉายรังสีด้วยเทคนิค RAPD

9. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วคาวาลเคดที่มีลักษณะที่ต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ด ใบ และข้อ ให้เกิดเป็นแคลลัส และชักนำให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์ ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดให้เกิดเป็นยอดหลายยอด และชักนำให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์ ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย และชักนำเซลล์แขวนลอยให้กลายเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ ศึกษาค่าอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแคลลัสโดยการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ศึกษาค่าอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์แขวนลอยโดยการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ ศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากแคลลัส และเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ และการสกัดดีเอ็นเอ การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอจากต้นพืชที่ผ่านการฉายรังสี เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วคาวาลเคดที่มีลักษณะที่ต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การใช้รังสี หรือสารเคมี ซึ่งการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในพืช เนื่องจากรังสีแกมมามีคุณสมบัติเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้ามีอำนาจทะลุทะลวงสูง วิธีการฉายรังสีไม่ยุ่งยาก ไม่มีรังสีตกค้างอยู่ในพืช (สิรินุช, 2536) และประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด ได้แก่ ข้าว ถั่วเหลือง ถั่วเขียว เบญจมาศ เก็กฮวย คาร์เนชั่น กล้วยหอมทอง ในพืชไร่วงศ์ถั่วและพืชน้ำมัน (สมศักดิ์และคณะ, 2549)

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการก่อกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมม่าร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า สามารถปรับปรุงลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจได้หลายอย่าง เช่น การเพิ่มผลผลิตที่สูงขึ้น การได้ต้นพืชที่แข็งแรง และคุณภาพที่ดีกว่าเดิม เป็นต้น ดังนั้น หากนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วคาวาลเคต ก็น่าจะทำให้ถั่วคาวาลเคตพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส และคัดเลือกต้นที่สามารถต้านทานต่อโรคไวรัสได้ และอาจจะได้ต้นถั่ว มีผลผลิตสูงขึ้น และมีคุณภาพทางอาหารให้สูงขึ้น เป็นต้น

1.5 คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

ถั่วคาวาลเคด (*Centrosema pascuorum* cv Cavalcade), แคลลัส (callus), เซลล์แขวนลอย (suspension), ค่าอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}), การเจริญเป็นต้นใหม่ (regeneration), และ อาร์เอพีดี (RAPD)

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

การวิจัยนี้สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และกลุ่มวิเคราะห์อาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัตว์และพืชอาหารสัตว์ กอง อาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี จะเป็นส่วนที่มีแหล่งข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพของพืช ในด้านพันธุศาสตร์ และการปรับปรุงพันธุ์พืชทั้งภายในห้องทดลองและแปลงปลูก ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งทั้งภาครัฐ เอกชน และเกษตรกรในการเพิ่มผลผลิต และพัฒนาคุณภาพสินค้าการเกษตร ดังนี้

1. ทราบถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ด ใบ และข้อ ให้เกิดเป็นแคลลัสและชักนำให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์

2. ทราบถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ด ให้เกิดเป็นยอดหลายยอด และชักนำให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์

3. ทราบถึงการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย และชักนำเซลล์แขวนลอยให้กลายเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์

4. ทราบค่าอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแคลลัส และเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคดโดยการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ

5. ทราบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากแคลลัส และเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ

6. ได้สายพันธุ์ถั่วคาวาลเคดที่มีลักษณะที่ต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส และอาจได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ดีอื่นๆ

7. สามารถนำข้อมูลวิจัยเหล่านี้ไปใช้ในการเรียน การสอน ระดับปริญญาตรี ปริญญาโท และปริญญาเอก

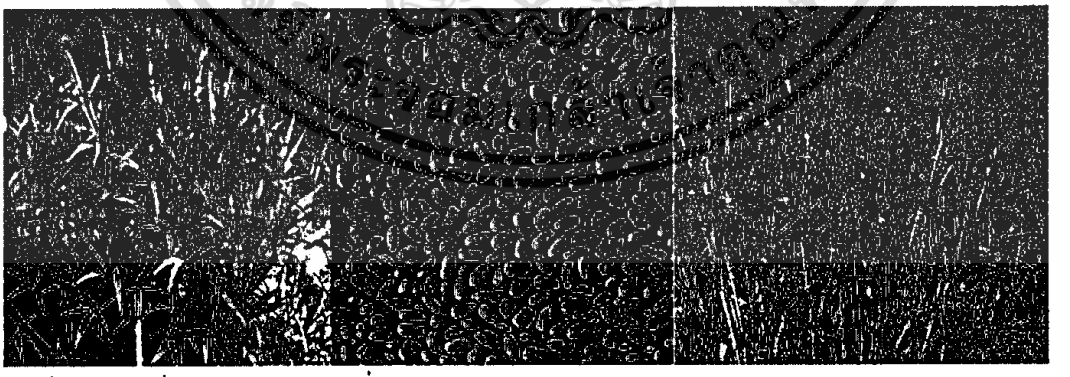
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ถั่วคาวาลเคด

ถั่วคาวาลเคดเป็นถั่วในสกุลเซนโตรซีม่า เป็นพืชฤดูเดียว แพร่กระจายอยู่ในแถบร้อนกึ่งแห้งแล้งที่มีช่วงฤดูแล้งยาวนานพบในทวีปอเมริกาตอนใต้และตอนกลางบางส่วน ลำต้นแถวเลื้อย ต้นที่ทอดนอนไปกับพื้นดินจะมีรากออกจากข้อ ใบมีขนาดเล็กเรียวแคบ และมีขนปกคลุม ใบมีสามใบย่อย ดอกมีสีม่วง และสีขาว เมล็ดมีสีน้ำตาล ผิวมัน (รูปที่ 2.1) ถั่วคาวาลเคดเจริญเติบโตและแพร่กระจายใน แหล่งที่มีฝนตก 1000–1500 มิลลิเมตรต่อปี และมีช่วงแล้งนาน 4–6 เดือน สามารถเจริญเติบโตได้ในดินหลายชนิดตั้งแต่ดินทรายจนกระทั่งดินเหนียว พีเอชของดินที่สามารถเจริญได้ตั้งแต่ 5.0-8.5 จากการศึกษาถั่วคาวาลเคดในออสเตรเลีย พบว่ามีการเจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิอากาศเขตมรสุม และทนต่อความแห้งแล้งได้ดี สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วเมื่อได้รับน้ำฝน เนื่องจากถั่วชนิดนี้มีการแพร่กระจายในบริเวณกว้างจึงทำให้มีความแปรผันทางลักษณะต่างๆในสายพันธุ์ค่อนข้างสูง (สายัณห์, 2540)

อาณาจักร (Kingdom) : Plantae
ส่วน (Division) : Magnoliophyta
ชั้น (Class) : Magnoliopsida
อันดับ (Order) : Fabales
วงศ์ (Family) : Fabaceae
สกุล (Genus) : *Centrosema*
สปีชีส์ (Species) : *pascuorum*



รูปที่ 2.1 ต้นและเมล็ด และ ดอก ของถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade ที่มา : http://www.thaicattle.com

ถั่วคาวาลเคดมีถิ่นกำเนิดบริเวณเขตร้อนของอเมริกาใต้ เป็นพืชฤดูเดียว ลักษณะต้นเป็นแบบเถาเลื้อย นอนไปตามผิวดิน และมีรากอยู่ตามข้อเป็นแบบ top root system โดยที่ขนาดและความยาวของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รากที่หยั่งลึกลงไปในดินจะขึ้นอยู่กับชนิดของดินที่ถั่วอาศัยอยู่ ใบดก มีสัดส่วนของใบมากกว่าลำต้น เป็นแบบ trifoliage leaf ประกอบด้วยใบย่อย 3 ใบ ใบมีสีเขียวเข้ม รูปใบคล้ายรูปไข่ แต่ค่อนข้างยาวและแคบกว่า ส่วนกว้างที่สุดอยู่ค่อนไปทางโคนใบ ปลายใบมนหรือเรียวเล็กแหลมขนาด 4 x 2 – 2.5 เซนติเมตร มีขนปกคลุมโดยเฉพาะด้านล่างของใบ ดอกมีขนาดใหญ่ ช่อดอกเป็นแบบ Raceme เกิดอยู่ระหว่างมุมใบ มีดอก 3-5 ดอก มีสีม่วงเข้มหรืออ่อนขึ้นอยู่กับพันธุ์ ฝักมีขนาดยาว 7 – 15 เซนติเมตร แต่ละฝักมีเมล็ด 15 – 20 เมล็ด ฝักจะเริ่มแก่ประมาณเดือนมกราคมถึง เดือนกุมภาพันธ์ ฝักแก่จะมีสีน้ำตาลแก่ (รูปที่ 2.1)

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

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

Centrosema pascuorum cv Cavalcade ถูกพัฒนาในเชิงพาณิชย์ในปี 1984 โดย Clements และคณะ เพื่อเพาะปลูกได้ในเขตร้อนกึ่งแห้งแล้ง ในภาคตะวันตกเฉียงเหนือประเทศออสเตรเลีย (Thiagalingam และคณะ 1997)

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) (อนุรักษ์, 2550)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพาะเลี้ยงได้จากทุกๆส่วนของเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ การเพาะเลี้ยงจะประสบความสำเร็จหรือไม่นั้น อาจจะต้องทดลองนำส่วนต่างๆของพืชเหล่านั้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งในส่วนของเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เพราะเซลล์แต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญเติบโตไม่เท่ากัน โดยส่วนมากนิยมใช้ส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

2.2.1 ส่วนต่างๆของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ได้แก่

2.2.1.1 เนื้อเยื่อบริเวณปลายยอด (shoot apex) เป็นบริเวณที่มีเซลล์มีการแบ่งตัวมากที่สุด บริเวณนี้วัดจากสุดปลายยอดลงมาไม่เกิน 5 มิลลิเมตร

2.2.1.2 เนื้อเยื่อบริเวณปลายราก (root apex) เป็นส่วนที่อยู่บริเวณถัดจากส่วนของหมวกราก (root cap) ซึ่งจะประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญคล้ายกับบริเวณส่วนของปลายยอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.3 เนื้อเยื่อเจริญในท่อลำเลียง (vascular ambium) เป็นเนื้อเยื่อเจริญที่พบในบริเวณส่วนของราก และลำต้น โดยจะอยู่บริเวณระหว่างกลุ่มของท่อน้ำ (xylem) และท่ออาหาร (phloem)

2.2.1.4 เนื้อเยื่อเจริญอยู่ระหว่างปล้อง (intercalary meristem) สามารถพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยมีหน้าที่ในการเพิ่มความยาวของปล้อง

2.2.1.5 เนื้อเยื่อพืชส่วนอื่นๆ ที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้ ได้แก่

2.2.1.5.1 ส่วนของเปลือกชั้นใน (inner bark) เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อท่ออาหาร และ cortex

2.2.1.5.2 ส่วนไส้ (pith) เป็นส่วนที่อยู่บริเวณกลางสุดของลำต้นซึ่งประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

2.2.1.5.3 ใบ (leaf) ในส่วนของมีเซลล์ของแผ่นใบที่เรียกว่า palisade parenchyma และ spongy parenchyma อยู่เป็นจำนวนมาก เหมาะสำหรับใช้ในการแยกโพรโทพลาสต์

2.2.1.5.4 ดอก (flower) ส่วนของดอกส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

2.2.1.5.5 ผล (fruit) เนื้อเยื่อของผลส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

2.2.1.5.6 เมล็ด (seed) ในบริเวณส่วนของเมล็ดจะประกอบด้วย 3 ส่วนสำคัญ คือ เอ็มบริโอ เอ็นโดสเปิร์ม และใบเลี้ยง ในการเพาะเลี้ยงส่วนของเอ็มบริโอภายในเมล็ดจะมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จค่อนข้างสูง

2.2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (อนุรักษ์, 2550)

ในปัจจุบันได้มีการนำเอาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในงานหลายสาขาวิชา เช่น พันธุศาสตร์ พันธุศาสตร์ของเซลล์ พันธุวิศวกรรมด้านพืช สรีรวิทยาของพืช ชีวเคมี ชีวโมเลกุล เซลล์วิทยา โรคพืช พฤษศาสตร์ และเภสัชศาสตร์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ที่สำคัญในด้านต่างๆ ดังต่อไปนี้ คือ

2.2.2.1 การขยายพันธุ์พืช (plant propagation) ในปัจจุบันการขยายพันธุ์พืชโดยวิธีปกติมีหลายวิธี ได้แก่ การตอน การติดตา การทาบกิ่ง และการเพาะเมล็ด เป็นต้น แต่ละวิธีต่างก็มีข้อดี ข้อเสียแตกต่างกัน เช่น การตอน การติดตา และการทาบกิ่ง จะได้ต้นพันธุ์ที่มีลักษณะเหมือนเดิม แต่การขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมาก ต้องใช้เวลายาวนาน สำหรับการเพาะเมล็ดจะได้ต้นพันธุ์ที่ไม่เหมือนเดิม อาจเกิดจากความผันแปรโดยได้ลักษณะที่ดี หรือไม่ดีไปจากต้นพันธุ์เดิมได้ ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถช่วยเพิ่มการขยายพันธุ์พืชให้ได้จำนวนมาก และในระยะเวลาที่เร็วกว่าการขยายพันธุ์ตามวิธีปกติ

ในปัจจุบันสามารถขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้เป็นจำนวนมาก ดังตัวอย่างต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชไร่นา ได้แก่ ข้าว ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง อ้อย หม่อน ยางพารา ยาสูบ ปาล์มน้ำมัน สบู่ดำ ป่านศรนาราย มันสำปะหลัง มันเทศ มันฝรั่ง ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วลิสง งา เผือก ละหุ่ง ฝ้าย ปอแก้ว ปอกระเจา และหญ้าสายพันธุ์ต่างๆ เป็นต้น

ไม้ดอก และไม้ประดับ ได้แก่ กล้วยไม้สายพันธุ์ต่างๆ เบญจมาศ หน้าวัว ทานตะวัน กุหลาบ พุดสวน ยี่หุบ บอนสี โกสน ว่านสี่ทิศ ว่านมหาโชค ว่านนางคุ้ม ว่านแสงอาทิศ ขิงแดง ขิงชมพู ปทุมมา ดาหลา หมากผู้หมากเมีย สับปะรดสี เฟิร์นก้านดำ บัวสายพันธุ์ต่างๆ เยอร์บิรา แกลดิโอลัส ลิลลี อาฟริกันไวโอเล็ต กลอกซิเนีย บีโกเนีย จิบโซฟิลลา ลิเซียนทัส สแตติส อะโลคาเซีย คาเนชัน แคตตัส ดราเซียนา และฟิลโลเดนดรอน เป็นต้น

ผัก และไม้ผล ได้แก่ ขิง ข่า ขมิ้น บุก กลอย เผือก หน่อไม้ฝรั่ง ขนุน ส้ม มะนาว มะม่วง มะพร้าว มะเฟือง มังคุด ทุเรียน น้อยหน่า ชมพู่ ลำไย สับปะรด มะละกอ องุ่น อินทผาลัม กีวีฟรุต สตรอเบอรี กล้วยสายพันธุ์ต่างๆ กาแฟ และแตงโม เป็นต้น

การผลิตในรูปหัวมันฝรั่งขนาดเล็กเรียกว่า ไมโครทูเบอร์ (microtubers) หรือผลิตเมล็ดพันธุ์ผักต่างๆ ในรูปของเมล็ดเทียม ได้แก่ แครอท โดยการเพาะให้เกิดเป็นเอ็มบริออยด์ แล้วเคลือบด้วยสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ผลสุดท้ายจะได้ลักษณะคล้ายกับเปลือกหุ้มเทียมที่เคลือบเอ็มบริออยด์เอาไว้ เลียนแบบเมล็ดในธรรมชาติ เมื่อนำไปออกปลูกจะได้ต้นที่มีลักษณะเหมือนเดิม

2.2.2.2 **การปรับปรุงพันธุ์** (plant improvement) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีส่วนช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ได้เป็นอย่างดี เช่น การช่วยย่นระยะเวลาในการสร้างสายพันธุ์แท้ โดยการเพาะเลี้ยงอับเรณูซึ่งมีจำนวนโครโมโซมหนึ่งชุดให้พัฒนาเป็นแคลลัสหรือต้นอ่อน จากนั้นเติมสารโคลชิซีนลงไปในอาหารที่เพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้โครโมโซมเพิ่มขึ้นมาอีกเท่าหนึ่งกลายเป็นสองชุดและเป็นสายพันธุ์แท้ หรือเพาะเลี้ยงส่วนของเอ็นโดสเปิร์มซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเป็นสามชุดก็จะได้พืชที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นสามชุด ซึ่งต้นพืชดังกล่าวเมื่อนำไปปลูกในสภาพธรรมชาติจะให้ผลที่ไม่มีเมล็ด นอกจากนี้ยังสามารถชักนำเกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี เช่น แกมมา อัลตราไวโอเลต และเอ็กซ์ เป็นต้น หรือใช้สารเคมี เช่น โคลชิซีน (colchicine) เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate) และโซเดียมเอไซด์ (sodiumazide) เป็นต้น เพื่อให้เกิดสายพันธุ์กลายที่มีลักษณะที่พึงประสงค์ เช่น สายพันธุ์กลายที่ทนทานต่อโรคแมลง ทนทานต่อสภาพดินกรด ดินเค็ม ทนต่อสภาพความแห้งแล้ง ทนทานต่อสารปราบวัชพืชบางชนิด หรือสายพันธุ์กลายที่มีสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่สูงขึ้นกว่าเดิม เป็นต้น

การปรับปรุงพันธุ์พืช สามารถสร้างพืชพันธุ์ต่างๆ ได้ตามความต้องการ เช่น การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนของพืชให้รอดชีวิตได้ ซึ่งถ้าปล่อยให้เอ็มบริโอเจริญเติบโตอยู่ในสภาพตามธรรมชาติอาจจะตายได้ เนื่องจากอาหารที่สะสมในเมล็ดมีอยู่ในปริมาณที่จำกัด เช่น เมล็ดกล้วยไม้และ เมล็ดข้าวที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ ในปัจจุบันสามารถผลิตลูกผสมระหว่าง apple กับ pear ได้ลูกผสมเป็น appear

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกผสมระหว่างผักกาดขาว (chinese cabbage) กับ กะหล่ำปลี (cabbage) ได้ลูกผสมเป็นผักกาดกระหล่ำ (hakuran) และลูกผสมไม้ดอกต่างๆ เช่น สร้อยทอง (sodidago) กับ แอสเตอร์ (aster) ได้เป็น sodidester แล้วใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโออ่อนในอาหารสังเคราะห์เพื่อให้ได้ลูกผสมที่สามารถเจริญเติบโตได้

ในธรรมชาติพืชต่างสายพันธุ์ (species) และต่างสกุล (genus) ไม่สามารถจะผสมพันธุ์กันได้ หรือถ้าผสมข้ามกันได้ก็เกิดขึ้นน้อย แต่การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชสามารถรวมลักษณะของพืชที่แตกต่างกัน 2 สายพันธุ์ไว้ในต้นเดียวกันได้ โดยการรวมโพรโทพลาสต์ของพืช (protoplast fusion) ซึ่งอาจใช้สารเคมี PEG หรือการใช้กระแสไฟฟ้าโดยเครื่อง somatic hybridizer หลังจากนั้นนำโพรโทพลาสต์ที่รวมกันแล้วมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อให้มีการพัฒนาเป็นต้นใหม่ ก็จะได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะรวมของพืชทั้ง 2 สายพันธุ์ แต่การทดลองส่วนใหญ่ไม่ค่อยประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากต้องใช้วิธีการ หรือการใช้เทคนิคขั้นสูงที่ซับซ้อนในการพัฒนาโพรโทพลาสต์ และต้องใช้ระยะเวลานานหลายเดือนในการพัฒนาให้กลายเป็นต้นใหม่ ปัจจุบันมีการใช้เครื่องยิงยีนหรืออนุภาคดีเอ็นเอ (particle gun หรือ microprojectile bombardment) ซึ่งสามารถยิงอนุภาคดีเอ็นเอเข้าไปในส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อเจริญของพืช รวมทั้งแคลลัส และเซลล์แขวนลอยได้โดยตรง และมีการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมมาช่วยในการย้ายยีนให้กับส่วนที่เป็นเนื้อเจริญของพืช แคลลัส และเซลล์แขวนลอย ได้เป็นผลสำเร็จโดยไม่จำเป็นต้องใช้โพรโทพลาสต์

2.2.2.3 **การผลิตพืชปราศจากโรค** (disease-free plants) โดยทั่วไปพืชที่ถูกเชื้อจุลินทรีย์เข้าทำลาย เช่น เชื้อแบคทีเรีย รา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อไวรัสที่เข้าทำลาย เชื้อไวรัสนี้จะติดไปกับส่วนของเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนของพืชตลอดเวลาทำให้ไม่สามารถผลิตพืชที่ปราศจากโรคได้ ซึ่งมีผลต่อพืชโดยตรง คือ พืชต้นนั้นจะมีความอ่อนแอ อัตราการเจริญเติบโตไม่สมบูรณ์ ผลผลิตต่ำหรืออาจทำให้พืชนั้นตายได้ การผลิตต้นพืชที่ปราศจากโรค โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทำได้โดยการตัดชิ้นส่วนบริเวณปลายยอด ให้มีขนาดเล็กประมาณ 0.01-0.05 มิลลิเมตร เพราะบริเวณปลายยอดมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว และต่อเนื่อง การตัดปลายยอดต้องตัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามมิติ ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื้อไวรัสเคลื่อนตัวตามท่อน้ำ และท่ออาหารไปไม่ถึง เมื่อนำเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ก็สามารถที่จะพัฒนาให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ และปราศจากเชื้อไวรัส เช่น มะเขือเทศ ยาสูบ เผือก มันฝรั่ง และมันเทศ เป็นต้น

2.2.2.4 **การเก็บรักษาพันธุ์พืช** (plant conservation) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถทำได้ในขวด จานแก้ว หรือในหลอดทดลอง ซึ่งต้องถูกเพาะเลี้ยงอยู่ในสภาพที่ปราศจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ และใช้เนื้อที่ในการจัดเก็บน้อย จึงเหมาะสำหรับการเก็บรวบรวมสายพันธุ์พืชที่หายาก หรือพืชที่ใกล้จะสูญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ชนิดต่างๆ มาเพาะเลี้ยงไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยต้องเลือกชิ้นส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อพืชให้เหมาะสมกับอาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยง

วิธีที่จะเก็บรักษาสายพันธุ์พืชต่างๆ ไว้ในหลอดทดลองโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแคลลัสและเซลล์แขวนลอย ในอาหารที่มีส่วนประกอบของสารชะลอการเจริญเติบโตบางชนิด ซึ่งมีผลทำให้พืชมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ ซึ่งเป็นการประหยัดอาหารที่เพาะเลี้ยง แรงงาน เวลา และค่าใช้จ่ายต่างๆ ในการที่จะต้องเปลี่ยนอาหารใหม่เป็นประจำทุกๆ เดือน และมีอีกวิธีหนึ่ง คือการเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืช แคลลัสและเซลล์แขวนลอย ไว้ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บรักษาไว้ได้ในระยะเวลานาน ซึ่งจะมีขั้นตอนที่ซับซ้อน และต้องใช้ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง เมื่อต้องการจะเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อพืช แคลลัส และเซลล์แขวนลอย ก็สามารถที่จะย้ายออกจากไนโตรเจนเหลวโดยวิธีการที่ถูกต้อง แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้ตามชนิดอาหารของพืชชนิดนั้นๆได้

2.2.2.5 การผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) การนำเนื้อเยื่อของพืชสมุนไพรมาเพาะเลี้ยงเพื่อให้ผลิตสารเคมีบางชนิดเช่น แอลคาลอยด์ (alkaloid) สเตรอยด์ (steroid) เทอร์พีนอยด์ (terpenoid) แอนทราคิวโนน (anthraquinones) เรซิปีน (resepine) และสารอื่นๆ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในทางเภสัชกรรม เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้น Ginseng (*Ranax ginseng c.v Meyer*) สามารถจะผลิตสารหลายชนิดที่มีผลต่อการช่วยให้เลือดไหลเวียนได้ดี และสารที่ต้านการเกิดมะเร็ง (anti-tumor) สำหรับการเพาะเลี้ยงต้นแพงพวยฝรั่ง (*Cantharanthus raseus*) ซึ่งมีสารแอลคาลอยด์หลายชนิด และมีสารที่สำคัญคือ vineblastine และ vineristine ซึ่งเป็นสารต่อต้านการเกิดมะเร็งเช่นกัน

2.2.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture)

แคลลัส (callus) หมายถึง กลุ่มเซลล์พาเรงไคมา (parenchyma) ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อชนิดต่างๆแคลลัสมีขนาดต่างๆกันหลายรูปแบบมีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีส่วนประกอบของแวคคิวโอสูง แคลลัสสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น มีความแข็ง เรียกว่า compact callus และแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆฉ่ำน้ำ คล้ายกับฟองน้ำ เรียกว่า friable callus ในบางครั้งอาจพบแคลลัสทั้งสองแบบอยู่ในก้อนหรือชิ้นเนื้อเยื่อเดียวกัน เนื้อเยื่อพืชทุกส่วนที่ยังมีชีวิต สามารถที่จะชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ ยกตัวอย่างเช่น ส่วนของเอ็มบริโอ ยอด ใบเลี้ยง ลำต้น ราก ใบอ่อน ดอกอ่อน เมล็ด เรณู แคมเบียม คอร์เทกซ์ และท่อลำเลียงอาหาร เป็นต้น

2.2.4 ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลลัส

2.2.4.1 สารควบคุมการเจริญเติบโต หมายถึง สารในกลุ่มออกซิน และไซโตไคนิน ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืช โดยขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น ถ้าอัตราส่วนออกซินต่อไซโตไคนินมีอัตราส่วนสูง เนื้อเยื่อพืชจะพัฒนาไปเป็นราก แต่ถ้าอัตราส่วนออกซินต่อไซโตไคนินมีอัตราส่วนต่ำ เนื้อเยื่อพืชจะพัฒนาไปเป็นส่วนยอด ถ้าอัตราส่วนสมดุล เนื้อเยื่อจะพัฒนาไปเป็นรากและยอด แต่ในบางกรณีอาจขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ

2.2.4.2 ธาตุอาหารชนิดต่าง เช่น เคซีนไฮโดรไลเซท กลูตามีน แอลฟา-คีโตกลูตาลิก โพรลีน แอสปาราจีน อาร์จินีน และ ซิลเวอร์ไนเทรต นอกจากนี้ยังมีสารสกัดจากยีสต์ และน้ำมะพร้าวยังมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้เช่นกัน

2.2.4.3 แหล่งคาร์บอน เป็นแหล่งให้พลังงานที่สำคัญ เช่น น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุสโตส น้ำตาลซอบิทอล น้ำตาลแมนนิทอล น้ำตาลมอลโทส และน้ำตาลกาแลกโตส เป็นต้น ซึ่งโดยปกติจะใช้น้ำตาลประมาณ 20-40 กรัมต่อลิตร หรือประมาณ 2-4 เปอร์เซ็นต์

2.2.4.4 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ แสง ซึ่งโดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงแคลลัสจะต้องใช้แสงที่มีความเข้มข้นต่ำ หรือนิยมเพาะเลี้ยงในที่มืดที่ไม่ต้องการแสงเลย และอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วงประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส

2.2.4.5 สถานะของอาหารที่เลี้ยง แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งมีการเจริญเติบโตได้น้อยกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารแข็งจะช่วยให้แคลลัสมีพื้นที่สัมผัสอาหารน้อยกว่า

2.2.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension culture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยนั้น อาจเริ่มต้นได้จากการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช โดยนำเอาชิ้นส่วนต่างๆของพืช ได้แก่ เนื้อเยื่อ ปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอ็มบริโอ อับเรณู รังไข่ ตาข้าง ดอก และผล มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เช่น สูตรอาหาร Murashige และ Skoog ซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินในอัตราส่วนค่อนข้างสูง โดยสารที่นิยมใช้ได้แก่ 2,4-D NAA และ 2,4,5-T เป็นต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหารสังเคราะห์จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืชไปเป็นแคลลัสซึ่งกลุ่มเซลล์จะเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆจากนั้นนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า ซึ่งมีผลทำให้กลุ่มเซลล์ที่เกาะกันหลวมๆสามารถหลุดแยกออกจากกันมาแขวนลอยอยู่ในอาหาร ในบางกรณีอาจใช้แท่งแก้ว หรือ ช้อนตักสารเคมีช่วยกวนอย่างเบาๆ เพื่อทำให้เซลล์หลุดจากก้อนแคลลัสก็ได้ เซลล์แขวนลอยที่ดีนั้นควรประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก และมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ที่มีความสม่ำเสมอในการเจริญเติบโต

2.2.6 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (รังสฤษฎ์, 2540) และ (อนุรักษ์, 2550)

อาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายสูตรด้วยกัน สูตรอาหารต่างๆ แต่ละสูตรจะมีชื่อเรียกต่างๆ กัน ตามชื่อผู้คิดค้น เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

White (1943) เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงปลายรากของมะเขือเทศ

Vacin และ Went (1949) เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

Murashige และ Skoog (1962) ค้นพบสูตร MS เป็นสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบ

Linsmaier และ Skoog (1965) ค้นพบอาหารสูตร LS

Nitch และ Nitch (1969) ค้นพบสูตรอาหาร NN

Gamborg และคณะ (1968) ค้นพบสูตรอาหาร B_5

Chu (1975) ค้นพบสูตร N_6 เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพด

Lloyd และ McCown (1980) ค้นพบสูตร WPM เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของไม้เนื้อแข็ง

Driver และ Kuniyuki (1984) ค้นพบสูตร DKW เป็นสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวอลนัส

สูตรอาหารต่างๆ ที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีอยู่หลายสูตร เมื่อนำมาวิเคราะห์แล้วจะพบว่ามีองค์ประกอบต่างๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมต่อชนิดของพืช ตลอดจนชนิดและสภาพของชิ้นส่วนพืช (explants) ที่จะนำมาเลี้ยง อย่างไรก็ตามอาหารที่นิยมใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากที่สุดคืออาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้เลี้ยงกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์ที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา (differentiated) มีช่องว่างในเซลล์จำนวนมากและเซลล์ยังไม่มีการจัดรูปแบบที่แน่นอน ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงแคลลัส (callus culture) และเซลล์แขวนลอย (suspension culture) ของพืชส่วนใหญ่เกือบทุกชนิดทำได้ง่ายกว่าการเลี้ยงจากส่วนอื่นๆ แคลลัสเหล่านี้ได้จากการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium) ที่อย่างน้อยที่สุดประกอบด้วยเกลือของธาตุอาหารที่ต้องการครบคือ สารประกอบอนินทรีย์หรือสารประกอบอินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง

แม้พืชจะมีความต้องการขั้นพื้นฐานในการเจริญเติบโตไม่ซับซ้อนก็ตาม แต่การนำชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นั้น มีความต้องการธาตุอาหารและสารอาหารบางอย่างที่จำเป็นที่มีความซับซ้อนมากกว่า และมีลักษณะเป็น seldom autotrophic กล่าวคือ ต้องการทั้งธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองที่ใช้กันตามปกติในการเลี้ยงพืชในสารละลาย นอกจากนั้น ยังต้องการธาตุอาหารอื่นๆ เช่น แหล่งของธาตุคาร์บอน และวิตามินอย่างมาก ปกติแล้วเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่แยกออกมาเลี้ยงจะต้องการวิตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ ซึ่งปกติสังเคราะห์ได้เองจากส่วนหนึ่งของต้นเพื่อไปสะสมไว้ยังอีกส่วนหนึ่งของต้นพืช แล้วเคลื่อนย้ายไปยังส่วนอื่นๆเพื่อใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม อย่างไรก็ตามผลของแต่ละสารประกอบที่จำเป็นนี้ยังไม่เป็นที่ทราบชัดสมบูรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึม เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารที่ใช้มักถูกดัดแปลงไปตามความมุ่งหมาย เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อกำเนิดอวัยวะ (organogenesis) และ/หรือ การกำเนิดคัพภะ (embryogenesis) จึงทำให้ยากต่อการหาข้อสรุป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พื้นฐานที่สอดคล้องไปในทางเดียวกันได้โดยง่าย อย่างไรก็ตาม โดยทั่วๆไปแล้วสามารถจำแนกสารเหล่านี้เป็นกลุ่มๆได้ดังนี้

2.2.6.1 ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์

2.2.6.1.1 ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณมาก (macro element/nutrients) (macronutrients หรือ major elements) ได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และซัลเฟอร์ (S) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณมาก และขาดไม่ได้ โดยทั่วไปพืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณ 25-60 มิลลิโมล หรืออาจจะมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.6.1.2 ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณน้อย (micro-element/nutrients) (micronutrients หรือ trace elements) ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้พืชต้องการนำไปใช้ในปริมาณน้อย แต่ขาดไม่ได้ เช่น เหล็ก (Fe) ใช้ประมาณ 1 ไมโครโมล แมงกานีส (Mn) ใช้ประมาณ 20-90 ไมโครโมล โคบอลต์ (Co) ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมล สังกะสี (Zn) ใช้ประมาณ 5-30 ไมโครโมล ทองแดง (Cu) ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมล โมลิบดีนัม (Mo) ใช้ประมาณ 1 ไมโครโมล และโบรอน (B) ใช้ประมาณ 25-100 ไมโครโมล โดยทั่วไปพืชต้องการแร่ธาตุอาหารรองไปใช้ในปริมาณน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.6.2 ธาตุอาหารพวกอินทรีย์

2.2.6.2.1 วิตามิน เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีสำคัญมาก มีผลทำให้พืชมีการพัฒนา และเจริญเติบโต มีหลายชนิดดังต่อไปนี้

2.3.6.2.1.1 ไทอามีน (thiamine) หรือวิตามิน B_1 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{17}N_4OS$ มีน้ำหนักโมเลกุล 265.35 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.6.2.1.2 อินโนสิทอล (inositol) สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_6H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 180.15 ปกติจะใช้ในรูปของไมโอ-อินโนสิทอล (myo-inositol)ใช้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 50-5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.6.2.1.3 ไนอะซิน (niacin) หรือกรดนิโคทินิก (nicotinic acid) หรือเรียกว่าวิตามิน B_3 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_6H_5NO_2$ น้ำหนักโมเลกุล 123.11 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.6.2.1.4 ไพริดอกซิน (pyridoxine) หรือวิตามิน B_6 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_{11}NO_3$ น้ำหนักโมเลกุล 169.18 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.6.2.1.5 ไบโอติน (biotin) หรือวิตามิน H หรือวิตามิน B_7 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ น้ำหนักโมเลกุล 244.31 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.01-1 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2.6.2.1.6 อะดีนีน (adenine) หรือวิตามิน B_4 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_5H_5N_5$ น้ำหนักโมเลกุล 135.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6.2.1.7 กรดแอสคอบิก (ascorbic acid) หรือวิตามิน C สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_6H_8O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 176.13

2.2.6.2.1.8 กรดโฟลิก (folic acid) หรือวิตามิน M หรือวิตามิน B_9 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{19}H_{19}N_7O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 441.14

2.2.6.2.1.9 กรดแพนโททีนิก (pantothenic acid) หรือแคลเซียมแพนโททีเนต (calcium pantothenate) หรือเรียกว่าวิตามิน B_5 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_9H_{17}NO_5$ น้ำหนักโมเลกุล 219.24

2.2.6.2.1.10 ไซยาโนโคบาลามิน (cyanocobalamine) หรือวิตามิน B_{12} สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{63}H_{90}CoN_{14}O_{14}P$ น้ำหนักโมเลกุล 1355.4

2.2.6.2.1.11 โคลีน คลอไรด์ (choline chloride) สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_5H_{14}ONCl$ น้ำหนักโมเลกุล 139.63

2.2.6.2.1.12 ไรโบฟลาวิน (riboflavin) หรือวิตามิน B_2 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{17}H_{20}N_4O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 376.37

2.2.6.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) ได้แก่ ฮอร์โมนพืชต่างๆ มีทั้งที่พืชสังเคราะห์ขึ้นได้เอง และมนุษย์สังเคราะห์ขึ้น ซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช เร่งการแบ่งเซลล์ และการขยายตัวของเซลล์ ฮอร์โมนพืชเหล่านี้สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้

2.2.6.2.2.1 ออกซิน (auxin) ช่วยชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ และการรวมเป็นกลุ่มของแคลลัส ออกซินปกติจะพบในรูปของกรดอินโดลอะซิติก (indol-3-yl acitic acid : IAA) ส่วน IAA ที่ผลิตจากทริปโตเฟนหรืออินโดล โดยส่วนมากพบได้ในใบอ่อนที่กำลังงอก และในเมล็ดที่กำลังพัฒนาในขณะที่มีการงอก สาร IAA จะมีการเคลื่อนย้ายจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้ มีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต ควบคุมการขยายขนาดของเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ และมีผลในการกระตุ้นการเกิดราก

2.2.6.2.2.2 กรดอินโดลอะซิติก (indol-3-yl acetic acid) หรือ 3-indolacetic acid เรียกย่อๆ ว่า IAA สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_9NO_2$ น้ำหนักโมเลกุล 175.19 สามารถละลาย ในอะซิโตน และอีเทอร์

2.2.6.2.2.3 กรดแอลฟาแนพทาลีนอะซิติก (α-napthalene acetic acid) หรือ 1-napthalene acetic acid หรือเรียกย่อๆ ว่า NAA สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{10}O_2$ ($C_{10}H_7CH_2CO_2H$) น้ำหนักโมเลกุล 186.21 สามารถละลายในแอลกอฮอล์

2.2.6.2.2.4 กรด 2,4 ไดคลอโรฟีนอกซีอะซิติก (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) หรือเรียกย่อๆ ว่า 2,4-D สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_6Cl_2O_3$($Cl_2C_6H_3OCH_2CO_2H$) น้ำหนักโมเลกุล 221.04 สามารถละลายในแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6.2.2.5 กรด2,4,5-ไตรคลอโรฟินอกซีอะซิติก (2,4,5Trichlorophenoxy acetic acid) หรือเรียกย่อๆ ว่า 2,4,5-T สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_5Cl_3O_3(Cl_3C_6H_2OCH_2CO_2H)$ น้ำหนักโมเลกุล 255.48 สามารถละลายในแอลกอฮอล์

2.2.6.2.2.6 กรดอินโดล-3-บิวทีริก (3-idole butyric acid) หรือ indol-3-butyric acid หรือ 4-[3-indoly] butyric acid หรือ เรียกย่อๆ ว่า IBA สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{13}NO_2$ น้ำหนักโมเลกุล 203.24 สามารถละลายในแอลกอฮอล์ อีเทอร์ และอะซิโตน

2.2.6.2.2.7 กรดพารา-คลอโรพีนอกซีอะซิติก (p-chlorophenoxyacetic acid) หรือ เรียกย่อๆ ว่า 4-CPA หรือ PCPA สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_7ClO_3(ClC_6H_4OCH_2COCl)$ น้ำหนักโมเลกุล 186.59

2.2.6.2.2.8 กรด 2-แนพทอกซีอะซิติก (2-naphthoxyacetic acid) หรือ เรียกย่อๆ ว่า NOA สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{10}O_3(C_{10}H_7OCH_2CO_2H)$ น้ำหนักโมเลกุล 202.21 เป็นผลึกสีเทา สามารถละลายในแอลกอฮอล์ อีเทอร์ และกรดอะซิติก

2.2.6.2.2.9 กรด 3,6-ไดคลอโร-ออโท-อะนิสิก (3,6-dichloro-o-anisic acid) หรือ 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid หรือ 3,6-dichloroanisic acid หรือเรียกย่อๆ ว่า dicamba สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_8H_6Cl_2O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 221.04 สามารถละลายในแอลกอฮอล์ และอะซิโตน

2.2.6.2.2.10 กรด 4-อะมิโน-3,5,6-ไตรคลอโรพิโคลินิก (4-amino-3,5,6-trichloro picolinic acid) หรือเรียกย่อๆ ว่า picloram สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_6H_3\ Cl_3N_2O_2$ น้ำหนักโมเลกุล 241.46 สามารถละลายในน้ำ และอะซิโตน

2.2.6.2.2.11 กรดฟีนีลอะซิติก (phenylacetic acid) หรือเรียกย่อๆ ว่า PAA สูตรทางเคมี $C_8H_8O_2$ $C_6H_5CH_2CO_2H$ น้ำหนักโมเลกุล 136.15 สามารถละลายในแอลกอฮอล์ และอีเทอร์

2.2.6.2.2.2 **ไซโตคินิน** (cytokinin) เป็นอนุพันธ์ของอะดีนีนซึ่งพบได้หลายชนิดในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ไซโตไคนินเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของอะดีนิน โดยจะเกิดในบริเวณปลายราก และเอ็มบริโอที่กำลังเจริญ มีผลต่อการแสดงออกของพืช คือสามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และสามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในพืชที่เกิดเป็นปุ่มปม นอกจากนี้ยังกระตุ้นการเจริญทางด้านข้างของพืช กระตุ้นการเจริญของตาข้าง ชะลอการแก่ของพืช นอกจากนั้นยังมีผลเล็กน้อยต่อการพัฒนาของผลโดยสารในกลุ่มนี้ที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่

2.2.6.2.2.2.1 6-เฟอร์เฟอริลอะมิโนเพียวรีน (6-furfurylaminopurine) หรือเรียกย่อๆ ว่า ไคนีทีน (kinetin) สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_9N_5O$ น้ำหนักโมเลกุล215.2 สามารถละลายในเมทานอล และเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6.2.2.2.2 6-เบนซิลอะมิโนเพียวรีน (6-benzylaminopurine) หรือเรียกย่อๆ ว่า BA หรือ BAP สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{12}H_{11}N_5$ น้ำหนักโมเลกุล 225.26 สามารถละลายในเมทานอลและ เอทานอล

2.2.6.2.2.2.3 2-ไอโซเพนทินิลอะมิโนเพียวรีน (2-isopentenyl aminopurine) หรือเรียกย่อๆ ว่า 2iP สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_{13}N_5$ น้ำหนักโมเลกุล 203.3 ละลายใน 1N. NaOH

2.2.6.2.2.2.4 ซีเอทิน (zeatin) หรือ 6-(4-ไฮดรอกซี-3-เมทิล-ทราน-2-บิวทีนิวอะมิโน) เพียวรีน (6-(4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butenylamino) purine) หรือเรียกย่อๆ ว่า zea เป็นสารที่เกิดในธรรมชาติ สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{10}H_{13}N_5O$ น้ำหนักโมเลกุล 219.25 ลักษณะสีขาวปนเหลืองๆ ละลายใน 1N. NaOH

2.2.6.2.2.3 จิบเบอร์เรลลิน (gibberellin) สารกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้น้อยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ใช้กันทั่วไป ได้แก่ กรดจิบเบอร์เรลลิก (gibberellic acid) สังเคราะห์จากกรดเมวาโลนิก (mevalonic acid) ในเนื้อเยื่อพืช หรือในเอ็มบริโอที่มีการเจริญขึ้น กรดจิบเบอร์เรลลิก สามารถที่จะเคลื่อนย้ายผ่านท่อน้ำและท่ออาหารได้

กรดจิบเบอร์เรลลิก หรือเรียกย่อๆ ว่า GA_3 สูตรทางเคมีประกอบด้วย $C_{19}H_{22}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 346.38 สามารถละลายใน เมทานอล เอทานอล และอะซิโตน

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเหล่านี้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายและเก็บรักษาไว้ในสภาพที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.1

2.2.6.2.3 สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน ที่มีส่วนสำคัญในการให้พลังงานแก่เนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ น้ำตาลที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีทั้งชนิดที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดียว และน้ำตาลโมเลกุลคู่ โดยปกติจะใช้น้ำตาลปริมาณ 20-40 กรัม หรือ 2-4 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเตรียมอาหาร 1 ลิตร หรือพบในบางรายงานอาจใช้ปริมาณมากกว่านี้ ตัวอย่างน้ำตาลที่ใช้ได้แก่

2.2.6.2.3.1 กลูโคส (glucose) สูตรทางเคมี $C_6H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 180.16

2.2.6.2.3.2 ฟรักโทส (fructose) สูตรทางเคมี $C_6H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 180.16

2.2.6.2.3.3 กาแลกโทส (galactose) สูตรทางเคมี $C_6H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 180.16

2.2.6.2.3.4 ซอบิทอล (sobitol) สูตรทางเคมี $C_6H_{14}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 182.17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.2.6.2.3.5 แมนนิทอล (mannitol) สูตรทางเคมี $C_6H_{14}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 182.17

2.2.6.2.3.6 ซูโครส (sucrose) สูตรทางเคมี $C_{12}H_{22}O_{11}$ น้ำหนักโมเลกุล 342.30

2.2.6.2.3.7 มอลโทส (maltose) สูตรทางเคมี $C_{12}H_{22}O_{11}$ น้ำหนักโมเลกุล 342.30

2.2.6.2.3.8 ซูคราโลส (sucralose) สูตรทางเคมี $C_{12}H_{19}Cl_3O_8$ น้ำหนักโมเลกุล 397.64

2.2.6.2.4 กรดอะมิโน (amino acid) กรดอะมิโนมีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชเป็นอย่างมาก กรดอะมิโนมีประมาณ 20 ชนิด และมีการใช้ในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น ไกลซีน (glycine) ใช้ประมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อะลานีน (alanine) และ อาร์จีนีน (arginine) ใช้ประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แอสปาราจีน (asparagine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสปาติก (aspartic acid) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีสทีน (cystein) ใช้ประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูตามีน (glutamine) และ กรดกลูตามิก (glutamic acid) ใช้ประมาณ 8 มิลลิโมล ลิวซีน (leucine) เมทไทโอนีน (methionine) และ ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โพรลีน (proline) ใช้ประมาณ 100-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เซอรีน (serine) ทริปโตเฟน (tryptophan) และไทโรซีน (tyrosine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นต้น โดยทั่วไปประสิทธิภาพในการทำงานของกรดอะมิโนที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะอยู่ในรูปของ L มากกว่าในรูปของ D ในบทนี้จะขอกล่าวถึงกรดอะมิโนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับมวลโมเลกุล การเก็บรักษา และตัวทำละลาย

2.2.6.2.5 สารอื่น ๆ เช่น สารอินทรีย์อื่นๆ สารเหล่านี้ได้จากผลิตภัณฑ์ของพืช เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน (coconut milk) น้ำมะเขือเทศ (tomato juice) น้ำองุ่น (grape juice) น้ำมันฝรั่ง (potato juice) กล้วย (banana) น้ำข้าวโพด (corn milk) สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) และอื่นๆ บทบาทของสารอินทรีย์เหล่านี้มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช นอกจากนี้ผงถ่าน (activated charcoal) เมื่อเติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะช่วยดูดสารพิษหรือสิ่งที่ถูกกำจัดออกมาจากเซลล์ เช่น พวกฟีนอลิกต่างๆ จะทำให้เนื้อเยื่อพืชไม่ได้รับอันตรายต่อสารดังกล่าว และสามารถทำให้เนื้อเยื่อพืชเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ข้อเสียของผงถ่าน คือผงถ่านสามารถยึดเกาะกับโมเลกุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงไปในอาหารได้ และมีผลทำให้เนื้อเยื่อพืชไม่สามารถดูดสารควบคุมการเจริญเติบโตมาใช้ได้อย่างเต็มที่ และทำให้เนื้อเยื่อพืชเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ มักใช้ผงถ่านที่ความเข้มข้นประมาณ 0.5-3.0 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

142895

ตารางที่ 2.1 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโตจากตัวทำละลายและสภาวะเก็บรักษา

กลุ่มสาร	ชื่อสาร	ตัวทำละลาย	การเก็บ
ออกซิน	Indole-3-acetic acid (IAA)	1N NaOH	0°C
(auxins)	Indole butyric acid (IBA)	1N NaOH	0-5°C
	Naphthaleneacetic (NAA)	1N NaOH	อุณหภูมิห้อง
	2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)	50%EtOH	อุณหภูมิห้อง
	2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)	50%EtOH	อุณหภูมิห้อง
ไซโตไคนิน	N_6-Benzyladenine (BA)	1N NaOH	อุณหภูมิห้อง
(cytokinins)	Kinetin	1N NaOH	0°C
	Zeatin	1N NaOH	0°C
	N_6-isopentenyl adenine (2iP)	1N NaOH	0°C
สารควบคุมการ	Abscissic acid (ABA)	1N NaOH	0°C
เจริญเติบโตอื่นๆ	Gibeberellic acid (GA)	50%EtOH	อุณหภูมิห้อง
	Picloram	0.2M KOH	0°C

หมายเหตุ EtOH = Ethanol alcohol
NaOH = Sodium hydroxide
KOH = Potassium hydroxide
N = Normality
M = Molarity

2.2.6.2.5.1 ชนิดและสายพันธุ์ พืชต่างชนิดและสายพันธุ์ ส่วนใหญ่ต่างต้องการธาตุอาหารไม่เหมือนกัน

2.2.6.2.5.2. อายุและระยะการพัฒนา แม้เป็นพืชชนิดและสายพันธุ์เดียวกัน ถ้าอายุและระยะการพัฒนาต่างกัน ก็อาจต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน

2.2.6.2.5.3. ชนิดของชิ้นส่วนพืช พืชชนิดเดียว หรือแม้กระทั่งต้นเดียวกัน แต่ใช้ชิ้นส่วนของพืชส่วนต่างๆ เช่นใช้ส่วนยอดมาเลี้ยงจะต้องใช้สูตรอาหารสูตรหนึ่งที่แตกต่างออกไปจากสูตรที่ใช้เลี้ยงใบหรือราก

2.2.6.2.5.4. เป้าหมายของการเพาะเลี้ยง พืชชนิดเดียวกันและชิ้นส่วนเดียวกัน แต่มีเป้าหมายของการเลี้ยงต่างกัน จำเป็นต้องใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกันด้วย ตัวอย่าง ต้องการเลี้ยงให้เกิดเป็นยอดก็ใช้สูตรอาหารสูตรหนึ่ง ที่แตกต่างไปจากสูตรที่ต้องการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสหรือราก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6.2.5.5. สถานะของอาหาร ชิ้นส่วนพืชเดียวกันที่เลี้ยงในสภาพอาหารแข็ง (solid medium) อาจได้ผลแตกต่างไปจากการเลี้ยงในอาหารเหลว (liquid medium) หรืออาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium)

2.2.7 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช (อนุรักษ์, 2550)

การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืชถือว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชว่าจะประสบความสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับขั้นตอนนี้ ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่สามารถนำมาฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญ ปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอ็มบริโอ อับเรณู รังไข่ ตาข้าง และดอกเป็นต้น โดยจะต้องทำให้เนื้อเยื่อพืชเหล่านั้นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อนที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เพราะว่าในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ อากาศ จะมีเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา และไวรัสแพร่กระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุที่สำคัญของการปนเปื้อน (contamination) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และเชื้อจุลินทรีย์มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่าเนื้อเยื่อพืชในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และทำให้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และจะตายในที่สุดซึ่งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์นี้เป็นสาเหตุสำคัญที่สุดที่ทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่ประสบความสำเร็จ

การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เป็นการทำให้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์โดยสารเคมีจะมีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์นั้นตายได้โดยการเข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ระบบการควบคุมสารผ่านเข้าออกเสียไป พร้อมทั้งกรดอะมิโน น้ำ และแร่ธาตุต่างๆภายในก็จะสูญเสียไปด้วย สารเคมีสามารถทำปฏิกิริยากับสารในไซโตพลาสซึม จะมีผลทำให้เกิดการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ หรือสารเคมีสามารถจับกับโปรตีนในเอนไซม์ และโปรตีนเสียสภาพไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ สารเคมีที่ใช้สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อมีจำนวนมากหลายชนิด ซึ่งมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจะต้องใช้ดุลยพินิจในการเลือกใช้สารเคมีให้มีความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการ โดยมีแนวทางในการเลือกใช้ดังนี้

2.2.7.1 มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด และมีเปอร์เซ็นต์ความปลอดจุลินทรีย์สูง

2.2.7.2 สารเคมีสามารถออกฤทธิ์ได้รวดเร็ว

2.2.7.3 สามารถละลายหรือผสมกับน้ำได้ง่าย และคงสภาพหลังจากการละลายแล้ว ไม่ควรมีสีและกลิ่นอันไม่พึงประสงค์

2.2.7.4 ราคาไม่แพง และหาซื้อได้ง่าย

2.2.7.5 ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ และไม่เป็นอันตรายต่อชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.8 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนของเนื้อเยื่อพืชมีดังต่อไปนี้

2.2.8.1 แคลเซียมไฮโปรคลอไรด์ ($Ca(OCl_2)$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 9-10 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.2.8.2 โซเดียมไฮโปรคลอไรด์ ($Na(OCl_2)$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5-5 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.2.8.3 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 3-12 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-15 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

2.2.8.4 คลอร็อกซ์ (Clorox) เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้กันโดยทั่วไปตามบ้าน หรือน้ำยาซักผ้า ขาวที่มีชื่อทางการค้าว่า ไฮเตอร์ โดยภายในส่วนประกอบของสารเหล่านี้จะมีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 5-15 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-20 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.2.8.5 สารละลายโปรไมด์ (bromide solution) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 2-10 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.2.8.6 ซิวเวอร์ไนเทรต ($Ag(NO_3)_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

2.2.8.7 สารละลายไอโอดีน (Iodine solution) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

2.2.8.8 เมอคิวริคลอไรด์ ($HgCl_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.1-1.0 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 2-10 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีพอสมควร

2.3.8.9 เมอคิวริไอโอไดด์ (HgI_2) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

2.2.8.10 เมอคิวริโบรไมด์ ($HgBr_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

2.2.8.11 เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) ความเข้มข้นที่ใช้ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 1-5 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.2.8.12 กรดกัมมะถันหรือกรดซัลฟุริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 20-70 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-20 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.2.8.13 เบนโซโคเมียมคลอไรด์ (benzalkonium chloride) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.01-0.1 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-20 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

2.2.8.14 สารปฏิชีวนะ (Antibiotic) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 4-50 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลาที่ใช้ 30-60 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังมีเทคนิคอื่นๆในการฆ่าเชื้อโยไม่ต้องใช้สารเคมี เช่น การอาบด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet light) หรือที่เรียกกันว่าแสง UV การเผาไฟซึ่งใช้กับตัวอย่างที่แข็งๆ เช่น เมล็ด ท่อนไม้ เป็นต้น

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

โดยมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องการปรับปรุงพันธุ์โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในถั่วเหลือง (Soybean: Glycine max L. Merrill) ที่เป็นโรคแอนแทรคโนส มีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* Schw. โรคนี้เข้าทำลายได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง เชื้อสาเหตุติดไปกับเมล็ดพันธุ์ ทำให้เมล็ดลีบ ความงอกลดลง ผลผลิตลดลง 16-26 เปอร์เซ็นต์ (มณฑา, 2535) ศุภชัย และคณะ (2534) นำเมล็ดพันธุ์ของถั่วเหลือง 8 พันธุ์ต่อสายพันธุ์ มาฉายรังสีแกมมาพันธุ์ละ 3 ระดับ เมื่อปี 2530 ผลการคัดเลือกในชั่วที่ 4-5 ในฤดูฝนปี 2533-34 ที่ อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่ โดยมีการปลูกเชื้อในสภาพไร่คัดเลือกได้เพียง 1 สายพันธุ์ ที่ไม่พบอาการของโรคบนฝัก และมีเชื้อติดไปกับเมล็ดเพียง 6 เปอร์เซ็นต์ (มณฑา และคณะ, 2536) งานวิจัยของ ชาตรี และคณะ (2537) นำเมล็ดพันธุ์ของถั่วเหลือง 3 พันธุ์ มาแช่ในสารเคมี EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปลูกชั่วที่ 3 ในฤดูฝนปี 2536 ที่ ม.เชียงใหม่ พบว่าสายพันธุ์ที่ได้จากพันธุ์ สจ.4 มีจำนวนต้นอ่อน ที่ถูกเชื้อเข้าทำลายเพียง 27 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าพันธุ์ สจ.4 เดิม ซึ่งถูกเชื้อเข้าทำลาย 76 เปอร์เซ็นต์เนื่องจากโรคนี้เข้าทำลายได้ทุกระยะการเจริญเติบโต การคัดเลือกได้สายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคในแต่ละส่วนของต้น ผสมข้ามระหว่างพันธุ์พ่อแม่ที่ต้านทานโรคในส่วนต่างๆ และรวมลักษณะต้านทานเข้าไว้ในรุ่นลูก งานวิจัยของกรมวิชาการเกษตร ปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้ต้านทานโรคใบจุด โดยใช้รังสีแกมม่าอัตรา 600 เกรย์ ใช้ถั่วเขียว 3 พันธุ์ VC 1971, VC 1560D และ VC 1973A คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ผลผลิตสูง เมล็ดโต และมีความต้านทานต่อโรคใบจุด ได้ 2 สายพันธุ์ นำเข้าประเมินผลผลิต (Chotechuen และคณะ 1991) การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียว (Mungbean: Vigna radiata (L.) Wilczek) ให้ต้านทานโรคราแป้ง เมล็ดถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 และชัยนาท 36 ส่วนหนึ่งไปฉายรังสีแกมม่าอัตรา 500 เกรย์ และอีกส่วนหนึ่งแช่ในสารเคมี EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ดำเนินการตั้งแต่ปี 2538 - 40 ได้ 32 สายพันธุ์ ที่ต้านทานโรคราแป้ง และใบจุด จึงนำเข้าเปรียบเทียบผลผลิตตั้งแต่ปี 2541 – 46 พบว่า สายพันธุ์กลายที่ให้ผลผลิตสูงและมีเสถียรภาพ ได้แก่ M 5-5, M 5-1 และ M 4-2 (Wongpiyasatid และคณะ 2000; สุมนา และคณะ, 2547) ปัจจุบันนำเข้าประเมินผลผลิตในไร่เกษตรกรเพื่อยืนยันข้อมูลในการขอรับรองพันธุ์

Meijer, 1982 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงส่วนไฮโพคอทิลของถั่ว *Stylosanthes humilis* บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ 78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bovo และคณะ (1986) ชักนำให้เกิดแคลลัสของถั่ว *Lotononis bainesii* โดยใช้ส่วนของใบเลี้ยงนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่าสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ดีที่สุดบนอาหารที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

กาญจนา และคณะ (2531) ได้ทำการศึกษาเรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเขียว โดยการชักนำให้เกิดยอดหลายยอดจากส่วนใบเลี้ยงของถั่วเขียว 7 สายพันธุ์ พบว่าอาหารแข็งสูตร B5 ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2 4 6 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกระดับความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดได้ ซึ่งในแต่ละสายพันธุ์จะให้จำนวนยอดหลายยอดที่แตกต่างกัน และระดับความเข้มข้นของ BAP ที่เหมาะสม คือ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบอายุของเมล็ด คือ 3 6 และ 8 วัน พบว่าใบเลี้ยง ที่ได้จากเมล็ดอายุ 3 วัน จะเกิดยอดหลายยอดได้ดีที่สุด คือ 88.88 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 18 วัน หลังจากเริ่มเลี้ยง ส่วนการเพาะเลี้ยง อับละอองเรณูของถั่วเขียว 7 สายพันธุ์นี้บนอาหารแข็งสูตร MS และ 1/2MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้นระดับต่างๆ คือ 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถเกิดแคลลัสได้บนอาหารที่เติม kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหาร 1/2 MS ให้ผลดีกว่า MS

Ian และคณะ (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 ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นต้นใหม่สูง การชักนำให้เกิดรากทำได้โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

Angelon และคณะ (1992) ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส และการพัฒนาเป็นต้นของถั่ว *Centrosema brasilianum*, *C. arenarium*, *C. macrocarpum*, *C. pascuorum*, *C. pubescens* และ *C. virginianum* พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมนี้ แคลลัสของถั่ว *C. brasilianum* สามารถพัฒนาเป็นต้นเพียงชนิดเดียว

Godwin และคณะ (1987) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสของถั่ว *Stylosanthes scabra* Vog จากส่วนของใบโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5-2 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Polisetty และคณะ (1997) การชักนำยอดโดยสารควบคุมการเจริญเติบโต Benzyladenine และการเจริญเป็นต้นใหม่จากเมล็ดของถั่วเขียว (*Cicer arietinum* L.) สายพันธุ์ BG-362 BG-329 BG-267 BG-256 และ C-235 พบว่าสูตรอาหารแข็ง MS ดัดแปลงที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญ BA น้อยกว่า 7.5 ไมโครโมล สามารถชักนำยอด 2–3 เซนติเมตรต่อยอด อายุ 30 วัน สารควบคุมการเจริญ BA ความเข้มข้น 75–100 ไมโครโมล สามารถชักนำยอดได้เมื่ออายุ 45–90 วัน และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำราก คือ BA ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 12.5 ไมโครโมล ความเข้มข้นของ BA ที่สูงมีผลยับยั้งต่อการชักนำราก

ฉัตรนภา และคณะ (2543) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเขียวเพื่อการถ่ายยีน ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการชักนำให้เกิดยอดหลายยอดในถั่วเขียวพันธุ์ กพส.1 โดยใช้ส่วนยอด และส่วนของข้อใบเลี้ยงที่ยังมีใบเลี้ยงติดอยู่ทั้งคู่ ได้จากการนำเมล็ดแก่ไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือ มี kinetin ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นเวลา 2 3 4 และ 5 วัน แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB (สูตร MS ร่วมกับ วิตามินจากสูตร B5) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ 2iP ที่ระดับความเข้มข้น 0 - 4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทุกระดับมีการเติม และไม่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 5 วัน แล้วย้ายลงเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ทำให้เกิดยอดหลายยอดได้ดี การชักนำให้เกิดราก พบว่าอาหารสูตร 1/2MB ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือ เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ส่วนขั้นตอนในการถ่ายยีนใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1301 ที่มียีน gus A และ hygromycin resistance อยู่เป็นพาหะสำหรับถ่ายยีน

Palanivel และคณะ (2002) การชักนำแคลลัสและการเจริญเป็นต้นใหม่จากส่วนของใบเลี้ยงของถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.) สายพันธุ์ VRI-2 และ VRI-3 ในสูตรอาหารแข็ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ IAA ร่วมกับ KIN หรือ BA ในสูตรอาหารที่มีเปอร์เซ็นต์การชักนำแคลลัสมากที่สุด IAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตรอาหารที่ประกอบด้วย IAA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ NAA ร่วมกับ BA หรือ KIN ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีลักษณะคอมแพคแคลลัส สีเขียว เมื่อย้ายแคลลัสไปชักนำต้นในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดมากที่สุด และนำไปชักนำรากด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA และ NAA สามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชักนำรากได้ถึง 84.3 เปอร์เซ็นต์ การเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ไม่สามารถชักนำรากได้ การย้ายปลูกลงดินมีอัตราการรอดชีวิต 95 เปอร์เซ็นต์

ขนิษฐา (2547) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) และใบเลี้ยง (cotyledon) ของถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata*) เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุดคือ 90 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่ได้เกาะกลุ่มกันแน่นเป็นกลุ่มก้อน มีสีเขียว เมื่อนำแคลลัสที่ได้มาชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอย พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม casein hydrolysate 1 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอยได้ และสามารถชักนำเซลล์แขวนลอยให้เกิดยอดได้บนอาหารสังเคราะห์แข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมากที่สุด 96.66 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำยอดให้เกิดรากได้ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Kaviraj และคณะ (2006) การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส และการเจริญเป็นต้นใหม่จากส่วนของใบเลี้ยงของถั่วเขียว (*Vigna Radiata* (L.) Wilezek.) สายพันธุ์ TAP – 7 และ Pusa บนสูตรอาหารแข็ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 2,4,5 –Trichlorophenoxyacetic acid และ NAA หรือร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.22 – 8.88 ไมโครโมล หรือ kinetin ความเข้มข้น 2.32–9.38 ไมโครโมล พบว่า NAA ความเข้มข้น 79.44 ไมโครโมล เป็นออกซินที่สามารถกระตุ้นให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสได้มากที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหาร แข็ง MS ที่ประกอบด้วย abscisic acid ความเข้มข้น 1.88 ไมโครโมล ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 6.66 ไมโครโมล สามารถเกิดต้นได้ 56.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปย้ายปลูกลงดินมีอัตราการรอดชีวิต 90 เปอร์เซ็นต์

Dang และ Wei (2008) การเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากข้อใบเลี้ยงของถั่วแขก พบว่าจากการศึกษาส่วนของข้อใบเลี้ยงอายุ 6 วัน บนสูตรอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ ให้เกิดยอด สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้นของ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดได้ 71.9 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อนำยอดที่เกิดขึ้นย้ายมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสาร silver nitrate ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดได้ถึง 87.6 เปอร์เซ็นต์ การใช้ silver nitrate จะช่วยทำให้เกิดยอดปริมาณสูงขึ้น แต่เมื่อใช้ silver nitrate มากกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะยับยั้งการเจริญเกิดเป็นยอด ส่วนการชักนำให้เกิดรากได้ดีในสูตรอาหารแข็งครึ่ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anuradha และคณะ (2006) ได้ทำการเพาะเลี้ยงถั่วลิสงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ร้อยละผลได้ของการเกิดเป็นต้นใหม่ และค่าเฉลี่ยการเกิดยอดสูงสุด การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนทดลองของพืช พบว่า ในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีการเติม BAP ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการเกิดยอดหลายยอดสูง มีร้อยละการเกิดเป็นต้นใหม่ และค่าเฉลี่ยการเกิดยอดสูง

Sakthivelu และคณะ (2008) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองที่ทำให้ทนต่อสภาวะแห้งแล้ง แรงออสโมซิส และการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ในหลอดทดลอง จากสภาพแวดล้อมที่ส่งผลให้พืชขาดน้ำ มีคุณภาพที่แย่ลง ในการคัดเลือกเพื่อให้มีความทนทานต่อความเครียดมีความสำคัญต่อการเพาะปลูกและการเพิ่มผลผลิต ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาวะแห้งแล้งให้มีการเจริญเติบโตให้มีศักยภาพในการออสโมซิส และการเกิดยอดจำนวนมากในหลอดทดลองของถั่วเหลือง มีการใช้ความเข้มข้นต่างๆของ PEG-6000 ในการเพาะเลี้ยงแคลลัส แสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม หลังจากได้รับ PEG-6000 ที่ 6 เปอร์เซ็นต์ ชักนำให้เกิดยอด 68.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม

Radhakrishman และคณะ (2009) การชักนำยอดและรากด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต thidizuron ในถั่วเหลือง (*Glycine max.* L) นำส่วนของไฮโปคอทิล ใบเลี้ยง ข้อใบเลี้ยงบนสูตรอาหารแข็งสูตร MS และ B5 ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.9–5.4 ไมโครโมล พบว่าในสูตรอาหาร B5 ที่ประกอบด้วย TDZ สามารถชักนำรากได้ทุกความเข้มข้น เกิดรากได้ 93.5 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 3.6 ไมโครโมล แต่ในสูตรอาหาร MS ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้น 4.5 ไมโครโมล สามารถเกิดยอดได้ 26.4 เปอร์เซ็นต์ และสูตรอาหาร B5 ที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้น 3.6 ไมโครโมล สามารเกิดยอดได้ 93.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของไซโตไคนิน ทำหน้าที่ชักนำยอด และหน้าที่ออกซินในการชักนำราก

Alam และ Khaleque (2010) ศึกษาการพัฒนาของแคลลัส และ การเกิดเป็นต้นใหม่ของถั่วลิสง *Arachis hypogeae* L. โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชชนิดต่างๆในหลอดทดลอง พบว่าการเกิดเป็นต้นใหม่จากชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ใบเลี้ยง ลำต้นเหนือ ใบเลี้ยง และ ลำต้นใต้ใบเลี้ยง โดยทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของถั่วลิสง BARI 5 และ BARI 6 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D, BAP และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งผลของการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงแสดงสมรรถภาพดีกว่าลำต้นเหนือใบเลี้ยง และ ใบเลี้ยง เมื่อศึกษาปริมาณความเข้มข้นของ 2,4-D ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นต่างๆที่มีผลต่อการชักนำแคลลัส พบว่าความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสได้ดี และเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าบริเวณตรงกลางของแคลลัสจะเกาะกันแน่น และมีสีเขียว และ ส่วนด้านข้างเกาะกันหลวมๆ หลังจากย้ายแคลลัสไปยังอาหาร MS ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้นต่างๆจะสังเกตได้ว่าแคลลัสมีการเจริญเติบโตดี และเมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหาร จะทำให้แคลลัสเกิดหน่อยอดเล็กๆ พบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนของยอดสูงสุด จากการศึกษาการเจริญเติบโตสำหรับชักนำแคลลัส พบว่า 2,4-D ได้ผลดีที่สุด โดยการเปลี่ยนถ่ายอาหารไปยังอาหารสูตรเดิมซ้ำทุกๆ 28-30 วัน

Iqbal และ คณะ (2011) ศึกษาการขยายพันธุ์ถั่วลิสง (*Arachis hypogeae*) ในหลอดทดลองผ่านกระบวนการการเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายโดยตรง จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสแคลลัสของถั่วลิสง บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมวิตามิน B5, วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส และ สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (2,4-D และ NAA) พบว่ามีการชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอสูงสุด 87 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีการพัฒนาของแคลลัสเป็นแบบ friable callus ที่มีสีขาวคล้ายครีม

Hasancebi และ คณะ (2010) ศึกษาการขยายพันธุ์และการเพาะเลี้ยงรากของแอสทรากาลัส *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae) พบว่าสามารถชักนำแคลลัสได้จากชิ้นส่วน ลำต้นใต้ใบเลี้ยง และแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างมากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.4 การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ คือ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของเซลล์ การกลายพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับการสูญหายไปบางส่วนของยีน หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในของยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) หรือพอยต์มิวเตชัน (point mutation) ส่วนการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนส่วนของโครโมโซม การสูญหายไปหรือเพิ่มเข้ามาของส่วนของโครโมโซมที่ครอบคลุมมากกว่าหนึ่งยีน เรียกว่าการกลายพันธุ์ของโครโมโซม (chromosome mutation) (วิสุทธิ์, 2536)

2.4.1 การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) (อรุณี, 2541)

การเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับลำดับของนิวคลีโอไทด์เพียงไม่กี่โมเลกุล เช่นการเพิ่มหรือขาดหายไปของเบสหรือการแทนที่เบสชนิดหนึ่งด้วยเบสชนิดหนึ่ง หรือทำให้ลำดับของเบสบนดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป แบ่งตามการกลายพันธุ์ของยีนได้ 2 ชนิด คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1.1 การกลายแบบเฟรมชิพต์ (frameshift mutation)

เกิดจากการเพิ่มหรือการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ ทำให้ลำดับเบสบน mRNA เกิดการเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้ลำดับอะมิโนบนสายโพลีเปปไทด์เปลี่ยนแปลงไป ทำให้โปรตีนที่สร้างยีนนั้นไม่สามารถทำงานได้เหมือนเดิม หรือทำได้แต่ไม่มีประสิทธิภาพ หรือทำงานไม่ได้เลย

2.4.1.2 การกลายแบบเบสซับสติติวชั่น (base substitution)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการแทนที่คู่เบส เกิดได้ 2 ลักษณะคือ

2.4.1.2.1 ทรานซิชั่น (transition)

การแทนที่เบสชนิดหนึ่งด้วยเบสอีกชนิดหนึ่งในกลุ่มเดียวกัน เช่น เบสกลุ่มพิวรีน (purine) มี 2 ชนิด คือ อะดินีน (adenine, A) และกัวนีน (guanine, G) ดังนั้น เบสอะดินีน จะเข้าแทนที่เบสกัวนีน หรือกลับกัน และในกลุ่มของเบสไพริมิดีน (pyrimidine) มี 2 ชนิด คือ ไซโตซีน (cytosine, C) และไทมีน (thymine, T) ก็จะแทนที่ซึ่งกันและกันได้

2.4.1.2.2 ทรานเวอร์ชัน (transversion)

การแทนที่เบสกลุ่มพิวรีน ด้วยเบสกลุ่มไพริมิดีน หรือแทนที่เบสกลุ่มไพริมิดีน ด้วยเบสกลุ่มพิวรีน คือ เป็นการแทนที่เบสต่างกลุ่ม

2.4.2 การกลายพันธุ์ของโครโมโซม (chromosome mutation) (อรุณี, 2541)

การเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับยีนหลายยีน เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง หรือจำนวนโครโมโซม แบ่งการกลายของโครโมโซมเป็น 2 ชนิดคือ

2.4.2.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม

ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงเกิดจากการแตกหักของโครโมโซม แล้วมีการเชื่อต่อกันโดยอาจจะมีชิ้นส่วนขาดหาย (deletion) การขาดหายไปนั้นทำให้ยีนจำนวนหนึ่งหายไปด้วย หรือมีการเชื่อมอย่างผิดปกติ เช่น มีชิ้นส่วนโครโมโซมเพิ่มขึ้นมา (duplication) การเชื่อมแบบกลับทิศทาง (inversion) หรือการเชื่อมสลับคู่ระหว่างโครโมโซมต่างคู่กัน (translocation) จะมีผลทำให้สิ่งมีชีวิตเกิดการเปลี่ยนแปลงไปได้โดยจะมีผลมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิดของยีนและจำนวนยีนที่เกี่ยวข้อง

2.4.2.2 การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม

การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.4.2.2.1 แอนิวพลอยด์ (aneuploidy) เป็นการเพิ่มขึ้นหรือหลุดหายไปของโครโมโซมทั้งแท่ง เป็นจำนวนหนึ่งหรือมากกว่า 1 โครโมโซมขึ้นไป เช่น สิ่งมีชีวิตที่เป็น ดิพลอยด์ ก็จะมีจำนวนโครโมโซมเปลี่ยนเป็น 2n+1, 2n+2, 2n-1 เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมแบบนี้ อาจเกิดได้เองตามธรรมชาติหรือเกิดจากการเหนี่ยวนำ ซึ่งจะมีประโยชน์ในด้านการศึกษาทางเซลล์พันธุศาสตร์

2.4.2.2.2 ยูพลอยด์ (euploid) เป็นการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของโครโมโซมเป็นชุด พืชที่มีเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ประกอบไปด้วยจีโนมครบชุดอย่างน้อย 1 ชุด เรียกว่าพืช โมโนพลอยด์ (monoploid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวมถึงพืชที่มีจีโนมเพิ่มเป็นผลคูณของชุดจีโนม คือ ดิพลอยด์ (diploid) ทริพลอยด์ (triploid) หรือเรียกรวมๆว่า พอลีพลอยด์ (polyploid)

การกลายพันธุ์แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) ซึ่งเป็นผลมาจากรังสี สารเคมี อุณหภูมิ ที่มีอยู่ในธรรมชาติ กระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ และการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำ (induced mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากมนุษย์ใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) (ประดิษฐ์, 2546)

2.4.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืช (สิรนุช, 2540)

การปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ ที่มีลักษณะที่ต้องการนั้นทำได้หลายวิธี วิธีการหนึ่งที่ทำให้ได้พืชสายพันธุ์ใหม่อย่างรวดเร็วกว่าวิธีดั้งเดิม และยังสามารถถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการไปยังรุ่นลูกชั่วต่อๆไปได้ นั้นคือ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation) พันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำให้เกิดในพืชสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ 2 แนวทาง คือ

2.4.3.1 การใช้ประโยชน์โดยตรง คือการนำมาขยายพันธุ์ ส่งเสริมได้ทันที เหมาะสมกับพืชที่มีการปรับปรุงพันธุ์ยังไม่ได้ระดับสูงสุด สามารถเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้ง่ายทำให้ได้ จีโนไทป์ใหม่ๆ ออกมาและนำไปใช้เป็นพันธุ์ใหม่ได้โดยตรง ระยะเวลาได้พันธุ์ใหม่จึงค่อนข้างสั้น

2.4.3.2 การใช้ประโยชน์ทางอ้อม พันธุ์กลายที่มีลักษณะที่น่าสนใจ แต่ยังไม่ดีพอที่จะนำมาขยายพันธุ์โดยตรง เนื่องจากยังมีลักษณะอื่นๆ ที่ไม่ต้องการอยู่ด้วย โดยถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการเข้าไปยังพืชที่ต้องการปรับปรุง

การกลายพันธุ์ที่เกิดโดยไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด เรียกว่าการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติซึ่งมีอัตราการเกิดที่ต่ำ วิธีการต่างๆ ที่นำมาชักนำให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์มากขึ้น เช่น การชักนำให้กลายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสี การชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี

2.4.4 การชักนำให้กลายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (อรุณี, 2550)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยชักนำให้เกิดแคลลัสหรือเลี้ยงในสภาพที่เป็นเซลล์แขวนลอย เมื่อกลุ่มเซลล์มีการพัฒนาไปเป็นต้นพืช พบว่า พืชที่เกิดขึ้นใหม่มีลักษณะแตกต่างกันออกไป ซึ่งไม่ปรากฏพันธุ์เดิม บางลักษณะสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ แสดงว่าได้เกิดการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมขึ้น ลักษณะความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เรียกว่า โซมาโคลนอลแวริเอชัน สามารถคัดเลือกลักษณะที่ดีไปใช้ในการสร้างพันธุ์ใหม่ได้ การเกิดแปรพันทางพันธุกรรมในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง มีการเกิดได้มากน้อยขึ้นอยู่กับวิธีการเพาะเลี้ยง และระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงโดยผ่านแคลลัสหรือผ่านสภาพที่เป็นเซลล์แขวนลอย ทำให้ต้นพืชที่เกิดมามีการแปรผันทางพันธุกรรมสูง ยิ่งเวลาที่ใช้การเลี้ยงตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงระยะที่เป็นต้นพืชใช้เวลานาน ยิ่งมีโอกาสทำให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรมสูงขึ้น การแปรผันที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงมีแหล่งที่มา 3 แหล่งคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4.1 การแปรผันทางพันธุกรรมเกิดอยู่แล้วในเนื้อเยื่อที่ใช้เพาะเลี้ยง

2.4.4.2 การแปรผันทางพันธุกรรม เกิดจากอาการที่ใช้เพาะเลี้ยง มีคุณสมบัติเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์

2.4.4.3 การแปรผันเกิดจากการตอบสนองของจีโนมพืชต่อความเครียด (stress) ต่างๆที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดในสภาพของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาพที่เป็นเซลล์แขวนลอย หรือสภาพที่เป็นแคลลัส เซลล์ทุกเซลล์มีโอกาสเกิดเป็นต้นใหม่ได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็น โททิโพเทนต์ หากนำเซลล์เหล่านี้มาเลี้ยงในอาหารที่ใส่สารที่ช่วยในการคัดเลือกเพื่อให้ได้ลักษณะที่เฉพาะเจาะจงสารดังกล่าวอาจเป็นทอกซิน สารป้องกันกำจัดวัชพืช กรด หรือเกลือเพื่อคัดเลือกพืชที่สามารถทนเค็ม หรือสารพวกออสโมติคัมบางชนิด เช่น โพลีเอทธีลีนไกลคอน หรือพีอีจี น้ำตาลแมนนิทอล และ ซอลบิทอล เป็นต้น โดยสารเหล่านี้จะทำหน้าที่ลดแรงดันออสโมซิส ของสารละลายที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ ทำให้เซลล์อยู่ในสภาพที่ขาดน้ำ เพื่อคัดเลือกพืชที่ทนแล้ง เซลล์ที่รอดชีวิตคือเซลล์ที่มีการเกิดความแปรผันทางพันธุกรรม ทำการชักนำเซลล์เหล่านี้ให้พัฒนาเป็นต้นแล้วนำพืชที่คัดเลือกได้ออกปลูกทดสอบในเรือนปลูกพืชทดลอง เพื่อคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ หากลักษณะความทนทานต่อสารที่ช่วยในการคัดเลือกยังคงอยู่ ก็จะได้พืชพันธุ์ใหม่ที่เป็นประโยชน์ออกมา เช่น พืชทนเค็ม ทนแล้ง ทนต่อโรค ทนต่อสารกำจัดวัชพืช โอกาสของการได้ลักษณะที่พึงประสงค์มีมากขึ้น เนื่องจากเกี่ยวข้องกับเซลล์เป็นล้านๆเซลล์ และการใช้สารที่ช่วยคัดเลือก ที่จำเพาะเจาะจงทำให้การคัดเลือกลักษณะต่างๆได้ตามประสงค์มากขึ้น (สิรินุช, 2540)

2.4.5 การชักนำให้เกิดกลายพันธุ์ด้วยรังสี (สิรินุช, 2541)

การกลายพันธุ์ในธรรมชาติมีอัตราการเกิดที่ต่ำ ในขณะที่การใช้สารเคมีหรือรังสีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์สามารถเกิดได้ในอัตราที่สูงกว่า การชักนำเพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ที่นิยมทำกันคือการชักนำด้วยรังสี

รังสี (radiation) หมายถึง พลังงานที่ออกมาในรูปของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (eletromagetic wave) หรือโพตอน (photon) หรือออกมาในรูปของอนุภาคที่มีขนาดเล็ก (particulate wave) ซึ่งสามารถแบ่งรังสีตามพลังงานที่มีอยู่ในตัวมันเองได้เป็น 2 พวก คือ รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (non-ionizing radiation) และรังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation)

รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (non-ionizing radiation) คือรังสีที่มีพลังงานต่ำ เมื่อผ่านเข้าไปในตัวกลางใดๆ จะไม่สามารถทำให้ตัวกลางนั้นแตกตัวเป็นไอออน (ionization) เนื่องจากมีพลังงานไม่เพียงพอที่จะผลักอิเล็กตรอนให้หลุดออกจากอะตอมได้ เช่น รังสี UV แสงสว่างอินฟาเรด รังสีเลเซอร์ และไมโครเวฟ เป็นต้น

รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) คือรังสีที่มีพลังงานสูงพอที่จะทำให้เกิดคู่ไอออนในตัวกลางที่รังสีผ่านไป โดยทำให้อะตอมหรือโมเลกุล (กลุ่มของอะตอม) เกิดการสูญเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิเล็กตรอน หรือได้อิเล็กตรอนเพิ่มขึ้นมา หากเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน ก็จะกลายเป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่มีประจุบวกหรือลบดังกล่าวว่า ไอออน ได้แก่ รังสี แอลฟา รังสีบีตา รังสีแกมมา รังสีเอกซ์ และอนุภาคนิวตรอน เป็นต้น

รังสีแกมมาเป็นรังสีที่ได้รับความนิยม เพื่อใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชมากกว่ารังสีเอกซ์ เนื่องจากมีวิธีการฉายไม่ยุ่งยาก ไม่มีรังสีตกค้างอยู่ในพืชซึ่งจะไม่เป็นอันตรายแก่ผู้ที่นำพืชไปปลูก

2.4.5.1 ผลของเซลล์พืชเมื่อได้รับรังสี

เมื่อเซลล์พืชได้รับรังสี หรืออนุภาคนิวตรอน รังสีหรืออนุภาคจะถ่ายพลังงานให้กับโมเลกุลต่างๆของเซลล์ ในกระบวนการถ่ายทอดพลังงาน ทำให้โมเลกุลที่ได้รับพลังงานแตกตัวเป็นไอออนและฟรีเลดิคอล ต่างๆจะมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลใหม่ มีการทำปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างกัน เกิดเป็นโมเลกุลที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างไปจากเดิม (สิรนุช, 2540) รังสีทำให้อะตอมต่างๆ ภายในเซลล์เกิดการแตกตัวเป็นไอออน โดยเฉพาะการเกิด chemical radicals ที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีขึ้นภายในเซลล์ ทำให้อาจทำให้เกิดความเสียหายต่อการทำหน้าที่ต่างๆของเซลล์ เซลล์พืชที่ได้รับความเสียหายจากรังสีและเกิดการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลทางพันธุกรรมได้คือ เซลล์เนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ส่วนต่างๆของพืช มีความสามารถในการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ ซึ่งภายในเซลล์จะมีชีวโมเลกุลที่สำคัญคือ ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic :DNA) โดยผลของรังสีจำทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไปดังนี้

2.4.5.1.1 เกิดการสลายตัวของพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ที่เชื่อมระหว่างคู่เบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ

2.4.5.1.2 เกิดการตัดขาดระหว่างพันธะที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลฟอสเฟต ที่ทำหน้าที่เป็น backbone ของดีเอ็นเอ (phosphate diester bond) ทำให้เกิด single strand break และdouble strand break

2.4.5.1.3 เกิดการแตกหักที่พันธะโควาเลนท์ (covalent bond) อื่นๆของดีเอ็นเอ

2.4.5.1.4 เกิด cross linkage ระหว่างสายและภายในสายของดีเอ็นเอ

2.4.5.1.5 เกิด dimer ระหว่าง pyrimidine base ภายในสายของดีเอ็นเอสายใดสายหนึ่ง เช่น เกิด TT หรือ CC เป็นต้น

2.4.5.1.6 เกิด DNA – protein crooslink เป็นการเชื่อมต่อระหว่างเบสและกรดอะมิโนด้วย sulfide linkage (SH)

2.4.5.2 ผลที่เกิดขึ้นกับเซลล์ภายหลังการได้รับรังสี

ความผิดปกติต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ภายหลังการได้รับรังสี จะส่งผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์ เช่น อาจมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ต่างๆ กระบวนการเมทาโบลิซึม กระบวนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังเคราะห์แสง ซึ่งจะส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ การเปลี่ยนแปลงจะเกิดมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับ ปริมาณรังสีที่ได้รับ ชนิดของเซลล์เป็นต้น โดยการแบ่งเซลล์นั้น อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลต่อเซลล์ได้ดังนี้

2.4.5.2.1 เซลล์ตายทันทีในขณะได้รับรังสี

2.4.5.2.2 เซลล์ที่ได้รับรังสีอาจมีการแบ่งเซลล์ได้ระยะหนึ่ง หรือไม่มีการแบ่งเซลล์เลยแต่มีชีวิตอยู่ได้ระยะหนึ่ง หลังได้รับรังสีแล้วจึงตาย

2.4.5.2.3 เซลล์มีชีวิตอยู่ต่อไปได้ แต่ไม่มีการแบ่งเซลล์ได้อีก

2.4.5.2.4 เซลล์มีชีวิตอยู่และสามารถแบ่งเซลล์ต่อไปได้ แต่การแบ่งเซลล์ในระยะแรกๆหลังได้รับรังสีแล้ว จะช้าลงบ้าง (อรุณี, 2541)

2.4.5.3 วิธีการฉายรังสี

การจะฉายรังสีแบบใดขึ้นอยู่กับวัตถุ ตัวอย่างพืช และความพร้อมของอุปกรณ์การฉายรังสี การฉายรังสีกับตัวอย่างพืชทำได้ 2 วิธีคือ

2.4.5.3.1 การฉายรังสีแบบเฉียบพลัน (Acute irradiation) คือ การให้รังสีโดยใช้อัตรารังสีและปริมาณรังสีสูงๆ และสิ้นสุดการฉายในระยะเวลาสั้นๆ

2.4.5.3.2 การฉายรังสีแบบเรื้อรัง (Chronic irradiation) คือ การให้รังสีโดยใช้อัตรารังสีและปริมาณรังสีต่ำๆ และใช้เวลาในการฉายรังสีเป็นระยะเวลานานๆ เช่น เป็นสัปดาห์ หรือเป็นเดือน

2.4.5.4 การหาปริมาณรังสีที่เหมาะสม

เนื่องจากพืชต่างชนิดกัน จะมีความไวต่อรังสีที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการจะใช้รังสีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง จะต้องทราบปริมาณรังสีที่เหมาะสมที่จะใช้กับพืชชนิดนั้นๆเสียก่อน ปริมาณรังสีที่เหมาะสมอาจทำการศึกษาจากรายงานผลงานวิจัย หรือแนะนำโดยทบวงการพลังงานปรามาณูระหว่างประเทศ หรือนักวิจัยเองสามารถทำการทดลองเบื้องต้น เพื่อหาปริมาณรังสีที่เหมาะสมได้ เช่นทำการหาค่า LD_{50} (50% Lethal Dose) คือค่าที่ทำให้พืชมีอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ ค่า GR_{50} (50% growth reduction) คือค่าที่ทำให้อัตราการเจริญลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (อรุณี, 2530)

2.5 การปรับปรุงพันธุ์พืชวงศ์ถั่วโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

ศุภชัย และคณะ (2534) นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 8 สายพันธุ์ มาฉายรังสีแกมมาพันธุ์ละ 3 ระดับ เมื่อปี 2530 ผลการคัดเลือกในชั่วที่ 4-5 ในฤดูฝนปี 2533-2534 ที่ อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่ โดยมีการปลูกเชื้อในสภาพไร่ คัดเลือกได้เพียง 1 สายพันธุ์ ที่ไม่พบอาการของโรคบนฝัก และเมื่อตรวจสอบพบว่ามีเชื้อติดไปกับเมล็ดเพียง 6 เปอร์เซ็นต์

มณฑา (2535) ได้นำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์มาปลูกคัดเลือกให้ต้านทานโรคราสนิมในฤดูฝนปี 2532-2536 ที่ อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่ คัดเลือกได้เพียง 1 สายพันธุ์ คือ CM60-10kr-71 เป็นสายพันธุ์ที่ได้มาจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์เชียงใหม่ 60 ฉายรังสีแกมมา 100 เกรย์ โรคราสนิมที่ทำให้ผลผลิตถั่วเหลืองลดลงนั้น สาเหตุสำคัญคือโรคทำให้ขนาดเมล็ดเล็กลง สายพันธุ์ CM60-10kr-71 มีพื้นที่ใบที่เป็นโรคในระดับต่ำ (1-6 เปอร์เซ็นต์) และผลผลิตลดลง เนื่องจากการเป็นโรค 0-17 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พันธุ์ สจ.5 และ เชียงใหม่ 60 ผลผลิตลดลง 37-34 เปอร์เซ็นต์ และ 12-41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ชาตรี และคณะ (2537) นำเมล็ดพันธุ์ของถั่วเหลือง 3 พันธุ์ มาแช่ในสารเคมี EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปลูกชั่วที่ 3 ในฤดูฝนปี 2536 ที่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่าสายพันธุ์ที่ได้จากพันธุ์ สจ.4 มีจำนวนต้นอ่อน ที่ถูกเชื้อเข้าทำลายเพียง 27 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าพันธุ์ สจ.4 เดิม ซึ่งถูกเชื้อเข้าทำลาย 76 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากโรคนี้เข้าทำลายได้ทุกระยะการเจริญเติบโต การคัดเลือกได้สายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคในแต่ละส่วนของต้น ผสมข้ามระหว่างพันธุ์พ่อแม่ที่ต้านทานโรคในส่วนต่างๆ และรวมลักษณะต้านทานเข้าไว้ในรุ่นลูก

อาณัติ และคณะ (2543) ศึกษาถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 72 เป็นสายพันธุ์กลายจากการฉายรังสีแกมมาพันธุ์กำแพงแสน 2 อัตรา 600 เกรย์ มีลักษณะเด่น คือ ให้ผลผลิตสูงเฉลี่ย 212 กิโลกรัมต่อไร่ สูงกว่าพันธุ์ชัยนาท 36 ประมาณ 4.4 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเมล็ดใหญ่ (น้ำหนัก 1,000 เมล็ด ประมาณ 66 กรัม) ตามความต้องการของตลาด มีความต้านทานปานกลางต่อหนอนแมลงวันเจาะลำต้นในสภาพธรรมชาติ และสามารถปลูกได้ดีในดินด่าง เช่น ดินชุดตาคลี โดยไม่มีผลต่อผลผลิต พันธุ์ชัยนาท 72 เป็นถั่วเขียวพันธุ์กลายพันธุ์แรกของประเทศไทยที่ได้รับการรับรองอย่างเป็นทางการ จากกรมวิชาการเกษตร เมื่อปี 2543

Wongpiyasatid และคณะ, (2000); สุมนา และคณะ (2547) เมล็ดถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 และชัยนาท 36 ส่วนหนึ่งไปฉายรังสีแกมมาอัตรา 500 เกรย์ และอีกส่วนหนึ่งแช่ในสารเคมี EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ดำเนินการตั้งแต่ปี 2538-2540 ได้ 32 สายพันธุ์ ที่ต้านทานโรคราแป้ง และใบจุด จึงนำเข้าเปรียบเทียบผลผลิตตั้งแต่ปี 2541–2546 พบว่า สายพันธุ์กลายที่ให้ผลผลิตสูงและมีเสถียรภาพ ได้แก่ M 5-5, M 5-1 และ M 4-2

2.6 หลักการสกัดดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยทั่วไปจะไม่ได้อยู่เป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่อิสระ แต่จะรวมตัวอยู่กับโปรตีนฮีสโตนและโปรตีนที่ไม่ใช่ฮีสโตน เกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนของโครมาติน นอกจากนี้ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตยังประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และอาร์เอ็นเอ (nascent RNA) ดังนั้นในการสกัดดีเอ็นเอออกจากสิ่งมีชีวิตต้องอาศัยหลักการดังนี้

2.6.1 ทำลายผนังเซลล์ (cell wall lysis)

โดยใช้สาร lysozyme (นิยมใช้ในโปรคาริโอต) หรือใช้สาร detergent (นิยมใช้ในยูคาริโอต) เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS) และ sodium lauroyl sarcosinate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2 การย่อยโปรตีน และอาร์เอ็นเอ

โดยใช้ protease และ RNase ตามลำดับ จากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วย phenol/chloroform (บางครั้งอาจเติมเกลือเช่น sodium chloride หรือ sodium acetate เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตกตะกอนโปรตีนได้ดีขึ้น)

2.6.3 ตกตะกอนดีเอ็นเอ

โดยใช้ cool absolute ethanol (อาจเติมเกลือ sodium acetate ด้วย) โดยเกิด dehydrate water ออกจากสายดีเอ็นเอ จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำหรือ TE buffer เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส หมายเหตุ บางครั้งเติมสาร CTAB เพื่อช่วยในการตกตะตอน polysaccaride เติม EDTA เพื่อยับยั้งการทำงานของ DNase (โดย EDTA จะเข้าไปจับกับ Mg^{2+} ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ต่างๆ)

2.7 การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Elctrophoresis of DNA) (สุรินทร์, 2545)

อิเล็กโทรโฟรีซิส (Elctrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นกับขนาด รูปร่างโมเลกุล แรงคลื่นไฟฟ้า และตัวกลางที่ใช้ด้วย โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายของดีเอ็นเอ (หรืออาร์เอ็นเอ) จึงมีประจุเป็นลบที่ pH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลใหญ่ ดังนั้นจะพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่โมเลกุลดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอด้วย

2.7.1 ปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอ

2.7.1.1 ขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่

2.7.1.2 รูปแบบของดีเอ็นเอ (configuration) กรณีที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันนั้นดีเอ็นเอที่มีรูปแบบเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อน (supercoil หรือ covalently closed circular) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอปลายเปิดแบบเส้นตรง (linear) และดีเอ็นเอแบบเส้นตรงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอแบบวงแหวนที่มีช่องเปิด ซึ่งจะพบรูปแบบทั้ง 3 ของดีเอ็นเอได้ในการสกัดพลาสมิด

2.7.1.3 เปอร์เซ็นต์และชนิดของเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจลโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ช้าลง โดยเจลที่นิยมใช้กับกรดนิวคลีอิกคือ โพลีอะครีลาไมด์เจล และอะกาโรสเจล (agarosegel) โดยโพลีอะครีลาไมด์เจลจะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กระหว่าง 6–1,000 คู่เบส ส่วนอะกาโรสเจลใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโลเลกุลขนาดใหญ่ประมาณ 100 คู่เบสจนถึงกว่า 50,000 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.1.4 แรงเคลื่อนไฟฟ้า (voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่นไฟฟ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น ในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสนี้ ต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสมถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงเกินไปดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้เร็ว แต่การแยกตัวจะไม่ดี ถ้าใช้การเคลื่อนที่ต่ำเกินไปดีเอนเอจะเคลื่อนที่ช้าแยกตัวได้ดี แต่แถบดีเอ็นเอจะไม่คมชัด เพราะเกิดการแพร่ (diffusion) ของดีเอ็นเอ

2.7.1.5 บัฟเฟอร์ ที่ใช้ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มี 3 ชนิด TAE, TBE, TPE ซึ่งมีข้อดีและข้อเสียต่างกัน TBE นิยมใช้ที่ความเข้มข้น 0.5 เท่า ใช้แยกดีเอ็นเอได้ดี มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ได้ดี แต่สามารถเกิดปฏิกิริยากับอะกาโรสเจลได้ จึงไม่เหมาะถ้าต้องการนำดีเอ็นเอกลับมาใช้อีก TAE ใช้ได้ทั่วไป และใช้ได้ดีในกรณีที่ต้องการนำดีเอ็นเอกลับมาใช้อีก แต่มีความสามารถในการบัฟเฟอร์ต่ำ จึงไม่ควรใช้ในกรณีที่ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเวลานาน หรือควรให้มีการหมุนเวียนของบัฟเฟอร์ ส่วน TPE มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ได้ดี แยกดีเอ็นเอได้เร็ว แต่ไม่เหมาะสมถ้ามีสกัดดีเอ็นเอจากเจลและตกตะกอนด้วยเอธานอล เพราะจะเกิดการตกตะกอนของฟอสเฟตด้วย การเลือกใช้บัฟเฟอร์แต่ละชนิดจึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดลอง

2.8 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลโดยเทคนิคอาร์เอพีดี

การกลายพันธุ์เป็นกระบวนการให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุ์กรรมของสิ่งมีชีวิตเห็นได้จากการที่ลำดับนิวคลีโอไทด์บางช่วงของดีเอ็นเอจีโนม หรือจีโนมิคดีเอ็นเอ มีความแปรผัน อาจเป็นได้ทั้งในส่วนที่เป็นยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน ส่วนที่เป็นยีนคือส่วนของดีเอ็นเอที่กำหนดการสร้างโปรตีนซึ่งจะมีผลลักษณะฟีโนไทป์ โดยอาจแสดงลักษณะที่แตกต่างออกมาที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หรือในส่วนที่ไม่ใช่ยีน คือส่วนของดีเอ็นเอที่ไม่กำหนดการสร้างโปรตีน ซึ่งจะไม่ปรากฏความแตกต่างทางฟีโนไทป์ของสิ่งมีชีวิตทั้งๆ ที่มีความแปรผันในระดับดีเอ็นเอ ดังนั้นการตรวจความแปรผันได้นั้นต้องตรวจสอบถึงในระดับโมเลกุล (อมรา, 2540) ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้วิธีเครื่องหมายโมเลกุลนั้นแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ Hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกัน ระหว่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการจะตรวจสอบ โดยเทคนิคที่นำมาใช้คืออาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphism : RFLP) เป็นต้น ส่วน PCR based marker เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลที่พัฒนาขึ้น โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณหรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยปฏิกริยาลูกโซ่จำลองดีเอ็นเอ หรือ เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR) ตัวอย่างได้แก่ เทคนิค อาร์เอพีดี (Restriction Amplified Polymorphic : RAPD) หรือเทคนิคเอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism : AFLP)

William และคณะ, 1990 เทคนิคอาร์เอพีดี ถูกพัฒนามาจากการทำพีซีอาร์ เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากดีเอ็นเอต้นแบบด้วยไพรเมอร์ขนาดสั้นๆเพียงไพร์เมอร์เดียว มีขนาดประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ แทนการใช้ไพร์เมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ทราบลำดับเบส การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นั้นทำในสภาวะ low stringency คือ annealing ที่อุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ที่ตำแหน่งของสายดีเอ็นเอ

Welsh และ Meclelland, 1990 โดยจะเกาะกับดีเอ็นเอในตำแหน่งที่เป็นเบสคู่สมตลอดจีโนมแบบสุ่ม ไพร์เมอร์ที่เกาะในทิศทางตรงข้าม และมีระยะห่างที่เหมาะสม จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบได้ หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มแล้ว สามารถแยกขนาดดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสและตรวจดูแถบดีเอ็นเอที่ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ภายใต้แสงอัตราไวโอเลต อาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการจัดและจำแนกสายพันธุ์ในเบื้องต้น ทั้งนี้เนื่องจากเทคนิคอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่ง่าย มีความสะดวกและรวดเร็วในการปฏิบัติงานและการตรวจสอบผล

Grattapaglia และ Sederoff, 1994; สุรินทร์, 2545 รายงานวิจัยโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีมาตรวจสอบการกลายพันธุ์ของพืชที่เกิดจากการชักนำด้วยรังสีหรือความแปรผันทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดังนี้

Arulbalachandran และคณะ (2010) ศึกษาการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาและสารเคมีเอทิลมีเทนซัลฟอเนตเพื่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในการกลายพันธุ์ของถั่วสีดำ (*Vigna mungo*) โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 20 ชนิด พบว่าจะแสดงแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 202 แถบ ไพรเมอร์ OPA-14 และ OPI-04 ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างจากต้นควบคุม และ Suleyman และคณะ (2010) ศึกษาความเป็นพิษของออกซิน 2,4-D และ ไดแคมบาเมล็ดถั่วและการตรวจความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ ไพรเมอร์จำนวน 15 ชนิด พบว่าจะแสดงแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 183 แถบ ไพรเมอร์ OPA04, OPA17, OPB01 และ OPB10 ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างจากต้นควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 พันธุ์ของถั่วอาหารสัตว์

3.1.1.1 ถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade

ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ จังหวัดปทุมธานี

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอรอกซ์ สารเปียกใบ (tween-20)

3.1.2.2 อาหารผงสำเร็จสูตรอาหาร Murashige และ Skoog (1962)

3.1.2.3 ผงวุ้นเจลแลนกัม

3.1.2.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับปรับความเป็นกรด-ด่าง ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ไฮโดรคลอริก (HCl)

3.1.2.5 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA โดยวิธี CTAB

3.1.2.5.1 2X CTAB buffer

3.1.2.5.2 Chloroform : isoamyl alcohol

3.1.2.5.3 10% CTAB

3.1.2.5.4 β - mercaptoethanol

3.1.2.5.5 Isopropanol

3.1.2.5.6 20 มิลลิกรัมต่อลิตร RNase A

3.1.2.5.7 สารละลายบัฟเฟอร์ TBE (TBE buffer)

3.1.2.5.8 สารละลาย ethylene diamine tetraacetate (EDTA)

3.1.2.5.9 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

3.1.2.5.10 แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

3.1.2.5.11 น้ำปราศจากไอออน (deionize H_2O)

3.1.2.6 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคอาร์เอพีดี

3.1.2.6.1 ไพรเมอร์ (primer)

3.1.2.6.2 $MgCl_2$

3.1.2.6.3 Mix dNTPs

3.1.2.6.4 KCl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2.6.5 เอนไซม์ *Tag* DNA polymerase

3.1.2.6.6 Tris-Hcl

3.1.2.6.7 Tris-borate-EDTA (TBE buffer) ความเข้มข้น 1X

3.1.2.7 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิส

3.1.2.7.1 อะกาโรสเจล (agarose gel)

3.1.2.7.2 สารละลายบัฟเฟอร์ TBE (TBE buffer)

3.1.2.7.3 สารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)

3.1.2.7.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 100 คู่เบส

3.1.2.7.5 สีย้อม (loading dye)

3.1.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

3.1.3.1 สารในกลุ่มออกซิน (auxins)

3.1.3.1.1 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

3.1.3.1.2 α-Naphthaleneacetic acid (NAA)

3.1.3.1.3 Indole-3-butyric acid (IBA)

3.1.3.2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinins)

3.1.3.2.1 N6-benzylaminopurine (BA)

3.1.3.2.2 TDZ (Thidiazuron); Riede-de Haen

3.1.3.3 สารในกลุ่มจิบเบอเรลลิน

3.1.3.3.1 Gibberellic acid (GA_3)

3.1.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

3.1.4.1 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)

3.1.4.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)

3.1.4.3 ตู้อบความร้อน (hot air oven)

3.1.4.4 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด และหยาบ (balance)

3.1.4.5 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)

3.1.4.6 เครื่องเขย่า (shaker)

3.1.4.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

3.1.4.8 เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)

3.1.4.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

3.1.4.10 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle)

3.1.4.11 เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (vortex mixer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4.12 ตู้เย็น 4 และ -20 องศาเซลเซียส (refrigerator)

3.1.4.13 ไมโครเวฟ (microwave oven)

3.1.4.14 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

3.1.4.15 หลอดทดลอง ขนาด 0.2 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube)

3.1.4.16 จานแก้ว (petri dish) และจานพลาสติก

3.1.4.17 กระบอกตวงขนาดต่างๆ 100 200 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (cylinder)

3.1.4.18 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดต่างๆ 1 2 4 6 และ 8 ออน (bottle)

3.1.4.19 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.4.20 ช้อนตักสาร (spectula)

3.1.4.21 อุปกรณ์การกรองแบคทีเรีย และกระดาษกรองแบคทีเรียขนาด 0.2 ไมครอน

3.1.4.22 บีกเกอร์ขนาดต่างๆ (beaker)

3.1.4.23 โกร่งบดยา (mortar and pestle)

3.1.4.24 มีดผ่าตัดขนาดต่างๆ (knives)

3.1.4.25 ปากคีบขนาดต่างๆ (forcept

3.1.4.26 ปิเปตแบบอัตดนมัติ (pipette boy)

3.1.4.27 ไมโครปิเปตต์ (micropipette)

3.1.4.28 ทิปขนาดต่างๆ (tip)

3.1.4.29 เวอร์เนียร์ (Vernier caliper)

3.1.4.30 กระดาษฟรอยด์ (aluminium foil)

3.1.4.31 กล้องถ่ายภาพดิจิตอล กล้องสเตอริโอ พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

3.1.4.32 กระถาง ดิน ปุ๋ย และ ยาฆ่าแมลง

3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.2.1. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำถั่วคาวาลเคดให้เจริญเป็นแคลลัส

3.2.1.1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนเมล็ดของถั่วคาลวาเคดให้เจริญเป็นแคลลัส

คัดเลือดเมล็ดถั่วที่มีความสมบูรณ์มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวนอกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 – 3 นาที จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบ (tween-20) จำนวน 1-2 หยด เขย่าตลอดเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้งๆ ละ 3 นาที นำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนทิชชูที่ปราศจากเชื้อ นำเมล็ดวางไปบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้นไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงภายใต้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 - 28 องศาเซลเซียส โดยทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บันทึกผลการทดลองการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารแต่ละสูตร ทุกๆ 30, 45 และ 60 วัน โดยการชั่งน้ำหนักสดของชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้น บันทึกจำนวนและลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเจริญเป็นแคลลัส วางการทดลองแบบ (completely randomized design) CRD ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 เมล็ด วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี HSD Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

3.2.1.2 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำใบเลี้ยงของถั่วคาลวาเคดให้เจริญเป็นแคลลัส

นำชิ้นส่วนของใบเลี้ยงจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความสมบูรณ์ มาตัดและเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้นไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงภายใต้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 - 28 องศาเซลเซียส โดยทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน บันทึกการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารแต่ละสูตร ทุกๆ 21 42 และ 70 วัน โดยการชั่งน้ำหนักสดของชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้น บันทึกจำนวนและลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเจริญเป็นแคลลัส วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้น วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี HSD Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

3.2.1.3 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำข้อของถั่วคาลวาเคดให้เจริญเป็นแคลลัส

นำชิ้นส่วนของข้อจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความสมบูรณ์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้นไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงภายใต้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 - 28 องศาเซลเซียส โดยทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน บันทึกการเจริญเติบโตของแคลลัสในอาหารแต่ละสูตร ทุกๆ 30 วัน โดยการชั่งน้ำหนักสดของชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้น บันทึกจำนวน และลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้น และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเจริญเป็นแคลลัส วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี HSD Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

3.2.2. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำถั่วคาวาลเคดให้เจริญเป็นต้นใหม่

3.2.2.1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้พัฒนาไปเป็นต้นใหม่

นำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงจากอาหารสูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.1.3 อายุ 60 วัน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต GA ร่วมกับ TDZ และ ความเข้มข้นของ BA ที่ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัมต่อลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25-28 องศาเซลเซียส โดยทำการย้ายลงอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน บันทึกการเจริญเติบโตของยอดในอาหารแต่ละสูตร ทุกๆ 30 วัน โดยการบันทึกลักษณะการพัฒนาของแคลลัสในการเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวและการเกิดยอดอ่อนใช้เวอร์เนียร์วัดความสูงของยอดของทุกสูตรอาหาร บันทึกจำนวน และลักษณะของยอดที่เกิดขึ้น และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเจริญเป็นยอด

3.2.2.2 การชักนำแคลลัสให้พัฒนายอด

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสมจากการทดลองข้างต้น (3.2.2.1) มาชักนำให้เกิดเป็นต้นโดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA (6-benzyladenine) ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ (Thidiazuron) ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ภายใต้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 56 และ 84 วัน บันทึกการเจริญเติบโตของยอดในอาหารแต่ละสูตร

3.2.2.3 การชักนำยอดจากแคลลัสให้ยืดยาว

นำแคลลัสที่สามารถพัฒนายอดมาศึกษาการเพิ่มความสูงของยอดบนอาหารเพาะเลี้ยงสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA3 (Gibberellic acid) ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25-28 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตของยอดในอาหารแต่ละสูตร

3.2.2.4 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำรากที่สมบูรณ์

ย้ายต้นถั่วจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้นไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25-28 องศาเซลเซียส โดยทำการย้ายลงอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน โดยการบันทึกการเจริญเติบโตของรากในอาหารแต่ละสูตร ทุกๆ 30 วัน โดยใช้เวอร์เนียร์วัดความยาวของรากในทุกสูตรอาหาร บันทึกจำนวน และลักษณะของรากที่เกิดขึ้น และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเจริญเป็นราก วางการทดลองแบบ CRD การทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี HSD Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วคาวาลเคดให้เกิดยอดจำนวนมาก (multiple shoot)

คัดเลือดเมล็ดถั่วที่มีความสมบูรณ์มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวนอกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์นาน 2 – 3 นาที จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบ (tween-20) จำนวน 1-2 หยด เขย่าตลอดเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้งๆ ละ 3 นาที นำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนทิชชูปลอดเชื้อ นำเมล็ดวางไปบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้นไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงภายใต้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 - 28 องศาเซลเซียส โดยบันทึกการเจริญเติบโตของยอดในอาหารแต่ละสูตร ทุกๆ 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยใช้เวอร์เนียร์วัดความสูงของยอดของทุกสูตรอาหาร บันทึกจำนวนและลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นและคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเจริญเป็นยอด

3.2.4. การศึกษาการผลของรังสีแกมมากับแคลลัสของถั่วคาวาลเคด

3.2.4.1 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของแคลลัสของถั่วคาวาลเคด

นำแคลลัสของถั่วคาวาลเคดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4 - D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25–28 องศาเซลเซียส นำไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 กิโลแรด โดยใช้เครื่องฉายรังสีแกมมา (รุ่น Mark I มีซีเซียม 137 เป็นต้นกำเนิดรังสีของศูนย์บริการฉายรังสีแกมมามาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ ฯ) จากนั้นนำไปพัฒนาเป็นต้น โดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญให้เกิดต้น ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 – 28 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 30 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD กำหนดให้ปริมาณรังสีเป็นทรีทเมนต์ แต่ละทรีทเมนต์ มี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำ 40 ชิ้น หลังเพาะเลี้ยง บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนแคลลัสที่อยู่รอดปริมาณรังสีแต่ละอัตรา เพื่อหาปริมาณรังสีที่ทำให้แคลลัสมีอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี HSD Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

3.2.4.2 การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ

นำต้นอ่อนของถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 กิโลแรด ย้ายมาเพาะเลี้ยงบนเลี้ยงสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GA ร่วมกับ BA และ IBA ที่เหมาะสม เพื่อชักนำให้เกิดยอด และรากที่สมบูรณ์ แล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติโดยนำออกจากขวดเพาะเลี้ยงล้างวุ้นที่ติดรากออกให้หมด และแช่ในสารละลายที่เติมสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา จากนั้นย้ายลงปลูกในกระถางพลาสติก โดยใช้วัสดุปลูกเป็น พีทมอส และเพอไรต์ อัตราส่วน 3:1 รดด้วยสารอาหารสูตร MS แล้วคลุมด้วยพลาสติกใส ปิดปากถุงไว้ประมาณ 7 วันเพื่อให้ต้นกล้ามีความพร้อมก่อนออกปลูกสภาพธรรมชาติ

3.2.5. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด

3.2.5.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

นำเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนเมล็ด ใบ และข้อ ของถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4–D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3, 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแบ่งเซลล์ของแคลลัสหนัก 0.5 กรัม นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4–D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ทำการแยกแคลลัสโดยใช้ช้อนโลหะกดให้เซลล์กระจายตัวออกจากกัน เซลล์จะหลุดออกเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยทุก 3 วันในช่วง 0-30 วัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ในแต่ละช่วงเวลาเมื่อเพาะเลี้ยงถึงเวลาตามกำหนด นำเซลล์แขวนลอยมาหาน้ำหนักสด โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (ที่ผ่านการอบ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง) ด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ และต่อเครื่องดูดอากาศเป็นเวลา 1 นาที ชั่งน้ำหนักสด นำเซลล์มาอบที่ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักแห้งและจดบันทึก (อนุรักษ์, 2550) และศึกษาการมีชีวิตของเซลล์แขวนลอย โดยย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (FDA) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ เซลล์ที่มีชีวิตจะมีสีเขียวเรืองแสง (Dixon, 1991)

3.2.5.2 การศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด

คัดเลือกเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนเมล็ด ใบ และข้อ ของถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุดนำไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25–28 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ชิ้น บันทึกจำนวนเซลล์แขวนลอยที่สามารถพัฒนาเป็นต้น และชักนำให้เกิดรากที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5.3 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด

นำเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคดเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4 -D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3, 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เมื่อเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตดีที่สุดนำไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการทดลอง 3.2.5.2 ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 - 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนทำการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 กิโลแรด โดยใช้เครื่องฉายรังสีแกมมา (รุ่น Mark I มีซีเซียม 137 เป็นต้นกำเนิดรังสีของศูนย์บริการฉายรังสีแกมมามาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ ฯ) จากนั้นนำไปพัฒนาเป็นต้น โดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม GA zeatin และ BA ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญให้เกิดต้น ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้นไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 – 28 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 30 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD กำหนดให้ปริมาณรังสีเป็นทรีทเมนต์ แต่ละทรีทเมนต์ มี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำ 30 ชิ้น หลังจากการเพาะเลี้ยง บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนเซลล์แขวนลอยที่อยู่รอดปริมาณรังสีแต่ละอัตรา เพื่อหาปริมาณรังสีที่ทำให้เซลล์แขวนลอยมีอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์

3.2.5.4 การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ

นำต้นอ่อนของถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 กิโลแรด ย้ายมาเพาะเลี้ยงบนเลี้ยงสูตรอาหาร MS ที่ย้ายมาเพาะเลี้ยงบนเลี้ยงสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA ร่วมกับ BA และ IBA ที่เหมาะสม เพื่อชักนำให้เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ แล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติโดยนำออกจากขวดเพาะเลี้ยงล้างวุ้นที่ติดรากออกให้หมด และแช่ในสารละลายที่เติมสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา จากนั้นย้ายลงปลูกในกระถางพลาสติก โดยใช้วัสดุปลูกเป็น พีทมอส และเพอไรต์ อัตราส่วน 3:1 รดด้วยสารอาหารสูตร MS แล้วคลุมด้วยพลาสติกใส ปิดปากถุงไว้ประมาณ 7 วันเพื่อให้ต้นกล้ามีความพร้อมก่อนออกปลูกสภาพธรรมชาติ

3.2.6 การสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอจากถั่วปกติ และถั่วที่ผ่านการฉายรังสี

3.2.6.1 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากถั่วปกติและถั่วที่ผ่านการฉายรังสี

3.2.6.1.1 นำตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช เช่น ใบ หรือต้นอ่อนมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนักประมาณ 10-30 มิลลิกรัม ใส่ในโกร่ง แช่แข็งตัวอย่างในโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว และบดตัวอย่างให้เป็นผงละเอียด ตักตัวอย่างพืชใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.6.1.2 การทำให้เซลล์แตก (Tissue lysis) โดยเติมสารละลาย Buffer PL 280 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเติมเอนไซม์ Proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา แล้วบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ระหว่างบ่มให้กลับหลอดไปมา

3.2.6.1.3 นำหลอดตัวอย่างมาใช้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 – 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใส (supernatant) ที่มี DNA ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.2.6.1.4 การกำจัดอาร์เอ็นเอ โดยเติมเอนไซม์ RNaseA (DNaseA-Free ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3.2.6.1.5 เติมสารละลาย Buffer PB ปริมาตร 2 เท่าของตัวอย่าง (ประมาณ 600 ไมโครลิตร) กลับหลอดไปมา และบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.2.6.1.6 การตกตะกอนดีเอ็นเอ (Precipitation) โดยการตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 1 นาที) แล้วเติม absolute ethanol 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.2.6.1.7 Loading to column ดูดตัวอย่างลงใน column (ปริมาตรสูงสุด 1 มิลลิลิตร) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายภายใน column ทิ้ง และทำซ้ำอีกครั้ง

3.2.6.1.8 ล้าง column ด้วยสารละลาย Wash Buffer 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายภายใน column ทิ้ง และทำซ้ำอีกครั้ง

3.2.6.1.9 Column drying นำ column ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที

3.2.6.1.10 DNA elution ย้าย column ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่สะอาดและเติมสารละลาย Elution Buffer ที่อุ่น (65 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส

3.2.6.1.11 นำดีเอ็นเอไปตรวจสอบการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยดูดดีเอ็นเอมา 5 ไมโครลิตร ผสมรวมกับสารละลาย TE หรือน้ำกลั่น ปริมาตร 495 ไมโครมิลลิลิตร

3.2.6.1.12 วัดการดูดแสงที่ 260 และที่ 280 เพื่อหาค่าอัตราส่วนระหว่าง O.D. ที่ 260 และ O.D. ที่ 280

3.2.6.2 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

การคัดเลือกต้นที่มีลักษณะแตกต่างไปจากต้นควบคุม สกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ 28 ชนิด คือ OPA02, OPA03, OPA05, OPA06, OPA08, OPA16, OPA17, OPA18, OPA20, OPB11, OPB12, OPB13, OPD11,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5.3 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด

นำเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคดเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4 -D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3, 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เมื่อเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตดีที่สุดนำไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการทดลอง 3.2.5.2 ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 - 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนทำการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 กิโลแรด โดยใช้เครื่องฉายรังสีแกมมา (รุ่น Mark I มีซีเซียม 137 เป็นต้นกำเนิดรังสีของศูนย์บริการฉายรังสีแกมมามาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ ฯ) จากนั้นนำไปพัฒนาเป็นต้น โดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม GA zeatin และ BA ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญให้เกิดต้น ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้นไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 – 28 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 30 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD กำหนดให้ปริมาณรังสีเป็นทรีทเมนต์ แต่ละทรีทเมนต์ มี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำ 30 ชิ้น หลังจากการเพาะเลี้ยง บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนเซลล์แขวนลอยที่อยู่รอดปริมาณรังสีแต่ละอัตรา เพื่อหาปริมาณรังสีที่ทำให้เซลล์แขวนลอยมีอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์

3.2.5.4 การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ

นำต้นอ่อนของถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 กิโลแรด ย้ายมาเพาะเลี้ยงบนเลี้ยงสูตรอาหาร MS ที่ย้ายมาเพาะเลี้ยงบนเลี้ยงสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA ร่วมกับ BA และ IBA ที่เหมาะสม เพื่อชักนำให้เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ แล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติโดยนำออกจากขวดเพาะเลี้ยงล้างวุ้นที่ติดรากออกให้หมด และแช่ในสารละลายที่เติมสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา จากนั้นย้ายลงปลูกในกระถางพลาสติก โดยใช้วัสดุปลูกเป็น พีทมอส และเพอไรต์ อัตราส่วน 3:1 รดด้วยสารอาหารสูตร MS แล้วคลุมด้วยพลาสติกใส ปิดปากถุงไว้ประมาณ 7 วันเพื่อให้ต้นกล้ามีความพร้อมก่อนออกปลูกสภาพธรรมชาติ

3.2.6 การสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอจากพืชที่ผ่านการฉายรังสี

3.2.6.1 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากพืชที่ผ่านการฉายรังสี

3.2.6.1.1 นำตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช เช่น ใบ หรือต้นอ่อนมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนักประมาณ 10-30 มิลลิกรัม ใส่ในโกร่ง แช่แข็งตัวอย่างในโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว และบดตัวอย่างให้เป็นผงละเอียด ตักตัวอย่างพืชใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.6.1.2 การทำให้เซลล์แตก (Tissue lysis) โดยเติมสารละลาย Buffer PL 280 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเติมเอนไซม์ Proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา แล้วบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ระหว่างบ่มให้กลับหลอดไปมา

3.2.6.1.3 นำหลอดตัวอย่างมาใช้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 – 16,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใส (supernatant) ที่มี DNA ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.2.6.1.4 การกำจัดอาร์เอ็นเอ โดยเติมเอนไซม์ RNaseA (DNaseA-Free ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมและบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3.2.6.1.5 เติมสารละลาย Buffer PB ปริมาตร 2 เท่าของตัวอย่าง (ประมาณ 600 ไมโครลิตร) กลับหลอดไปมา และบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.2.6.1.6 การตกตะกอนดีเอ็นเอ (Precipitation) โดยการตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 1 นาที) แล้วเติม absolute ethanol 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.2.6.1.7 Loading to column ดูดตัวอย่างลงใน column (ปริมาตรสูงสุด 1 มิลลิลิตร) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายภายใน column ทิ้ง และทำซ้ำอีกครั้ง

3.2.6.1.8 ล้าง column ด้วยสารละลาย Wash Buffer 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายภายใน column ทิ้ง และทำซ้ำอีกครั้ง

3.2.6.1.9 Column drying นำ column ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที

3.2.6.1.10 DNA elution ย้าย column ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่สะอาดและเติมสารละลาย Elution Buffer ที่อุ่น (65 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส

3.2.6.1.11 นำดีเอ็นเอไปตรวจสอบการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยดูดดีเอ็นเอมา 5 ไมโครลิตร ผสมรวมกับสารละลาย TE หรือน้ำกลั่น ปริมาตร 495 ไมโครมิลลิลิตร

3.2.6.1.12 วัดการดูดแสงที่ 260 และที่ 280 เพื่อหาค่าอัตราส่วนระหว่าง O.D. ที่ 260 และ O.D. ที่ 280

3.2.6.2 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

การคัดเลือกโคลนที่มีลักษณะแตกต่างไปจากต้นควบคุม สกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ 28 ชนิด คือ OPA02, OPA03, OPA05, OPA06, OPA08, OPA16, OPA17, OPA18, OPA20, OPB11, OPB12, OPB13, OPD11,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OPG02, OPG04, OPG05, OPG08, OPG09, OPG11, OPH-05, OPN07, OPN09 OPN11, OPN-15, OPV-02, OPV-03, OPY15 และ OPZ-04 (ตารางที่ 3.1) ทำการเตรียมสารละลายที่เป็นส่วนประกอบในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยมีความเข้มข้นสุดท้าย ได้แก่ ไพรเมอร์ความเข้มข้น 1.6 พิโคโมล จีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA) ความเข้มข้น 15 นาโนกรัม สารละลาย dNTPs ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ พีซีอาร์บัฟเฟอร์ (PCR buffer) ความเข้มข้น 1 เท่า KCl ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สารละลาย Magnesium chloride ความเข้มข้น 3.5 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 0.2 ยูนิต น้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized H_2O) นำสารละลายดังกล่าวผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร แล้วนำเข้าเครื่อง DNA thermal cycle เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) โดยมีสถานะดัง (ตารางที่ 3.2) ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟริซิส

ตารางที่ 3.1 แสดงชื่อและลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5′-3′)
OPA02	TGCCGAGCTG
OPA03	AGTCAGCCAC
OPA05	AGGGGTCTTG
OPA06	GGTCCCTGAC
OPA08	GTGACGTAGG
OPA16	AGCCAGCGAA
OPA17	GACCGCTTGT
OPA18	AGGTGACCGT
OPA20	GTTGCGATCC
OPB11	GTAGACCCGT
OPB12	CCTTGACGCA
OPB13	TTCCCCCGCT
OPD11	AGCGCCATTG
OPG02	GGCACTGAGG
OPG04	AGCGTGTCTG
OPG05	CTGAGACGGA
OPG08	TCACGTCCAC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OPG09	CTGACGTCAC
OPG11	TGCCCGTCGT
OPH05	AGTCGTCCCC
OPN07	CAGCCCAGAG
OPN09	TGCCGGCTTG
OPN11	TCGCCGCAAA
OPN15	CAGCGACTGT
OPV02	AGTCACTCCC
OPV03	CTCCCTGCAA
OPY15	AGTCGCCCTT
OPZ04	AGGCTGTGCT

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบสารเคมีในเทคนิค RAPD ต่อ 1 ตัวอย่าง

สารเคมี	ความเข้มข้น	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
DI water	ปรับปริมาตรจนครบปริมาตรรวม	
Deoxynucleotides triphosphate (dNTPs)	1.25 mM	4
TBE buffer	10X	2.5
Primer	20 pmol/µl	2
Taq DNA polymerase	500 unit/ml	0.2
KCl	75 mM	0.625
Tris-HCl	10 mM	2.5
Magnesium chloride	25 mM	3.5
DNA template	100 ng	3.75
ปริมาตรรวม	**25 ไมโครลิตร**	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในเทคนิค PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Pre denature	94	4	1 รอบ
Denature	94	1	45 รอบ
Annealing	37	1	
Extension	72	1	
Final extension	72	5	1 รอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลและอภิปรายผลการทดลอง

4.1. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำถั่วคาวาลเคดให้เจริญเป็นแคลลัส

4.1.1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำส่วนเมล็ดของถั่วคาลวาเคดให้เจริญเป็นแคลลัส

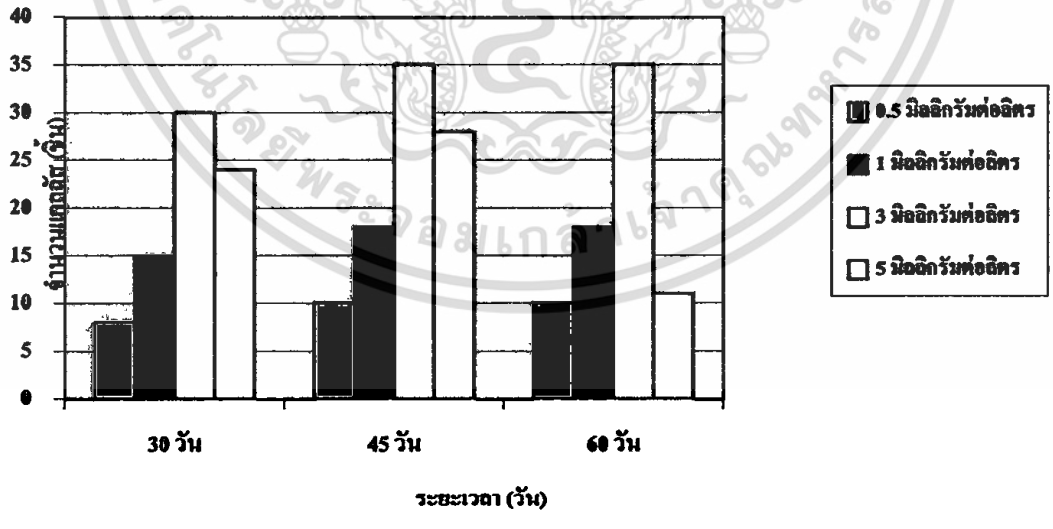
การทดลองนี้ทำการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำเมล็ดให้เกิดเป็นแคลลัส และนำผลที่ได้ในแต่ละสูตรอาหารมาเปรียบเทียบกันโดยได้ทดลองเปรียบเทียบในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30, 45 และ 60 วัน ถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS โดยเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ทุกความเข้มข้นสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ โดยพบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดจำนวน 40 แคลลัส เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (ตารางที่ 4.1 รูปที่ 4.1 และ รูปที่ 4.2) และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นระยะเวลา 30 45 และ 60 วัน ตามลำดับ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เมล็ดของถั่วคาวาลเคดเจริญเป็นแคลลัสได้สูงที่สุด แคลลัสส่วนมากจะมีลักษณะเป็นแข็ง แน่น สีขาวนวล (compact callus) คิดเป็นร้อยละ 87.5 สอดคล้องกับการทดลองของ Saleem และ คณะ (2011) และการชักนำใบเลี้ยงให้เกิดแคลลัสของถั่ว chick pea (*Cicer arietinum* L.) สายพันธุ์ KK-1 บนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 4 สัปดาห์ เกิดแคลลัสได้ 53 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสมีลักษณะเป็น compact callus สีเขียวอ่อน มีน้ำหนักสด 0.537 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนแคลลัสของถั่วคาวาลเคดจากเมล็ดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30, 45 และ 60 วัน

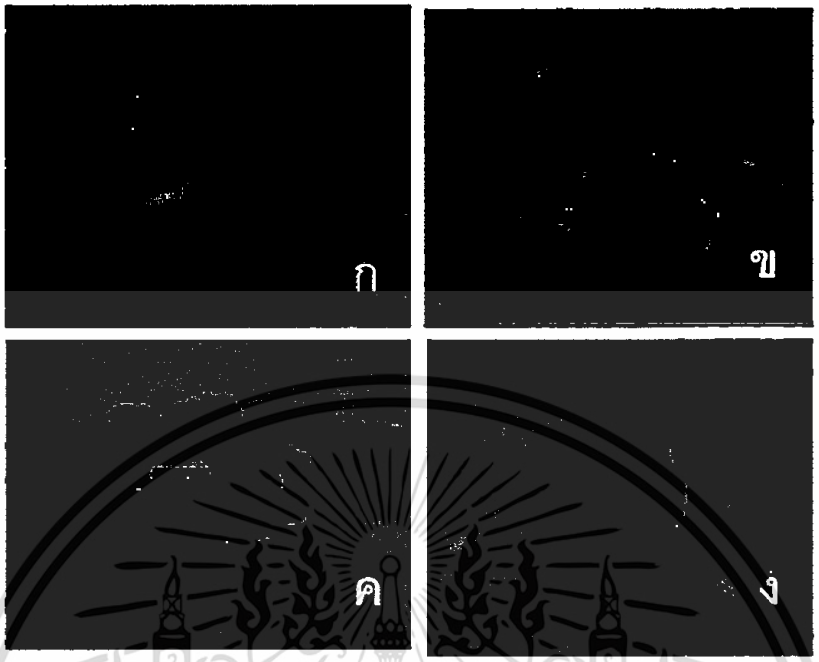
ความเข้มข้น 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนเมล็ดถั่วคาวาลเคดเริ่มต้น	จำนวนแคลลัสของถั่วคาวาลเคด (ชิ้น)			
		เวลา 30 วัน	เวลา 45 วัน	เวลา 60 วัน	%การเกิดแคลลัส เวลา 60 วัน
0.5	40	8	10	10[c]	25
1	40	15	18	18[cb]	45
3	40	30	35	35[a]	87.5
5	40	24	28	26[ab]	70

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบ โดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.1 กราฟเปรียบเทียบการเกิดแคลลัสของถั่วคาวาลเคดจากเมล็ดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตร คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30, 45 และ 60 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสของถั่วคาวาลเคดจากเมล็ดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตร คือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก) สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข) สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค) สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง) สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.1.2 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำใบเลี้ยงของถั่วคาลวาเคดให้เจริญเป็นแคลลัส

การเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วคาวาลเคดบนสูตรอาหารแข็ง MS เป็นระยะเวลา 6 วัน เมล็ดจะมีการพัฒนากลายเป็นใบเลี้ยง เมื่อนำใบเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D พบว่าใบเลี้ยงสามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ทุกระดับความเข้มข้น โดยมีการพัฒนาเป็นแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วัน ลักษณะของแคลลัสเป็น compact callus ผสม friable callus มีสีเขียว สีเหลือง เมื่อส่องดูลักษะของแคลลัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด Scanning electron microscope (SEM) compact callus มีลักษณะกลม แข็ง เกาะกันเป็นกลุ่มก้อน และ friable callus มีลักษณะเป็นเส้นใย และเป็นแคลลัสที่มีสีขาวใส ฉ่ำน้ำ (friable callus) และเป็นแคลลัสได้สมบูรณ์ทั้งชิ้นเมื่อระยะเวลา 28 วัน (ตารางที่ 4.2 รูปที่ 4.3 และ รูปที่ 4.4) เซลล์ที่ประกอบกันเป็นแคลลัสชนิดที่เป็น compact callus นี้ มักจะเป็นเซลล์ที่มีไซโตพลาสซึมเข้มข้น และมีออร์แกเนล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

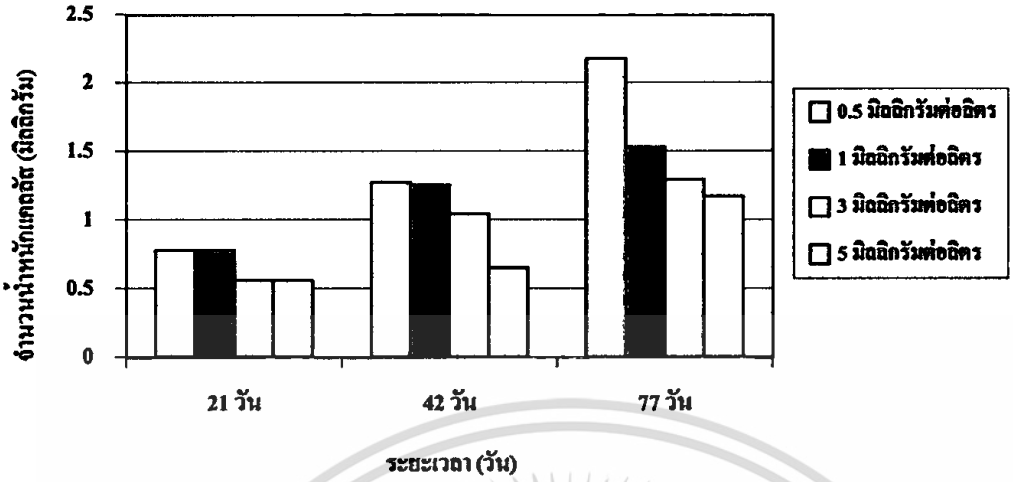
หนาแน่น และแคลลัสชนิดนี้ มักจะสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ง่าย (สุพรรณี, 2532) เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ และที่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชั่งน้ำหนักสดของแคลลัสได้สูงที่สุด 2.17 มิลลิกรัม รองลงมาคือ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชั่งน้ำหนักสดแคลลัสได้ 1.53 มิลลิกรัม และ 1.29 มิลลิกรัม ตามลำดับ ในระยะเวลา 70 วัน สอดคล้องกับงานวิจัยของอนุรักษ์ (2551) ได้ศึกษาการเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสที่พัฒนามาจากไฮโพคอทิลของถั่วคาวาลเคด โดยเพาะเลี้ยงส่วนไฮโพคอทิลบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ทุกสูตรอาหาร แต่สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือที่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 57.09 ตารางมิลลิเมตร

ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนแคลลัสของถั่วคาวาลเคดจากส่วนใบเลี้ยงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 21, 42 และ 70 วัน

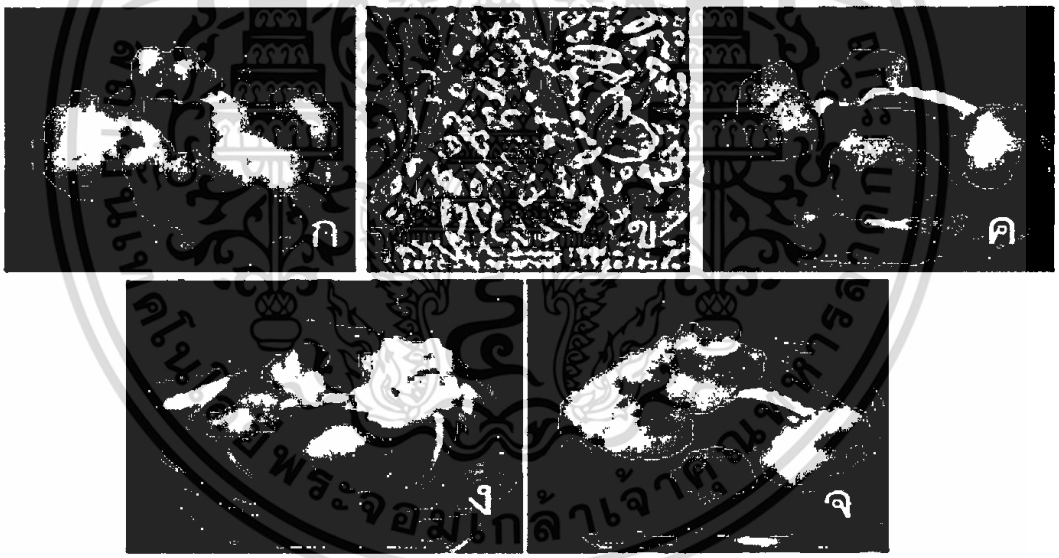
ความเข้มข้น 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนใบเลี้ยงถั่วคาวาลเคดเริ่มต้น	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	น้ำหนักสดของแคลลัสของถั่วคาวาลเคด (มิลลิกรัม)		
			เวลา 21 วัน	เวลา 42 วัน	เวลา 70 วัน
0.5	40	100	0.78[a]	1.27[a]	2.17[a]
1	40	100	0.78[a]	1.25[a]	1.53[ab]
3	40	100	0.56[a]	1.04[a]	1.29[b]
5	40	65	0.53[a]	0.65[b]	1.17[b]

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบ โดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 กราฟเปรียบเทียบการเกิดแคลลัสของถั่วคาวาลเคดจากส่วนใบเลี้ยงอ่อนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรMS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 21, 42 และ 77 วัน



รูปที่ 4.4 การเจริญเติบโตเป็นแคลลัสจากส่วนใบเลี้ยงอ่อนเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. แคลลัสที่นำไปดูด้วยกล้อง SEM

ค. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ. สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำข้อของถั่วคาลวาเคตให้เจริญเป็นแคลลัส

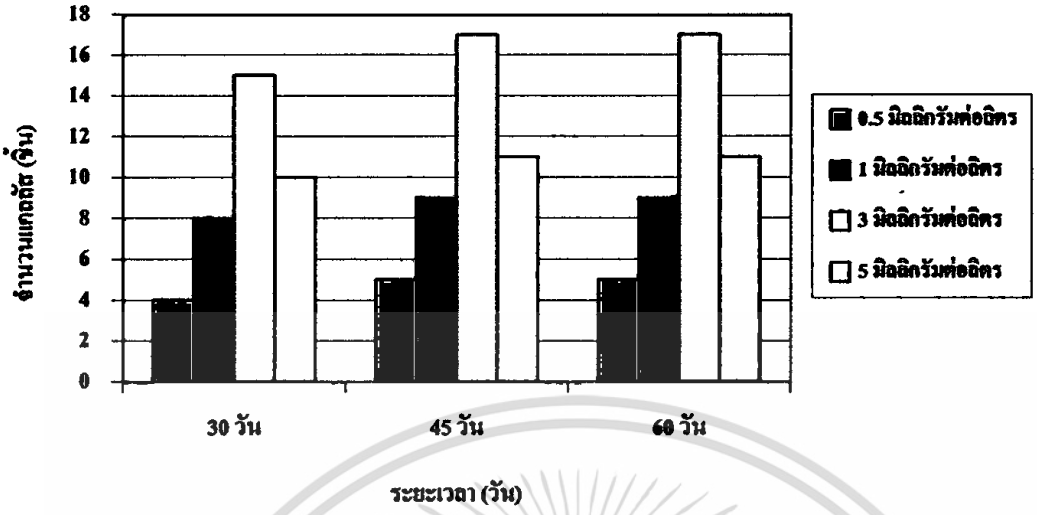
การเพาะเลี้ยงส่วนข้อถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าทุกความเข้มข้นสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ โดยอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดจำนวน 15 แคลลัส เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (ตารางที่ 4.3 รูปที่ 4.5 และ รูปที่ 4.6) และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นระยะเวลา 45 และ 60 วัน ตามลำดับ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการชักนำให้ข้อของถั่วคาวาลเคดเจริญเป็นแคลลัสได้สูงที่สุด 17 แคลลัส คิดเป็นร้อยละ 85 รองลงมาคือ 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 55 และ 45 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม 2,4-D ยังเป็นออกซินที่มีฤทธิ์รุนแรง ถ้าใช้ในความเข้มข้นสูงอาจก่อให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมของเซลล์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (somaclonal variation) ได้ (สุพรรณี, 2532)

ตารางที่ 4.3 แสดงจำนวนแคลลัสของถั่วคาวาลเคดจากส่วนข้อเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 45 และ 60 วัน

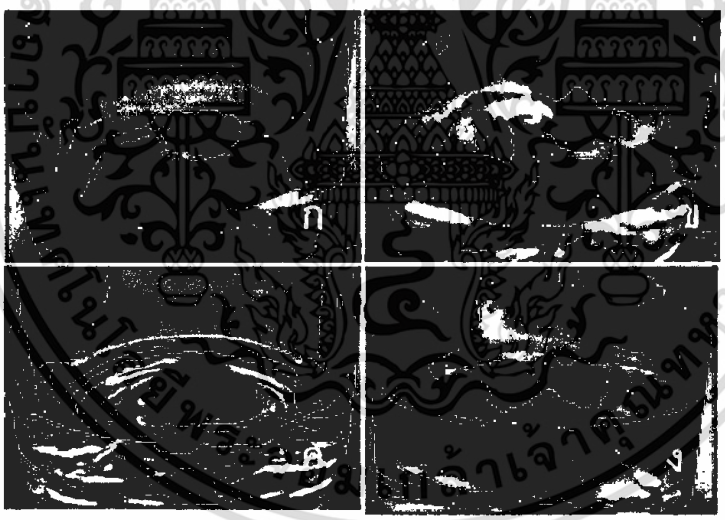
ความเข้มข้น 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนข้อถั่วคาวาลเคดเริ่มต้น	จำนวนแคลลัสของถั่วคาวาลเคด (ชิ้น)			
		เวลา 30 วัน	เวลา 45 วัน	เวลา 60 วัน	% การเกิดแคลลัส เวลา 60 วัน
0.5	20	4	5	5[c]	25
1	20	8	9	9[c]	45
3	20	15	17	17[a]	85
5	20	10	11	11[b]	55

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบ โดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 กราฟเปรียบเทียบการเกิดแคลลัสของถั่วคาวาลเคดจากส่วนข้อเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตรคือ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 45 และ 60 วัน



รูปที่ 4.6 การเจริญเติบโตเป็นแคลลัสของถั่วคาวาลเคดจากส่วนข้อเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตร คือ 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. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำถั่วคาวาลเคดให้เจริญเป็นต้นใหม่

4.2.1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้พัฒนาไปเป็นต้นใหม่

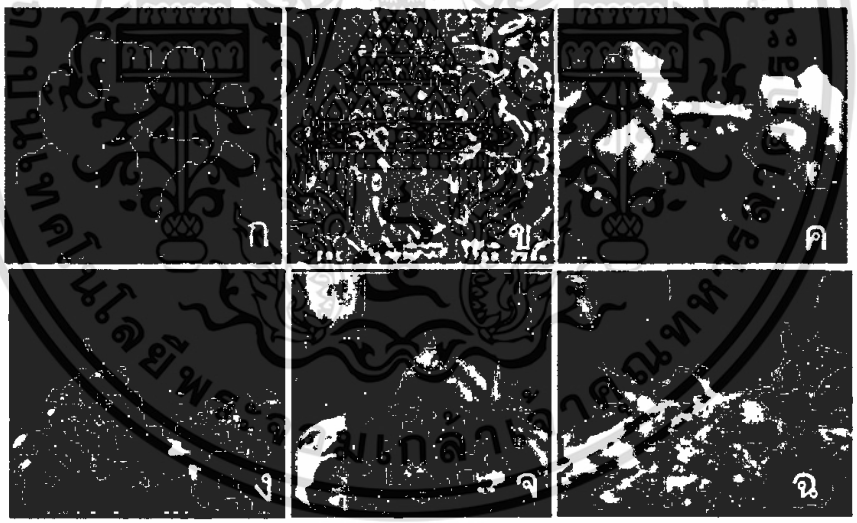
การชักนำแคลลัสให้เกิดยอดโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้บนอาหารทุกสูตร และที่ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาให้เกิดจำนวนยอดได้มากที่สุดร้อยละ 85 ได้จำนวน 3.25 ยอดต่อแคลลัส ในระยะเวลา 56 วัน และ 4.20 ยอดต่อแคลลัส 84 วัน ตามลำดับ และสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เป็นสารในกลุ่ม ไซโตไคนิน ซึ่งสามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและกระตุ้นการเจริญของตาข้าง และสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดยอดหลายๆยอดได้ (อนุรักษ์, 2551) การใช้ TDZ ร่วมกับ BA จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำยอด จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัสของถั่วคาวาลเคดเพื่อให้เกิดยอดจำนวนมาก พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการเพิ่มสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำยอดให้เพิ่มมากขึ้น กว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เพียงอย่างเดียว จากการทดลองเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดให้เกิดได้มากที่สุด 6.71 ยอด และมีความสูงมากที่สุดง 5.09 มิลลิเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 56 วัน (ตารางที่ 4.4 และ รูปที่ 4.7) ซึ่งสอดคล้องกับการใช้สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดยอดของต้นถั่วแขกสายพันธุ์ pusa-33 ค่าเฉลี่ย 13 ยอดต่อเมล็ด และสูง 3.16 เซนติเมตร (Dolendro และคณะ., 2002) และในถั่วเขียวผิวดำเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดยอด ค่าเฉลี่ย 10.6 ยอดต่อชิ้น (Dilip และคณะ., 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจากแคลลัส สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัม ต่อลิตร อายุ 56 วัน และ 84 วัน

BA (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนชิ้นแคลลัส	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด	จำนวนยอดต่อชิ้น	
			56 วัน	84 วัน
0.5	40	40	1.40^{c}	1.85^{c}
1	40	60	1.75^{bc}	2.22^{c}
3	40	85	3.25^{a}	4.20^{a}
5	40	80	2.30^{ab}	3.80^{ab}

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบ โดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.7 แคลลัสของถั่วคาวาลเคดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก. แคลลัสเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงใน 2,4-D อายุ 28 วัน

ข. แคลลัสที่นำไปดูด้วยกล้อง SEM

ค. BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 28 วัน

ง. BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 56 วัน

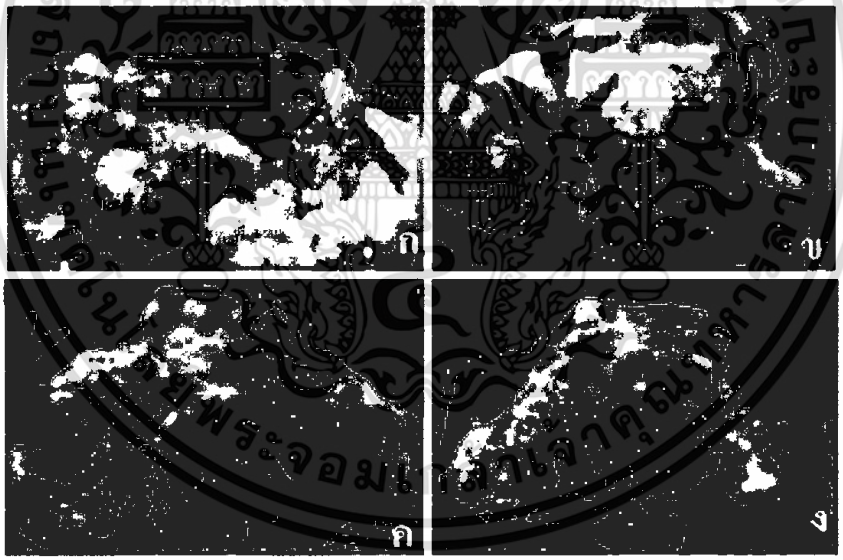
จ. และ ฉ. BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 84 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลการเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจากแคลลัสของถั่วคาวาลเคดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น TDZ ม.ก/ล	จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	% การเกิดยอด	จำนวนยอดที่เกิดต่อชิ้น	ความสูง (มิลลิเมตร)
0	40	85	3.25^{b}	3.11^{b}
0.5	40	85	3.75^{a}	3.38^{b}
1	40	87	5.56^{a}	4.25^{ab}
3	40	90	6.71^{a}	5.09^{a}
5	40	89	4.38^{a}	4.18^{ab}

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบ โดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.8 แคลลัสของถั่วคาวาลเคดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก. TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. TDZความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรอายุ 56 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำต้นจากแคลลัสให้มีลักษณะยืดยาว

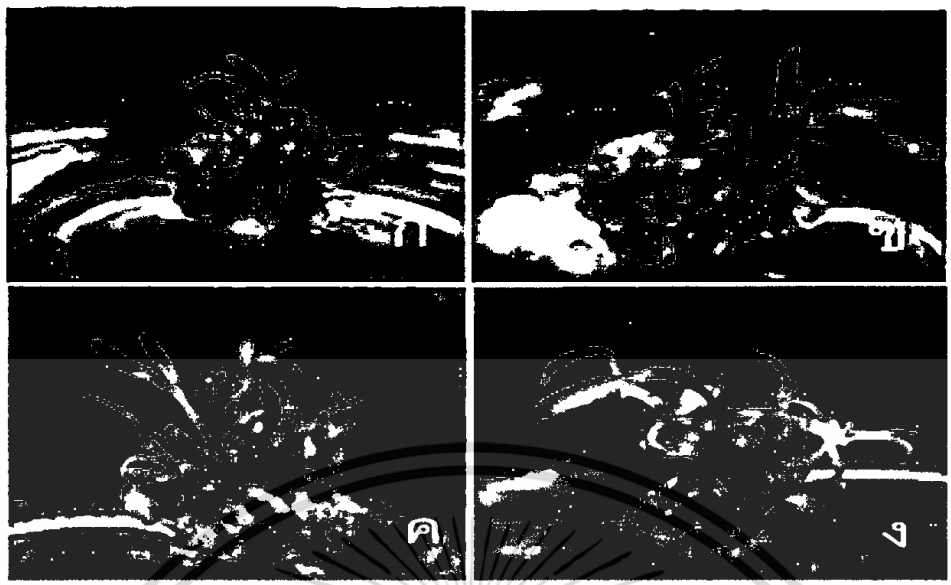
นำแคลลัสที่พัฒนายอดแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสที่มียอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม GA_3 ความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูง 6.75 และ 7.42 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) ลักษณะยอดที่เกิดขึ้น จะขนาดเล็กผอมและมีการเจริญของแคลลัสน้อยกว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรอื่นๆ (รูปที่ 4.9) ซึ่งสอดคล้องกับการใช้สูตรอาหาร MS ที่เติม GA_3 ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อลิตรกระตุ้นการเพิ่มความสูงของต้นถั่วแขกได้มากขึ้น 46 เปอร์เซ็นต์ (Shamsudeen และคณะ, 2006) และการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรกระตุ้นการเพิ่มความสูงของต้นถั่วแระได้มากขึ้น 42.10 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยความสูง 2.6 เซนติเมตร (Gaurav และคณะ, 2011)

ตารางที่ 4.6 ผลการชักนำต้นจากแคลลัสให้มีลักษณะยืดยาวของถั่วคาวาลเคดอายุ 42 วัน

ความเข้มข้น GA_3 (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนแคลลัสที่เริ่มเพาะเลี้ยง	ความยาวยอด (มิลลิเมตร)
0	20	4.16[b]
1	20	3.92[b]
3	20	6.75[b]
5	20	7.42[a]

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบ โดยวิธี HSD Turkey Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แคลลัสของถั่วคาวาลเคดที่ผ่านการชักนำยอดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร สูตรอาหาร MS เพิ่มความสูงของยอด เป็นระยะเวลา 42 วัน

ก. ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

ข. สารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. สารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. สารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2.3 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำราก

จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดรากได้ทุกสูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต IBA สามารถชักนำรากที่มีลักษณะยาว สีขาว (รูปที่ 4.10) พบว่า IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำจำนวนรากเฉลี่ยได้มากที่สุด 16 รากต่อต้น และมีความยาวรากเฉลี่ย 12.48 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.8) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Saini และ Jaiwal (2005) โดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต IBA นั้นดีกว่าเพราะเกิดรากจำนวนมากและบางยาว เมื่อเทียบกับลักษณะรากหนา และแคระแกรน ในสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ IAA ในต้นถั่วดำ *Vigna mungo*

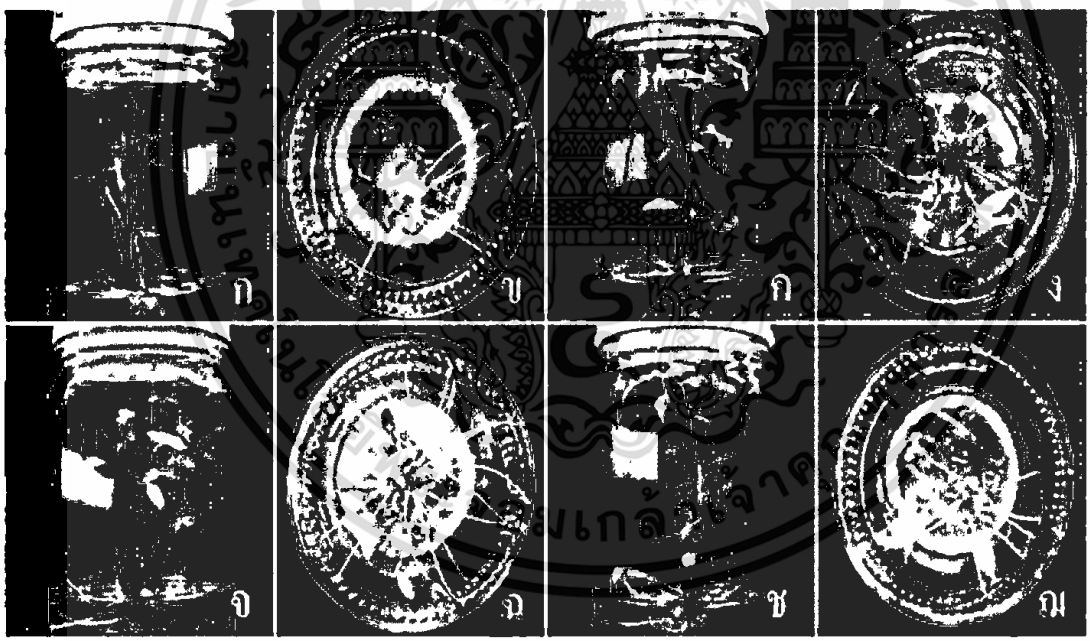
สาร IBA เป็นสารที่แสดงผลของออกซินค่อนข้างต่ำ เคลื่อนย้ายได้ช้ามาก แต่สลายตัวได้รวดเร็ว ซึ่งเป็นลักษณะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดราก ส่วน NAA เป็นสารที่แสดงผลของออกซินสูง สลายตัวได้ช้าแต่เคลื่อนที่ได้ดี ทำให้มีโอกาสที่เป็นพิษต่อพืชมากกว่า IBA (พีรเดช, 2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ผลการชักนำรากของถั่วคาวาลเคดอายุ 28 วัน

สารควบคุมการเจริญเติบโต IBA (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนยอดที่เพาะเลี้ยง	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	ค่าเฉลี่ยความยาวราก/ต้น (มิลลิเมตร)	ค่าเฉลี่ยจำนวนราก/ต้น
0.5	30	56.67	8.76^{cd}	2.73^{d}
1	30	83.33	10.14^{b}	4.97^{d}
3	30	90.00	12.48^{a}	16.00^{a}
5	30	73.33	9.55^{bc}	6.47^{d}

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบ โดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.10 ถั่วคาวาลเตดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ก-ข. IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค-ง. IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

จ-ฉ. IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ช-ฌ. IBA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วคาวาลเคดให้เกิดยอดจำนวน (multiple shoot)

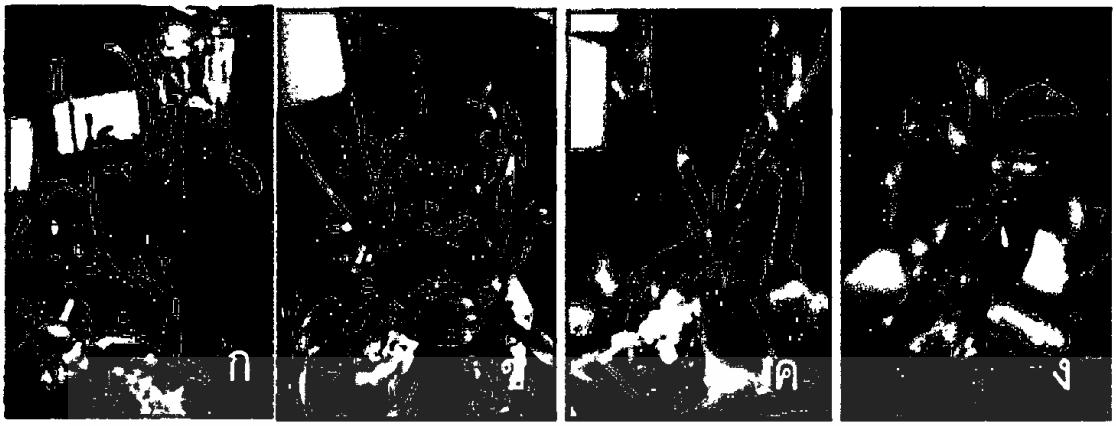
จากการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วคาวาลเคดให้เกิดยอดจำนวนมาก บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.11 และ ตารางที่ 4.8) พบว่าสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ประมาณ 28 วัน มียอดจำนวนมากที่สุดคือ 5.29 ยอดต่อเมล็ด และมีความสูงของยอดเท่ากับ 30.99 มิลลิเมตร ลักษณะของต้นมีความสมบูรณ์มากที่สุด ส่วนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วง 28 วัน มีจำนวนยอดต่อเมล็ดเท่ากับ 4.69 ยอดต่อเมล็ด และมีความสูงของยอดมากที่สุดคือ 38.00 มิลลิเมตร มีลักษณะลำต้นผอมและยืดยาว และสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะลำต้นแคระแกร็นไม่สูง และไม่สามารถเกิดยอดได้อย่างชัดเจนซึ่งเกิดจำนวนยอดได้น้อยที่สุดในการทดลอง ในทุกสูตรอาหารบริเวณราก และลำต้นจะเกิดแคลลัสรอบๆบริเวณเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก ซึ่งแคลลัสที่เกิดขึ้นสามารถนำไปชักนาให้เกิดต้นใหม่ได้ อนุรักษ์ และคณะ (2551) ได้ศึกษาแคลลัสที่ชักนาจากส่วนไฮโปคอทิลให้เกิดเป็นต้นบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม สามารถชักนำเป็นต้นได้ดีที่สุด

ตารางที่ 4.8 ผลการชักนำให้เกิดยอดและความยาวจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของของถั่วคาวาลเคด ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ อายุ 7 ถึง 28 วัน

ความเข้มข้น BA มิลลิกรัมต่อลิตร	จำนวนเมล็ดเริ่มต้น	ระยะเวลา 7 วัน		ระยะเวลา 14 วัน		ระยะเวลา 21 วัน		ระยะเวลา 28 วัน	
		ยอด/เมล็ด	ความยาว (ม.ม)	ยอด/เมล็ด	ความยาว (ม.ม)	ยอด/เมล็ด	ความยาว (ม.ม)	ยอด/เมล็ด	ความยาว (ม.ม)
0.5	30	1^{a}	16.35^{a}	2.10^{a}	34.97^{a}	3.14^{a}	37.50^{a}	4.69^{a}	38.00^{a}
1	30	1^{a}	13.21^{ab}	2.57^{a}	26.87^{b}	4.50^{b}	28.97^{b}	5.29^{a}	30.99^{b}
3	30	1^{a}	13.71^{ab}	1.73^{bc}	19.97^{c}	2.62^{bc}	20.77^{c}	2.81^{b}	21.32^{c}
5	30	1^{a}	11.53^{b}	1.38^{c}	14.90^{c}	1.88^{c}	17.34^{c}	1.92^{b}	18.72^{c}

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบ โดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 การเกิดยอดจำนวนมากและความยาวจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของของถั่วคาวาลเคด ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ อายุ 7 ถึง 28 วัน

4.4. การศึกษาการผลของรังสีแกมมา กับแคลลัสของถั่วคาวาลเคด

4.4.1 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของแคลลัสของถั่วคาวาลเคด

นำแคลลัสฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ10 กิโลแรด แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่ได้รับปริมาณรังสี 6.3 กิโลแรด มีการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD 50) (รูปที่ 4.12 และตารางที่ 4.9) เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสจะลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.15) ซึ่งสอดคล้องกับ ศรัณย์ (2552) ได้ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์หญ้าไนล์ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา โดยเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสจะลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น จากการทดลองแคลลัสที่ไม่สามารถอยู่รอดได้ จะเปลี่ยนเป็นสีดำและตายในที่สุด (รูปที่ 4.13 ค) ค่า LD50 ที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับผลของการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันและโครนิกต่อเนื้อเยื่อ (*Anubias congensis*) มีค่า LD50 ปริมาณรังสีที่ 30-40 เกรย์ และ GR50 ประมาณ 16-28 เกรย์ (ปกรณ์, 2552) ส่วนแคลลัสของหญ้าอะตราตั้มมีค่า LD50 เท่ากับ 22.13 เกรย์ (ธนภักษ์, 2545) และแคลลัสของหญ้าเนเปียร์แคระมีค่า LD50 เท่ากับ 10.6 เกรย์ (จันทกานต์, 2544) ปริมาณรังสีที่มีผลทำให้พืชมีอัตราการตายเป็นจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ขนาดของนิวเคลียส จำนวนและขนาดของโครโมโซม ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดต่อเซลล์ เป็นต้น (Sparrow และคณะ 1963) โดยแคลลัสที่ได้รับรังสีปริมาณ 10 กิโลแรด จะสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ต่ำที่สุดเท่ากับ 34 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอดทั้งหมดนั้นจะน้อยลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับ Gaul (1977) ที่พบว่าแคลลัสที่ได้รับรังสีในปริมาณที่สูง เซลล์จะหยุดการเจริญเติบโต จากการทดลองแคลลัสที่ได้รับรังสีปริมาณ 8 กิโลแรด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะสามารถพัฒนาเกิดยอดได้จำนวน 0.56 ค่าเฉลี่ยความสูงยอด 2.72 ส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

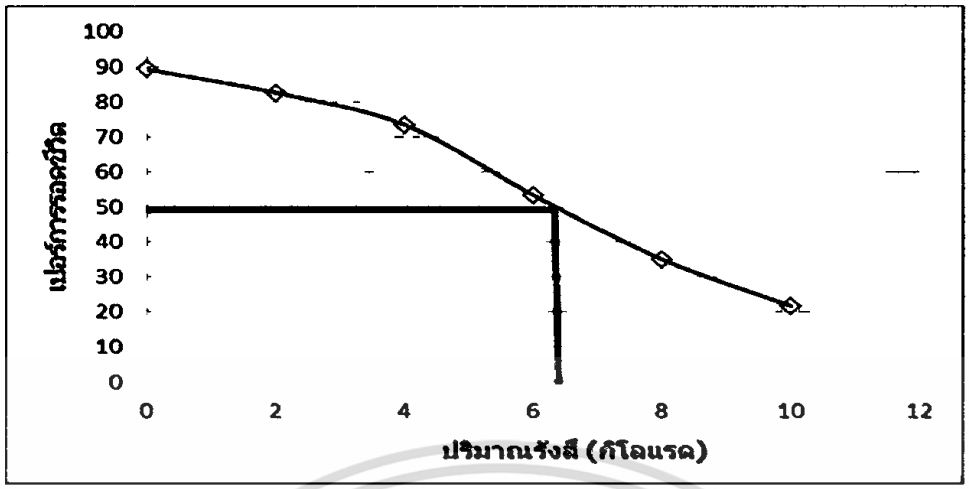
แคลลัสที่ได้รับรังสีปริมาณ 10 กิโลแรด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะสามารถพัฒนาเกิดยอดได้จำนวน และ 0.4 ยอดต่อแคลลัส ค่าเฉลี่ยความสูงยอด 2.33 มิลลิเมตร ยอดที่พัฒนามาจากแคลลัสที่รอดชีวิตจากการฉายรังสีแกมมานี้ สามารถพบความแปรปรวนในลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การแตกยอดลดลง ต้นเตี้ยแคระแกร็น (รูปที่ 4.12 ฉ) และเมื่อย้ายต้นอ่อนที่รอดชีวิตที่พัฒนาจากแคลลัสปริมาณรังสีแกมมา 2, 4, 6, 8 และ 10 กิโลแรด มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และยอดที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ฉายรังสีแกมปริมาณ 2 และ 4 กิโลแรด สามารถเกิดราก แต่ยอดที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 8 และ 10 กิโลแรดไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้

ตารางที่ 4.9 ผลของจำนวนรอดชีวิตของแคลลัสของถั่วคาวาลเคด เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และค่าเฉลี่ยความสูงยอดหลังจากฉายรังสีแกมมาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 กิโลแรด ในระยะเวลา 8 สัปดาห์

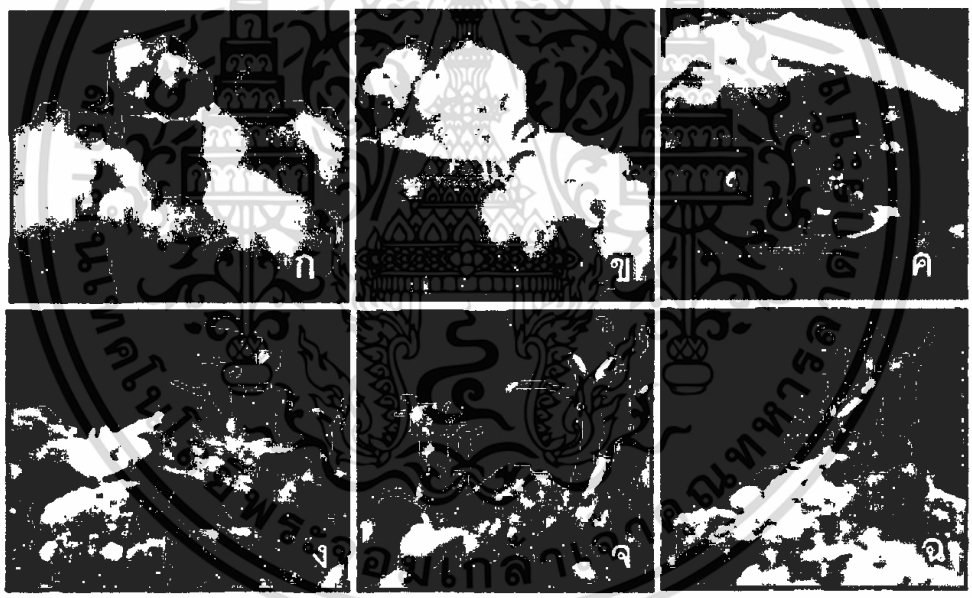
ความเข้มข้นของรังสี (กิโลแรด)	จำนวนแคลลัสเริ่มต้น	จำนวนรอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย/แคลลัส	ค่าเฉลี่ยความสูงยอด (มิลลิเมตร)
0	120	107	89.2	90	6.35 ^{a}	4.54 ^{a}
2	120	99	82.5	80	3.11 ^{b}	4.24 ^{ab}
4	120	88	73.3	74	1.6 ^{bc}	3.8 ^{ab}
6	120	64	53.3	59	2.06 ^{b}	3.23 ^{bc}
8	120	42	35.0	30	0.56 ^{cd}	2.72 ^{c}
10	120	26	21.7	10	0.4 ^{d}	2.33 ^{c}

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0. 05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของแคลลัสถั่วคาวาลเคดหลังได้รับรังสีแกมมา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 กิโลแรด ระยะเวลา 8 สัปดาห์



รูปที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงของ แคลลัสที่รอดชีวิต หลังจากการฉายรังสี

ก. แคลลัสที่ชักนำจากใบ ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ข. แคลลัสที่รอดชีวิตหลังจากได้รับรังสีเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ค. แคลลัสที่เริ่มตายหลังจากได้รับรังสีเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ง. แคลลัสที่ไม่ได้ฉายรังสีสามารถเกิดยอดจำนวนมากเป็นเวลา 8 สัปดาห์

จ. แคลลัสที่ฉายรังสี 6 กิโลแรด สามารถเกิดยอดจำนวนมากเป็นเวลา 8 สัปดาห์

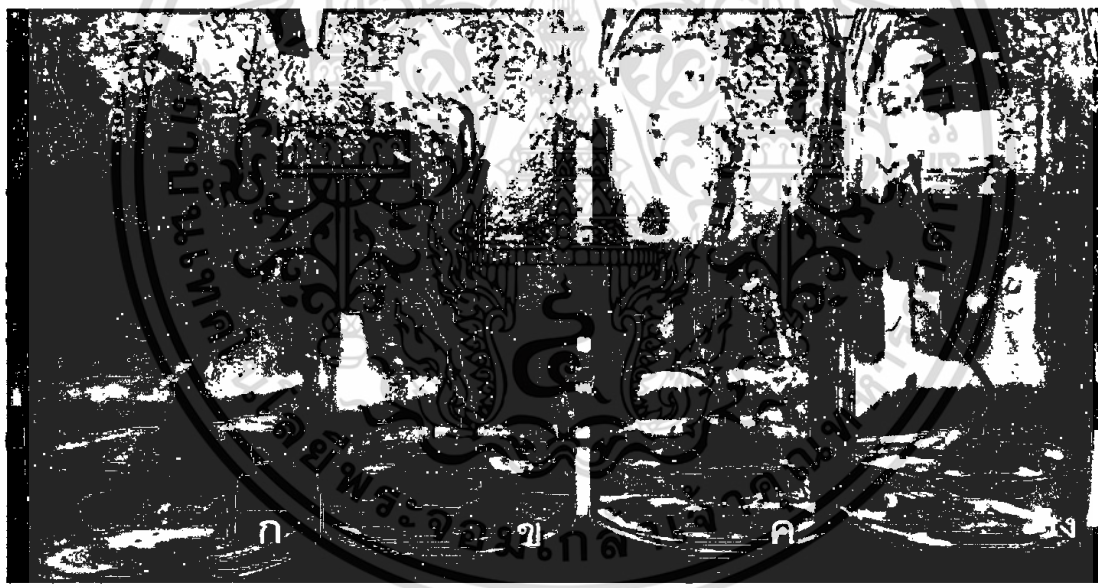
ฉ. แคลลัสที่ฉายรังสี 8 กิโลแรด สามารถเกิดยอดจำนวนมากเป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ

นำต้นอ่อนของถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 กิโลแรด เพื่อชักนำให้เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ ตรวจสอบดูต้นที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นปกติ และนำต้นที่ได้มาตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ แล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติโดยนำออกจากขวดเพาะเลี้ยงล้างวุ้นที่ติดรากออกให้หมด และแช่ในสารละลายที่เติมสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา จากนั้นย้ายลงปลูกในกระถางพลาสติก โดยใช้วัสดุปลูกเป็น พีทมอส และเพอไรต์ อัตราส่วน 3:1 รดด้วยสารอาหารสูตร MS แล้วคลุมด้วยพลาสติกใส ปิดปากถุงไว้ประมาณ 7 วันเพื่อให้ต้นกล้ามีความพร้อมก่อนออกปลูกสภาพธรรมชาติ และนำต้นที่ได้มาตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่มีการเปลี่ยนแปลงจากต้นปกติ

ต้นที่ได้รับการฉายรังสีมีหลายลักษณะที่เกิดขึ้น ลำต้นสูง มีใบเจริญตามปกติ ต้นเตี้ย มีการแตกยอดจำนวนมาก, ต้นที่มีใบจำนวนน้อย แล้วใบจะเหี่ยวตาย ในที่สุด, ลำต้นไม่แตกกอ, บางต้นมีขนาดลำต้นและใบขนาดใหญ่กว่าปกติ , มีการแตกรากจำนวนมาก,ลำต้นผอม ใบขนาดเล็ก รูปที่ 4.14 และ รูปที่ 4.15



รูปที่ 4.14 ถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 กิโลแรด

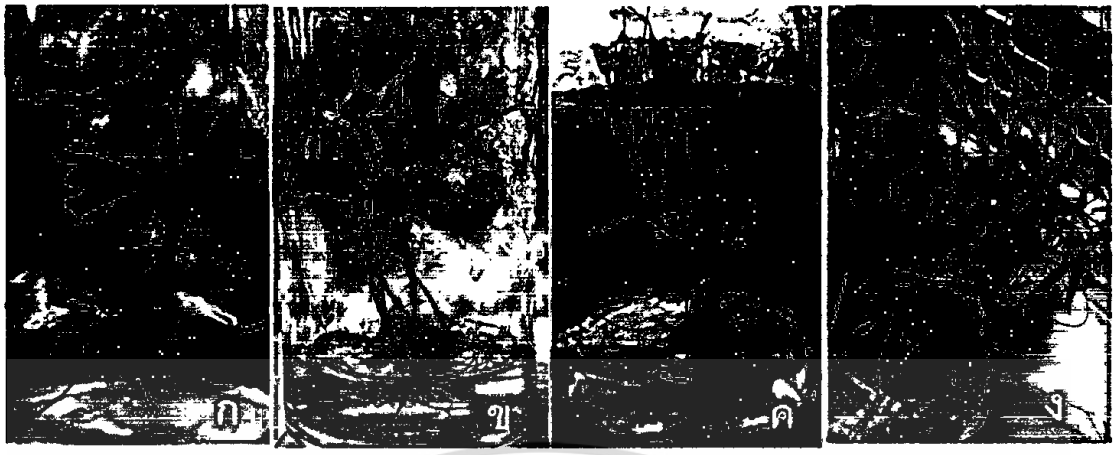
ก. ลักษณะของต้นถั่วปกติ

ข. ลักษณะของต้นถั่ว ต้นเตี้ย มีการแตกยอดจำนวนมาก

ค. ลักษณะของต้นถั่วต้นที่มีใบจำนวนน้อย แล้วใบจะเหี่ยวตาย ในที่สุด

ง. ลักษณะของต้นถั่วลำต้นไม่แตกกอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 ลักษณะของต้นต้นถั่วคาวาลเคดที่ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจากการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 กิโลแรด

ก. ลักษณะของต้นถั่ว มีขนาดลำต้น และใบขนาดใหญ่กว่าปกติ

ข. ลักษณะของต้นถั่ว มีการแตกรากจำนวนมาก

ค. ลักษณะของต้นถั่ว ต้นผอม ใบขนาดเล็ก

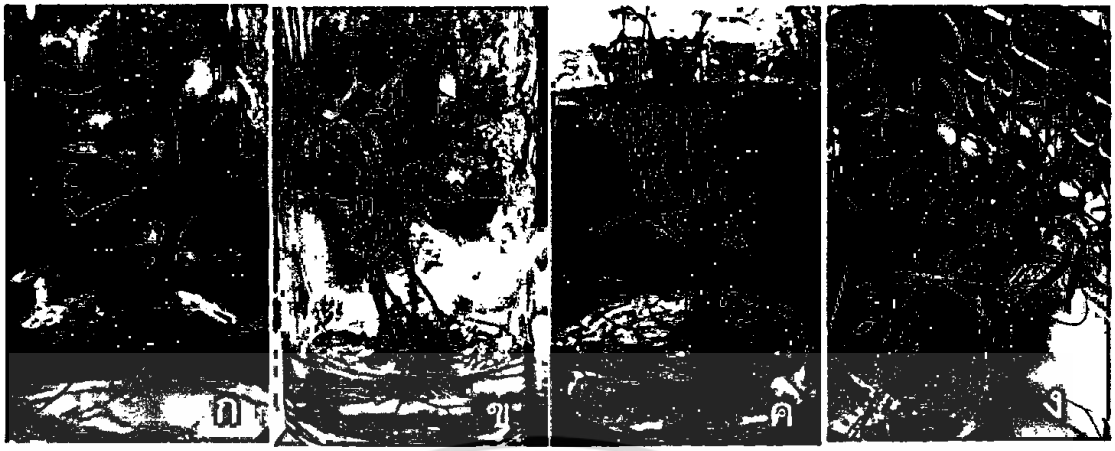
ง. ลักษณะของต้นถั่วต้นที่ย้ายออกปลูกตามธรรมชาติ

4.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

4.5.1 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด

นำแคลลัสจากการทดลอง 4.1.2 ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร พบว่าลักษณะของเซลล์แขวนลอยมีสีเหลืองอ่อนกระจายอยู่ภายในอาหารเหลว และเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ (รูปที่ 4.16 ก) เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 3-12 วัน ซึ่งเป็นระยะ log phase จากนั้นจะเข้าสู่ stationary phase ในช่วง 12-21 วัน และ death phase ในช่วง 21-30 วัน ในวันที่ 15 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงสุด 1.1674 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร และ 0.0220 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหาร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10, 4.17, ก และ ข) อนุรักษ์ (2550) กล่าวว่าเซลล์ที่อยู่ในระยะ log phase เป็นเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเหมาะสำหรับจะนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ เช่น เปลี่ยนอาหารใหม่ หรือนำไปชักนำให้พัฒนาเกิดเป็นต้น เมื่อศึกษาเซลล์แขวนลอยที่อายุ 30 วัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ brightfield microscope จะเห็นเซลล์แขวนลอยมีรูปร่างกลม กลมรี และเป็นท่อนยาวอยู่ปะปนกัน ลักษณะสีใส และสีดำเนื่องจากการทึบแสงของเซลล์แขวนลอยที่รวมกลุ่มซ้อนทับกัน (รูปที่ 4.17, ข) เซลล์แขวนลอยที่เห็นไม่สามารถบอกได้ชัดเจนว่ามีชีวิตหรือไม่ จึงตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซิเตต พบว่าจำนวนเซลล์แขวนลอยที่มีชีวิตยังสามารถพบได้อยู่ทั่วไปในอาหารเป็นจำนวนมาก และมีเซลล์แขวนลอยที่ตายแล้วอยู่ปะปนในอาหาร เนื่องจากเซลล์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์เอสเตอร์เรส (esterase) อยู่ภายในเซลล์ สีจะถูกย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 ลักษณะของต้นต้นถั่วคาวาลเคดที่ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจากการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 กิโลแรด

ก. ลักษณะของต้นถั่ว มีขนาดลำต้น และใบขนาดใหญ่กว่าปกติ

ข. ลักษณะของต้นถั่ว มีการแตกรากจำนวนมาก

ค. ลักษณะของต้นถั่ว ต้นผอม ใบขนาดเล็ก

ง. ลักษณะของต้นถั่วต้นที่ย้ายออกปลูกตามธรรมชาติ

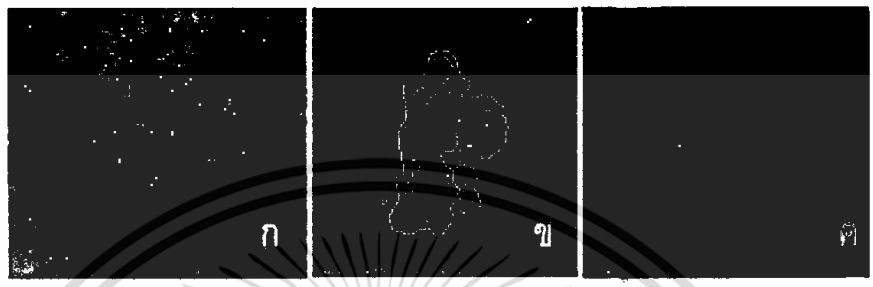
4.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

4.5.1 การศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด

นำแคลลัสจากการทดลอง 4.1.2 ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร พบว่าลักษณะของเซลล์แขวนลอยมีสีเหลืองอ่อนกระจายอยู่ภายในอาหารเหลว และเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ (รูปที่ 4.16 ก) เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 3-12 วัน ซึ่งเป็นระยะ log phase จากนั้นจะเข้าสู่ stationary phase ในช่วง 12-21 วัน และ death phase ในช่วง 21-30 วัน ในวันที่ 15 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงสุด 1.1674 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร และ 0.0220 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหาร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10, 4.17, ก และ ข) อนุรักษ์ (2550) กล่าวว่าเซลล์ที่อยู่ในระยะ log phase เป็นเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเหมาะสำหรับจะนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ เช่น เปลี่ยนอาหารใหม่ หรือนำไปชักนำให้พัฒนาเกิดเป็นต้น เมื่อศึกษาเซลล์แขวนลอยที่อายุ 30 วัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ brightfield microscope จะเห็นเซลล์แขวนลอยมี รูปร่างกลม กลมรี และเป็นท่อนยาวอยู่ปะปนกัน ลักษณะสีใส และสีดำเนื่องจากการทึบแสงของเซลล์แขวนลอยที่รวมกลุ่มซ้อนทับกัน (รูปที่ 4.17, ข) เซลล์แขวนลอยที่เห็นไม่สามารถบอกได้ชัดเจนว่ามีชีวิตหรือไม่ จึงตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซิเตต พบว่าจำนวนเซลล์แขวนลอยที่มีชีวิตยังสามารถพบได้อยู่ทั่วไปในอาหารเป็นจำนวนมาก และมีเซลล์แขวนลอยที่ตายแล้วอยู่ปะปนในอาหาร เนื่องจากเซลล์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์เอสเตอร์เรส (esterase) อยู่ภายในเซลล์ สี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์เอสเตอร์เรสภายในเซลล์แขวนลอย เมื่อกระทบกับแสงสีน้ำเงินจากกล้อง florescence microscope โมเลกุลของฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (รูปที่ 4.16, ค) (อารีย์, 2541) จากการศึกษาการมีชีวิตของ Rotman and Papermaster (1966) กล่าวว่าเซลล์ที่ถูกย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต จะเกิดกิจกรรม fluorochromatic ขึ้นภายในเซลล์ เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ความยาวคลื่นแสง 440-480 นาโนเมตร จะมีสีเขียวเรืองแสงกับเซลล์ที่มีชีวิต

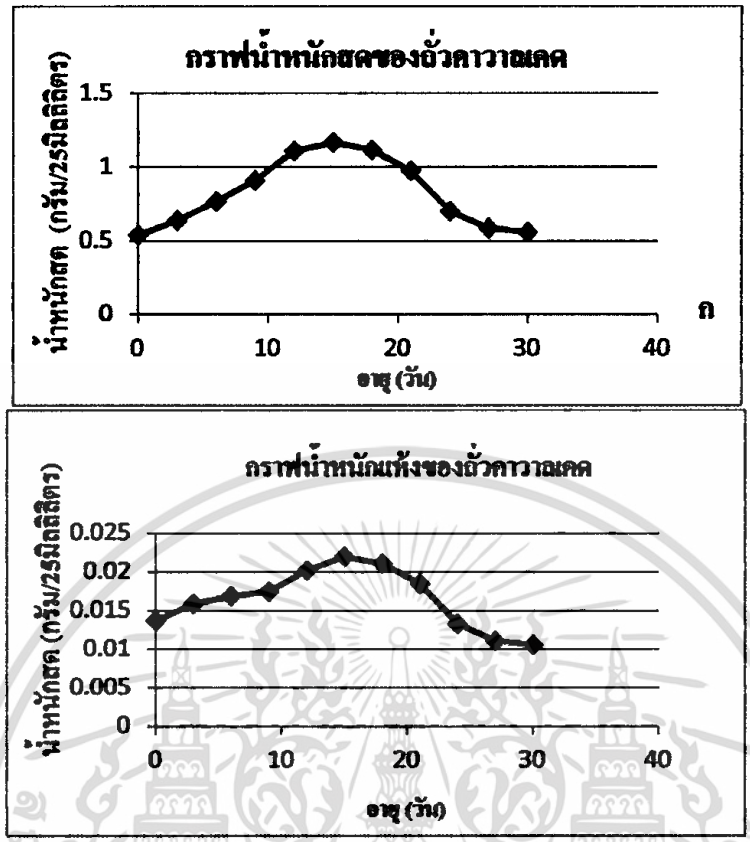


รูปที่ 4.16 เซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคดในสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร อายุเวลา 30 วัน (ก) ลักษณะของเซลล์แขวนลอย (ข) ลักษณะเซลล์แขวนลอยผ่านกล้องจุลทรรศน์ (ค) เซลล์แขวนลอยที่มีชีวิตเกิดสีเขียวเรืองแสงเมื่อย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซิเตต

ตารางที่ 4.10 การหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยในระยะเวลา 30 วัน

วัน	น้ำหนักสด (กรัม/25มล)	น้ำหนักแห้ง (กรัม/25มล)
0	0.5403	0.0137
3	0.6368	0.0159
6	0.7675	0.0169
9	0.9099	0.0175
12	1.1104	0.0202
15	1.1674	0.0220
18	1.1182	0.0211
21	0.9762	0.0185
24	0.7016	0.0133
27	0.5872	0.0111
30	0.5611	0.0106

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

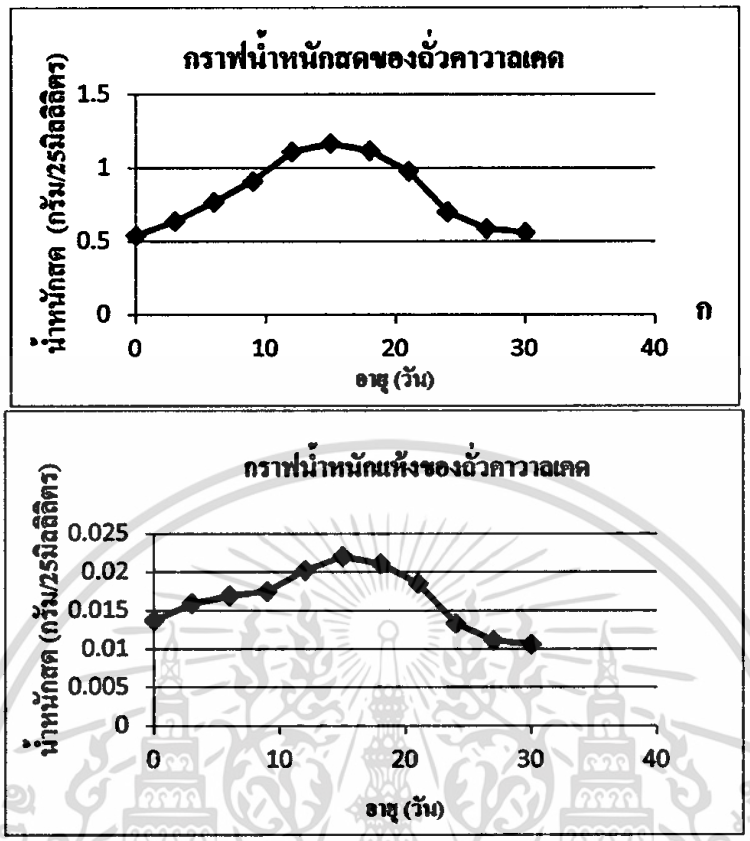


รูปที่ 4.17 ผลของเซลล์แขวนลอยในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน ก. น้ำหนักสด และ ข. น้ำหนักแห้ง

4.5.2 การศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด

คัดเลือกเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนเมล็ด ใบ และข้อ มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยนำเซลล์แขวนลอยไปผสมกับอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นนำแคลลัสที่เจริญในอาหารย้ายมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารแข็งสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25–28 องศาเซลเซียส พบว่าทุกสูตรอาหารสามารถเจริญเป็นตุ่มสีเขียวได้ ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นนำ แคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม พบว่าสามารชักนำให้เกิดเป็นยอดขนาดเล็กได้จำนวนมากในอาหารทุกสูตร ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.11 และ รูปที่ 4.18) และย้ายมาเพาะเลี้ยงบน BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำเป็นต้นที่สมบูรณ์ สอดคล้องกับการทดลองของ Palanivel และคณะ, 2002 และ Xuejun Yuan (2011 ได้ศึกษาระบบการเจริญเป็นต้นของถั่ว *Stylosanthes guianensis* cv 'Reyan 2' จากส่วนของใบเลี้ยง โดยชักนำยอดจากแคลลัสบนสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 ผลของเซลล์แขวนลอยในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน ก. น้ำหนักสด และ ข. น้ำหนักแห้ง

4.5.2 การศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด

คัดเลือกเอ็มบริโอจีนิคแคลลัสที่พัฒนาจากส่วนเมล็ด ใบ และช้อ มาเพาะ ขงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยนำเซลล์แขวนลอยไปผสมกับอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นนำแคลลัสที่เจริญในอาหารย้ายมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารแข็งสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25–28 องศาเซลเซียส พบว่าทุกสูตรอาหารสามารถเจริญเป็นตุ่มสีเขียวได้ ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นนำ แคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม พบว่าสามารชักนำให้เกิดเป็นยอดขนาดเล็กได้จำนวนมากในอาหารทุกสูตร ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.11 และ รูปที่ 4.18) และย้ายมาเพาะเลี้ยงบน BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำเป็นต้นที่สมบูรณ์ สอดคล้องกับการทดลองของ Palanivel และคณะ, 2002 และ Xuejun Yuan (2011 ได้ศึกษาระบบการเจริญเป็นต้นของถั่ว *Stylosanthes guianensis* cv 'Reyan 2' จากส่วนของใบเลี้ยง โดยชักนำยอดจากแคลลัสบนสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

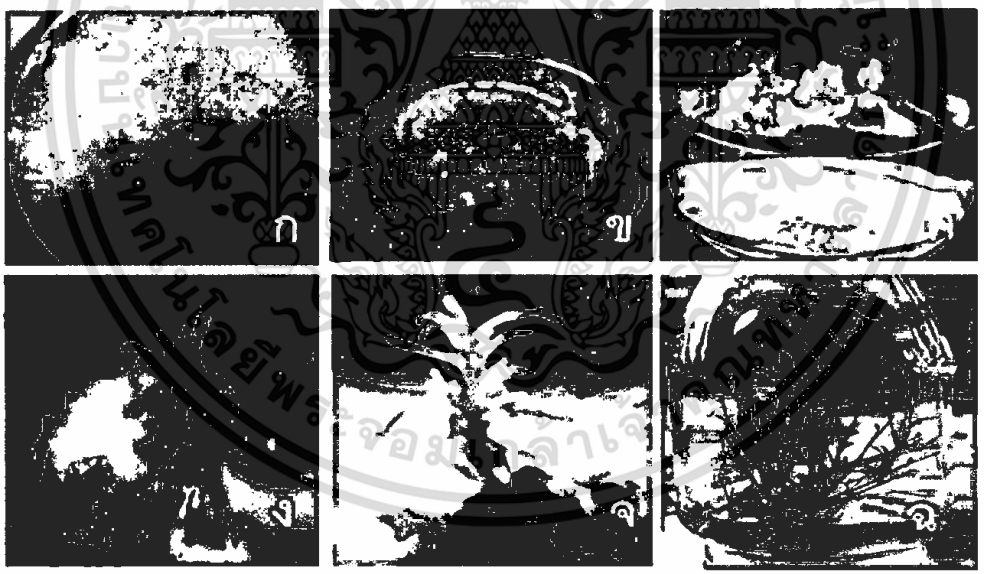
อาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดยอดได้ 66 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากนั้นย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหาร ที่เติมลักษณะของต้นถั่ว IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากได้สมบูรณ์

ตารางที่ 4.11 ผลการชักนำให้เป็นต้นจากเซลล์แขวนลอย

ความเข้มข้น BA มก/ล	จำนวนเซลล์แขวนลอยเริ่มต้น	จำนวนยอดที่เกิดขึ้น ระยะเวลา 8 สัปดาห์
0.5	60	34^{b}
1	60	52^{ab}
3	60	54^{a}
5	60	37^{b}

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบ โดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



รูปที่ 4.18 การพัฒนาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

ก. เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

ข. เซลล์แขวนลอยที่ผสมกับอาหาร ระยะเวลา 8 สัปดาห์

ค. แคลลัสที่เริ่มเพาะเลี้ยง

ง. แคลลัสพัฒนาเป็นยอด

จ. แคลลัสพัฒนาเป็นยอดที่ยาวขึ้น ระยะเวลา 8 สัปดาห์

ฉ. แคลลัสที่เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ ระยะเวลา 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.3 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของแคลลัสที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด

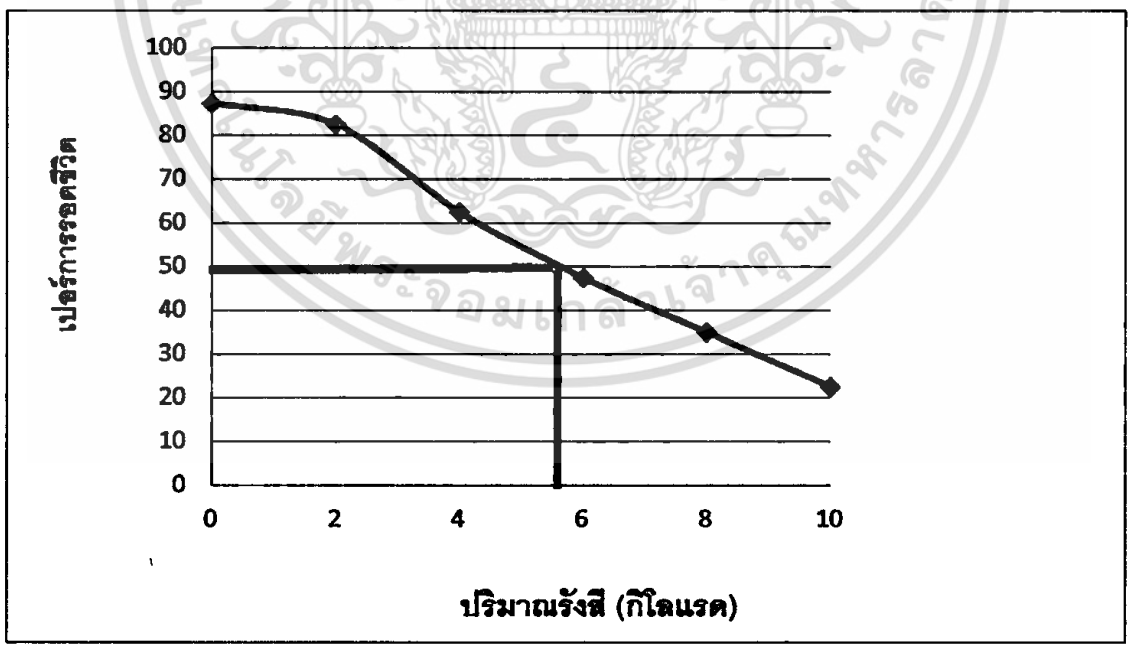
นำแคลลัสที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ10 กิโลแรด แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่ได้รับปริมาณรังสี 5.8 กิโลแรด มีการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD 50) (รูปที่ 4.19) เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสจะลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.12) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ อนุรักษ์ และคณะ (2556) การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าไนล์ โดยนำแคลลัสที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยอายุ 4 สัปดาห์ ไปฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ 0-100 เกรย์ แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดและอัตราการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัสลดลงเมื่อได้รับปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น โดยปริมาณรังสีที่ทำให้แคลลัสมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) คือ 70.48 เกรย์ จากนั้นย้ายยอดที่พัฒนามาจากแคลลัสที่รอดชีวิตเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร LS เพื่อชักนำให้เกิดราก แล้วนำย้ายออกปลูกเพื่อศึกษาเป็นเวลา 45 วัน พบว่า ความสูง และความยาวเฉลี่ยของใบของหญ้าไนล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น และสามารถตรวจพบความแปรปรวนในลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากต้นที่พัฒนาจากแคลลัสที่ได้รับรังสี เช่น ใบเล็ก หรือ มีลักษณะเตี้ยแคระแตกกอมาก จากการทดลองแคลลัสที่ไม่สามารถอยู่รอดได้ จะเปลี่ยนเป็นสีดำและตายในที่สุด (รูปที่ 4.20 ง) ส่วนแคลลัสของหญ้าอะตราตั้มมีค่า LD50 เท่ากับ 22.13 เกรย์ (ธนภักษ์, 2545) และ แคลลัสของหญ้าเนเปียร์แคระมีค่า LD50 เท่ากับ 10.6 เกรย์ (จันทกานต์, 2544) โดยแคลลัสที่ได้รับรังสีปริมาณสูง การพัฒนาเป็นต้นได้ต่ำที่สุด และจำนวนยอดทั้งหมดนั้นจะน้อยลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับ Gaul (1977) ที่พบว่าแคลลัสที่ได้รับรังสีในปริมาณที่สูง เซลล์จะหยุดการเจริญเติบโต และเมื่อย้ายต้นอ่อนที่รอดชีวิตที่พัฒนาจากแคลลัสปริมาณรังสีแกมมา 2, 4, 6, 8 และ 10 กิโลแรด มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และยอดที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ยอดที่พัฒนามาจากแคลลัสที่รอดชีวิตจากการฉายรังสีแกมมานี้สามารถพบความแปรปรวนในลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ต้นอ้วนอบขนาดใหญ่(รูปที่ 4.20 จ) บางต้นเตี้ยแคระแกร็น ขนาดเล็ก (รูปที่ 4.20 ฉ) บางต้นมีใบขนาดใหญ่ (รูปที่ 4.20 ช) บางต้นใบและยอดมีการเหี่ยวตายในระยะเวลา 8 สัปดาห์ (รูปที่ 4.20 ซ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ผลของจำนวนรอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด หลังจากฉายรังสีแกมมาที่ระดับความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ10 กิโลแรด ระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของรังสี (กิโลแรด)	จำนวนแคลลัสที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยเริ่มต้น	จำนวนรอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต
0	40	35	87.5
2	40	33	82.5
4	40	25	62.5
6	40	19	47.5
8	40	14	35
10	40	9	22.5

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0. 05



รูปที่ 4.19 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของแคลลัสที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยถั่วคาวาลเคดหลังได้รับรังสีแกมมา 0, 2, 4, 6, 8 และ10 กิโลแรด ระยะเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.20 การพัฒนาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยหลังจากการฉายรังสี

ก. แคลลัสที่ชักนำจากเซลล์แขวนลอย ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ข. แคลลัสที่รอดชีวิตหลังจากได้รับรังสีเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ค. แคลลัสที่รอดชีวิตหลังจากได้รับรังสีเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ง. แคลลัสที่เริ่มตายหลังจากได้รับรังสีเป็นเวลา 4 สัปดาห์

จ. แคลลัสที่ฉายรังสีสามารถเกิดยอดที่มีขนาดใหญ่ในระยะเวลา 8 สัปดาห์

ฉ. แคลลัสที่ไม่ได้ฉายรังสี สามารถเกิดยอดจำนวนมากในระยะเวลา 8 สัปดาห์

ช. แคลลัสที่ฉายรังสี สามารถเกิดยอดและมีใบขนาดใหญ่ในระยะเวลา 8 สัปดาห์

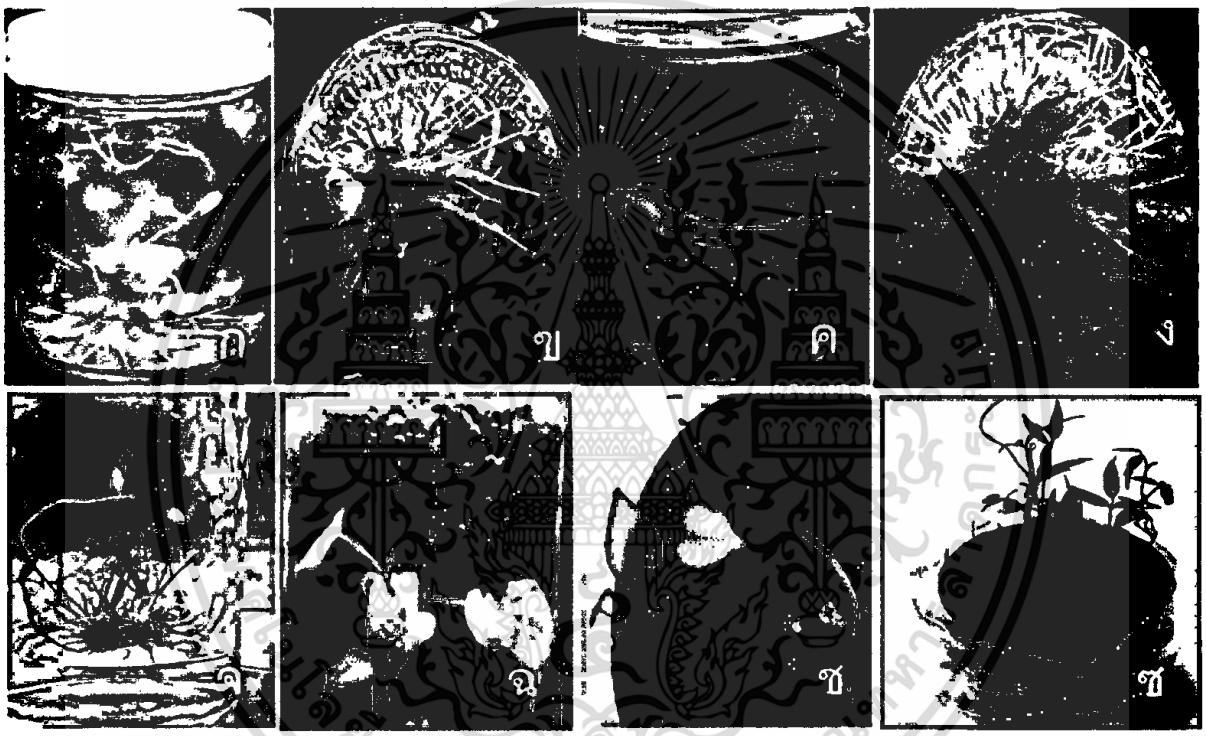
ซ. แคลลัสที่ฉายรังสี ใบและยอดมีการเหี่ยวตายในระยะเวลา 8 สัปดาห์

4.5.4 การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากแคลลัสที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เมื่อปลูกในสภาพธรรมชาติ

นำต้นอ่อนของถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากแคลลัสที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ10 กิโลแรด เพื่อชักนำให้เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ ตรวจสอบดูต้นที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นปกติ และนำต้นที่ได้มาตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ แล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติโดยนำออกจากขวดเพาะเลี้ยงล้างวุ้นที่ติดรากออกให้หมด และแช่ในสารละลายที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติมสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา จากนั้นย้ายลงปลูกในกระถางพลาสติก โดยใช้วัสดุปลูกเป็น พีทมอส และเพอไรต์ อัตราส่วน 3:1 รดด้วยสารอาหารสูตร MS แล้วคลุมด้วยพลาสติกใส ปิดปากถุงไว้ประมาณ 7 วันเพื่อให้ต้นกล้ามีความพร้อมก่อนออกปลูกสภาพธรรมชาติ และนำต้นที่ได้มาตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่มีการเปลี่ยนแปลงจากต้นปกติ ต้นที่ได้รับการฉายรังสีมีหลายลักษณะที่เกิดขึ้น เช่น ลำต้นสูง มีใบเจริญตามปกติ, ต้นเตี้ย มีการแตกยอดจำนวนมาก, ต้นที่มีใบจำนวนน้อย แล้วใบจะเหี่ยวตาย ในที่สุด, ลำต้นไม่แตกกอ, บางต้นมีขนาดลำต้น และใบขนาดใหญ่กว่าปกติ, บางต้นมีการแตกรากจำนวนมาก, บางต้นมีลำต้นผอม มีใบขนาดเล็ก รูปที่ 4.21 ก-ช



รูปที่ 4.21 ถั่วคาวาลเคดที่พัฒนาจากแคลลัสที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา ปริมาณต่างๆ คือ 0, 2, 4, 6, 8 และ10 กิโลแรด

ก. และ ข. ลักษณะของต้นถั่ว มีขนาดลำต้นใหญ่ และรากขนาดใหญ่กว่าปกติ

ค. และ ง. ลักษณะของต้นถั่ว มีขนาดลำต้นใหญ่ มีการแตกรากจำนวนมาก

จ. ลักษณะของต้นถั่ว ต้นผอม ใบขนาดเล็ก

ฉ. ลักษณะของต้นถั่ว ต้นที่อยู่ในขวดมีใบขนาดใหญ่

ช. ลักษณะของต้นถั่ว ต้นที่ย้ายออกปลูกมีใบขนาดใหญ่

ซ. ลักษณะของต้นถั่ว ต้นที่ย้ายออกปลูกมีใบขนาดเล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การตรวจสอบต้นกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

จากการคัดเลือกต้นถั่วคาวาเคดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ฉายรังสีหรือต้นควบคุม (control) จำนวน 6 ต้น ได้แก่ ต้นที่1 ต้นที่2 ต้นที่ 3 ต้นที่ 4 ต้นที่ 5 ต้นที่ 6 เมื่อนำต้นที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุม และต้นควบคุมมาสกัดดีเอ็นเอใช้วิธี CTAB และตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยการศึกษาจากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างไปจากต้นควบคุม ด้วยไพรเมอร์จำนวน 28 ชนิด (ตารางที่ 4.13) ได้แก่ OPA02, OPA03, OPA05, OPA06, OPA08, OPA16, OPA17, OPA18, OPA20, OPB11, OPB12, OPB13, OPD11, OPG02, OPG04, OPG05, OPG08, OPG09, OPG11, OPH-05, OPN07, OPN09 OPN11, OPN-15, OPV-02, OPV-03, OPY15 และ OPZ-04 พบว่าไพรเมอร์จำนวน 16 ไพรเมอร์ สามารถทำให้เกิดแถบแบนดีเอ็นเอได้คือ OPA16, OPD11, OPG02, OPG04, OPG05, OPG08, OPG09, OPG11, OPH-05, OPN07, OPN09 OPN11, OPN-15, OPV-02, OPV-03, และ OPZ-04 แต่เนื่องจากบางตัวอย่างมีจำนวนดีเอ็นเอน้อยมาก ไม่สามารถทำการทดลองต่อได้ จึงเลือกต้นที่มีดีเอ็นเอจำนวนมากมาทำการทดลองต่อ พบว่ามีจำนวนไพรเมอร์ 6 ชนิด คือ OPH05, OPV02, OPV03, OPN09, OPN15 และ OPZ 04 สามารถแยกแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างไปจากต้นควบคุม โดยไพรเมอร์ OPN 09 สามารถแยกความแตกต่างได้ดีที่สุดในทุกต้น (รูปที่ 4.22 ก-จ) และต้นที่สามารถแยกความแตกต่างจากต้นควบคุมมากที่สุดคือต้นที่ 5 โดยให้จำนวนแถบที่แตกต่างจากต้นควบคุมจำนวน 14 แถบ คิดเป็นค่าเฉลี่ยต่อไพรเมอร์เท่ากับ 2.33 ดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.13 ชุดของไพรเมอร์ชนิดต่างๆ ที่มีลำดับเบส 10 เบส สามารถเกิดแบนดีเอ็นเอขึ้นได้ และไม่สามารถเกิดแบนดีเอ็นเอขึ้นได้

สามารถเกิดแบนดีเอ็นเอได้	ไม่สามารถเกิดแบนดีเอ็นเอได้
OPA16 AGCCAGCGAA	OPA02 TGCCGAGCTG
OPD11 AGCGCCATTG	OPA03 AGTCAGCCAC
OPG02 GGCACTGAGG	OPA05 AGGGGTCTTG
OPG04 AGCGTGTCTG	OPA06 GGTCCCTGAC
OPG05 CTGAGACGGA	OPA08 GTGACGTAGG
OPG09 CTGACGTCAC	OPA17 GACCGCTTGT
OPG11 TGCCCGTCGT	OPA20 GTTGCGATCC
OPH05 AGTCGTCCCC	OPA18 AGGTGACCGT
OPN07 CAGCCCAGAG	OPB11 GTAGACCCGT
OPN09 TGCCGGCTTG	OPB12 CCTTGACGCA
OPN11 TCGCCGCAAA	OPB13 TTCCCCCGCT

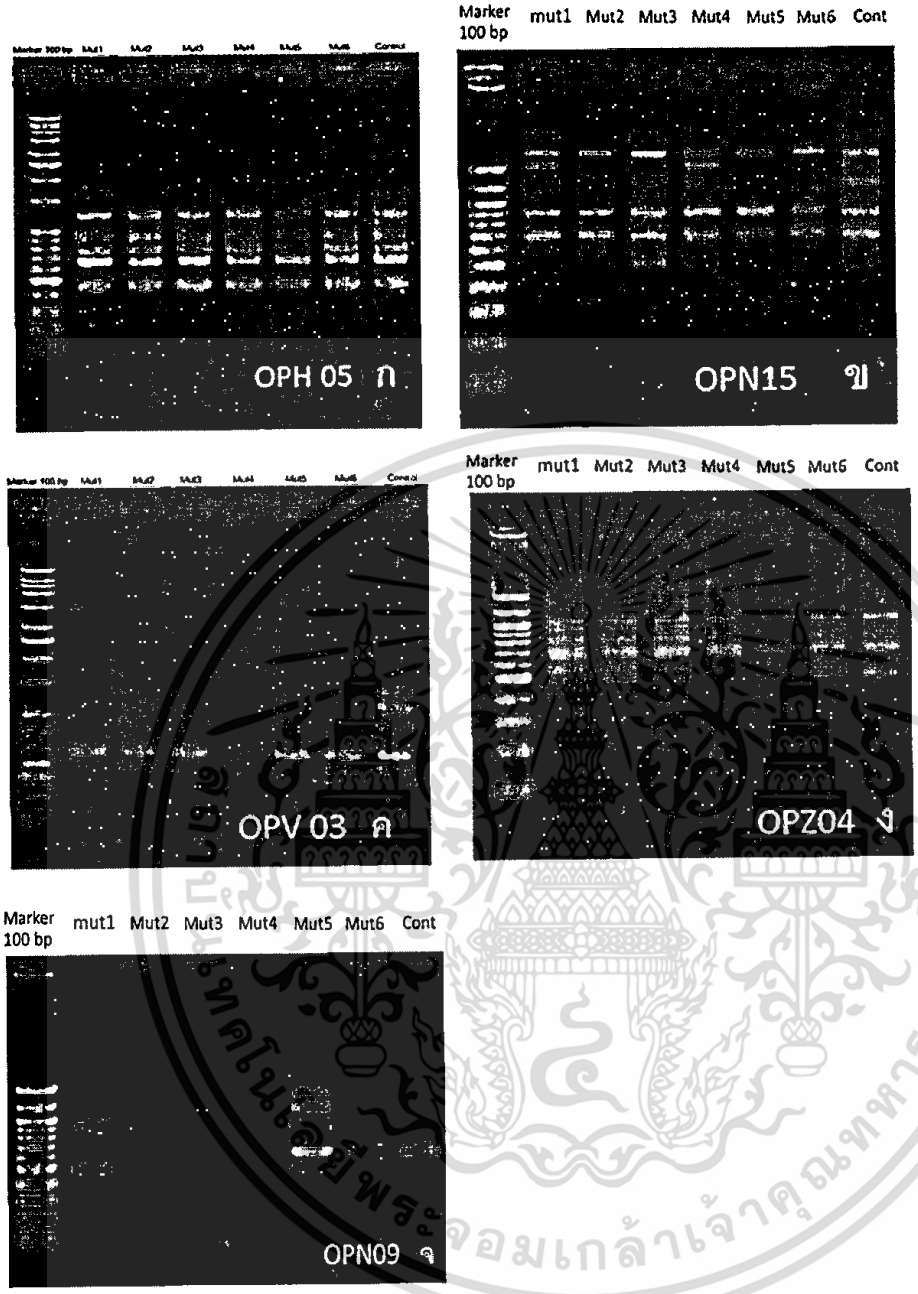
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OPN15 CAGCGACTGT	OPG08 TCACGTCCAC
OPV02 AGTCACTCCC	OPY15 AGTCGCCCTT
OPV03 CTCCCTGCAA	
OPZ04 AGGCTGTGCT	

ตารางที่ 4.14 แสดงต้น และจำนวนแถบที่แตกต่างจากต้นควบคุมเมื่อใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบต้นถั่วที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมาโดยใช้ไพรเมอร์ 6 ชนิด

ไพรเมอร์	ต้นที่/จำนวนแถบที่แตกต่างจากต้นควบคุม					
	ต้น mut 1	ต้น mut2	ต้น mut 3	ต้น Mut4	ต้น mut5	ต้น mut6
OPH05	1	1	0	1	1	1
OPN09	1	1	2	4	4	1
OPN15	1	1	0	2	5	3
OPV02	1	0	2	0	1	0
OPV03	0	0	1	0	1	0
OPZ04	2	2	2	1	2	1
จำนวนที่แตกต่างทั้งหมด	6	5	7	8	14	5
ค่าเฉลี่ยต่อไพรเมอร์	1	0.83	1.17	1.33	2.33	0.83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.22 ลักษณะการเกิดแถบแบนของดีเอ็นเอ ในไพรเมอร์ชนิดต่างๆ

ก. ไพรเมอร์ OPH 05

ข. ไพรเมอร์ OPN15

ค. ไพรเมอร์ OPV03

ง. ไพรเมอร์ OPZ04

จ. ไพรเมอร์ OPN09

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วคาวาลเคดให้เกิดยอดจำนวนมาก พบว่าสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นได้มากที่สุด 88 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดจำนวน 5.50 และ 9.00 ยอดต่อเมล็ด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ ส่วนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 3.76 และ 4.19 เซนติเมตรต่อยอด ตามลำดับ

การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงถั่วคาวาลเคด พบว่าการชักนำแคลลัสจากส่วนของใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด 96 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักสดมากที่สุด 2.22 และ 3.53 กรัม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 และ 12 สัปดาห์ ตามลำดับ

การนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร พบว่าค่าน้ำหนักสดและค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดคือ 1.164 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร และ 0.022 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 3-12 วัน ซึ่งเป็นระยะ log phase

แคลลัสที่พัฒนาจากส่วนของใบเลี้ยงสามารถชักนำให้เป็นต้นบนอาหารสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด 90 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำยอดเฉลี่ยได้มากที่สุด 6.47 ยอดต่อแคลลัส และความสูงเฉลี่ย 5.09 มิลลิเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อนำแคลลัสที่พัฒนายอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงเฉลี่ย 7.15 มิลลิเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

สามารถชักนำยอดให้เกิดรากได้บนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดได้ 16 รากต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ย 12.48 มิลลิเมตร

การชักนำการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสีแกมมา นำแคลลัสฉายรังสีแกมมาที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 กิโลแรด พบว่าปริมาณรังสีที่ทำให้แคลลัสถั่วคาวาลเคดมีเปอร์เซ็นต์การตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD50) มีค่าเท่ากับ 6.3 กิโลแรด ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ และแคลลัสเจริญจากเซลล์แขวนลอยมีเปอร์เซ็นต์การตาย 50 เปอร์เซ็นต์ 5.8 กิโลแรด ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นตรวจสอบการกลายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

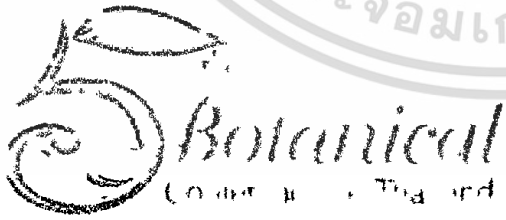
ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีเปรียบเทียบต้นควบคุม พบว่าสามารถนำเทคนิคอาร์เอพีดีมาตรวจสอบการกลายพันธุ์ของถั่วคาวาลเคดได้

การตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค RAPD พบว่า ไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิด คือ OPH05, OPN09, OPN15 OPV02, OPV03, และ OPZ 04 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา และไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมาได้

การวิจัยครั้งนี้สามรถทำได้ตามวัตถุประสงค์เกือบทุกหัวข้อ ยกเว้นหัวข้อสุดท้ายที่ยังไม่สามารถคัดต้นที่ต้านทานต่อไวรัสได้ ตอนนี้กำลังอยู่ระหว่างการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายชื่อเรื่องเต็ม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

การประชุมวิชาการ
พฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 5

จัดโดย

- ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

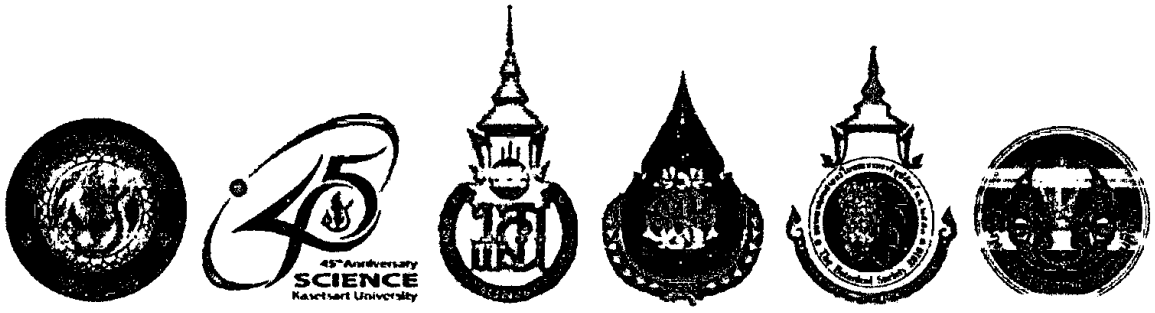
ร่วมกับ

- ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- องค์การสวนพฤกษศาสตร์
- สมาคมพฤกษศาสตร์ในพระบรมราชินูปถัมภ์
- สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)

ณ อาคารทวี ญาณสุคนธ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วันพุธที่ 30 มีนาคม – วันศุกร์ที่ 1 เมษายน 2554

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หลักการและเหตุผล

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมในเขตร้อน ซึ่งเป็นแหล่งรวมความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช ผลงานวิจัยในสาขาต่าง ๆ ทางพฤกษศาสตร์ เช่น อนุกรมวิธาน สัณฐานวิทยากายวิภาค สรีรวิทยา พันธุศาสตร์ ชีวโมเลกุล พฤกษเคมี เทคโนโลยีชีวภาพ พฤกษศาสตร์พื้นบ้าน นิเวศสรีรวิทยา และนิเวศวิทยา ตลอดจนสาขาวิชาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น พืชสวน พืชไร่นา วนศาสตร์ วิทยาสาหร่าย เห็ดรา และไลเคน จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการบริหารจัดการและการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรพรรณพืชอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน อันจะเป็นผลดีต่อการพัฒนาประเทศ ดังนั้น หน่วยงานต่าง ๆ จึงได้ร่วมมือกันจัดการประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทยครั้งที่ 5

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสนับสนุนให้มีการนำเสนอเผยแพร่ผลงานวิจัยด้านพฤกษศาสตร์ และสามารถนำความรู้ที่ได้จากผลงานวิจัยไปประยุกต์ใช้ต่อไป

2. เพื่อแลกเปลี่ยนความรู้ ประสบการณ์ ความคิดเห็นระหว่างอาจารย์ นักวิจัย นักวิชาการ นิสิต นักศึกษา และผู้ที่สนใจ ทำให้เกิดความร่วมมือทางวิชาการ อันจะนำไปสู่การเพิ่มพูนความรู้และเพิ่มความเข้มแข็งทางวิชาการสาขาพฤกษศาสตร์ให้เจริญก้าวหน้ายิ่งขึ้นไป

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

อาจารย์ นักวิจัย นักวิชาการ นิสิต นักศึกษา และผู้ที่สนใจในสาขาต่าง ๆ ทางพฤกษศาสตร์ ตลอดจนสาขาวิชาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แลกเปลี่ยนความรู้ ประสบการณ์ ความคิดเห็น มีความร่วมมือทางวิชาการระหว่างหน่วยงานและบุคคล มีบทความวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในการประชุมวิชาการ อันจะนำไปสู่การเพิ่มพูนความรู้และเพิ่มความเข้มแข็งทางวิชาการสาขาพฤกษศาสตร์ให้เจริญก้าวหน้ายิ่งขึ้นไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

P-36	ผลของฟางข้าวต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของวอเตอร์บลูม นิษา ชุมภู ศรีสม สุวรรณวงศ์ และ ณรงค์ วงศ์กันทรากร
P-37	สารอัลลีโลเคมีคอลจากผักโขมหินที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดพริก อมรทิพย์ วงศ์สารสิน และ อัญชลี จาละ
P-41	ความหลากหลายของกล้วยไม้ดินในอุทยานแห่งชาติภูจองนายอย จังหวัดอุบลราชธานี เยาวพา บัวงาม และ ฉัตรชัย เงินแสงสรวย
P-43	การศึกษาเบื้องต้นของพืชสกุล *Vigna* Savi (Leguminosae-Papilionoideae) ในประเทศไทย รัมภ์รดา มีบุญญา และ ฉัตรชัย เงินแสงสรวย
P-46	ความหลากหลายของสาหร่ายและความสัมพันธ์ระหว่างสาหร่ายกับคุณสมบัติของน้ำในลุ่มน้ำคลองกำพวน ตำบลกำพวน อำเภอสุขสำราญ จังหวัดระนอง สันติ สาระพล สรัญญา วัชโรทัย ฉัตรชัย เงินแสงสรวย และ ณัฏฐา เสนีวาส
P-51	ความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจสอบอะไมโลเพคตินโดยการย้อมสารละลายไอโอดีนกับการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่ใกล้ชิดกับยีนแวกซ์ซีในข้าวโพดข้าวเหนียว เยาวลักษณ์ จรัสเอี่ยม วราลักษณ์ เกษตรานันท์ สรรเสริญ จำปาทอง วันชัย เย็นเพชร ศานนท์ สุขสถาน และ ชบา จำปาทอง
P-53	ความเป็นกรด-ด่างของเปลือกต้นไม้ในเมืองและการดำรงอยู่ของไลเคน สัมฤทธิ์ เส็งเล็ก อนุวัตร ไชยยงค์ เวชศาสตร์ พลเยี่ยม และ กัณฑรีย์ บุญประกอบ
P-55	การเติบโตของเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสของใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคด (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade) รัตนาภรณ์ บุญเรือง อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ จันทกานต์ อรณนันท์
P-56	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์บางประการและการใช้ประโยชน์แบบดั้งเดิมของพืชสมุนไพรพากรูดในจังหวัดปัตตานีและจังหวัดสตูล อุบลวรรณ อุโพธิ์ และ สุภาจรี นิยะมานนท์
P-57	กายวิภาคศาสตร์เนื้อเยื่อชั้นผิวใบของพืชวงศ์บุก (Araceae) บางชนิดในประเทศไทย จันทร์ฑิตา บุญแท่ง อนิษฐาน ศรีนวล และ สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ
P-58	การวิเคราะห์ขนาดทางสัณฐานของใบไม้สกุลมะม่วง (*Mangifera* L., Anacardiaceae): การประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานของฟอสซิลใบไม้ สุรเดช เอ่งฉ้วน และ ประกาศ สว่างโชติ
P-59	สภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ด้วยแสงของไลเคน *Usnea undulata* Stirt จากป่ารุ่นสอง ณ อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ วันวิสาข์ เพาะเจริญ และ กัณฑรีย์ บุญประกอบ
P-62	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ที่ระดับผิวน้ำและระดับครึ่งของความลึกบึง และปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการในบึงบรเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ไพริน สุดทัง สรัญญา วัชโรทัย ศรีสม สุวรรณวงศ์ และ ณัฏฐา เสนีวาส
P-63	การตรวจสอบพันธุ์ทุเรียนในจังหวัดนนทบุรี โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิค AFLP ฤทัยชนก กิตติวโรดม และ คณพล จุฑามณี
P-64	ผลของ BA และ TDZ ต่อการเพิ่มปริมาณ และ GA_3 ต่อการยืดยาวของยอดกันภัยมหิดลในสภาพปลอดเชื้อ สาวินี ลายทอง มาลี ณ นคร และ ศรีสม สุวรรณวงศ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

P-50	การศึกษาเบื้องต้นของการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์แบบ crassulacean acid metabolism ในพรรณไม้น้ำบางชนิด ศรีสม สุวรรณวงศ์ พิทวัส วิชัยดิษฐ และ นิษา ชุมพู
P-51	ความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจสอบอะไมโลเพคตินโดยการย้อมสารละลายไอโอดีนกับการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่ใกล้ชิดกับยีนแวกซีในข้าวโพดข้าวเหนียว เยาวลักษณ์ จรัสเอี่ยม วราลักษณ์ เกษตรานันท์ สรรเสริญ จำปาทอง วันชัย เย็นเพชร ศานนท์ สุขสถาน และ ชบา จำปาทอง
P-52	การประเมินสภาพภูมิอากาศปัจจุบันโดยใช้ลักษณะของใบพืชมีดอกและสภาพภูมิอากาศบรรพกาลโดยใช้ซากดึกดำบรรพ์พืชมหายุคซีโนโซอิกในประเทศไทย พิชชานาถ เงินดี และ พอล เจ โกรดิ
P-53	ความเป็นกรด-ด่างของเปลือกต้นไม้ในเมืองและการดำรงอยู่ของไลเคน สัมฤทธิ์ เส็งเล็ก อนุวัตร ไชยยงค์ เวชศาสตร์ พลเยี่ยม และ กัณฑรีย์ บุญประกอบ
P-54	การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้านภาคเหนือของไทยบางชนิด รัชฎาวรรณ ปัญญา และ กัลยา จำปาทอง
P-55	การเติบโตของเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสของใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคด (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade) รัตนาภรณ์ บุญเรือง อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ จันทกานต์ อรณนันท์
P-56	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์บางประการและการใช้ประโยชน์แบบดั้งเดิมของพืชสมุนไพรพากรูดในจังหวัดปัตตานีและจังหวัดสตูล อุบลวรรณ อุโพธิ์ และ สุภาจรี นิยะมานนท์
P-57	กายวิภาคศาสตร์เนื้อเยื่อชั้นผิวใบของพืชวงศ์บุก (Araceae) บางชนิดในประเทศไทย จันทร์ทิตา บุญแท่ง อนิษฐาน ศรีนวล และ สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ
P-58	การวิเคราะห์ขนาดทางสัณฐานของใบไม้สกุลมะม่วง (*Mangifera* L., Anacardiaceae): การประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานของฟอสซิลใบไม้ สุรเดช เอ่งอ้วน และ ประกาศ สว่างโชติ
P-59	สภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ด้วยแสงของไลเคน *Usnea undulata* Stirt จากป่ารุ่นสอง ณ อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ วันวิสาข์ เพาะเจริญ และ กัณฑรีย์ บุญประกอบ
P-60	พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชาวขมุ บ้านห้วยสะแดง ตำบลงอบ อำเภอทุ่งช้าง จังหวัดน่าน วรุฬห์กาญจน์ ศุภวิมลพันธุ์ และ อังคณา อินตา
P-61	พืชอาหารพื้นบ้านของชาวไทใหญ่ บ้านหลักแต่ง อำเภอเวียงแหง จังหวัดเชียงใหม่ ณัฐญาภรณ์ ศรีบุญปวน และ อังคณา อินตา
P-62	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ที่ระดับผิวน้ำและระดับครึ่งของความลึกบึง และปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการในบึงบรเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ไพริน สุดทัง สรัญญา วัชโรทัย ศรีสม สุวรรณวงศ์ และ ณัฏฐา เสนีวาส
P-63	การตรวจสอบพันธุ์ทุเรียนในจังหวัดนนทบุรี โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิค AFLP ฤทัยชนก กิตติวโรดม และ คณพล จุฑามณี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเติบโตของเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสของใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคด (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade)

Growth of cell suspension cultures from callus of cotyledon of Calvacade (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade)

รัตนาภรณ์ บุญเรือง*[1] อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม[1] ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ[2] และ จันทกานต์ อรณนันท์[3]

Rattanaporn Boonruang*[1] Anurug Poeaim[1] Pradit Pongtongkam[2] and Jantakarn Arananant[3]

บทคัดย่อ

การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด โดยการเพาะเมล็ดถั่วคาวาลเคดบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ นำใบเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 28 วัน นำแคลลัสที่ได้ปริมาณน้ำหนักสด 0.5 กรัม ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร พบว่าในวันที่ 15 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงสุด 1.1674 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร และ 0.0220 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 3-12 วัน ซึ่งเป็นระยะ log phase จากนั้นจะเข้าสู่ stationary phase ในช่วง 12-21 วัน และ death phase ในช่วง 21-30 วัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการใช้น้ำตาลซูโครสด้วยวิธีแอนโทรนในช่วง 3-12 วันมีปริมาณน้ำตาลซูโครสอย่างรวดเร็วและมีปริมาณน้ำตาลซูโครสน้อยลงเรื่อย ๆ

คำสำคัญ: พืชวงศ์ถั่ว, เซลล์แขวนลอย, ถั่วคาวาลเคด, สีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต

ABSTRACT

Seeds of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade were culture on solid MS for 1 week. The cotyledon were transferred to solid MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D and 30 g/l sucrose for 28 days. The compact calli were transferred to liquid MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D and 30 g/l sucrose for 30 days. Fresh weight and dry weight of cell suspension with the best growth for 15 days of 1.1674 g/25 ml fresh weight and 0.0220 g/25 ml respectively. Cell suspension has grown rapidly during the period of 3-12 days, log phase in 3-12 days, stationary phase in 12-21 days and and 21-30 days during the death phase. Measurement of sucrose were found that at 3-12 days the sucrose concentrations decreased rapidly and the amount was less and less.

Keywords: legume, suspension, *Stylosanthes hamata*, FDA

*Corresponding author: folkkung@hotmail.com

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

[1]Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520

[2]ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[2]Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

[3]กลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

[3]Feed and Forage Analysis Section, Animal Nutrition Division, Department of Livestock Development, Bangkadee subdistrict, Mueang district, Pathum Thani province 12000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ถั่วคาวาลเคดเป็นสายพันธุ์ในสกุลเดียวกับถั่วเซนโตรซีม่า มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade สามารถขึ้นได้ดีในสภาพดินฟ้าอากาศทั่วไป และในดินหลายชนิด เป็นพืชล้มลุก มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน *C. pascuorum* (ไม่ได้ระบุสายพันธุ์) เป็นหนึ่งในถั่วอาหารสัตว์จำนวนไม่น้อยกว่า 15 สกุล ที่มหาวิทยาลัยขอนแก่นนำเข้ามาทดสอบระหว่างปี 2519-2525 ซึ่งปรากฏว่าระยะเวลาทดสอบ 3 ปี คือระหว่าง 2523 - 2525 นั้น *C. pascuorum* สามารถให้ผลผลิตน้ำหนักแห้งได้มากกว่า 800 กิโลกรัมต่อไร่ ข้อดีของถั่วคาวาลเคดคือ เมื่อทำถั่วแห้ง ใบถั่วจะไม่ร่วงหล่นง่ายเหมือนถั่วอื่น ๆ จึงใช้ทำถั่วแห้งอัดฟ่อนได้ดี (สายัณห์, 2546) จากรายงานความก้าวหน้าของโครงการพัฒนาการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชอาหารสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่ได้มีการทดสอบที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์นครราชสีมา พบว่า ต้นถั่วเกิดโรคอย่างรุนแรง โดยพบ 3 กลุ่มอาการ คือ 1. ลักษณะใบไหม้ มีแผลเป็นลักษณะเป็นรูและขอบแผลมีรอยไหม้ เกิดจากโรคแอนแทรคโนส 2. ลักษณะใบหงิกผิดรูปร่าง ใบเล็กหงิกเป็นฝอย เกิดจากเชื้อไวรัสจำพวก Gemini virus 3. อาการใบไหม้ทั้งใบ (leaf bright) เกิดจากเชื้อ Rhizoctonia ในส่วนของโรคที่เกิดจากไวรัสนั้น peanut strip virus และพบว่าถั่วคาวาลเคดมีความแปรปรวนด้านความต้านทานโรคและแมลงน้อยมาก โอกาสที่จะคัดพันธุ์จากแหล่งพันธุกรรมที่มีอยู่นั้นค่อนข้างต่ำ (จีระวัชร์, 2544 สมจิตร และธำรงศักดิ์, 2545) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การชักนำให้เกิดต้นใหม่จากเซลล์แขวนลอย การแยกโพรโทพลาสต์ การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการฉายรังสี การถ่ายฝากยีนโดยการใช้อะโกรแบคทีเรียม และการยิงอนุภาคดีเอ็นเอ การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยจึงมีประโยชน์อย่างมากที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยขั้นสูงต่อไปในอนาคต

วิธีการทดลอง

นำเมล็ดที่มีความสมบูรณ์ที่ได้รับจากกลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ จังหวัดปทุมธานีมาเพาะบนอาหารแข็งสังเคราะห์ MS (Murashige และ Skoong, 1962) เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ คัดเลือกใบเลี้ยง ที่มีความสมบูรณ์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน นำแคลลัสที่ได้น้ำหนักสด 0.5 กรัม มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4–D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ทำการแยกแคลลัสโดยใช้ข้อนโลหะกดให้เซลล์กระจายตัวออกจากกัน เซลล์จะหลุดออกเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยทุก 3 วันในช่วง 0-30 วัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ในแต่ละช่วงเวลา เมื่อเพาะเลี้ยงถึงเวลาตามกำหนด นำเซลล์แขวนลอยมาหาน้ำหนักสด โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (ที่ผ่านการอบ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง) ด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ และต่อเครื่องดูดอากาศเป็นเวลา 1 นาที ชั่งน้ำหนักสด นำเซลล์มาอบที่ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักแห้งและจดบันทึก (อนุรักษ์, 2550) และศึกษาการมีชีวิตของเซลล์แขวนลอย โดยย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (FDA) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ เซลล์ที่มีชีวิตจะมีสีเขียวเรืองแสง (Dixon, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการเพาะเมล็ดถั่วคาวาลเคดในอาหารแข็งสูตร MS เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ คัดเลือกใบเลี้ยง (Figure 1, A) ที่มีความสมบูรณ์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส พบว่าใบเลี้ยงมีการพัฒนากลายเป็นแคลลัสขัดเจนเมื่ออายุ 28 วัน โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นมีสีเหลืองอ่อนและสีเขียวประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดเล็กๆ มีทั้งแบบที่เซลล์เกาะกันแน่น และเซลล์เกาะกันหลวมๆ (Figure 1, B) เมื่อย้ายลงไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร พบว่าลักษณะของเซลล์แขวนลอยมีสีเหลืองอ่อนกระจายอยู่ภายในอาหารเหลว และเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ (Figure 3, A) เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 3-12 วัน ซึ่งเป็นระยะ log phase จากนั้นจะเข้าสู่ stationary phase ในช่วง 12-21 วัน และ death phase ในช่วง 21-30 วัน ในวันที่ 15 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงสุด 1.1674 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร และ 0.0220 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหาร ตามลำดับ (Table 1. Figure 2, A-B) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ รัตนาภรณ์ และคณะ (2554) ที่ศึกษาการเจริญของเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากส่วนของใบเลี้ยงของถั่วท่าพระสไตโล (*Stylosanthes guianesis* CIAT 184) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดในวันที่ 15 หลังการเพาะเลี้ยง และมีช่วงระยะ log phase อยู่ระหว่างวันที่ 3-15 หลังการเพาะเลี้ยงเช่นกัน ทั้งนี้ อนุรักษ์ (2550) กล่าวว่าเซลล์ที่อยู่ในระยะ log phase เป็นเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเหมาะจะนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ เช่น เปลี่ยนอาหารใหม่ หรือนำไปชักนำให้พัฒนาเกิดเป็นต้น การวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสในอาหารเหลวด้วยสารละลายแอนโทรนจะสามารถวิเคราะห์ธาตุอาหารหลักของพืชคือแหล่งคาร์บอนที่พืชใช้ไปในการเจริญได้ซึ่งหากอาหารหมดพืชจะขาดแหล่งอาหารและตายลงในที่สุด จากการทดลองพบว่าจะมีการใช้น้ำตาลซูโครสอย่างมากตั้งแต่วันที่ 3 ซึ่งจะสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Figure 2, C) และน้ำตาลซูโครสไม่ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kato และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบน้ำตาล 6 ชนิด ในถั่วอะซูกิ (*Vigna angilaris*) ในอาหารเหลว พบว่าน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ชักนำให้อัตราการเจริญของเซลล์แขวนลอยดีที่สุดให้น้ำหนักสด 82 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระยะเวลา 10 วัน และน้ำตาลซูโครสไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย น้ำตาลที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยคือ น้ำตาลแมนโนส และกาแลคโตส โดยให้น้ำหนักสดเพียง 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาเซลล์แขวนลอยที่อายุ 30 วัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ brightfield microscope จะเห็นเซลล์แขวนลอยมี รูปร่างกลม กลมรี และเป็นท่อนยาวอยู่ปะปนกัน ลักษณะสีใส และสีดำเนื่องจากการทึบแสงของเซลล์แขวนลอยที่รวมกลุ่มซ้อนทับกัน (figure 3, B) เซลล์แขวนลอยที่เห็นไม่สามารถบอกได้ชัดเจนว่ามีชีวิตหรือไม่ จึงตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซิเตต พบว่าจำนวนเซลล์แขวนลอยที่มีชีวิตยังสามารถพบได้อยู่ทั่วไปในอาหารเป็นจำนวนมาก และมีเซลล์แขวนลอยที่ตายแล้วอยู่ปะปนในอาหาร เนื่องจากเซลล์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์เอสเตอร์เรส (esterase) อยู่ภายในเซลล์ สีจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์เอสเตอร์เรสภายในเซลล์แขวนลอย เมื่อกระทบกับแสงสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำเงินจากกล้อง florescence microscope โมเลกุลของฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (Figure 3, C-D) (อารีย์, 2541) จากการศึกษาการมีชีวิตของ Rotman and Papermaster (1966) กล่าวว่าเซลล์ที่ถูกย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต จะเกิดกิจกรรม fluorochromatic ขึ้นภายในเซลล์ เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ความยาวคลื่นแสง 440-480 นาโนเมตร จะมีสีเขียวเรืองแสงกับเซลล์ที่มีชีวิต ในทำนองเดียวกัน Steward และคณะ (1999) ที่ทำการศึกษาความมีชีวิตของเซลล์จากเอนไซม์เอสเตอเรสภายในเซลล์ พบว่าในถั่วอัลฟาฟา (*Medicago sativa* L.) มีกิจกรรมของเอนไซม์เอสเตอเรสภายในไซโตพลาสซึมที่จะสามารถย่อยสีฟลูออเรสซีนไดอะซิเตตทำให้เกิดสีเขียวเรืองแสง

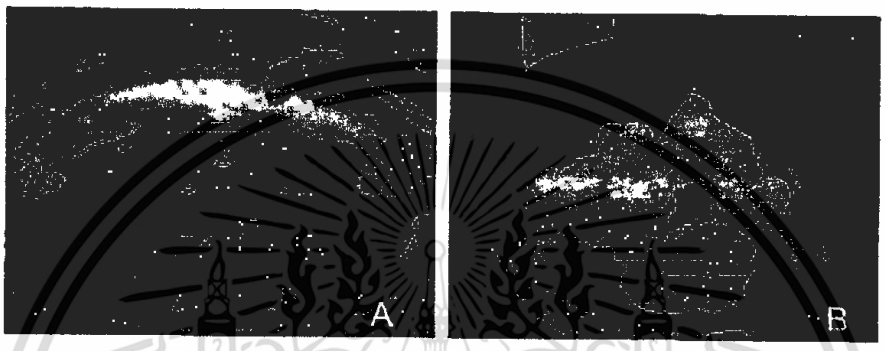


Figure 1. *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade on MS medium. (A) Cotyledon at the age of 1 day. (B) Callus in duced from cotyledon on MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D and 30 g/l sucrose for 4 weeks.

Table 1. The effects of cell suspension culture in liquid MS medium supplemented with 1 mg /l 2,4-D for 30 days.

Days	Fresh Weight (g/25ml)	Dry Weight (g/25ml)	Sucrose in medium (g/l)
0	0.5403	0.0137	27.11
3	0.6368	0.0159	25.45
6	0.7675	0.0169	20.42
9	0.9099	0.0175	17.08
12	1.1104	0.0202	15.63
15	1.1674	0.0220	14.86
18	1.1182	0.0211	13.21
21	0.9762	0.0185	12.31
24	0.7016	0.0133	11.89
27	0.5872	0.0111	11.41
30	0.5611	0.0106	10.58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร พบว่าค่าน้ำหนักสดและค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดคือ 1.164 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร และ 0.0220 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 3-12 วัน ซึ่งเป็นระยะ log phase มีการใช้น้ำตาลซูโครสอย่างมากในวันที่ 3 เมื่ออายุ 30 วัน เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ brightfield microscope เซลล์จะมีลักษณะสีใส และสีน้ำตำ รูปร่างกลม กลมรี และเป็นท่อนยาวอยู่ปะปนกัน กระจายอยู่ และเมื่อย้อมเซลล์แขวนลอยด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซิเตตส่วนที่มีชีวิตจะปรากฏสีเขียวเรืองแสง โดยจำนวนเซลล์แขวนลอยที่มีชีวิตยังสามารถพบได้อยู่ทั่วไปในอาหารเป็นจำนวนมาก และมีเซลล์แขวนลอยที่ตายแล้วอยู่ปะปนในอาหารเช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

จีระวัชร์ เข็มสวัสดิ์. 2544. **รายงานความก้าวหน้าของโครงการพัฒนาการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชอาหารสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.** จดหมายข่าวโครงการพัฒนาการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชอาหารสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. ปีที่ 1 ฉบับที่ 2 (พฤษภาคม-สิงหาคม 2544) หน้า 3-7.

รัตนาภรณ์ บุญเรือง และอนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2554. **การศึกษาการเจริญของเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากส่วนของใบเลี้ยงของถั่วท่าพระสไตโล (*Stylosanthes guianesis* CIAT 184).** รายงานผลงานวิจัย สาขาพืช การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน. กรุงเทพฯ.

สายัณห์ ทัดศรี. 2546. **พืชอาหารสัตว์เขตร้อน.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สมจิตร อินทรมณี และธำรงศักดิ์ พลบำรุง. 2545. **รายงานความก้าวหน้าของโครงการพัฒนาการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชอาหารสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.** จดหมายข่าวโครงการพัฒนาการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชอาหารสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. ปีที่ 2 ฉบับที่ 4 (มกราคม-เมษายน 2545) หน้า 3-4.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. **ปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืช.** โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 102 น.

อารีย์ วรัญญูวัฒน์. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.** กรุงเทพฯ. 133 น.

Dixon, R A. 1991. Plant Cell Culture. Practical Approach Series. 236p.

Kato, A., H. Tohoyama., M. Joho. and M. Inouhe. 2007. Different effect of galactose and mannose on cell proliferation and intracellular soluble sugar levels in *Vigna angularis* susupension cultures. Journal of Plant Research. 120 : 713-719

Murashike, T. and F. Skoong. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497.

Rotman, B. and B. W. Papermaster. 1966. Membrane properties of living mammalian cells as studied by hydrolysis of fluorogenic esters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55: 134–141.

Steward, N., R. Martin., J.M. Engasser. and J.L. Goergen. 1999. A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. Plant Cell Reports. 19:171–176

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

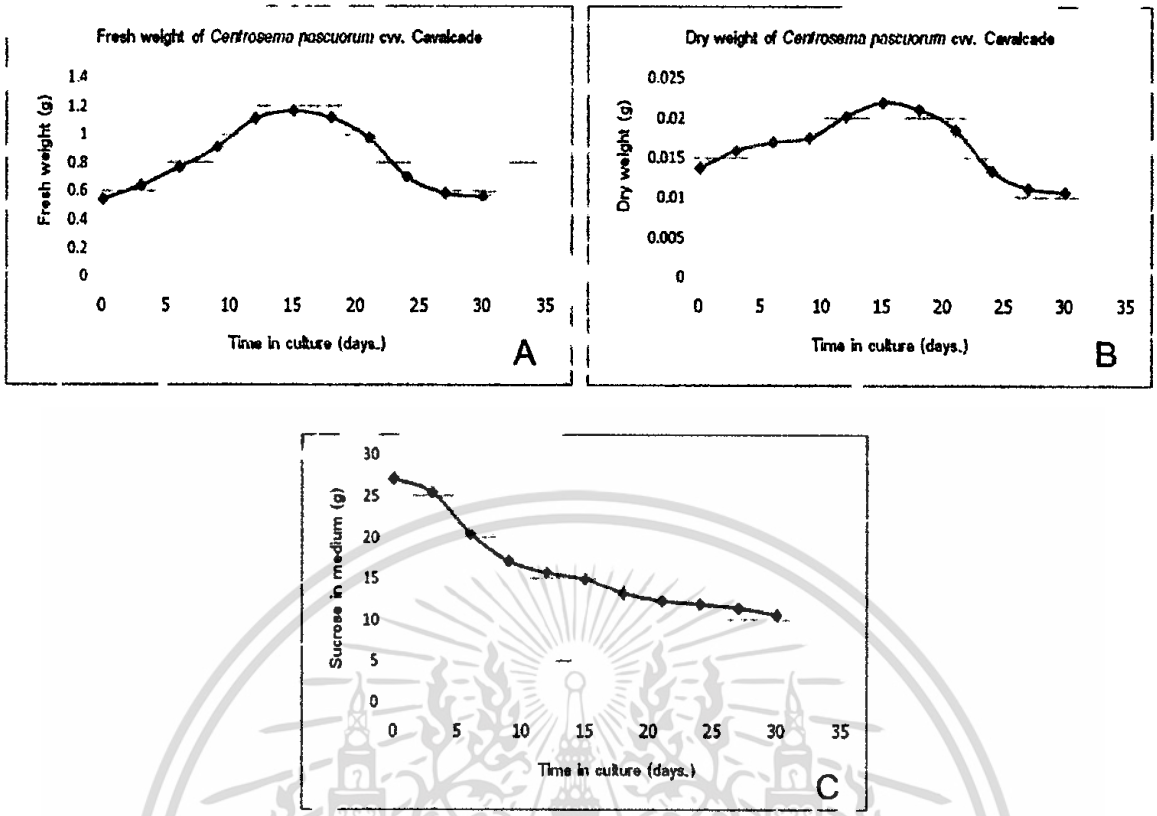


Figure 2. (A-C) Growth curves of suspension cultured cells of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade for 30 days. (A) Cell fresh weight. (B) Cell Dry weight. (C) Sugar remaining.

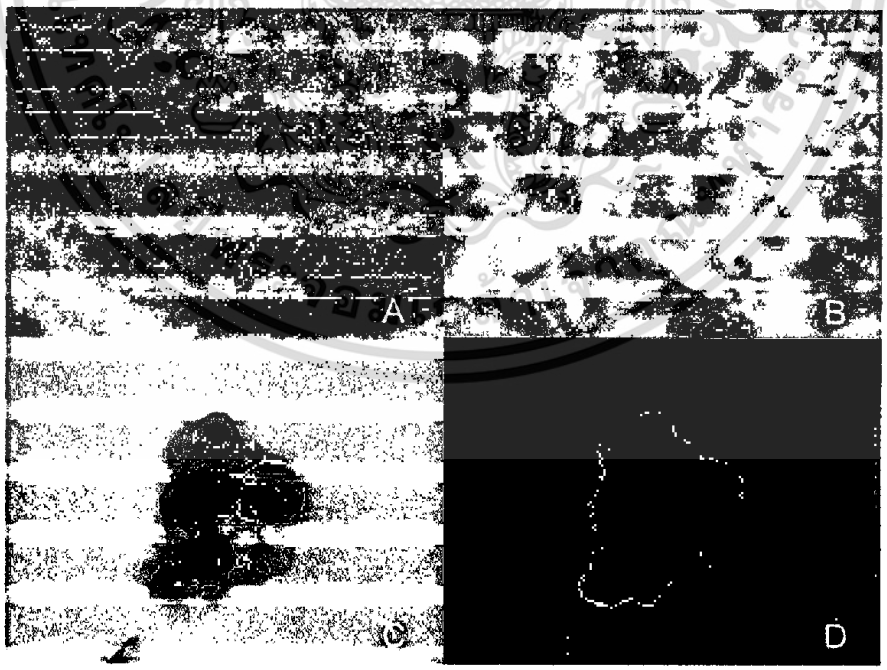


Figure 3. (A-D) Suspension of *Centrosema pascuorum* cv.Cavalcade for 30 days. (A) The cultured cell suspension for a period of 30 days. (B-C) Cell suspension from the brightfield microscope for 30 days. (D) Expression of cell viability when stained with fluorescein diacetate for 30 days.

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วารสาร ISSN 0125-0369

วิทยาศาสตร์เกษตร
AGRICULTURAL SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 42 ฉบับที่ 2 (พิเศษ) พฤษภาคม-สิงหาคม 2554 Vol.42 No.2 (Suppl.) May-August 2011

การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยพืชเขตร้อนและกึ่งร้อน ครั้งที่ 5

1 ผลของวิธีการคงสภาพต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในรำข้าว
ปฏิวิทย์ ลอยพิมาย และ อนุชิตา มุ่งงาม

5 ผลของแป้งเนื้อในเมล็ดมะขาม กัมอะราบิคและมอลโตเดกซ์ตรินที่มีต่อประสิทธิภาพการเอนแคปซูเลชันและความคงตัวของอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันในน้ำ
ธนวรรณ วันทอง เทพกัญญา หาญศีลวัต และ พิชญอร ไหมสุทธิสกุล

9 การศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของเห็ดนางฟ้าภูฏาน *Pleurotus eous* อบแห้ง
สุพัตรา เปี่ยมวารี สรวิศ แจ่มจำรูญ วันทนา สะสมทรัพย์ ธนภักษ์ อินยอด และ สุริวิภา สังขาร

13 การใช้ไคโตซานในการยืดอายุการเก็บรักษามะนาว ภายหลังการเก็บเกี่ยวในสภาวะที่แตกต่างกัน
พรจันทร์ จงศรี ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี และ กนกวรรณ เสรีภาพ

17 ผลของการจุ่มน้ำร้อนต่อคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวและอายุการเก็บรักษาของมะนาว
มัลลิกา บุญฤทธิ์ ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี และ กนกวรรณ เสรีภาพ

21 ผลของราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาต่อการเติบโตและอัตราผลผลิตของผักสลัด
วรรณธิรา รณะบุตร และ ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี

25 การทดสอบเบื้องต้นและการประเมินผลเชิงเศรษฐศาสตร์สำหรับเครื่องขุดย้ายต้นไม้
ฤาชา บุญยกิจโณทัย ศุภกิตต์ สายสุนทร และ บัญญัติ เศรษฐฐิติ

29 ผลของชนิดและความเข้มข้นของไคโตซานที่มีต่อการเติบโตของผักสลัด 'ฟิลเลย์ ไอซ์เบิร์ก'ที่ปลูกด้วยวิธีไฮโดรพอนิก
ธเนศ จิระพรประเสริฐ กนกวรรณ เสรีภาพ ปรีดา บุญ-หลง รัฐ พิชญางกูร และ ศุภจิตรา ชัชวาลย์

33 ผลของไคโตซาน ความแตกต่างของอุณหภูมิและความชื้นที่มีต่อการเจริญเติบโตของผักสลัด'เรดโอ๊ก' ที่ปลูกด้วยวิธีไฮโดรพอนิก
ศรีรัตน์ รอดณรงค์ กนกวรรณ เสรีภาพ ปรีดา บุญ-หลง รัฐ พิชญางกูร และ ศุภจิตรา ชัชวาลย์

37 ผลของวัสดุปลูกชีวภาพและวัสดุปลูกกึ่งชีวภาพต่อการเจริญเติบโต และคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของผักสลัดพันธุ์ 'เรดโอ๊ค'
ไพบูลย์ หมุ่ยมาศ ปรีดา บุญ-หลง ศุภจิตรา ชัชวาลย์ รัฐ พิชญางกูร และ กนกวรรณ เสรีภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

149 ผลของสารละลายอาหารเสริมพืชต่อความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105
ศิริวรรณ ทิพรักษ์ และ ชวนพิศ อรุณรังสิกุล

153 การประเมินเปอร์เซ็นต์ต้นข้าวด้วยวิธีการกะเทาะข้าวเปลือกสด
ทนิดา ตะเภาลอย วันชัย จันทร์ประเสริฐ กัญญา เชื้อพันธุ์ ชุลีกร ผ่องแผ้ว และ พนิดา ทับทิมเพียร

157 ประสิทธิภาพของผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคถอดฝักดาบของข้าวในแปลงนา
รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์ ปิยะพันธ์ ศรีคุ้ม วิชชุดา รัตนากาญจน์ และ วันพร เข็มมุกด์

161 ผลของการขาดน้ำต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของอ้อย
ศานิต สวัสดิกาญจน์ และ สิงหราช โค้วเจริญ

165 ผลของระยะเวลาการให้น้ำท่วมขังต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของอ้อย
ศานิต สวัสดิกาญจน์ วริสรา ปลื้มฤดี และ สิงหราช โค้วเจริญ

169 ผลของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าว
ศานิต สวัสดิกาญจน์ และ สิริวรรณ สมิทธิอาภรณ์

173 ผลของการขาดน้ำต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของมันสำปะหลัง
ศานิต สวัสดิกาญจน์ และ กิตติ การะพิมพ์

177 ผลของการขาดน้ำต่อการงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง
ศานิต สวัสดิกาญจน์ และ วริสรา ปลื้มฤดี

181 ผลของการงอกต่อสมบัติทางเคมีกายภาพ และการปลดปล่อยกลูโคสภายใต้สภาวะจำลองการย่อยในร่างกายของสตาร์ชถั่วเขียว
นันทรัตน์ ณ นครพนม ภาธินี สุวรรณมณี และ สุทธินี สุปิยพันธ์

185 การเกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade
รัตนาภรณ์ บุญเรือง อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ จันทกานต์ อรณนันท์

189 การพัฒนาสายพันธุ์ผสมรวมโดยวิธีผสมสลับ S1~ Half-Sib เพื่อผลิตข้าวโพดไร่ลูกผสมทางการค้า
สิทธินันต์ จองโพธิ์ และ กฤษฎา สัมพันธารักษ์

193 การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์โดยการปรับปรุงประชากรแบบ Flexible
กรณ์วดี ตุ้มทรัพย์ เฉลิมพล ภูมิไชย์ ทวีศักดิ์ ภู่หลำ และ ธานี ศรีวงศ์ชัย

197 ผลของระยะเวลาการให้น้ำท่วมขังต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของยางพารา
ศานิต สวัสดิกาญจน์ และ วิษณุ ทรัพย์กร

201 ลักษณะทางกายภาพของเยื่อหุ้มเมล็ดและคุณภาพเมล็ดพันธุ์ของถั่วเหลืองสายพันธุ์ก้าวหน้า 6 สายพันธุ์
ณัฐกานต์ ปรารถนา วันชัย จันทร์ประเสริฐ สุปราณี งามประสิทธิ์ และ ประศาสตร์ เกื้อมณี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Agricultural Sci. J. 42(2)(Suppl.): 185-188 (2011)

ว. วิทย์. กษ. 42(2)(พิเศษ): 185-188 (2554)

การเกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade

Multiple Shoots Cultured from Seeds of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade

รัตนาภรณ์ บุญเรือง[1] อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม[1] ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ[2] และ จันทกานต์ อรณนันท์[3]

Boonruang, R.[1], Poeaim, A.[1], Pongtongkam, P.[2] and Arananant, J.[3]

Abstract

In the present study we optimized the multiple shoot from *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade. Mature seeds were cultured on MS medium supplemented with 0.5, 1, 3 and 5 mg/l 6-benzyladenine (BA), 30 g/l sucrose and 2.6 g/l phytagel. The cultures were incubated under fluorescent light for 16 hr/day and dark for 8 hr/day at 25°C for 4 weeks. The results showed that multiple shoot regeneration on MS medium supplemented with 1 mg/l BA was the highest numbers of shoots per seed (5.29 shoots per seed). The highest of shoots elongation was found in MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA which the average of shoots length was 38.00 mm per explant.

Keywords: cavalcade, multiple shoots, seeds

บทคัดย่อ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดจำนวนมากของถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade โดยเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 6 - benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมง ที่มืด 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยของยอดจำนวนมากที่สุดคือ 5.2 ยอดต่อเมล็ด สำหรับสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยความสูงของต้นมากที่สุดคือ 37.50 มิลลิเมตรต่อชิ้นเนื้อเยื่อ

คำสำคัญ: ถั่วคาวาลเคด ยอดจำนวนมาก เมล็ด

คำนำ

พืชวงศ์ถั่วเพียงบางชนิดเท่านั้นที่ใช้ปลูกเพื่อเป็นอาหารสัตว์ โดยมีแหล่งดั้งเดิมและการแพร่กระจายแตกต่างกัน (Williams, 1983) โดยถั่วเขตร้อนที่ใช้ปลูกเป็นอาหารสัตว์จะมีเพียงไม่กี่ชนิด โดยสกุล Desmodium และ Stylosanthes มีจำนวนชนิดที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมากที่สุด รองลงมาได้แก่ Centrosema ปัจจุบันในประเทศไทยมีการนำถั่วเหล่านี้มาศึกษาทั้งหมด และแนะนำให้เกษตรกรปลูกเพื่อใช้เลี้ยงสัตว์เป็นส่วนใหญ่ ถั่ว Centrosema มีแหล่งดั้งเดิมอยู่ในแถบตอนกลางและตอนใต้ของทวีปอเมริกาบริเวณคาริบเบียน และตอนใต้สหรัฐอเมริกา และอีกหลายชนิดมีถิ่นกำเนิดในบริเวณเขตร้อนชื้นของแอฟริกา เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และอินเดีย (สายัณห์, 2547) คุณค่าทางโภชนะของถั่วคาวาลเคดแห้งอายุตัดที่ 90 วัน มีวัตถุแห้ง 91.96 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประกอบทางเคมีคิดเป็นวัตถุแห้ง มีค่าโปรตีน 17.07 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 1.58 เปอร์เซ็นต์ (จินดา และคณะ, 2546) ในปี 1992 Angelon และคณะ ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส และการพัฒนาเป็นต้นของถั่ว *Centrosema brasilianum*, *C. arenarium*, *C. macrocarpum*, *C. pascuorum*, *C. pubescens* และ *C. virginianum* พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส ได้บนอาหารสูตรที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมนี้ แคลลัสของ *Centrosema brasilianum* สามารถพัฒนาเป็นต้นได้เพียงชนิดเดียว และจากการศึกษาของ รัตนาภรณ์ และคณะ (2554) การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงใน

[1] สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพ 10520

[1] Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520

[2] ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ 10900

[2] Department of Genetics.Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, 10900

[3] กลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ จังหวัดปทุมธานี 12000

[3] Feed and Forage Analysis Section, Animal Nutrition Division, Department of Livestock Development, Pathumthani Province, 12000

เอกสารนี้ได้รับอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร พบว่าค่าน้ำหนักสดและค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดคือ 1.164 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร และ 0.0220 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ถั่วคาวาลเคดยังมีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น การใช้เทคโนโลยีชีวภาพในด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นพื้นฐานอันสำคัญในการช่วยปรับปรุงและขยายพันธุ์ถั่วอาหารสัตว์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ และอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ในอนาคตต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วคาวาลเคดให้เกิดยอดจำนวนมาก โดยคัดเลือดเมล็ดถั่วที่มีความสมบูรณ์มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวนอกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 – 3 นาที จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารจับใบ (tween-20) จำนวน 1-2 หยด เขย่าตลอดเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 - 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที นำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนทิชชูปลอดเชื้อ นำเมล็ดวางบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige และ Skoog, 1962) ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงภายใต้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 - 28 องศาเซลเซียส ทำการบันทึกการเจริญเติบโตของยอดในอาหารแต่ละสูตร ทุก 1 สัปดาห์ โดยใช้เวอร์เนียร์วัดความสูง จำนวนยอดและลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นและคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเจริญเป็นยอด

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วคาวาลเคดให้เกิดยอดจำนวนมาก บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Figure 1) พบว่าสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 4 มียอดจำนวนมากที่สุดคือ 5.29 ยอดต่อเมล็ด และมีความสูงของยอดเท่ากับ 30.99 มิลลิเมตร ลักษณะของต้นมีความสมบูรณ์มากที่สุด ส่วนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 4 มีจำนวนยอดต่อเมล็ดจำนวนมากที่สุดคือ 4.69 ยอดต่อเมล็ด และมีความสูงของยอดมากที่สุดคือ 38.00 มิลลิเมตร มีลักษณะลำต้นผอมและยืดยาว และสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะลำต้นแคระแกร็นไม่สูงและไม่สามารถเกิดยอดได้อย่างชัดเจนซึ่งเกิดจำนวนยอดได้น้อยที่สุดในการทดลอง ในทุกสูตรอาหารบริเวณรากและลำต้นจะเกิดแคลลัสรอบๆบริเวณเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก ซึ่งแคลลัสที่เกิดขึ้นสามารถนำไปชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ รัตนาภรณ์ และคณะ (2554) โดยนำแคลลัสที่ชักนำจากใบเลี้ยงมาชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ และพัฒนาแคลลัสให้เกิดเป็นยอดได้ 4.2 ยอดต่อแคลลัส (Figure 2) อนุรักษ์ และคณะ (2551) ได้ศึกษาแคลลัสที่ชักนำจากส่วนไฮโปคอทิลให้เกิดเป็นต้นบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดคือ 70 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส 3.5 ยอด

Table 1 Effect of BA on number of shoot per seed and length of shoot of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade.

BA (mg/l)	Number of seeds	Shoot formation developed	1 week		2 weeks		3 weeks		4 weeks	
			Shoots /seed	Length (mm)	Shoots /seed	Length (mm)	Shoots /seed	Length (mm)	Shoots /seed	Length (mm)
0.5	30	29	1^{A}	16.35^{A}	2.10^{A}	34.97^{A}	3.14^{A}	37.50^{A}	4.69^{A}	38.00^{A}
1	30	28	1^{A}	13.21^{AB}	2.57^{B}	26.87^{B}	4.50^{B}	28.97^{B}	5.29^{A}	30.99^{B}
3	30	25	1^{A}	13.71^{AB}	1.73^{BC}	19.97^{C}	2.62^{BC}	20.77^{C}	2.81^{B}	21.32^{C}
5	30	26	1^{A}	11.53^{B}	1.38^{C}	14.90^{C}	1.88^{C}	17.34^{C}	1.92^{B}	18.72^{C}

Means followed by different character showed the singnificantly different at $P \leq 0.05$ according to HSD Turkey's test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Figure 1 Mutiple shoot regenerated on MS medium supplement with BA (A) 0.5 mg/l, (B) 1 mg/l, (C) 3 mg/l, and (D) 5 mg/l for 4 weeks.

Figure 2 (A) Callus from stem shoot on MS medium supplement with BA 1 mg/l for 4 weeks. (B) Callus from root on MS medium supplement with BA 1 mg/l.

สรุปผล

การเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วคาวาลเคดให้เกิดยอดจำนวนมาก บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 4 มียอดจำนวนมากที่สุดจำนวน 5.29 ยอดต่อเมล็ด และมีความสูง 30.99 มิลลิเมตร สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มียอดจำนวน 4.69 ยอดต่อเมล็ด และมีความสูง 38.00 มิลลิเมตร และสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีลักษณะลำต้นแคระแกร็นและไม่สามารถเกิดยอดได้อย่างชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จินดา สนิทวงศ์ฯ ประพฤทธิ์ จงใจภักดิ์ และพิมพาพร พลเสน, 2546, คุณค่าทางโภชนของถั่วคาวาลเคดและระดับการเสริมถั่วคาวาลเคดในโคเนื้อ, รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2546, กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, หน้า 264-276.

รัตนาภรณ์ บุญเรือง อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และจันทกานต์ อรณนันท์, 2554, การเติบโตของเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสของใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคด (*Centrosema pascuorum* cv.Cavalcade), รายงานผลงานวิจัย สาขาพืช การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน, กรุงเทพฯ.

รัตนาภรณ์ บุญเรือง อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และจันทกานต์ อรณนันท์, 2554, การเจริญเป็นต้นใหม่จากแคลลัสของถั่วอาหารสัตว์พันธุ์คาวาลเคด, การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 10, กรุงเทพ, หน้า 292.

สายัณห์ ทัดศรีม, 2547, พืชอาหารสัตว์เขตร้อน, ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 534 หน้า.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม วิชุดา พิริยพลพงศ์ ศุภลักษณ์ มั่นไทย ศรัณย์ สุขวัฒน์ และจันทกานต์ อรณนันท์, 2551, การเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสที่พัฒนามาจากไฮโพคอทิลของถั่วคาวาลเคด, การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 5, 8-9 ธันวาคม 2551, หน้า 1139-1145.

Angelon, P.N., Rey. H.Y. and Mroginski, L.A, 1992, Regeneration of Plants from Callus Tissue of the Pasture Legume *Centrosema brasilianum*, Plant Cell Reports, 11: 519 - 521.

Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures, Physiol. Plant., 15: 473 – 497.

Williams, R.J., 1983, Tropical Legumes, In: Genetic Resources of Forage Plants, McIvor J.G. and Bray R.A. (Eds.), 7 – 37 p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1st International Symposium on Technology for Sustainability

(ISTS2011)

26-29 January 2012, KMITL, Bangkok Thailand

Co-organized by:
Institute of National Colleges of Technology, Japan
and
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bio-technology (BIO)

BIO001 *"An efficient protocol for shoot organogenesis and plant regeneration from callus of Centrosema pascuorum cv. Calvacade"*
Rattanaporn Boonruang, Anurug Poeaim, Pradit Pongtongkam, Arananant Jantakarn

BIO002 *"Isolation, identification and antimicrobial activity of Microbispora strains from Thai hot spring sediment"*
Chitti Thawai

BIO003 *"Cytotoxic activity of crude extracts from Beauveria bassiana"*
Intira Pathubtim, Supattra Poeaim, Kasem Soytong

BIO004 *"Preparation and Antibacterial Properties of Mangosteen Extract-cellulose Composite Film"*
Jirarat Chitranuwatkul, Duangjai Ochaikul, Wanida Janvikul

BIO005 *"Antimicrobial activity of a newly found actinomycete, Streptomyces sp. GDN 8-88"*
Chitti Thawai

BIO006 *"Antimicrobial Producing Endophytic Xylaria sp. Isolated from Phukhieo Wildlife Sanctuary at Chaiyaphum Province"*
Krittapong Orachaipunlap, Nuttika Suwannasai, Anthony J.S. Whalley, Cherdchai Phosri, Prakitsin Sihanonth

BIO007 *"Semi-Continuous Airborne Bacteria Analyzer"*
Purachai Chongsomchai, Noppadol Maneerat, Ruttikorn Varakulsiripunth, Suwannee Junyapoon

BIO008 *"Far-Infrared Assisted Microwave- Vacuum Drying of Ginger (Zingiber officinale) : Drying Experiment & Mathematical Modeling"*
Pattharanid Wongsupaluk, Ampawan Tansakul

BIO009 *"Drying Characteristics and Qualities of Red Chilli (Capsicum frutescens L.) undergoing Combination of Far-infrared Radiation and Microwave-vacuum Drying"*
Rattapon Saengrayup, Ampawan Tansakul, Gauri S. Mittal

BIO010 *"Effect of Different Nitrogen Sources and Concentrations on Growth and Microcystin Production of Toxic Cyanobacterium, Microcystis Aeruginosa"*
Suneerat Ruangsomboon, Sakchai Choochote, Paveena Taveekijakarn, Monthon Ganmanee

BIO011 *"Effects of expanded-softening pretreatment on methane production from rice straw"*
Tatsuhiko Kaji, Morihiro Takano

BIO012 *"Study of bio-ethanol production from cellulosic waste (rice straw)"*
Marie Hatakawa, Tadayosi Yoshimura, Fumio Takahashi, Takatoshi Kawashima

BIO013 *"Refinement Plant Development for Waste Cooking Oil"*
Yusuke Hashimoto, Keigo Fukunaga

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

An efficient protocol for shoot organogenesis and plant regeneration from callus of *Centrosema pascuorum* cv. Calvacade.

Boonruang Rattanaporn [1] Poeaim Anurug[1] Pongtongkam Pradit [2] and Arananant Jantakarn [3]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand
[2]Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand
[3]Feed and Forage Analysis Section, Animal Nutrition Division, Department of Livestock Development, Pathumthani Province, Thailand
Email: folkkung@hotmail.com, Email: Anurug@hotmail.com

Abstract—**An efficient regeneration system for *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade was developed from mature seeds germinated on MS medium. The highest multiple shoot regeneration on MS medium supplemented with 1 mg/l BA were average 5.29 shoots per seed. The shoots of elongation on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA were average shoots length had 38.00 mm per explant. Shoots formed roots upon transfer to MS with 3 mg/l IBA. Plantlets were successfully transferred to soil.**

Callus derived cotyledons of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade. The best callus production was obtained with medium containing 0.5 mg/l 2,4-D. The largest callus size, 2.17 fresh weights. The callus was transferred onto MS regeneration medium supplemented with 3 mg/l BA. The percentage of regenerated callus pieces were 75% and the number of shoots per callus piece was 4.2 shoots and these were the highest number among all the media tested.

Keywords-Cotyledon, Callus induction, Plant regeneration

Abbreviations: BA N6-benzylaminopurine; IBA indole-3-butyric acid; 2,4-D 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid; NAA a-naphthaleneacetic acid; MS Murashige and Skoog

I. Introduction

Centrosema pascuorum cv. Calvacade are annual pasture legume developed by Clements et al. and released commercially in 1984 as being suitable for the semi-arid tropics of north-west Australia. Calvacde is capable of consistently producing high herbage and seed yields [1]. Legume crops are capable of protein production through symbiotic nitrogen fixation, and grain legumes are therefore thought to have potential as biofactories for the production of proteins, peptides, amino acids, and secondary metabolites by genetic engineering [2]. The genus Centrosema contains about 35 species, which inhibit a great range of climates in the tropics and subtropics. Some have great forage value. Therefore, interest in tissue culture of legume has increase considerably. Plant regeneration is one of basic requirements for employing cell, tissue and organ culture in plant breeding. Species which belong to the Leguminosae in general have proved moderately difficult to manipulate in vitro *Centrosema brasilianum* cultured in vitro. Callus and buds were produced on MS medium, 0.1 mg/l NAA and 1 mg/l BAP. Shoots formed roots upon transfer to MS with 0.01 mg/l NAA. Plantlets were successfully transferred to soil. Leaf-derived calli of *Centrosema arenarium, C. macrocarpum, C. pascuorum, C. pubescens,* and *C. Virginianum* did not produce shoots when cultured in vitro [3]. This protocol opens new biotechnological strategies to transfer economically important genes to this important crop species. The present paper also reports procedures employed to induce plant regeneration from callus-derived cotyledon and describe a protocol for direct organogenesis of *Centrosema pascuorum* cv. Calvacade.

II. Materials and Methods

A. Plant materials

Mature seeds of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade obtained from Feed and Forage Analysis Section. Animal Nutrition Division. Department of Livestock Development. Surface sterilized with 70% ethanol for 2 min, followed by 15% clorox for 15 min. Seeds were then rinsed thoroughly three times with sterile water and dried on sterile filter paper. Then the seeds were allowed to culture at temperature of 25±2°C and a 16-h photoperiod on MS medium [4] supplemented with various concentrations 0.5, 1.0, 3.0 5.0 mg/l BA, 30 g/l sucrose and 2.6 g/l phytagel. Subculturing was done every 3 weeks.

B. Callus induction and Shoot regeneration

Five days after germination, cotyledons were used cultured on MS medium supplemented with various concentrations 0.5, 1.0, 3.0 5.0 mg/l 2,4-D, 30 g/l sucrose and 2.6 g/l phytagel. All the cultures were incubated at 25±2 °C under white fluorescent light (16-h photoperiod). Subsequent subculturing of embryogenic calli was done on the same callusing medium. The multiple shoots were then transferred onto shoot formation media containing MS medium supplemented with different concentrations of 0.5, 1.0, 3.0 5.0mg/l BA, 30 g/l sucrose and 2.6 g/l phytagel sub-culturing every 3 weeks.

C. Root induction.

The shoots were transferred for 12 weeks to rooting medium. Shoots taller than 5 cm were found ideal for the induction of adventitious roots. The well developed shoots

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

were cultured on MS medium containing IBA (0.5, 1.0 3.0 and 5.0 mg/l) or NAA (0.5, 1.0 3.0 and 5.0 mg/l), 30 g/l sucrose and 2.6 g/l phytagel. Plantlets with well-developed root system were transferred to pots. Rooted plantlets were carefully removed, roots washed in sterile distilled water and grown initially in plastic pots and covered with plastic bags.

D. Statistical evaluation

All experiments were repeated at least three times. The data were analyzed statistically through one-way ANOVA using SPSS ver.17 SPSS Inc., Chicago, USA). The significance of difference among means was carried out by HSD Turkey's multiple range test at $P \leq 0.05$ and the results are expressed as mean ± SE of three repeated experiments.

III. Results and Discussion

Multiple shoot from *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade. Mature seeds were cultured on MS medium supplemented with 0.5, 1, 3 and 5 mg/l BA, 30 g/l sucrose and 2.6 g/l phytagel. The cultures were incubated in 16 hour light and 8 hour dark at 25°C for 4 weeks. Germination commenced after about 5 days (Fig I. A). After 2 weeks culture, the first portion of the shoot appeared. Over time, more and more shoots commenced and elongated. The number of shoots per explant was also dependent on the BA concentration (Table I). We found that 1 mg/l BA is the optimal level for shoot development. The highest multiple shoot regeneration on MS medium supplemented with 1 mg/l BA were average 5.29 shoots per seed (Fig I. B). After 4 weeks culture, callus induced from stem on MS medium supplemented with various concentration of BA (Fig I. C). BA was an effective inducer on the adventitious shoot buds formation [6]. The shoots of elongation on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA were average shoots length had 38.00 mm per explant. Root cultures were induced successfully from segments of calvacade with these media. The concentrations of NAA and IBA in the media were determined experimentally by culturing calvacade (Table II). IBA had a positive effect on root induction, and subsequent development of the induced roots proceeded normally. The shoots were transferred on MS medium supplemented with 3 mg/l IBA. Thick white roots were successfully induced in 2 weeks (Fig I. D-E). Shoots cultured on the media without IBA did not develop roots. We found the optimal rooting level was 3mg/l of IBA, producing average 17 roots per explant. Rooting on MS medium supplemented with 5 mg/l NAA were average 17 roots per explant (Fig I. F-G).

Callus and regeneration protocol by using cotyledons derived explants of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade. Cotyledon was cultured on MS medium supplement with various concentrations of 2,4-D (Fig I. H). The results showed that MS medium with 0.5 mg/l 2,4-D could induce the highest percentage of callus per explant. Expanded and swollen tissues were observed in most of the media within 2 weeks, callus development was observed thereafter. Within 3 week of inoculation in media supplement with 1 mg/l 2,4-D, cotyledon explants formed 100% callus. Morphological variation of the induced callus was observed and they were categorized as friable callus, red compact and green compact (Fig I. I). The largest callus size, 2.17 fresh weight could be induced in MS medium with 0.5 mg/l 2,4-D for 11 weeks. (Table II). Scanning electron microscope observations revealed clusters of somatic embryos on one part of the explants, while other parts grew further, resulting in callus tissue. (Fig I. J).The callus was transferred onto MS regeneration medium supplemented with various concentrations of BA 0.5, 1, 3 and 5 mg/l, 30 g/l sucrose and 2.6 g/l phytagel. All callus cultures were subcultured at 3-week intervals. The number of well developed shoots (stem with leaves 1.0–2.0 cm long) regenerated per callus was evaluated after 6 weeks. After 12 weeks of growth the best media for shoot regeneration was MS medium supplemented with 3 mg/l BA (Fig I. K). The percentages of regenerated callus pieces were 75%. Shoots regenerated with a frequency of approximately 4.2 shoots per callus. Data in Table IV shows the percentage of explants producing shoots from those in which callus is induced. As the concentration of BA was reduced to 1 or 0.5 mg/l, the number of multiple buds also decreased correspondingly. No multiple buds occurred at 0.5 mg/l BA, instead the meristems directly regenerated into single shoots. The regenerated plantlets with healthy roots grew successfully when transferred to soil.

Table I. Effect of BA on shoots induction of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade.

BA (mg/l)	Number of seeds	Shoot formation developed	1 weeks		2 weeks		3 weeks		4 weeks	
			Shoots /seed	length (mm)	Shoots /seed	length (mm)	Shoots /seed	length (mm)	Shoots /seed	length (mm)
0.5	30	29	1^{A}	16.35^{A}	2.10^{A}	34.97^{A}	3.14^{A}	37.50^{A}	4.69^{A}	38.00^{A}
1	30	28	1^{A}	13.21^{AB}	2.57^{B}	26.87^{B}	4.50^{B}	28.97^{B}	5.29^{A}	30.99^{B}
3	30	25	1^{A}	13.71^{AB}	1.73^{BC}	19.97^{C}	2.62^{BC}	20.77^{C}	2.81^{B}	21.32^{C}
5	30	26	1^{A}	11.53^{B}	1.38^{C}	14.90^{C}	1.88^{C}	17.34^{C}	1.92^{B}	18.72^{C}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Means followed by different character showed the significantly different at P ≤0.05 according to HSD Turkey's test.

Table II. Root induction from the different auxin in vitro germinated seeds of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade.

Hormone	Concentration	2 weeks		3 weeks		4 weeks	
		Roots /explant	length (mm)	Roots /explant	length (mm)	Roots /explant	length (mm)
IBA (mg/l)	0.5	2.00^{AB}	7.11^{A}	3.57^{C}	8.55^{B}	5.3^{B}	9.61^{AB}
	1	2.50^{AB}	4.76^{ABC}	4.25^{BC}	7.48^{BC}	6.00^{AB}	12.72^{A}
	3	12.40^{A}	2.36^{CD}	15.00^{A}	13.49^{A}	17.00^{A}	14.21^{A}
	5	3.50^{AB}	1.72^{D}	4.5^{BC}	7.69^{BC}	5^{B}	9.94^{AB}
NAA	0.5	9.00^{AB}	3.59^{BCD}	10.50^{ABC}	2.25^{D}	11.00^{AB}	9.49^{AB}
(mg/l)	1	7.75^{AB}	3.83^{BCD}	10.75^{AB}	2.59^{D}	8.00^{AB}	5.32^{C}
	3	8.50^{AB}	5.71^{AB}	9.00^{ABC}	3.81^{CD}	10.00^{AB}	6.82^{C}
	5	0.00^{B}	0.00^{E}	13.00^{A}	7.23^{BC}	14.67^{B}	13.54^{A}

Means followed by different character showed the significantly different at P ≤0.05 according to HSD Turkey's test

Table III. Effect of 2,4-D on callus induction from 6-d-old cotyledon explants of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade.

2,4-D (mg/l)	Cotyledon of explants	Percent of callus	Callus fresh mass (mg)		
			3 weeks	7 weeks	11 weeks
0.5	40	100	0.78^{A}	1.27^{A}	2.17^{A}
1	40	100	0.78^{A}	1.25^{A}	1.53^{AB}
3	40	100	0.56^{A}	1.04^{A}	1.29^{B}
5	40	65	0.53^{A}	0.65^{B}	1.17^{B}

Means followed by different character showed the significantly different at P ≤0.05 according to HSD Turkey's test.

Table IV. Effect of BA on number of shoots from callus derived cotyledon explant of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade.

BA (mg/l)	Number of callus	Shoot formation (%) developed	Shoots per explants	
			8weeks	12weeks
0.5	40	40	1.40^{C}	1.85^{C}
1	40	60	1.75^{BC}	2.22^{C}
3	40	85	3.25^{A}	4.20^{A}
5	40	80	2.30^{AB}	3.80^{AB}

Means followed by different character showed the significantly different at P ≤0.05 according to HSD Turkey's test.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

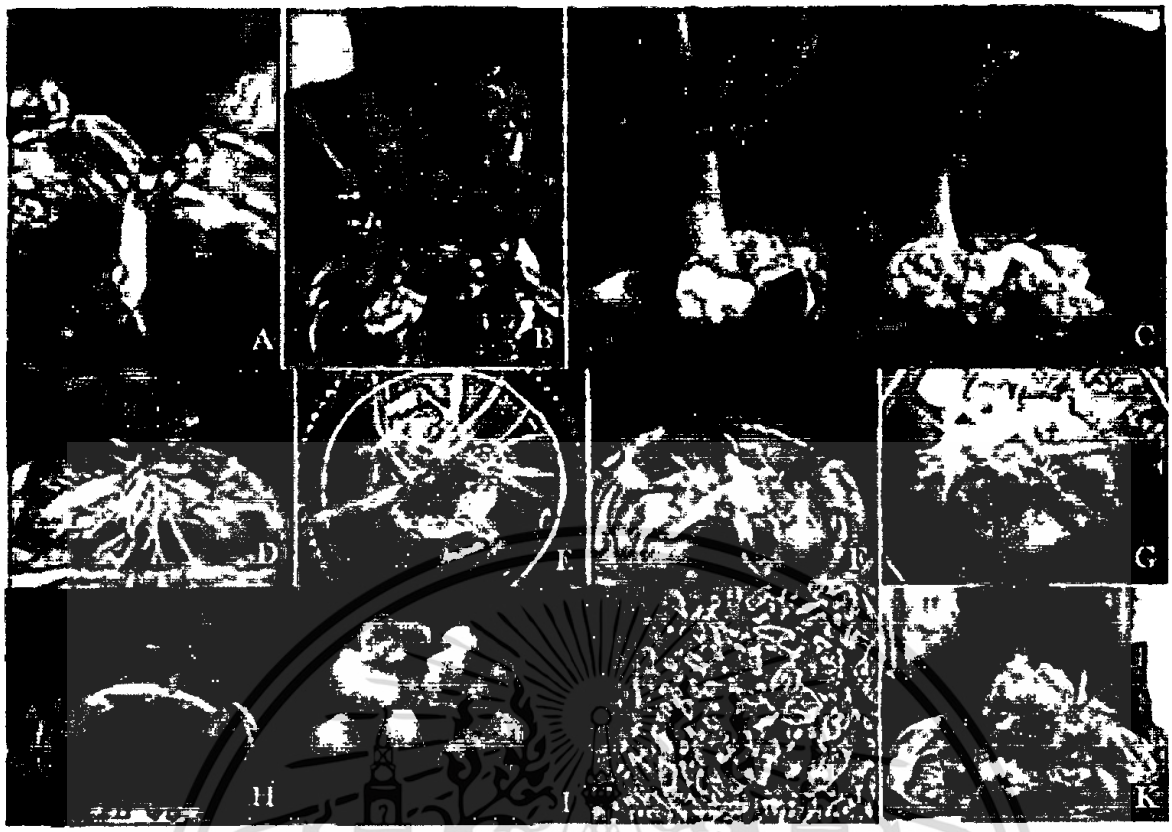


Figure I. Plant regeneration from seeds of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade (A) Seeds were used cultured on MS medium for 5 days. (B) Multiple shoot regenerated on MS medium supplement with 1 mg/l BA for 4 weeks. (C) Callus from stem shoot on MS medium supplement with BA for 4 weeks. (D – E) Plantlet with healthy root on rooting medium supplemented with 3 mg/l IBA for 4 weeks. (F-G) Plantlet with healthy root on rooting medium supplemented with 5 mg/l NAA for 4 weeks. (H) Cotyledon at the age of 1 day. (I) Callus induced from cotyledon on MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D for 4 weeks. (J) Callus surface (SEM) of calvacade. (K) Callus were transferred to MS medium supplemented with 3 mg/l BA for 12 weeks.

References

[1] K. Thiagalingam, D.zuill and T.Price, 1997. A review of centrosema pascuorum (Centurion) cvv. Calvacade and Bunday as a pasture legume in the ley farming system studies in north west Australia. International grasslands. 10:43-44.

[2] S. Moemen., Hanafy, M. Shaikh., Rahman., M. Mutasim., Khalafalla., A. Hany., El-Shemy., Yumi Nakamoto., Masao Ishimoto and Kyo Wakasa., 2006. Accumulation of free tryptophan in azuki bean (Vigna angularis) induced by expression of a gene (OASA1D) for a modified a-subunit of rice anthranilate synthase. Plant Science 171: 670–676.

[3] P.N. Angelon., Rey. H.Y., and L.A. Mroginski. 1992. Regeneration of plants from callus tissue of the pasture legume *Centrosema brasilianum*. Plant Cell Rep 11:519-521.

[4] T. Murashige and F Skoog., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue Cultures. Physiol. Plant. 15:473–497.

[5] A. Vasudevan., N. Selvaraj., A. Ganapathi., C.W. Choi., M. Manickavasagam., and S. Kasthurirengan., 2007. Direct plant regeneration from cucumber embryonal axis. - Biol. Plant. 51:521-524.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพิ่มประสิทธิภาพการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคด (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade)

High-Efficiency of Plant Regeneration was Callus Culture Derived from Cotyledon Explants of Pasture Legume (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade)

รัตนาภรณ์ บุญเรือง[1] อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม[1] ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ[2] และ จันทกานต์ อรณนันท์[3]

Rattanaporn Boonruang[1] Anurug Poeaim[1] Pradit Pongtongkam[2] and Jantakarn Arananant[3]

บทคัดย่อ

การเพิ่มประสิทธิภาพของสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสของถั่วคาวาลเคดให้เกิดยอดจำนวนมาก การชักนำยอดจำนวนมากบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำยอดให้เพิ่มมากขึ้น 6.71 ยอดต่อแคลลัส ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำยอดมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารชักนำให้ยอดสูงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดมีความสูงเฉลี่ย 7.42 มิลลิเมตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อนำยอดที่มีความสูงที่เหมาะสมต่อการนำมาชักนำให้เกิดรากบนสูตรอาหาร MS และสูตรอาหารครึ่ง MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหารอาหาร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำจำนวนรากเฉลี่ยได้ 17 รากต่อต้น และความยาวเฉลี่ยของราก 14.21 มิลลิเมตร และสามารถย้ายออกปลูกลงดินเป็นผลสำเร็จ

ABSTRACT

High efficiency of the multiple shoots regeneration of Calvacade from callus culture on MS medium supplemented with 3 mg/l BA combination with 3 mg/l TDZ for 8 weeks, The results showed that multiple shoots regeneration were average of 6.71 shoots per callus was studied these shoots were elongated on MS medium supplemented with 5 mg/l GA_3 for 6 weeks. Shoots had average length 7.42 mm. The shoots were transferred onto MS medium and half MS medium supplemented with 3 mg/l IBA for 4 weeks. It was found that MS medium supplemented with 3 mg/l of IBA could produce average 17 roots per shoot and average length rooting 14.21 mm. The regenerated plantlets with healthy roots grew successfully when transferred to soil.

Key Words: legume ; Plant regeneration ; Centrosema pascuorum

e-mail address: folkkung@hotmail.com

[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพ 10520

Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok, 10520.

[2]ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ 10900.

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900.

[3]กลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ จังหวัดปทุมธานี 12000.

Feed and Forage Analysis Section, Animal Nutrition Division, Department of Livestock Development, Pathumthani Province 12000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ถั่วคาวาลเคดเป็นพืชสายพันธุ์ในสกุลเดียวกับถั่วเซนโตรซีม่า มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Centrosema pascuorum* cv Cavalcade ถูกพัฒนาในเชิงพาณิชย์ในปี 1984 จาก Clements และคณะ เพื่อเพาะปลูกได้ในเขตร้อนกึ่งแห้งแล้งในภาคตะวันตกเฉียงเหนือประเทศออสเตรเลีย (Thiagalingam *et al.*, 1997) ถั่วเซนโตรซีม่ามีประมาณ 35 ชนิด มีคุณค่าอาหารสัตว์ที่ดี การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นหนึ่งในพื้นฐานที่จำเป็นต้องใช้สำหรับปรับปรุงพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงพืชตระกูลถั่วโดยทั่วไปยังทำได้มาก ถั่ว *Centrosema brasilianum* สามารถเพาะเลี้ยงแคลลัสและยอดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดที่เกิดขึ้นเมื่อย้ายไปชักนำรากบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถเกิดรากและสามารถย้ายออกปลูกลงดินได้ประสบความสำเร็จ แต่แคลลัสจากใบของถั่ว *Centrosema arenarium*, *C. macrocarpum*, *C. pascuorum*, *C. pubescen*, และ *C. virginianum* ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ (Angelon *et al.*, 1992) รัตนาภรณ์ และคณะ (2554 ก) ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดของถั่วคาวาลเคดโดยเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้นต่างๆเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากเฉลี่ย 5.29 ยอดต่อเมล็ด และศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด จากแคลลัสจากใบเลี้ยงปริมาณน้ำหนักสด 0.5 กรัม ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร พบว่าในวันที่ 15 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงสุด 1.1674 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร และ 0.022 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 3-12 วัน ซึ่งเป็นระยะ log phase จากนั้นจะเข้าสู่ stationary phase ในช่วง 12-21 วัน (รัตนาภรณ์ และคณะ, 2554 ข) การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคด เพาะเลี้ยง 11 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีแคลลัสขนาดใหญ่และมีน้ำหนักสด 2.17 กรัม จากนั้นนำแคลลัสมาชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ และพัฒนาแคลลัสให้เกิดเป็นยอดได้ 4.2 ยอดต่อแคลลัส (รัตนาภรณ์ และคณะ, 2554 ค)

ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีบทบาทอย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยอาจใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยการใช้รังสีหรือสารเคมี เพื่อให้ได้พืชสายพันธุ์ใหม่ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ และอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ในอนาคตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยง

คัดเลือกเมล็ดถั่วคาวาลเคดที่มีความสมบูรณ์มาล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นต้นอ่อนบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige และ Skoog,1962) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน นำส่วนของใบเลี้ยงเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส (รัตนาภรณ์ และคณะ, 2554) เพื่อชักนำใบเลี้ยงให้พัฒนาเป็นแคลลัส

การชักนำแคลลัสให้พัฒนายอด

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสมจากการทดลองข้างต้นมาชักนำให้เกิดเป็นต้นโดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA (6-benzyladenine) ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ (Thidiazuron) ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ภายใต้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโตของยอดในอาหารแต่ละสูตร

การชักนำยอดจากแคลลัสให้ยืดยาว

จากนั้นนำแคลลัสที่สามารถพัฒนายอดมาศึกษาการเพิ่มความสูงของยอดบนอาหารเพาะเลี้ยงสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม GA_3 (Gibberellic acid) ความเข้มข้น 0 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตของยอดในอาหารแต่ละสูตร

การชักนำราก

เมื่อต้นมีความสูงอย่างน้อย 5 เซนติเมตร นำไปชักนำให้เกิดรากบนสูตรอาหาร MS ที่เติม IBA (indole-3-butyric acid) ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นปกติ (half strength) ที่เติม IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโตของรากในอาหารแต่ละสูตร โดยใช้เวอร์เนียร์วัดความสูง จำนวนรากและลักษณะของรากที่เกิดขึ้นและคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเจริญเป็นราก และนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

ผลการทดลองและวิจารณ์

การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยง

จากการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคดเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลลัมกัม 2.6 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะแข็ง (compact callus) สีเหลืองเขียวซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปชักให้เกิดยอดได้ (Fig 1. A) (รัตนาภรณ์ และคณะ, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การชักนำแคลลัสให้พัฒนายอด

เมื่อนำมาชักนำให้เกิดยอดโดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้บนอาหารทุกสูตร และ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พัฒนาให้เกิดจำนวนยอดได้มากที่สุดจำนวน 3.25 ยอดต่อแคลลัส (รัตนาภรณ์ และคณะ, 2554) TDZ เป็นสารในกลุ่ม ไซโตไคนิน ซึ่งสามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และกระตุ้นการเจริญของตาข้างและสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดยอดหลายๆยอดได้ (อนุรักษ์, 2552) การใช้ TDZ ร่วมกับ BA จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำยอด จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัสของถั่วคาวาลเคดเพื่อให้เกิดยอดจำนวนมาก พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการเพิ่มสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำยอดให้เพิ่มมากขึ้นกว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เพียงอย่างเดียว จากการทดลองเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดให้เกิดได้มากที่สุด 6.71 ยอด และสูง 5.09 มิลลิเมตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (Table 1.) (Fig 1. B) ซึ่งสอดคล้องกับการใช้สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดยอดของต้นถั่วแขกสายพันธุ์ pusa-33 ค่าเฉลี่ย13 ยอดต่อเมล็ดและสูง 3.16 เซนติเมตร (Dorendro et al., 2002) และในถั่วเขียวผิวดำเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดยอด ค่าเฉลี่ย 10.6 ยอดต่อชิ้น (Dilip et al., 1998)

การชักนำต้นจากแคลลัสให้มีลักษณะยืดยาว

เมื่อนำแคลลัสที่พัฒนายอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม GA_3 ความเข้มข้น 0 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม GA_3 ความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูง 6.75และ 7.42 มิลลิเมตรตามลำดับ (Table 2.) ลักษณะยอดที่เกิดขึ้นจะผอมและมีการเจริญของแคลลัสน้อยกว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรอื่นๆ (Fig 1. C) ซึ่งสอดคล้องกับการใช้สูตรอาหาร MS ที่เติมGA_3 ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อลิตรกระตุ้นการเพิ่มความสูงของต้นถั่วแขกได้มากขึ้น 46 เปอร์เซ็นต์ (Shamsudeen *et al.*, 2006) และการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรกระตุ้นการเพิ่มความสูงของต้นถั่วแระได้มากขึ้น 42.10 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยความสูง 2.6 เซนติเมตร (Gaurav *et al*, 2011)

การชักนำราก

ต้นที่มีความสูงที่เหมาะสมต่อการนำมาชักนำให้เกิดรากบนสูตรอาหาร MS ที่เติมIBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารครึ่ง MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหารอาหาร MS ที่เติมIBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำจำนวนรากเฉลี่ยได้ 17 รากต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ย 14.21 มิลลิเมตรได้มากกว่า (Fig 1. D) สูตรอาหารครึ่ง MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำจำนวนรากเฉลี่ยได้ 7.46 รากต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ย 12.54 มิลลิเมตร (Fig 1. E)

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Table 3.) และสูตรอาหารอาหาร MS ที่เติมIBA หรือ NAA ความเข้มข้น 0.5-5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ทุกสูตรอาหาร สามารถย้ายออกปลูกลงดินเป็นผลสำเร็จ (Fig 1. F)

Table 1 Effects of various Concentrations of TDZ on shoot formation of cotyledon explants culture on MS medium supplemented with 3 mg/l BA after 8 weeks of culture

TDZ (mg/l)	Number of calli culture	Shoot formation (%)	No. of shoots	Shoot length (mm)
0	40	85	3.25 [b]	3.11 [b]
0.5	40	85	3.75 [a]	3.38 [b]
1	40	87	5.67 [a]	4.25 [ab]
3	40	90	6.71 [a]	5.09 [a]
5	40	89	4.38 [a]	4.18 [ab]

Means followed by different letter are significantly different at P ≤0.05 according to HSD Turkey's test.

Table 2 Effect of various media on shoot elongation for 6 weeks.

Growth regulator	Concentration (mg/l)	No. of calli	Shoots length (mm)
BA+TDZ	3	20	3.90 [b]
½ MS medium	0	20	4.49 [b]
No Hormone	0	20	4.16 [b]
GA3	1	20	3.92 [b]
	3	20	6.75 [b]
	5	20	7.42 [a]

Means followed by different letter are significantly different at P ≤0.05 according to HSD Turkey's test.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 3 Effect of different Indole-3-butyric acid (IBA) concentrations on *in vitro* rooting of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade shoots after 4 weeks.

Basic medium	IBA (mg/l)	Roots /explant		length (mm)	
		3 weeks	4 weeks	3 weeks	4 weeks
½ MS	3	6.77[b]	7.46[b]	8.56A[b]	12.54[ab]
MS	3	15.00[a]	17.00[a]	13.49[a]	14.21[a]

Means followed by the same (alphabets) are not singnificantly different at P ≤0.05 according to HSD Turkey's test

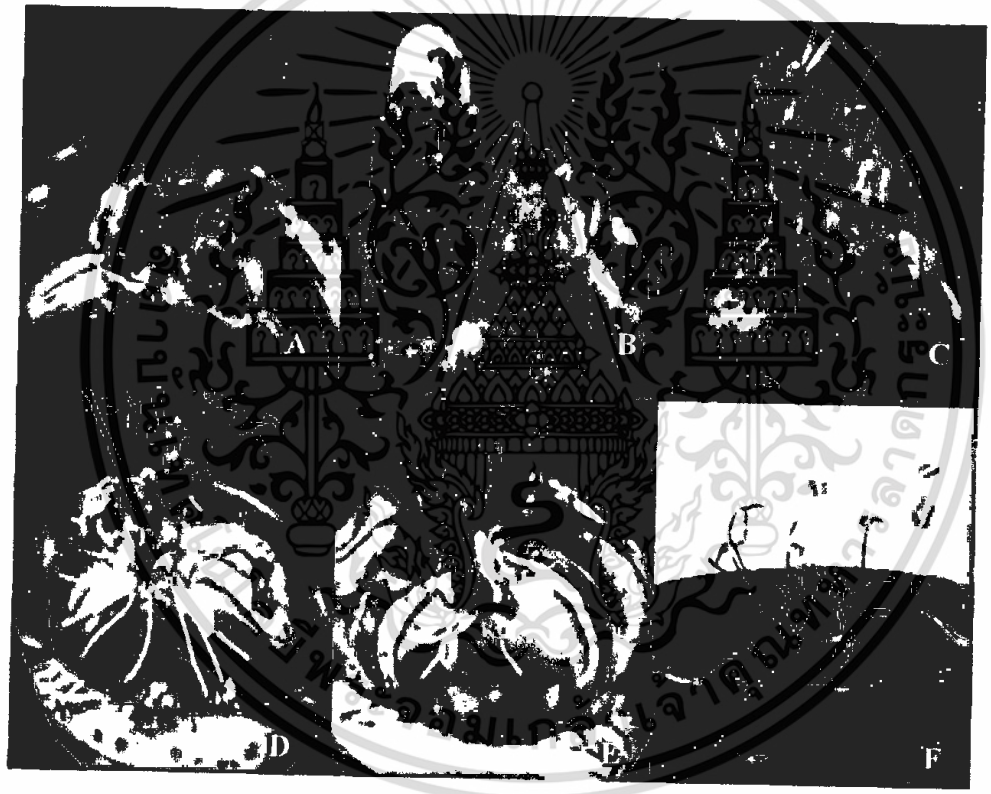


Figure 1 (A) Callus formation in MS medium supplemented with 0.5 mg/l 2,4-D after 4 weeks of seed culture. (B) Multiple shoot regenerated on MS medium supplement with 3 mg/l BA combination with 3 mg/l TDZ for 8 weeks. (C) Multiple shoot elongated on MS medium supplement with 5 mg/l GA_3 for 6 weeks (D) Induction from shoot culture on MS medium containing 3 mg/l IBA (E) half MS medium containing 3 mg/l IBA after 4 weeks and (F) Acclimatization of plantlet under culture room conditions.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของถั่วคาวาลเคดอายุ 60 วัน บนสูตรอาหารชักนำให้เกิดยอดเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด 6.71 ยอดและยอดมีความสูง 5.09 มิลลิเมตร และเมื่อนำยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม GA_3 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ามีความสูงเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 7.42 มิลลิเมตร และเมื่อนำยอดไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร สูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำยอดให้เกิดรากได้ 17 รากต่อยอด และความยาวเฉลี่ยของราก 14.21 มิลลิเมตร และสามารถย้ายต้นที่ได้ออกปลูกลงดินเป็นผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

รัตนาภรณ์ บุญเรือง อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ จันทกานต์ อรณนันท์. 2554 ก. การเกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade. การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยพืชเขตร้อนและกึ่งร้อน ครั้งที่ 5. Agricultural Science. Jounal. 185-188

รัตนาภรณ์ บุญเรือง อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ จันทกานต์ อรณนันท์. 2554 ข. การเติบโตของเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสของใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคด (*Centrosema pascuorum* cv.Cavalcade). **การประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ ๕.**

รัตนาภรณ์ บุญเรือง อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ จันทกานต์ อรณนันท์. 2554 ค. การเจริญเป็นต้นใหม่จากแคลลัสของถั่วอาหารสัตว์พันธุ์คาวาลเคด. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**. งานประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 10. หน้า 199-202.

สมจิตร อินทรมณี และธำรงศักดิ์ พลบำรุง. 2545. รายงานความก้าวหน้าของโครงการพัฒนาการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชอาหารสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. **จดหมายข่าวโครงการพัฒนาการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชอาหารสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ**. ปีที่ 2 ฉบับที่ 4 (มกราคม-เมษายน 2545) หน้า 3-4.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2552. **เทคโนโลยีชีวภาพของพืช**. วี.เจ.พริ้นติ้ง. กรุงเทพฯ. 159 น.Angelon, P.N., H.Y. Rey and L.A. Mroginski. 1992. Regeneration of plants from callus tissue of the pasture legume *Centrosema brasilianum*. Plant Cell Report 11:519-521.

Dilip, K. D., N. S. Prakash and N. B. Sarin.1998. An efficient regeneration system of black gram (*Vigna mungo* L.) through organogenesis. Plant Science 134: 199-206

Dolendro, N. S., L.Sahoo., N. B. Sarin and P. K. Jaiwal. 2002. The effect of TDZ on organogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp). Plant Science 164: 341-347

Gaurav, K., P. S. Reddy., P. W.Ramjteke., P. Rambabu., S. S. Sohrab., D. Rana and P. Bhattachaya 2011. *In vitro* regeneration through organogenesis and somatic embryogenesis in pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] cv. JKR105. Physiol Mol Biol Plants. 17(4): 375-385

Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology. 15: 473-497.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shamsudeen, V. M., J. M. Sung., T. L. Jeng and C. S. Wang. 2006. Organogenesis of *Phaseolus angularis* L.: high efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N6-benzylaminopurine and thidizuron. **Plant Cell tissue.** 86:187-199

Thiagalingam, K., D.zuill and T. Price, 1997. A review of *Centrosema pascuorum* (Centurion) cvv. Calvacade and Bunday as a pasture legume in the ley farming system studies in north west Australia. **International grasslands.** 10:43-44.

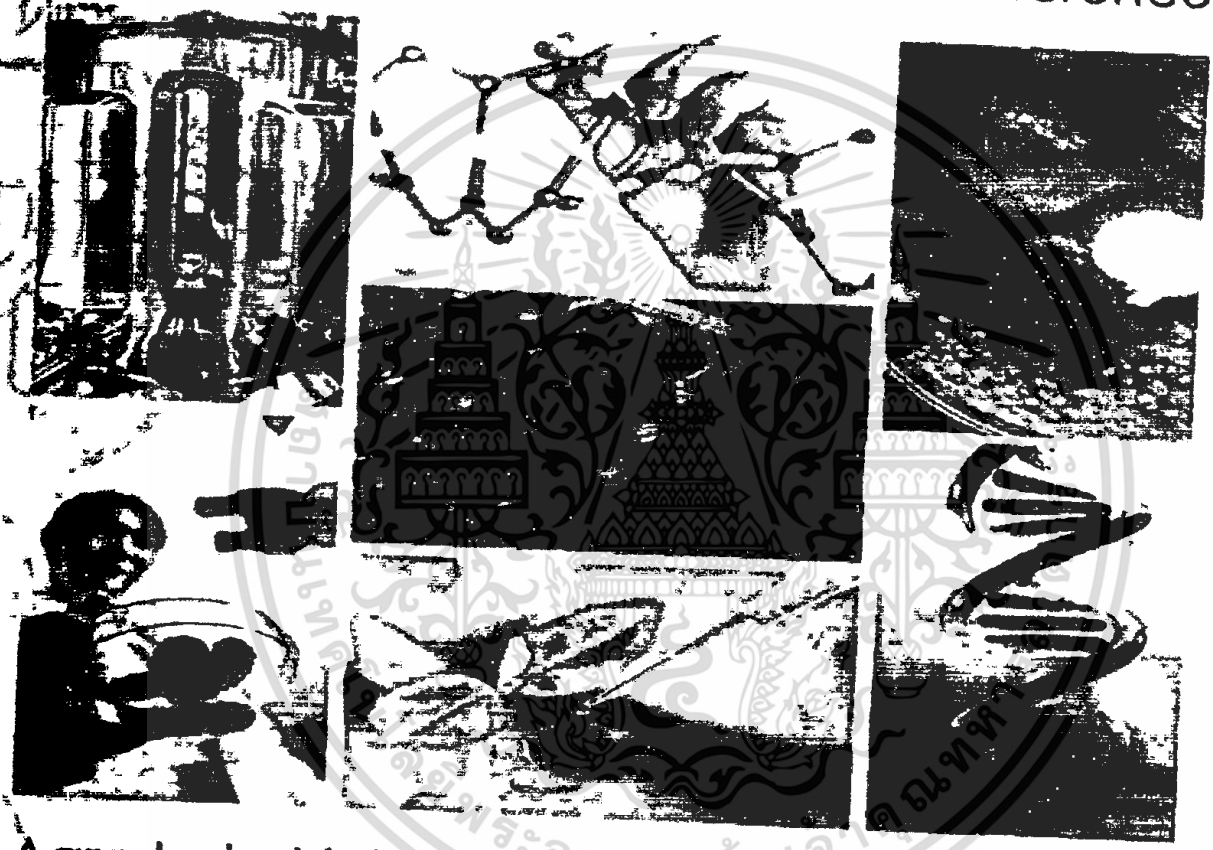
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16-19 October 2013
The Emerald Hotel, Bangkok, THAILAND

TSB 2013

Programme & Book of Abstracts

The 25th Annual Meeting of The Thai Society for Biotechnology and International Conference



Agro-Industrial Biotechnology for Global Sustainable Prosperity

Joint Symposia
BIOPRODUCT AND SYSTEMS BIOTECHNOLOGY
JATROPHA UPDATES 2013

Organized by

KASETSART UNIVERSITY

THAI SOCIETY FOR BIOTECHNOLOGY

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

O-08-007 Optimization of the concentrated liquid biofertilizer production *Namfon Panjanapongchai and Sarote Sirisansaneeyakul**	115
O-08-008 Enzymatic assay for the compost from oil palm empty fruit bunch inoculated with *Rhodopseudomonas palustris* *Pei Ying Onga, Chew Tin Lee*, Nur Mizatul Hidayah Binti Ismail, Chee Wah Leow, Li Yee Lim, Lee Suan Chua and Mohamad Roji Sarmidi*	116
POSTER PRESENTATION	
P-01-001 Adaptation of commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to tolerate inhibitors generated during cassava pulp hydrolysis *Solsuda Pompukdeewattana*, Jinnicha Khamfun and Narinthorn Phatyenchai*	121
P-01-002 The chemical and enzymatic pretreatment of cotton for ethanol production *Warathip Jintawadeetanachod, Chatchaya Thongplew, Phimchanok Jaturapiree and Adisak Jaturapiree**	122
P-01-003 Biodiesel production from black oil obtained from waste water pond of coconut milk plant *Mallika Tapanwong and Vittaya Punsuvon**	123
P-01-004 Lipid accumulation of *Chlorella* sp. TISTR 8990 in nitrogen- and phosphorus-minimal media cultivated photoautotrophically in 6-L drinking water bottle *Natthawut Yodsuwan, Nahatai Chamchuang, Yothaka Puchcha and Sarote Sirisansaneeyakul**	124
P-02-001 Decomposition rates of cotton and polyester fabrics buried in soil at Khao Yai Da, Rayong Province, Thailand *Sasikarn Komleow*, Anthony J.S. Whalley, Aphichart Kamchonatat and Prakitsin Sihanonth*	126
P-02-002 Antimicrobial activity of nisin coated films produced by electrospinning technique *Juthasinee Sriraksa, Nuttapun Supaka, Piyawit Koombhongse and Supat Chareonpornwattana*	127
P-02-003 Characterization of the physicochemical properties on silk sericin-sodium carboxymethylcellulose scaffolds *Tippawan Siritientong, Antonella Motta, Walter Bonani, Eleonora Carletti and Pornanong Aramwit**	128
P-02-004 Composite banana starch-alginate hydrogels for the controlled release of hydrophilic drug *Warin Pimpa* and Chakkrit Pimpa*	129
P-02-005 Enhanced stability and targeted delivery of nanoencapsulated anthocyanins for improved food quality and human health *Bongkot Poosawatratana, Kittiwut Kasemwong*, Yodsakorn Tattiyakul, Aujima Pongtiwattanakul and Teerarat Itthisoponkul*	130
P-02-006 Poly (lactic acid)/fish water soluble protein bio composite film obtained from washing water of surimi process: preparation and characterization *Rapeepan Salwaew, Panuwat Suppakul and Chiravoot Pechyen**	131
P-02-007 Screening of bioplastic content in Thailand-isolated cyanobacteria *Aurotol Kaewbai-ngam**	132
P-02-009 Influence of sappanwood ethanolic extract on mechanical properties of bacterial cellulose/alginate composite films plasticized with glycerol *Saranyou Oontawee and Chanan Phonprapai**	133
P-03-001 Removal of Cu^{2+} using water-soluble EDTA-chitosan as flocculant *Sayaka Fujita* and Nobuo Sakairi*	135
P-03-002 Culture-independent prokaryotic diversity in the Andaman Sea, Thailand *Khunnalack Khitmoh* and Naraporn Somboonna*	136

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TSBBook of Abstract.indb 11 10/2/2013 6:21:25 PM

P-03-003 Yeast biodiversity in the coastal area of Koh Si Chang and their potential as biosurfactant producer *Jiraporn Thanlyavarn*, Sasitorn Jindamorakot, Somjit Am-in, Sudarat Luepongpattana, Tipnipa Yoochang, Jamroomsri Poomtien , Suthirux Niyomrit, Savitree Limtong and Suthep Thanlyavarn*	137
P-03-004 Effect of light intensity and pH on hydrogen production from pickle bamboo shoot wastewater by *Rhodopseudomonas palustris* TN1 *Wiboon Riansa-ngawong*, Nijchaya Wongkumpoo, Predawan Ditthapan, Supansa Keawkird, Wanticha Lapsiri and Maneewan Suwansaard*	138
P-03-005 Biodegradation of selected chloroanilines by *Acinetobacter baumannii* strain GFJ1 *Ha Danh Duc and Alisa S. Vangnai**	139
P-03-006 Optimization of iprodione and 35DCA degradation by *Pseudomonas aeruginosa* strain I4 *Aornsiri Polla and Alisa S. Vangnai**	140
P-03-007 Effect of influent concentration and hydraulic retention time on performance of anaerobic hybrid reactor treating sugarcane bagasse wash wastewater *Jeerapom Sawasdikul, Mangkorn Rodprapakorn, Nuttakan Nitayapat and Pornpan Panichnumsin**	141
P-03-008 Toxicity test of silver nanoparticles on water flea (*Moina macrocopa*) in Thailand *Preeyawis Na Ubol, Wiyong Kangwansupamonkon, Kanittha Boonpavanitchakul and Nuttapun Supaka**	142
P-03-009 Decolourisation of synthetic dyes contaminated water by *Lentinus polychrous* Lev. cultivated on cassava rhizome *Jirachaya Boonyarit, Nuttakan Nitayapat* and Amornrat Promboon*	143
P-03-010 Effect of trace element addition to improve the specific methanogenic activity from anaerobic reactor treating the cassava starch wastewater *Chaiwat Waewsak*, Phimonrat Niyomwet and Annop Nopharatana*	144
P-03-011 Acute gamma irradiation dose on mutation induction of *in vitro Centrosema pascuorum* cv. Calvacade. *Anurug Poealm*, Rattanaporn Boonruang, Pradit Pongtongkam and Arananant Jantakam*	145
P-03-012 Enzyme activities of organic compounds degradable screened bacteria from Thammasat University cafeteria effluents *Chalermwoot Sompark, Kampol Nuntapong and Pariya Na Nakorn**	146
P-04-001 Effect of storage conditions on the phytochemical content and the antioxidant activity of *Peperomia pellucida* L. Kunth extracts *Siripom Phongtongpasuk* and Sarinya Podang*	148
P-04-002 Antioxidative capacity of proanthocyanidins from China bitter *Humulus lupulus in vitro* *Chunfeng Liu Yan Shan, Xiangsheng Yin and Qi Li**	149
P-04-003 Contamination of potentially aflatoxigenic *Aspergillus* in rice *Rinnapa Putthang and Cheewanun Dachoupakan Sirisomboon**	150
P-04-004 Suitable soaking and drying conditions for producing turmeric-flavoured parboiled rice *Kemika Angkaew, Weerachet Jittanit*, Thitima Neeranatpuree and Narapongpun Thanachotboriwat*	151
P-04-011 Inhibition of aflatoxigenic fungal growth in dried chili powder by *Bacillus subtilis* BCC 6327 extract *Rattanaporn Thakaew and Hataichanoke Niamsup**	152
P-04-012 Flavor and quality improvement of soy sauce by using *Candida etchellsii* as a starter culture at various sodium chloride concentrations *Xiao-Bei Zhan, Li Zhu, Li-Min Zhang*, Jie Feng*	153
P-04-013 GABA (gamma-aminobutyric acid) production of mung bean (*Phaseolus aureus*) during germination and the cooking effect *Kasarin Tiansawang, Patroj Luangpituksa, Manop Suphantharika, Warunee Varanyanond and Chanida Hansawasdi**	154

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TSBBook of Abstract.indb 12 10/2/2013 6:21:25 PM

P-03-011

Acute gamma irradiation dose on mutation induction of *in vitro Centrosema pascuorum* cv. Calvacade.

Anurug Poealm[a,*], *Rattanaporn Boonruang*[a], *Pradit Pongtongkam*[b] *and Arananant Jantakarn*[c]

[a] *Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Bangkok. 10520. Thailand*

[b] *Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University Bangkok. 10900. Thailand*

[c] *Feed and Forage Analysis Section. Animal Nutrition Division. Department of Livestock Development. Pathumthani Province. 12000. Thailand.*

**Corresponding author: e-mail: kpanurug@kmitl.ac.th*

Abstract

In this study, acute gamma rays were used to irradiated embryogenic calli induced from cotyledon explants of *Centrosema pascuorum* cv. Calvacade. Embryogenic calli were acutely irradiated at the dose of 0, 2, 4, 6, 8 and 10 Krad. Experiments were set up in a completely randomized design (CRD) and repeated four times, with at 30 explants per treatment. After irradiation, all embryogenic calli were cultured on MS medium (Murashige and Skoong, 1962) containing 30 g L^{-1} sucrose and 2.6 g L^{-1} phytagel for 4 weeks. The results revealed that fifty percent lethal dose value at 4 weeks after irradiation (LD50) was 8.3 Krad. To follow the effects of gamma irradiation, on embryogenic calli growth, the irradiated embryogenic calli were subcultured on MS medium supplemented with 3 mg L^{-1} 6 benzyladenine (BA) and 3 mg L^{-1} thidiazuron (TDZ), 30 g L^{-1} sucrose and 2.6 g L^{-1} phytagel for 6 weeks. The reduction of plant height, width and number of lateral branches were highly significantly different by increasing of irradiation dose. This method will be very useful for agronomic improvement.

Keywords: *Centrosema pascuorum* cv. Calvacade, mutation, gamma irradiation

Selected References:

1. Boonruang, R., A. Poealm, P. Pongtongkam, and J. Arananant. 2011. Multiple Shoots Cultured from Seeds of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade. **Agricultural Sci. J.** 42(2XSuppL): 185-188.
2. Boonruang, R., A. Poealm, A. Jantakarn, and P. Pongtongkam. 2012. An efficient protocol for shoot organogenesis and plant regeneration from callus of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade. 1st International Symposium on Technology for Sustainability (ISTS2011) 26-29 January KMITL Bangkok Thailand. 42-46.
3. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant** 15:473–497.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PROCEEDINGS OF THE 17TH ASIAN AGRICULTURAL SYMPOSIUM

1+2+3=6

PROSPECTS AND CHALLENGES OF 'THE SIXTH INDUSTRY,' OR THE COLLABORATION OF PRIMARY, SECONDARY AND TERTIARY INDUSTRY IN ASIA

- FOR THE CREATION OF A SUSTAINABLE AND INDEPENDENT AGRICULTURE -

農業 เกษตรกรรม [illegible] কৃষি Pertanian Agrikultura 农业

December 7, 2013, Kumamoto, Japan

কৃষি Pertanian [illegible] Agrikultura 農業 เกษตรกรรม [illegible]

Organized by

Tokai University Educational System

Tokai University

Nong nghiep 농업 农业 Agrikultura 農業 Pertanian เกษตรกรรม কৃষি

Sponsored by

Kumamoto Prefecture

Kumamoto City

农业 Agrikultura เกษตรกรรม কৃষি Pertanian 농업 Nong nghiep 農業

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TOKAI UNIVERSITY
EDUCATIONAL SYSTEM

Prospects and Challenges of 'the Sixth industry,' *or the Collaboration of Primary, Secondary and Tertiary Industry in Asia*

- For the Creation of a Sustainable and Independent Agriculture -

アジア諸国における六次産業化の展望と課題

－自立できる農業を目指して－

Proceedings of

The 17th Asian Agricultural Symposium

第 17 回アジア農業シンポジウム

December 7, 2013
Kumamoto, Japan

2013 年 12 月 7 日

Organized by
Tokai University Educational System
Tokai University

Sponsored by
Kumamoto Prefecture
Kumamoto City

主催：学校法人東海大学，東海大学
後援：熊本県、熊本市

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Contents

Rationale 1

Keynote Address

Sufficiency Economy and Challenges of the Sixth Industry on Sustainable Agriculture in Asia
Prawit Puddhanon 4

Considering 'Agriculture in the Future' from the Agriculture in Kumamoto - Effort to 'the Sixth Industrialization' -
Hidenori Aso 6

Oral Session 1: Strategic Planning for Farm Businesses

Future Prospects and Challenges of the Sixth Industrialization in Thailand
Monchai Duangjinda 12

Effort to Sixth Industrialization in the Northern Part of Kumamoto Prefecture
Osamu Yamamura 13

Concerning the Promotion of Sightseeing which Utilized the "Gastronomic Culture" by "the Sixth Industrialization" Promotion Case Study: The Strategy of Kumamoto Kamiamakusa
Tokiya Nitta 14

Construction and Evaluation of Hydroponics Environment Using Multiple LED Light Sources
Takuo Nakashima and Megumi Fukuma 15

Oral Session 2: Value-addition to Agricultural Products

Process Development for Mozzarella Farm Cheese
Wanna Tungjaroenchai and Sawanya Pandolsook 17

Prevention of Lifestyle-Related Diseases with AGEs Inhibitors Found in Natural Products
Ryoji Nagai, Rei-ichi Ohno, Narumi Moroishi, Jun-ichi Shirakawa and Mime Nagai 18

Utilization and Physiological Function in Sweetpotato (*Ipomoea Batatas.* L) Tops
Rie Kurata 19

Poster Session:

Effects of Chicken, Pig and Cow Manures on Growth and Yield of Kalmegh (*Andrographis paniculata* Nees)
Detpiratmongkol Somyot, Ubolkerd Thawatchai and Yoosukyingsataporn Sommart 21

Green Pesticide from Thai Essential Oils against House Fly (*Musca domestica* L.; Diptera: Muscidae)
Mayura Soonwera and J. Sinthusiri 22

***Environmental Friendly Repellent from Thai Essential Oils against* Dengue Fever mosquito (*Aedes aegypti* (L.)) and Filaria Mosquito Vector (*Culex quinquefasciatus* (Say))**
Mayura Soonwera and S. Phasomkusolsil 23

เอกสารนี้ ... ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dose Rate Effects of Gamma Ray Induced Mutation *in vitro Centrosema pascuorum* cv. Calvacade.
Anurug Poeaim, R. Boonruang, P. Pongtongkam and J. Arananant 24

Transplanting Time and Planting Density of the Rice Cultivar 'Mizuhochikara' for high Yield
Jiro Sakanashi 25

Effects of Fertilizer Application Method and Compost Application on Yield of the Rice Cultivar 'Mizuhochikara'
Jiro Sakanashi 26

Long-term Storage of Citrus 'Shiranuhi' Using Modified Atmosphere (MA) Packing
Hideo Sakaki, Hiroshi Aikawa, Kuniya Kitazono and Kensuke Fujita 27

Production Characteristics of Passion Fruit and Dragon Fruit under Unheated Greenhouse
Kensuke Fujita 28

Development of High-Valued Products from Silk Worms and Its Cocoons Cultivated in Sanitary-Controlled Factory through a Year
Ryukichi Mine and Shigeki Shimizu 29

Realization of Biodiversity by Establishment and Spread of the Propagation of Eelgrass (*Zostera marina* L.)
Gen Yamauchi, Kouki Motoyama and Tatuya Motoyama 30

Revival of the "Misao Soybean"- the Treasure of Kumamoto and Challenges for a New Food Culture
Kishino Nishimoto, Ayaka Yamamoto, Mei Takeda, Arisa Nishiyama Saya Sugitani, Akane Nishiyama and Haruna Miyata 31

Eating Green Tea - Aiming to Increase Consumption of Green Tea –
Azusa Kudo 32

Development of Rice Seasoning 'Furikake' Using Vegetables Produced in Kumamoto Prefecture
Rina Morizaki, Atsuko Fukuda, Juna Ieiri, Yurika Sato and Chinami Sugimori 33

Outline of 'Nanryou Rice' Produced by Students through the Intellectual Property Learning
Keisuke Sugino, Ichirou Akaike, Fuma Kosage, Futa Takahashi and Kouhei Hotta 34

Isolation of New AGEs Structure and Screening of AGEs Inhibitors from Foods as Target for Anti-Aging
Shuhei Ueda and Saori Tada 35

Possibility of Traditional Food · Suizenjinori (*Aphanothece sacrum* (Sur.) Okada)
Hironobu Nikki, Makoto Suzuki, Hideji Yamashita, Chikato Masuoka, Kazuhiro Urabe, Masaknori Itou, Kiyofumi Gejima, Keiji Igoshi, Maiko Okajima, Tatsuo Kaneko, Masateru Ono and Kiyotaka Kabata 36

Mechanism of the Suppression by p-Nitrophenol O-sulfate on the Reactive Oxygen Generation Systems
Shintaro Sugahara, Ryo Takeuchi, Masateru Ono, Keiji Igoshi and Shin Yasuda 37

Study of Acetic Acid Fermentation for Development of Alcohol-free Beverage
Kotaro Iwashita, Shin Yasuda, Naohiko Taga, Takeshi Shibata Tatsurou Murata, Yasushi Matsuda, Kensyou Honda, Tomohiro Araki, Kiyotaka Kabata 38

Structural Analysis of Cysteine Proteases from Ginger Produced in Kumamoto
Yuki Nishiyama and Tomohiro Araki 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dose Rate Effects of Gamma Ray Induced Mutation *in vitro Centrosema pascuorum* cv. Calvacade.

Anurug Poealm, R. Boonruang, P. Pongtongkam[1] and J. Arananant[2]

Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand
[1]Faculty of Science, Kasetsart University, Thailand
[2]Animal Nutrition Division, Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand

Callus induced from cotyledon explants of *Centrosema pascuorum* cv. Calvacade were cultured on MS medium (Murashige and Skoong, 1962) containing with 0.5 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 30 g/l sucrose and 2.6 g/l gellen guml. Callus were acutely irradiated at the dose of 0, 2, 4, 6, 8 and 10 Krad. Experiments were set up in a completely randomized design and repeated four times, with at 30 explants per treatment. After irradiation, all callus were cultured on MS medium supplemented with 3 mg/l 6-benzyladenine (BA) and 3 mg/l thidiazuron (TDZ), 30 g/l sucrose and 2.6 g/l gellen gum for 8 weeks. The results revealed that fifty percent lethal dose value was 6.3 Krad at 8 weeks after irradiation (LD50). Callus non irradiated were 6.35 shoots per callus and shoots higher than that of explants irradiated by dose higher than 2 Krad at 3.11 shoot per callus for 8 weeks. The number of shoots regenerated per explants also decreased with the increase of radiation dose. When concentration of gamma ray increased, plant growth decreased and abnormal characters occurred. The reduction of plant height, width and number of lateral branches were highly significantly and differ by increasing of irradiation dose. Mutation techniques have contributed significantly to plant improvement worldwide, and have made and outstanding impact on the productivity and value of some crop.

In vitro における *Centrosema pascuorum* cv. Calvacade の突然変異体作出のためのガンマ線照射の影響

Anurug Poealm・R. Boonruang・P. Pongtongkam・J. Arananant
(タイ国モンクット王ラカバン工科大学理学部・[1]タイ国カセサート大学理学部
[2]タイ国農業・協同組合省畜産局家畜栄養部)

Centrosema pascuorum cv. Calvacade の子葉から誘導したカルスは，0.5 mg/l 2,4-D を添加した 3%ショ糖を含むゲルライトで固形させた MS 培地で培養された．このカルスを用いて，0, 2, 4, 6, 8 および 10 Krad の異なる線量の放射線を照射した．本実験にあたり，30 個の外植片を同時に処理し，計 4 回の反復試験を行った．照射後，全てのカルスは，3 mg/l BA および 3 mg/l TDZ を添加した 3%ショ糖を含むゲルライト (0.26%) で固形させた MS 培地にて 8 週間培養された．その結果，照射後 8 週間における 50 % 致死率 (LD50) は 6.3 Krad の線量で認められた．放射線を照射しないカルスでは平均 6.35 本のシュート形成が認められ，この値は 2 Krad 以上の線量における平均 3.11 本のシュート形成率よりも高かった．1 外植片あたりのシュート再分化数についても，線量が増加するにつれ，その数は減少していた．ガンマー線の照射量が増大すると，植物の成長は弱まり，異常な形態をもつ個体が得られた．植物の高さ，特に，幅および側枝数の減少は顕著であり，これらは照射した線量によって異なっていた．ミューテーション技術は，植物の改良に広く利用されており，いくつかの作物の生産性や付加価値を与えている．

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย

ได้ตีพิมพ์ในวารสารดังต่อไปนี้

รัตนาภรณ์ บุญเรือง อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ จันทกานต์ อรณนันท์. 2554. การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสของใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคต (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade) การประชุมวิชาการทางพฤกษศาสาตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 5. หน้า 55.

รัตนาภรณ์ บุญเรือง อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ จันทกานต์ อรณนันท์. 2554. การเกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade. ว. วิทย. กษ. 42(2) (พิเศษ) 185-188.

Boonruang Ratanaporn. A., Poeaim, A., Jantakarn and P. Pongtongkam. 2012. An efficient protocol for shoot organogenesis and plant regeneration from callus of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade. 1st International Symposium on Technology for Sustainability (ISTS2011) 26-29 January KMITL Bangkok Thailand. P 42-45.

รัตนาภรณ์ บุญเรือง อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ จันทกานต์ อรณนันท์. 2556. การเพิ่มประสิทธิภาพการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคด (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade). การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51: สาขาพืช. กรุงเทพฯ .

Anurug Poeaim, Rattanaporn Boonruang, Pradit Pongtongkam and Arananant Jantakarn. 2013. Acute gamma irradiation dose on mutation induction of *in vitro Centrosema pascuorum* cv. Calvacade. the 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference: Agro-Industrial Biotechnology for Global Sustainable Prosperity. 16th - 19th October, at the Emerald Hotel, Bangkok, Thailand.

Poeaim A., R. Boonruang., P. Pongtongkam and J. Arananant. 2013. **Dose Rate Effects of Gamma Ray Induced Mutation *in vitro Centrosema pascuorum* cv. Calvacade. Proceeding of** The 17th Asian Agricultural Symposium, Prospects and Challenges of "the Sixth industry," or the Collaboration of Primary, Secondary and Tertiary Industry in Asia – For the Creation of a Sustainable and Independent Agriculture Tokai University. Choyo, Minamiaso, Kumamoto Pref., 869-1404 JAPAN

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก-1 **สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ** Murashige and Skoog (1962)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัม/ลิตร)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.5H_2O$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.33
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.25
Nicotinic acid	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Pyridoxine-HCl	0.5
Glycine	2.0
Myo-inosital	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์, อรุณี วงศ์ปิยะสถิต และสิรนุช ลามศรีจันทร์. 2531. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเขียว. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันวิจัย และพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ขนิษฐา บุรมย์. 2547. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วฮามาต้าและหญ้ารูซี่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ ฯ.

จันทกานต์ อรณนันท์. 2544. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าเนเปียร์แคระโดยรังสีแกมมากับการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จีระวัชร์ เข็มสวัสดิ์. 2544. รายงานความก้าวหน้าของโครงการพัฒนาการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชอาหารสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.จดหมายข่าวโครงการพัฒนาการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชอาหารสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. ปีที่ 1 ฉบับที่ 2 (พฤษภาคม-สิงหาคม 2544) หน้า 3-7.

จินดา สนิทวงศ์ฯ ประพฤทธิ์ จงใจภักดี พิมพาพร พลเสน. 2546. คุณค่าทางโภชนะของถั่วคาวาลเคดและระดับการเสริมถั่วคาวาลเคดในโคเนื้อ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2546 กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 264 – 276. น.

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

ชาตรี สิทธิกุล วิชา สอาดสุด และสุพรรณ ปัญญาฟู. 2537. การใช้สาร Ethyl Methanesulfonate กับถั่วเหลืองเพื่อชักนำให้ต้านทานโรค. เอกสารรายงานการประชุมทางวิชาการการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอาหารและการเกษตรโดยนิวเคลียร์II. การปรับปรุงพันธุ์พืช. วันที่ 25-27 พ.ค. 2537. กรุงเทพฯ.

ชิต ยุทธวรวิทย์ อิทธิพล เผาไพศาล วิรัช สุขสราญ และเฉลียว ศรีชู. 2538. การศึกษาผลผลิตและส่วนประกอบทางเคมีของถั่วสกุลเซนโตรซีมา (*Centrosema* spp.) ที่ปลูกในเขตทุ่งกุลาร้องไห้. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2538 กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์. หน้า 33-37.

ธนภักษ์ อินยอด. 2545. การชักนำให้เกิดกลายพันธุ์ในหญ้าอะตราตรัม โดยรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปกรณ์ ตั้งปอง, 2552. ผลของการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันและโครนิกต่อเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงอนูเบียสคอนเจนซิส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2546. พันธุศาสตร์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

มณฑา นันทพันธ์. 2535. โรคบางชนิดของถั่วเหลืองและถั่วเหลืองฝักสด และการป้องกันกำจัด. ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มณฑา นันทพันธ์ ศุภชัย แก้วมีชัย และปรีชา สุรินทร์. 2536. การประเมินความรุนแรงโรคแอนแทรคโนส ของถั่วเหลืองอาบรังสีและสายพันธุ์ดีสภาพไร่. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2533. ถั่วเหลือง ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร. 616-622. น.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : หลักการและเทคนิค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.

ศรัณย์ สุขวัฒน์. 2552. การปรับปรุงพันธุ์หญ้าไนล์ (*Acroceras macrum*) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศุภชัย แก้วมีชัย อลงกรณ์ กรณ์ทอง สิทธิ์ แดงประดับ มณฑา นันทพันธ์ และวิจิตร ขจรมาลี. 2534. การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองเพื่อต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนส: โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2531. ถั่วเหลือง. ศูนย์วิจัยพืชไร่ เชียงใหม่ สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 6-12.

นงลักษณ์ เทียนเสรี. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบีโกเนียเร็กซ์และผลของรังสีแกมมา. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2536. พันธุศาสตร์. เจ้าพระยาระบบการพิมพ์. กรุงเทพฯ. หน้า 640.

พีรเดช ทองอำไพ. 2537. ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์: แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. วิชัยการพิมพ์. กรุงเทพฯ. หน้า 196.

ศุภชัย แก้วมีชัย อลงกรณ์ กรณ์ทอง สิทธิ์ แดงประดับ มณฑา นันทพันธ์ และวิจิตร ขจรมาลี. 2534. การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองเพื่อต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนส:โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี.

สายัณห์ ทัดศรี. 2540. พืชอาหารสัตว์เขตร้อนการผลิตและการจัดการ. ภาควิชาพืชไร่นาคณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2536. การกลายพันธุ์ของพืช. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2541. การกลายพันธุ์และความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับรังสีและสารเคมีก่อกลายพันธุ์. ในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยเทคนิคการกลายพันธุ์. ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 73 – 90

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 40 – 44.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมจิตร อินทรมณี และธำรงศักดิ์ พลบำรุง. 2545. รายงานความก้าวหน้าของโครงการพัฒนาการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชอาหารสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. จดหมายข่าวโครงการพัฒนาการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชอาหารสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. ปีที่ 2 ฉบับที่ 4 (มกราคม-เมษายน 2545) หน้า 3-4.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. 2547. พันธุศาสตร์โมเลกุล. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี. หน้า 156 – 161.

สุมนา งามผ่องใส สมทรง โชติชื่น วิไลวรรณ พรหมคำ และอรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2547. การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์. การประชุมทางวิชาการถั่วเขียว แห่งชาติ ครั้งที่ 9. โรงแรมลำปางเวียงทอง จังหวัดลำปาง. หน้า 111-118.

สุพรรณี แก่นสาร. 2532. ผลของรังสีแกมมาต่อการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนในข้าว. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2522. การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้ต้านทานโรคใบด่างเหลืองโดยใช้รังสี. เอกสารเพื่อสรุปผลงานประจำปี 2522. โครงการแม่บทพัฒนาพืชโปรตีนสูง 3 มิถุนายน 2523. ณ ห้องประชุมสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 7 น.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2536. การกลายพันธุ์ของพืช. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สิรนุช ลามศรีจันทร์ อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์ สุมินทร์ สุมุทคุปต์ และธนพนธ์ จุนขุนทด. 2537. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลือง. รายงานการประชุมทางวิชาการ การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอาหารและการเกษตรโดยนิวเคลียร์เทคโนโลยี II. การปรับปรุงพันธุ์พืช. วันที่ 25-27 พ.ค. 2537. กทม.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. ปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืช. โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. เทคโนโลยีชีวภาพของพืช. โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.กรุงเทพฯ. หน้า 102.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม วิชุดา พิริยพลพงศ์ ศุภลักษณ์ มั่นไทย ศรัณย์ สุขวัฒน์ และ จันทกานต์ อรณนันท์. 2551. การเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสที่พัฒนามาจากไฮโพคอทิลของถั่วคาวาลเคด. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 5.8-9 ธันวาคม. 1139-1145 น.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ศรัณย์ สุขวัฒน์ จันทกานต์ อรณนันท์ และ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2556. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์โดยการฉายรังสีแกมมา ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51: สาขาพืช. กรุงเทพฯ.

อุไร เรืองณรงค์. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนาให้เกิดการกลายในต้นอเมซอนโดยใช้รังสีแกมมา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2530. วิธีปรับปรุงพันธุ์โดยการกลายพันธุ์. เอกสารคำสอน. ภาควิชารังสี ประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2541. หลักการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยรังสีในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด.ในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคการกลายพันธุ์. เอกสารคำสอน. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 97 – 111.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2550. การกลายพันธุ์ : เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อารีย์ วรัญญูวัฒน์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ. หน้า 133.

อาณัติ วัฒนสิทธิ์ สุมนา งามผ่องใส วันชัย ถนอมทรัพย์ และสุวิมล ถนอมทรัพย์. 2543. ถั่วเขียว พันธุ์ชัยนาท 72. การประชุมทางวิชาการถั่วเขียวแห่งชาติครั้งที่ 8. ณ ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัด นครปฐม. หน้า 53-62.

อมรา คัมภิรานนท์. 2540. พันธุศาสตร์ของเซลล์. มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์. กรุงเทพฯ.

Alam A.K.M.M. and Khaleque M.A. 2010. *In vitro* response of different explants on callus development and plant regeneration in groundnut (*Arachis hypogeae* L.). International Journal of Experimental Agriculture.vol. 1. pp. 1–4.

Angelon. P. N. , Rey. H.Y., and Mroginski. L.A. 1992. Regeneration of plants from callus tissue of the pasture legume *Centrosema brasilianum*. Plant Cell Rep 11:519-521.

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:nptII* fusion gene based vector. J. Biosci. 31(2), 236 – 245.

Arulbalachandran, D., Mullainathan, L., Karthigayan, S., Somasundaram, S.T. and Velu, S. 2010. Genetic variation in mutants of black gram (*Vigna mungo* L. hepper) evaluated by RAPD markers. India Journal Crop Science Biotech. 13(1): 1-6.

Angelon, P.N., Rey. H.Y. and Mroginski, L.A. 1992. Regeneration of plants from callus tissue of the pasture legume *Centrosema brasilianum*. Plant Cell Report. 11: 519-521.

Balarama, S. Yadav, P. and Padmaja, V. 2003. Shoot organogenesis and plantlet regeneration from leaf segments of pigeonpea. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 73: 197–200.

Basalma, D., Uranbey, S., Gurlek, D. and Ozcan, S. 2008. TDZ-induced plant regeneration in *Astragalus cicer* L. African Journal Biotechnology. 7: 955-959.

Bovo, O. A., Mroginski L. A. and Rey. H. Y. 1986 Regeneration of plants from callus tissue of the pasture legume *Lotononis bainessi*. Plant Cell Rep 5:295-297.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Capelle, S.C., Mok, D.W.S., Kirchner, S.C. and Mok, M.C. 1983. Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of n6-(δ 2-isopentenyl) adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. Plant Physiol. 73: 796-802.

Castillo, A.M., Egana, B., Sanz, J.M. and Cistue, L. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. Plant Cell Report. 17: 902-906.

Chee, P.P. 1990. High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. Horticultural Science. 25: 792-793.

Chotechuen, S., P. Nakeerak., A. Chinchest and S. Pichitporn. 1991. Improvement of Mungbean for Disease Resistance and a Better Agronomic Trait through Induced Mutation. Project Abstracts in Plant Mutation Breeding, Thailand 1986-1990.

Cooke, A.R. 1955. The effect of continuous gamma irradiation on the growth hormone content of green plants. In proceedings of the Oklahoma Academy of Science 36: 47-48.

Dang, W. and Wei, Z.M. 2008. High frequency plant regeneration from the cotyledonary node of common bean. Biologia Plantarum. 53 (2): 312-316.

Dhabhai, K. Sharma, M. and Batra, A. 2010. *In vitro* clonal propagation of *Acacia nilotica* (L.) a nitrogen fixingtree. Researcher. 2(3): 14-21.

Dilip, K.D., Prakash, N.S. and Sarin, N.B. 1998. An efficient regeneration system of black gram (*Vigna mungo* L.) through organogenesis. Plant Science. 134: 199-206.

Dipankar, C., Anindya, S. and Sampa, D. 2006. Efficient and rapid in vitro plant regeneration system for Indian cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) Plant Cell Tissue and Organ Culture. 86: 117–123.

Dixon, R.A. 1991. Plant Cell Culture. Practical Approach Series. Oxford. 236.

Dolendro, N.S., Sahoo, L., Sarin, N.B. and Jaiwal, P.K. 2002. The effect of TDZ on organogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp). Plant Science. 164: 341-347.

Evans, D.A., Sharp, W.R. and Bravo, J.E. 1984. The induction percentage of callus formation and dry weight of callus formed were increased with increasing incubation time. Cell culture methods for crop improvement. Hand Book of Plant Cell Culture.

Firoz, A., Sharmila, P. and Pardha, S.P. 2008. An optimal protocol for *in vitro* regeneration, efficient rooting and stable transplantation of chickpea. *Physiology* and Molecular Biology of *Plants.* V.14, Issue 4, 329-335.

Lethality Manual on Mutation Breeding, 2nd. International Atomic Energy Agency. Vienna.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Grattapaglia, D. and Sederoff, R. 1994. Genetic linkage maps of *Eukalyptus grandis* and *Eukalyptus Urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD marker. Genetic. 137: 1121-1137.

Gaul, H. 1977. Plant injury and Lethality Manual on Mutation Breeding, 2nd. International Atomic Energy Agency. Vienna.

Gaurav, K., P. S. Reddy., P. W.Ramjteke., P. Rambabu., S. S. Sohrab., D. Rana and P. Bhattachaya. 2011. *In vitro* regeneration through organogenesis and somatic embryogenesis in pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] cv. JKR105. Physiol Mol Biol Plants. 17(4): 375-385.

Godwin, I.D., Gordon, G.H. and Cameron, D.F. 1987. Plant regeneration from leaf-derived callus cultures of the tropical pasture Legume *Stylosanthes scabra* Vog. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 9: 3-8.

Gosal, S.S. and Bajaj, Y.P.S. 1979. Establishment of callus tissue cultures, and the induction of organogenesis in some grainlegume. Crop Improvement. 6: 154-160.

Grattapaglia, D. and Sederoff, R. 1994. Genetic linkage maps of *Eukalyptus grandis* and *Eukalyptus Urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD marker. **Genetic.** 137: 1121-1137.

HASANÇEBİ S., TURGUT K.N., ÇAKIR Ö., ARI Ş. 2010. Micropropagation and root culture of Turkish endemic *Astragalus chrysochlorus* Gaul, H. 1977. Plant injury and Heinz,

Ian, D.G., Gordon, G.H. and Cameron, D.F. 1987. Plant regeneration from leaf-derived callus cultures of the tropical pasture Legume *Stylosanthes scabra* Vog. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 9: 3-8.

Iqbal M.M., Nazir F., Iqbal J., Tehrim S. and Zafar Y. 2011. *In vitro* micropropagation of peanut (*Arachis hypogaea*) through direct somatic embryogenesis and callus culture. International Journal of Agriculture & Biology.Vol.13. No. 5. pp. 811–814.

Kartha, K.K., Pahl, K., Leung, N.L. and Mroginski, L.A., 1981. Plant regeneration from meristems of grain legumes–soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean. Canadian Journal of Botany. 59: 1671–1679.

Kaviraj, C. P., Kiran, G., Venugopal, R.B., Kavikishor, P.B. and Srinath, R. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledonary explants of green gram (*Vigna radiata* L. Wilezek.) – a recalcitrant grain Legume. In Vitro Cell Developmental *Biology* Plant. 42: 134–138.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kiran, S.G., Sujata, K.G., Rao, M.S. and Kishor, P.B.K.. 2010. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature explants of chickpea. Biologia Plantarum. 54(1): 121-125.

Mamun, A.N.K., Islam, R., Reza, M.A. and Joadar, O.I. 1996. In vitro differentiation of plantlet of tissue culture of *Samonea saman*. Plant Tissue Culture. 6: 1-5.

Meijer, E.G.M. 1982. High-frequency plant regeneration from hypocotyls and leaf derived tissue culture of tropical legume *Stylosanthes humilis*. Plant Physiol. 56:381-385.

Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473–497.

Mok, M.C., Mok, D.W.S., Armstrong, D. J., Shudo, K., Isogai, Y. and Okamoto, T. 1982. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-l,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). Phytochem. 21: 1509-1511.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473–497.

Palanivel, S., Parvathi, S. and Jayabalan, N. 2002. Callus induction and plantlet regeneration from mature cotyledonaury segments of groundnut *(Arachis hypogaea* l.) Journal of Plant Biology. 45(1): 22-27.

Polisetty, R., Paul, V., Deveshwar, J.J., Khetarpal, S., Suresh, K. and Chandra R. 1997. Multiple shoot induction by benzyladenine and complete plant regeneration from seed explants of chickpea *(Cicer arietinum* L.) Plant Cell Reports. 16: 565-571.

Radhakrishnan, R., Ramachandran, A. and Ranjitha, K.B.D. 2009. Rooting and shooting: dual function of thidiazuron in vitro regeneration of soybean (*Glycine max.* L). Physiol Plant. 31: 1213–1217.

Rotman, B. and Papermaster, B.W. 1966. Membrane properties of living mammalian cells as studied by hydrolysis of fluorogenic esters. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 55: 134–141.

Saleem, K., Farhad, A., Farhad, A., Hakim, K., Ayub, K. and Zahoor A.S. 2011. Callus induction via different growth regulators from cotyledon explants of indigenous chick pea (*Cicer arietinum* L.) cultivars KK-1 and Hassan-2K. African Journal of Biotechnology. 10(40): 7825-7830.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Saini, R. and Jaiwal, P.K. 2005. Transformation of a recalcitrant grain legume, *Vigna mungo* L. Hepper, using *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer to shoot apical meristem cultures. Plant Cell Report. 24: 164-171.

Sakthivelu, G., Akitha Devi, M.K., Giridhar, P., Rajasekaran, T., Ravishankar, G.A., Nedev, T. and Kosturkova, G. 2008. Droght-induced alterations in growth, osmotic potential and *in vitro* regeneration of soybean cultivars. General and Applied Plant Physiology. Special issue. 34 (1-2): 103-112.

Shagufta, N., Aamir, A., Siddique, F.A. and Javed, I. 2007. Multiple shoot formation from different explants of chick pea (*Cicer arietinum* L). Pakistan. Pak. Journal Botany.39(6): 2067-2073.

Shamsudeen, V. M., J. M. Sung., T. L. Jeng and C. S. Wang. 2006. Organogenesis of *Phaseolus angularis* L.: high efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N6-benzylaminopurine and thidizuron. Plant Cell tissue. 86:187-199.

Sparrow, A.H., Schairer, L.A. and Sparrow, R.C. 1963. Relationship between nuclear volume, chromosome number, and relative radio-sensitivities. Science. 141: 163-166.

Steward, N., Martin, R., Engasser, J.M. and Goergen, J.L. 1999. A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. Plant Cell Reports. 19:171–176.

Suleyman, C., Mustafa,Y., Ibrahim, H.C., Ahmet, B., Hakan, T. and Evrim S.A. 2010. Evaluation of 2,4-D and Dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays. Ecotoxicology and Environmental Safety. 73: 1558–1564.

Teitzel J.K., Burt R.L. 1976. Cenrrosema pubescens in Australia. Tropical Grassland 10: 5-14.

Thiagalingam, K., D.zuill and T. Price, 1997. A review of *Centrosema pascuorum* (Centurion) cv. Calvacade and Bunday as a pasture legume in the ley farming system studies in north west Australia. International grasslands. 10:43-44.

Thomas, L. N. and Gina M. 1997. Fluorescein diacetate as a viability stain for tree roots and seeds. Kluwer Academic Publishers. 14:221–232.

Topark-Ngarm, A. 1976. Effects of seeding rate and cutting frequency on forage yields of four *Stylosanthes* spp. Khon kaen University Pasture Improvement Project. Annual Report. 27-29.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wang, W., Cui, S.X., and Zhang, C.L. 2001. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of dune reed. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 67. 11-17.

Welsh, J. and Mcclelland, M. 1900. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primer. Nucleic *acids* Research. 18: 7213-7218.

Wi, S.G., Chung, B.Y., Kim, J., Kim. J., Baek, M. Lee, J. and Kim, Y. S. 2007. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. Micron. 38: 553-564.

Williams, J.G.K., Kuberik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic marker. Nucleic *acids* Research. 18: 6231-6235.

Wongpiyasatid, A., Chotechuen, S., Hormchan, P., Ngampongsai, S. and Promchum, W. 2000. Induced mutations in mungbean breeding: regional yield trial of mungbean mutant Lines. Natural Sciences Kasetsart Journal. 34: 443-449.

Xuejun, Y., Li, L., Guodao, L. and Zhiyong, W. 2011. Plant regeneration system from cotyledons-derived calluses cultures of *Stylosanthes guianensis* cv. 'Reyan 2'. African Journal of Biotechnology. 10(56): 11919-11924.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ ผศ. ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

Asst. Prof. Dr. Anurug Poeaim

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ 3101700024667

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 8

4. หน่วยงานที่สังกัด สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เลขที่ 1 ถนน ฉลองกรุง 1 เขต ลาดกระบัง กรุงเทพ 10520.
โทร 02-3298000-99 ต่อ 6223, มือถือ 081-7321658 โทรสาร 02-3298427
E-mail : kpanurug@kmitl.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญาตรี โท เอก	อักษรย่อและปริญญา	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2531	ตรี	วท.บ วิทยาศาสตรบัณฑิต	วิทยาศาสตร์	ชีววิทยา	ศรีนครินทรวิโรฒ	ไทย
2535	โท	วท.ม วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	วิทยาศาสตร์	พันธุศาสตร์	เกษตรศาสตร์	ไทย
2548	เอก	Dr. Sci. in Agr.		Plant Breeding and Molecular Genetics	Kyushu Tokai University	Japan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ระบุสาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการฉายรังสี และสารเคมี ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การย้ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรียม และเครื่องยิงยีน การจำแนกสายพันธุ์โดยเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

รางวัลและเกียรติประวัติที่เคยได้รับ

1990-1991	Thesis of Master Degree at Kasetsart university	National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (NCGEB) Bangkok ,Thailand.
1995-1998	Plant tissue culture of Rice and Corn	National Research Council of Thailand
1995	Visiting at Kyushu Tokai University. Japan.	Visiting scholar under the Acadermic Exchang Program between King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Thailand and Kyushu Tokai University Japan
1996-1998	Thai rice genetic transformation by Agrobacterium	The Rockefeller Foundation USA
2001	Visiting at Kyushu Tokai University. Japan.	Visiting scholar under the Acadermic Exchang Program between King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Thailand and Kyushu Tokai University Japan
2002-2005	Doctural Degree at Kyushu Tokai University , Japan.	Visiting scholar under the Acadermic Exchang Program between King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Thailand and Kyushu Tokai University Japan
2006-2009	Improvement of Nile Grass (*Acrocras macrum* Stapf) by Tissue Culture.	National Research Council of Thailand
2009-2010	Genetics variation of *Ficus* sp.	Faculty of Science KMITL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2010-2011	Genetic diversity in *Passiflora* spp.	Faculty of Science KMITL
2009-2011	Mass Propagation of *Jatropha curcas* L. by Tissue Culture for Agricultural and Studies on Genetic Diversity	National Research Council of Thailand
2011-2012	Improvement of *Centrosema pascuorum* cv Cavalcade for virus resistance by tissue culture	National Research Council of Thailand
2013	Study on factor for plant regeneration of Hoya	Faculty of Science KMITL
2013	Study on cost and time to produce of Rhizoma peanut (*Arachis glabrata*) by tissue culture and to determine the mutation after culturing	Fund of King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และนิตย์ศรี แสงเดือน. 2535. กราฟการเติบโตของเซลล์ในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของข้าวโพด ลูกผสมSW3 x INV. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 30. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 358 น.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และนิตย์ศรี แสงเดือน. 2535. การแยกโพรโทพลาสต์จากส่วนของใบอ่อนของข้าวโพด 5 สายพันธุ์.ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 18. 704 น.

นิตย์ศรี แสงเดือน อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม กมลพรรณ นามวงศ์พรหม เดชา บุญมะลิช้อน ชำนาญฉัตรแก้ว ราเชนทร์ ถิระพร และ Bernd Buter. 2536. เทคโนโลยีชีวภาพ ของ *Zea may* L:การประยุกต์ใช้ในโครงการปรับปรุงข้าวโพด. การแสดงแบบโปสเตอร์ การสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 8. 29 มีนาคมถึง 1 มีนาคม 2536 ณ สถาบันพัฒนาวิชาการ สาธารณสุขอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดลศาลายา นครปฐม 89น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิตย์ศรี แสงเดือน อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม กมลพรรณ นามวงศ์พรหม ประศาสตร์ เกื้อมณี และ ชำนาญ ฉัตรแก้ว. การชักนำให้เกิดเป็นต้นจากแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงเอมบริโออ่อนของข้าวโพด. วารสารวิทยาศาสตร์ การเกษตรฉบับที่ 26 (4-6) 67 - 79 น.

Poeaim, A., N. Sangduen., S. Pongchareankit, W, Boonmee and W. Kaewbunsong. 1995. Growth Curve of KAO-DAWK-MALI 105 rice (Oryza Sativa L .) Suspension Culture. p 204. In International conference on Biotechnology Research and Application for Sustainable in Development. Chulabhorn Research Institute, (BRASD) August 7-10, Bangkok. (poster)

Poeaim, A., and N. Sangduen. 1995. Protoplast Isolation and Culture from Cell Suspension Culture by using KAO-DAWK-MALI 105 Rice Callus (*Oryza sativa* L.). p 115. abstracts of the Third Asia -Pacific Conference on Agricutural Biotechnology : Issues and Choices. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) and National Science and Technology Development Agency (NSTDA). November 10-15. Prachuapkhirikhan, Thailand

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และนิตย์ศรี แสงเดือน. 2539. การแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์บาสมาติ 370. วารสารวิทยาศาสตร์ ลาดกระบัง ปีที่ 6 ฉบับที่ 1 70-79 น.

Klamsomboon, P, A, Poeaim and N. Sangduen. 1997. Enhancement of Embryogenic Callus Production and an Established Cell Suspension Culture of Indica Rice. Abstracts of General Meeting of The International Program on Rice Biotechnology.15-19 September. Malacca, Malaysia.

Poeaim A. 1998. Gene Transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in Khao Ta Hang 17 rice (*Oryza sativa* L.). Abstract of The 10th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology A nd The 1998 Annual Meeting of the Nation Center for Genetic Engineering and Biotechnology on Biotechnology for a Self-Sufficient Economy. 25-27 November. Bangkok, Thailand. 79 .

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2542. การแสดงออกของยีนในแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว123 โดยอโกรแบคทีเรียม. ในรายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37. ระหว่างวันที่ 3-5 กุมภาพันธ์. 224-229 น.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ นิตย์ศรี แสงเดือน. 2542. การเจริญเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. ในรายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37. ระหว่างวันที่ 3-5 กุมภาพันธ์. 230-236 น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2542. การแสดงออกของยีนในแคลลัสของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยอโกรแบคทีเรียม 3 สายพันธุ์. ในเอกสารประกอบ การประชุมทางวิชาการ 30 ปี เกษตรเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. ระหว่าง วันที่ 24-25 มิถุนายน. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 343-349 น.

Poeaim, A and C, Sallaud. 1999. Thai rice Genetic Transformation by *Agrobacterium*. Abstracts of General Meeting of The International Program on Rice Biotechnology. Phuket. Thailand.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ นิตย์ศรี แสงเดือน. 2543. การเจริญของแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123. ในรายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. ระหว่าง วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์. 472-479 น.

Poeaim, A and N. Sangduen. 2000.*Agrobacterium*-mediated Transformation using Embryogenic Rice Suspension Culture. Abstract for *The International Conference* Tropical Agriculture Technology for Better Health and Environment. Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom Thailand.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และนิตย์ศรี แสงเดือน 2544 . การเจริญเป็นต้นใหม่ของเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60. ในรายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ครั้งที่ 39. ระหว่าง วันที่ 5-7 กุมภาพันธ์ 174-180 น.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ นิตย์ศรี แสงเดือน. 2544. การย้ายยีนในเซลล์แขวนลอยของข้าวสายพันธุ์สุพรรณบุรี 60. ในสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12 ระหว่างวันที่ 28-30 มีนาคม 2544. 150-154

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ นิตย์ศรี แสงเดือน. 2545. การแสดงออกของยีนในแคลลัสและไมโครแคลลัสของข้าวสายพันธุ์ชัยนาทโดยอโกรแบคทีเรียม 3 สายพันธุ์. ในรายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40. ระหว่างวันที่ 4-7 กุมภาพันธ์. 256-262 น.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และนิตย์ศรี แสงเดือน. 2545. การถ่ายยีนในแคลลัสข้าวโพดหวานพันธุ์ อินทรีย 2 โดยเชื้ออโกรแบคทีเรียม 2 สายพันธุ์. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า ปีที่ 19 ฉบับ ที่ 2 60-66 น.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ยาสุชิ มัสสุดะ และ ทัสสุโระ มุระตะ. 2548. การศึกษาผลของความดันและระยะทางจากเครื่องยิงอนุภาคต่อไมโครแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากเซลล์แขวนลอยของหญ้าสายพันธุ์"ยูคิกิรุชิ" (*Zoysia japonica*) การประชุมพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5 ระหว่างวันที่ 26-29 เมษายน.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ปราการ กระถินทอง และ นิตย์ศรี แสงเดือน. 2548. ชนิดของอะโกรแบคทีเรียมที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนในแคลลัสของข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี1. ในรายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. ระหว่างวันที่ 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 565-572 น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Poeaim, A, Y, Matsuda and T. Murata. 2004. Optimization of callus induction and plant regeneration from seed explants of Zoysia species. J Jpn Soc Turfgrass Sci 31:3-10.

Poeaim, A., Y, Matsuda, T, Inoue, T, Shigeyasu and Tatsuro Murata. 2004. Estiblishment of plant regeneration systems from callus in the lawn grass (*Zoysia minima*) collectioned from New Zealand. Breeding research. Ikushugaku Kenkyu. Japan.

Poeaim, A., Y, Matsuda, and T.Murata. 2005. Callus formation and plant regeneration fro shoot tip of Zoysis species. Proceedings of the school of agriculture, Kyushu Tokai University. Vol 24:29-36.

Poeaim, A., Y, Matsuda and T. Murata. 2005. Plant regeneration from immature florescence of zoysiagrass. Plant Biotechnology. 22(3), 245-248.

Poeaim, A., Y, Matsuda and T. Murata. 2005. Callus induction and plant regeneration from seeds and shoot tip explants of *Zoysia minima* collected from New Zealand. J Jpn Soc Turfgrass Sci. Vol 34(1) 1-7.

Poeaim, A., K. Meepian , J. Benjanukrom and N. Sangduen. 2006. Plant regeneration from suspension Culture of RD 6 and Chainat rice (*Oryza sativa* L.). Conference Science and Technology Thammasat University.

Poeaim, A., O. Chonvanich and S. Amnuaypanich. 2006. Plant regeneration from somatic embryogenesis in Bermudagrass. International Conference on Applied Science (ICAS-2006) Vientiane, 5-7 November. Loa. 296-300.

Poeaim, A., S. Sukhawat and S. Hungtrakul. 2006. Regeneration of Ruzi grass (*Brachiaria ruziziensis*) by Tissue culture. The 6th National Horticultural Congress.7-10 November. Lutus Hotel Pang Suan Kaew Chiang Mai. Thailand. 909-912.

Poeaim, A. T. Wongkankha and S. Jayasuta. 2007. Efficiency of gene transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in tissue of F60 grass (*Zoysia japonica*). 45th Kasetsart University Annual Conference. 30 January-2 February. 45. 224-229.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม นิตย์ศรี แสงเดือน ชาญวิทย์ ม่วงมิตร และ ชำนาญ ฉัตรแก้ว . 2550. การเจริญเป็นแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของเนื้อเยื่อสบู่ดำสายพันธุ์ สมก. ในโครงการสัมมนาวิชาการ เรื่อง การประชุมวิชาการสบู่ดำ แห่งชาติ ครั้งที่ 1 จัดโดย สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งหมาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์. หน้า 119-123.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Poeaim, S., A. Poeaim and K. Soytong. 2007. Determination of the genetic relationship of Vanilloideae (Orchidaceae) based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. Proceedings of the International Conference on Science and Technology for Sustainable Development. Bangkok, Thailand. 26-27 April. 514-517.

Poeaim. A., S. Poeaim and N. Sangduen. 2007. Gene Transformation in Calli of Supunburi 1 Rice (*Oryza sativa* L.) by *Agrobacterium tumefaciens.* BioAsia 2007 Thailand Pre-Conference Seminars 5-6 November, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. 385-391.

Poeaim, A., Y. Matsuda and T. Murata. 2008. Effect of pressure and distance of grass variety "V.102" (*Zoysia minima*) microcallus from suspension culture using particle bombardment. 46th Kasetsart University Annual Conference. 29 January - 1 February. 609-615.

Poeaim, A., S, Sukhawat., A, Jantakarn and P. Pongtongkam. 2008. Induction embryogenic callus and plant regeneration of Nile grass (*Acroceras macrum*). 46th Kasetsart University Annual Conference. 29 January-1 February. 603-608น.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม วิชุดา พิริยพลพงศ์ ศุภลักษณ์ มั่นไทย ศรัณย์ สุขวัฒน์ และ จันทกานต์ อรณนันท์. 2551. การเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสที่พัฒนามาจากไฮโพคอทิลของถั่วคาวาลเคด. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 5.8-9 ธันวาคม.1139-1145 น.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ศรัณย์ สุขวัฒน์ จันทกานต์ อรณนันท์ และ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2552. การพัฒนาเป็นต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนของหญ้าไนล์. วารสารพันธุศาสตร์ 2(1) 30-35 น.

Sukhawat, S and A. Poeaim. 2009. Efficiency of gene transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in Node tissue of Nilegrass (*Acroceras macrum*). The International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences in Collaboration with Kasetsart University 23-27 Febuary the Emerald hotel, Rachadapisek Road, Bangkok Thailand. 99-106.

ศรัณย์ สุขวัฒน์ และ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2552. ผลของสภาวะแล้งจากการชักนำด้วย PEG ต่อการพัฒนาเป็นต้นในเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์. การประชุมทางวิชาการ พันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 16. 281-286 น.

ศิริพร ขุนศรี และ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2552. การขยายพันธุ์ของวานิลา (*Vanilla planifolia* Andr.) จากการเพาะเลี้ยงตาข้างในสภาพปลอดเชื้อ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาพืช. กรุงเทพฯ, 630-635 น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศรัณย์ สุขวัฒน์ และ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2552. การชักนำให้เกิดเป็นยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงส่วนข้อของหญ้าไนล์ในสภาพปลอดเชื้อ. ว. วิทย. กษ. 40:1 (พิเศษ) 197-200.

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม มธุรา อุณหศิริกุล อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ โองการ วณิชาชีวะ. 2554. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของจักรนารายณ์บริเวณ *trn*L intron ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ. เอกสารรวมผลงานการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 17: การวิจัยพันธุศาสตร์เพื่อแปลผลสู่การประยุกต์. โรงแรมอิมพีเรียลแม่ปิง จังหวัดเชียงใหม่. ระหว่างวันที่ 7-9 เมษายน 2554. 199-202.

รัตนาภรณ์ บุญเรือง อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ จันทกานต์ อรณนันท์. 2554. การเกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade. ว. วิทย. กษ. 42(2) (พิเศษ) 185-188.

รัตนาภรณ์ บุญเรือง อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ จันทกานต์ อรณนันท์. 2554. การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสของใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคต (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade) การประชุมวิชาการทางพฤกษศาสาตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 5. หน้า 55.

รัตนาภรณ์ บุญเรือง และ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2554. การศึกษาการเจริญของเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากส่วนของใบเลี้ยงของถั่วท่าพระสไตโล (*Stylosanthes guianesis* CIAT 184) การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49: สาขาพืช. กรุงเทพฯ

Boonruang Ratanaporn. A., Poeaim, A., Jantakarn and P. Pongtongkam. 2012. An efficient protocol for shoot organogenesis and plant regeneration from callus of *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade. 1st International Symposium on Technology for Sustainability (ISTS2011) 26-29 January KMITL Bangkok Thailand. p. 42- 46.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และ ทัศนารถ กระจ่างวุฒิ. 2556. Genetic Diversity in *Passiflora* spp. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 18. Thai J. Genet. S(1): 214-217.

รัตนาภรณ์ บุญเรือง อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ จันทกานต์ อรณนันท์. 2556. การเพิ่มประสิทธิภาพการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคด (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade). การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51: สาขาพืช. กรุงเทพฯ.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ศรัณย์ สุขวัฒน์ จันทกานต์ อรณนันท์ และ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2556. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์แขวนลอยของหญ้าไนล์โดยการฉายรังสีแกมมา ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51: สาขาพืช. กรุงเทพฯ.

Poeaim, Anurug., Rattanaporn, Boonruang, Pradit, Pongtongkam and Arananant, Jantakarn. 2013. Acute gamma irradiation dose on mutation induction of *in vitro Centrosema*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pascuorum cv. Calvacade. the 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference: Agro-Industrial Biotechnology for Global Sustainable Prosperity. 16th - 19th October, 2013 at the Emerald Hotel, Bangkok, Thailand.

Poeaim, A., R. Boonruang., P. Pongtongkam and J. Arananant. 2013. Dose Rate Effects of Gamma Ray Induced Mutation *in vitro Centrosema pascuorum* cv. Calvacade. Proceeding of The 17th Asian Agricultural Symposium, Prospects and Challenges of "the Sixth industry," or the Collaboration of Primary, Secondary and Tertiary Industry in Asia – For the Creation of a Sustainable and Independent Agriculture Tokai University. Choyo, Minamiaso, Kumamoto Pref., 869-1404 JAPAN

Ailada Chaiyabut, Supattra Poeaim, Anurug Poeaim and Kasedis Distabanjong. 2014. Genetic diversity analysis of sugarcane (*Saccharum* sp.) in Thailand using RAPD technique. Journal of Agricultural Technology 2014 Vol. 10(1):159-165.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้