อิทธิพลของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ของถั่วลิสงเถา (*Arachis glabrata*)

EFFECTS OF MEDIUM AND PLANT GROWTH REGULATORS ON REGENERATION OF PERENNIAL PEANUT (*Arachis glabrata*)

อภิสรา ผลจัด

APISARA PHOLJAD

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2564

KMITL-2021-SC-M-020-036

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECTS OF MEDIUM AND PLANT GROWTH REGULATORS ON REGENERATION OF PERENNIAL PEANUT (*Arachis glabrata*)

APISARA PHOLJAD

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2021

KMITL--2021-SC-M-020-036

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2021
SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	อิทธิพลของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของถั่วลิสงเถา (*Arachis glabrata*)
ชื่อนักศึกษา	นางสาวอภิสรา ผลจัด
รหัสประจำตัว	61605070
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2564
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

ถั่วลิสงเถา หรือ *Arachis glabrata* Benth. เป็นพืชอายุหลายปี มีลำต้นใต้ดิน ซึ่งเป็นพืชอาหารสัตว์เขตร้อน และมีคุณค่าทางโภชนะที่สูง เหมาะสำหรับปลูกผสมกับหญ้าให้สัตว์แทะเล็ม ใช้เป็นพืชคลุมดินเพื่อรักษาสภาพหน้าดิน อีกทั้งยังสามารถทนต่อสภาพแห้งแล้งได้เป็นอย่างดี ในการขยายพันธุ์ในธรรมชาติของถั่วลิสงเถากลาบราต้านั้นพบว่าต้องใช้เหง้าที่อยู่ใต้ดินเท่านั้น เนื่องจากไม่สามารถผลิตเมล็ดได้ จึงศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วลิสงเถาเพื่อเพิ่มปริมาณต้นพืชและพัฒนาสายพันธุ์ให้ดียิ่งขึ้น พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อข้อและใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook Ecoturf และ Florigraze ด้วยเมอคิวริคคลอไรด์ ที่เสริมด้วย antibiotic cefotaxime และ PPM สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี จากนั้นเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA KN *m*T หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.5 0.75 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า *m*T นั้นส่งเสริมให้เกิดการชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่า BA และ TDZ ในทุกสายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สำหรับสายพันธุ์ Arbrook การเพาะเลี้ยงใน *m*T ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้นส่งผลให้เกิดการเกิดยอดและความยาวยอดสูงที่สุด ได้แก่ ร้อยละ 60 และ 22.42 มิลลิเมตร ตามลำดับ สายพันธุ์ Ecoturf พบว่า *m*T ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดและความยาวยอดสูงที่สุด ได้แก่ ร้อยละ 60 และ 18.75 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสำหรับสายพันธุ์ Florigraze เมื่อเพาะเลี้ยงใน *m*T ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีร้อยละการเกิดยอดและความยาวยอดสูงที่สุด ได้แก่ ร้อยละ 70 และ 18.43 มิลลิเมตร ตามลำดับ และพบว่าจากการชักนำข้อให้เกิดเป็นยอดนั้นมีการเจริญเติบโตของแคลลัสร่วมด้วย หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ในการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถาทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสมากที่สุดในทุกสายพันธุ์ โดยพบว่าในสายพันธุ์ Arbrook นั้นแคลลัสมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 56.67 และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.810 กรัม สำหรับ สายพันธุ์ Ecoturf นั้นพบว่าแคลลัสมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดร้อยละ 100 และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.685 กรัม และสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Florigraze แคลลัสมีการเจริญเติบโตสูงสุดถึงร้อยละ 100 และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 0.513 กรัม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย สำหรับสายพันธุ์ Arbrook ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงที่สุดในระยะเวลา 12-24 วัน สายพันธุ์ Ecoturf ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงที่สุดในระยะเวลา 12-27 วัน และสายพันธุ์ Florigraze ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงที่สุดในระยะเวลา 9-24 วัน

การศึกษาการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่จากแคลลัสของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf โดยเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในสภาวะมีแสง 24 ชั่วโมง พบว่ามีการเกิดกระบวนการโซมาติกเอมบริโอเจเนซิสและเจริญเติบโตเป็นยอดได้ร้อยละ 30 และมีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 7 ยอดต่อแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำการยืดยอดด้วย GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีจำนวนยอดและความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 28.33 ยอดต่อแคลลัส และ 13.04 มิลลิเมตร ตามลำดับ

การศึกษาการชักนำให้เกิดรากของถั่วลิสงเถาสายพันธุ์ Ecoturf เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ AC ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์นั้น มีการเจริญเติบโตของรากมากที่สุดร้อยละ 70 และมีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 3 รากต่อยอด และสายพันธุ์ Florigraze เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี *m*T ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ AC ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากมากที่สุดร้อยละ 50 และมีจำนวนรากมากที่สุดเท่ากับ 3.75 รากต่อยอด นำต้นกล้าของถั่วลิสงเถากลาบราต้าที่ได้จากการทดลองมาทำการออกปลูกและปรับสภาพ พบว่าต้นถั่วลิสงเถากลาบราต้ามีความแข็งแรงและเจริญเติบโตต่อไปได้

คำสำคัญ : การเจริญเป็นต้นใหม่ การชักนำยอด ถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook Ecoturf และ Florigraze

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Effects of Medium and Plant Growth Regulators on Regeneration of Perennial Peanut (*Arachis glabrata*)
Student Name	Miss Apisara Pholjad
Student ID	61605070
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2021
Thesis advisor	Assoc. Prof. Dr. Anurug Poeaim

Abstract

Rhizoma peanut or *Arachis glabrata* Benth. It is a perennial plant and has underground stems. Which is a tropical forage plant having high nutritional values appropriate for field planting mixed with the grass, used as a ground cover to maintain soil conditions. It is able to the high efficiency of resist drought. The natural propagation of *A. glabrata* was used only underground rhizomes due to the inability to produce seeds. Therefore, the study was used tissue culture propagation and to development of *A. glabrata* species. It was found on studied sterilization node and leaf segment of *Arachis glabrata* cv. Arbrook Ecoturf and Florigraze used mercuric chloride ($HgCl_2$) supplemented with the antibiotic cefotaxime and PPM were induced to inhibit the growth of microorganisms. The nodal segment was cultured in MS medium supplemented with plant growth regulators in cytokinin group different concentrations at 0.5, 0.75, 1, 2, 3 and 5 mg/L of BA KN *m*T or TDZ. It was found that assisting shoot induction *m*T is better than BA and TDZ in all cultivars. In the part of Arbrook found the maximum growth rate and highest of shoot induction when cultured on 3 mg/L of *m*T at 60% and 22.42 mm, respectively. For Ecoturf found that the maximum growth rate and highest of shoot induction when cultured on 2 mg/L of *m*T at 60% and 18.75 mm, respectively. And Florigraze found the maximum growth rate and shoot induction when cultured on 5 mg/L of *m*T at 70% and 18.43 mm, respectively. From the results, it was found that shoot induction common to the callus growth together after 4 weeks.

In this studies, callus induction from leaf of 3 species on *A. glabrata* were cultured on MS medium supplemented with different concentrations at 0.5, 1, 2, 3 and 5 mg/L of 2,4-D. The results found that at 3 mg/L of 2,4-D, it shows most calli growth in all species. For Arbrook found the maximum growth rate of callus induction at 56.67% and the highest average of weight at 0.810 g. For Ecoturf found that the maximum growth rate of callus induction at 100% and the highest average of weight at 0.685 g.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

And Florigraze found that the maximum growth rate of callus induction at 100% and the highest average of weight at 0.513 g after 4 weeks. After that, studying the pattern of growth cell suspension. For Arbrook cultured on synthetic liquid medium supplemented with 3 mg/L of 2,4-D, the fresh and dry weight was the highest average in the period of 12-24 days. For Ecoturf cultured on synthetic liquid medium supplemented with 3 mg/L of BA, the fresh and dry weight was the highest average in 12-27 days. And Florigraze cultured on synthetic liquid medium supplemented with 3 mg/L of TDZ found that the fresh and dry weight was the highest average in 9-24 days.

The study on the regeneration from callus development of *A. glabrata* cv. Ecoturf when cultured on MS solid medium supplemented with 3 mg/L of BA and 0.15% AC in 24 hours of the light condition. The resulting somatic embryogenesis and growth rate of multiple shoots at 30% and had of shoots was 7 shoots/callus for 12 weeks. Then, the shoot was extended with 2 mg/L of GA_3 as a result, the number of shoots and average length were 28.33 shoots/callus and 13.04 mm, respectively.

The study on root induction of *A. glabrata* cv. Ecoturf when cultured on MS medium supplemented with 3 mg/L of BA combined at 2 mg/L of NAA and 0.15% AC. Found that the highest root growth rate was 70% and the average root number was 3 roots/shoot and Florigraze when cultured on MS medium supplemented with 5 mg/L of *m*T combined at 2 mg/L of NAA and 0.15% AC. Found that the highest root growth rate was 50% and the root number was 3.75 roots/shoot. The plantlet of the *A. glabrata* obtained from the tissue culture method was acclimatization. It was found that the plantlet was strong and able to continue growing.

Keywords : Regeneration, Shoot induction, *A. glabrata* cv. Arbrook, cv. Ecoturf, cv. Florigraze.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่อง “อิทธิพลของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ของถั่วลิสงเถา (*Arachis glabrata*)” ฉบับนี้สำเร็จลงไปด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำและปรึกษาตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความใส่ใจเป็นอย่างยิ่ง ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจสอบความถูกต้อง พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี ซึ่งให้ความอนุเคราะห์ต้นถั่วลิสงเถาทั้ง 3 สายพันธุ์ และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องต่าง ๆ รวมถึงอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ในท้ายที่สุดนี้ขอขอบพระคุณครอบครัวอันเป็นที่รัก คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน และคอยเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจทุกท่าน หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีสิ่งที่ขาดตกบกพร่องหรือผิดพลาดประการใด ผู้เขียนต้องขออภัยเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้ด้วย

นางสาว อภิสรา ผลจัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค
กิตติกรรมประกาศ..... จ
สารบัญ..... ฉ
สารบัญตาราง..... ญ
สารบัญรูปภาพ..... ฐ
คำย่อ/สัญลักษณ์..... ท
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย..... 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3
2.1 ข้อมูลทั่วไปของถั่วลิสงเถากลาบราต้า..... 3
2.1.1 อนุกรมวิธาน..... 3
2.1.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*Arachis glabrata*)..... 3
2.1.3 การเพาะปลูกในธรรมชาติของถั่วลิสงเถากลาบราต้า..... 4
2.1.3.1 การเตรียมวัสดุเพาะปลูก..... 4
2.1.3.2 การเพาะกล้าด้วยท่อนพันธุ์..... 5
2.1.3.3 การดูแลต้นกล้าพันธุ์..... 5
2.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook..... 5
2.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf..... 6
2.4 ถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Florigraze..... 7
2.5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 8
2.6 ธาตุอาหารและอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 9
2.6.1 ธาตุอาหารอนินทรีย์..... 9
2.6.1.1 แร่ธาตุอาหารหลัก..... 9
2.6.1.2 แร่ธาตุอาหารรอง..... 9
2.6.2 ธาตุอาหารอินทรีย์..... 9
2.6.2.1 คาร์โบไฮเดรต..... 9
2.6.2.2 วิตามิน..... 9
2.6.2.3 กรดอะมิโน..... 9
2.6.2.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช..... 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6.2.5 วุ้น 11
2.6.2.6 ผงถ่านกัมมันต์ 11
2.6.2.7 ความเป็นกรด-ด่าง 11
2.7 การฟอกฆ่าเชื้อ 12
2.7.1 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ 12
2.8 การเพาะเลี้ยงแคลลัส 12
2.9 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย 13
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 13
2.10.1 การฟอกฆ่าเชื้อ 13
2.10.2 การชักนำให้เกิดยอดจากข้อ 14
2.10.3 แคลลัส และการเจริญเป็นต้นใหม่ 15
2.10.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย 17
2.10.5 การชักนำให้เกิดราก 18
2.10.6 การออกปลูกต้นกล้า 19
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 20
3.1 วัสดุและอุปกรณ์ 20
3.1.1 สายพันธุ์ถั่วลิสงเถากลาบราต้าที่ใช้ในการทดลอง 20
3.1.2 ภาชนะและอุปกรณ์ 20
3.1.3 เครื่องมือวิทยาศาสตร์ 20
3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 21
3.1.4.1 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ 21
3.1.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการปรับความเป็นกรด-ด่าง 21
3.1.4.3 อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 21
3.1.4.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 21
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย 22
3.2.1 การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช 22
3.2.1.1 ชิ้นส่วนข้อ 22
3.2.1.2 ชิ้นส่วนใบ 22
3.2.2 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด 23
3.2.2.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook 23
3.2.2.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf 23
3.2.2.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze 24
3.2.3 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำใบให้เกิดแคลลัส 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.3.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook..... 24
3.2.3.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf..... 25
3.2.3.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze..... 25
3.2.4 การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย..... 26
3.2.4.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook..... 26
3.2.4.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf..... 26
3.2.4.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze..... 27
3.2.5 การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมะสมต่อการพัฒนาแคลลัสให้เกิดยอดใหม่อย่างสมบูรณ์..... 28
3.2.5.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook..... 28
3.2.5.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf..... 28
3.2.5.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze..... 29
3.2.6 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากและการออกปลูกต้นกล้าในธรรมชาติ..... 30
3.2.6.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf..... 30
3.2.6.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze..... 30
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล..... 32
4.1 ผลการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชในสภาวะปลอดเชื้อ..... 32
4.1.1 ชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า..... 32
4.1.2 ชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า..... 34
4.2 ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการการชักนำข้อให้เกิดยอดอย่างสมบูรณ์..... 36
4.2.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook..... 36
4.2.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf..... 40
4.2.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze..... 44
4.3 ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำใบให้เกิดแคลลัส..... 48
4.3.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook..... 48
4.3.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf..... 51
4.3.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze..... 54
4.4 ผลการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย..... 57
4.4.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook..... 57
4.4.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf..... 60
4.4.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze..... 63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5 ผลการศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการพัฒนาแคลลัสให้เกิดยอดใหม่อย่างสมบูรณ์ 66
4.5.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook 66
4.5.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf 70
4.5.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze 83
4.6 ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำรากและการออกปลูกต้นกล้าในธรรมชาติ 90
4.6.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf 90
4.6.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze 94
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 97
5.1 สรุปผลการวิจัย 97
5.2 ข้อเสนอแนะ 101
เอกสารอ้างอิง 102
ภาคผนวก 108
ภาคผนวก ก 109
ประวัติผู้เขียน 110

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้าทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยการใช้เมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.18 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ antibiotic cefotaxime PPM 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์..... 33

4.2 ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยการใช้เมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ antibiotic cefotaxime PPM 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 10 นาที เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์..... 35

4.3 ผลการชักนำข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook ให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 37

4.4 ผลการชักนำข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 41

4.5 ผลการชักนำข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze ให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA KN *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 45

4.6 ผลการชักนำใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook ให้เกิดแคลลัสบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 49

4.7 ผลการชักนำใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ให้เกิดแคลลัสบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 52

4.8 ผลการชักนำใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze ให้เกิดแคลลัสบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 55

4.9 ผลแสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเซลล์แขวนลอยในถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 36 วัน 58

4.10 ผลแสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเซลล์แขวนลอยในถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 36 วัน..... 61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.11 ผลแสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเซลล์แขวนลอยในถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 36 วัน..... 64

4.12 ผลการชักนำให้เกิดการเจริญของแคลลัสที่ได้จากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงที่ 0.1 กรัม ในระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 67

4.13 ผลการชักนำให้เกิดการเจริญของแคลลัสที่ได้จากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงที่ 0.1 กรัม ในระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 71

4.14 ผลการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจำนวนมาก (multiple shoot) จากแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาวะแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในระยะเวลา 12 และ 16 สัปดาห์..... 76

4.15 ผลการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจำนวนมาก (multiple shoot) จากแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาวะแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 28 สัปดาห์..... 77

4.16 ผลการยืดยอดของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ GA_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 80

4.17 ผลการชักนำให้เกิดการเจริญของแคลลัสที่ได้จากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงที่ 0.1 กรัม ในระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 84

4.18 ผลการชักนำให้เกิดการเจริญของแคลลัสที่ได้จากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงที่ 0.1 กรัม ในระยะเวลา 4 สัปดาห์..... 87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.19 ผลการชักนำรากจากยอดของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ AC ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 91

4.20 ผลการชักนำรากของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย *m*T ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ AC ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	(ก) ลักษณะของถั่วลิสงเถากลาบราต้า (ข) ลักษณะลำต้นและเหง้าของถั่วลิสงเถากลาบราต้า	4
2.2	ลักษณะดอกของถั่วลิสงเถากลาบราต้า	4
2.3	ท่อนพันธุ์ถั่วลิสงเถากลาบราต้า (เหง้า)	5
2.4	ลักษณะต้นของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook	6
2.5	ลักษณะใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook	6
2.6	ลักษณะต้นของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf	7
2.7	ลักษณะใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf	7
2.8	ลักษณะต้นของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze	8
2.9	ลักษณะใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze	8
4.1	(ก) แสดงลักษณะตาข้างของถั่วลิสงเถากลาบราต้าที่สมบูรณ์ (ข) ตาข้างของถั่วลิสงเถาที่ไม่สมบูรณ์	33
4.2	แสดงลักษณะข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigaze ที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์	33
4.3	ลักษณะของใบถั่วลิสงเถากลาบราต้าที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ หลังจากการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ (ก) สายพันธุ์ Arbrook (ข) สายพันธุ์ Ecoturf (ค) สายพันธุ์ Florigrze	35
4.4	การเปรียบเทียบร้อยละการเกิดยอดของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	38
4.5	ผลการเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	38
4.6	ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ช) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ที่ความเข้มข้น 0.5 0.75 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	39
4.7	ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (ค) TDZ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	39
4.8	ผลการเปรียบเทียบร้อยละการเกิดยอดของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.9	ผลการเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	42
4.10	ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ช) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ที่ความเข้มข้น 0.5 0.75 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	43
4.11	ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (ค) TDZ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	43
4.12	ผลการเปรียบเทียบร้อยละการเกิดยอดจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA KN *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	46
4.13	ผลการเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA KN *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	46
4.14	ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ช) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ที่ความเข้มข้น 0.5 0.75 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	47
4.15	ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต KN ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) BA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (ค) TDZ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	47
4.16	การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะวลา 4 สัปดาห์.....	49
4.17	ผลการเปรียบเทียบร้อยละการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.18	ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	50
4.19	การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะวลา 4 สัปดาห์.....	52
4.20	ผลการเปรียบเทียบร้อยละการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	53
4.21	ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	53
4.22	การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Florigraze (ก) เมื่อเพาะเลี้ยง ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะวลา 4 สัปดาห์.....	55
4.23	ผลการเปรียบเทียบร้อยละการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Florigraze เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	56
4.24	ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Florigraze เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	56
4.25	การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) น้ำหนักสด (ข) น้ำหนักแห้ง...	59
4.26	เซลล์แขวนลอยจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook เป็นเวลา 24 วัน	59
4.27	การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) น้ำหนักสด (ข) น้ำหนักแห้ง.....	62
4.28	(ก) เซลล์แขวนลอยจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf ในระยะเวลา 27 วัน (ข) เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.29	การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) น้ำหนักสด (ข) น้ำหนักแห้ง.....	65
4.30	(ก) เซลล์แขวนลอยจากข้อของถั่วลิสงเถาสายพันธุ์ Florigraze วันที่ 0 (ข) เวลา 24 วัน.....	65
4.31	ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	68
4.32	ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	68
4.33	ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	69
4.34	ลักษณะแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงใน TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	69
4.35	ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	72
4.36	ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	72
4.37	ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 16 สัปดาห์.....	73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.38	ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก) แคลลัสมีจุดสีเขียว ลักษณะฉ่ำน้ำ (friable callus) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) ลักษณะของแคลลัสเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ.....	73
4.39	ลักษณะของแคลลัสของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ก) การเกิดโซมาติกเอมบริโอ (ข) แคลลัสที่มีความฉ่ำน้ำ (friable callus).....	74
4.40	กระบวนการการเกิดโซมาติกเอมบริโอเจนเนซิสจากแคลลัสของใบถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเสริมด้วย AC ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ.....	74
4.41	ผลการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจำนวนมาก (multiple shoot) จากแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาวะแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในระยะเวลา (ก-ค) 4 สัปดาห์ (ง-ฉ) 8 สัปดาห์ (ช-ฌ) 12 สัปดาห์ และ (ญ-ฏ) 16 สัปดาห์ ตามลำดับ.....	78
4.42	ผลการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจำนวนมาก (multiple shoot) จากแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ในระยะเวลา (ก-ค) 20 สัปดาห์.....	79
4.43	ผลการเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยต่อแคลลัสของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ และ GA_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	81
4.44	การเก็บผลการทดลองของยอดอ่อนจำนวนมากของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก) การแยกต้นอ่อน (ข) การวัดความยาวด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ (มม.) (ค) กลุ่มยอดที่เพาะเลี้ยงใน GA_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 8 สัปดาห์...	81
4.45	การเจริญเติบโตของยอดอ่อนจำนวนมากของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก) กลุ่ม ยอดอ่อนก่อนการยืดยอด (ข) กลุ่มยอดอ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ (ค-ฉ) กลุ่มยอดอ่อนที่เสริมด้วย GA_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.46	ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น ต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	85
4.47	ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	85
4.48	ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยแคลลัสจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	88
4.49	ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 8 สัปดาห์	88
4.50	ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 8 สัปดาห์	89
4.51	ลักษณะของแคลลัสจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze ด้วยกล้องสเตอริโอไมโครสโคป (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข-ค) เมื่อเพาะเลี้ยงใน TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์	89
4.52	ผลการเปรียบเทียบจำนวนรากเฉลี่ยของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยอดในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	91
4.53	ลักษณะของต้นถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก-ง) เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 0.5 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	92
4.54	ลักษณะของต้นถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก-ฉ) เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์	92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.55	ลักษณะของต้นกล้าถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก-ข) ที่เจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ ทั้งยอดและราก (ค) ออกปลูก (ง) ระยะเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์.....	93
4.56	ผลการเปรียบเทียบจำนวนรากเฉลี่ยของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยอดในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย AC ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	95
4.57	ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze (ก) ที่เหมาะต่อการนำไปชักนำให้เกิดราก และการเจริญเติบโตของรากที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย AC ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) ในระยะเวลา 11 วัน (ค) 18 วัน และ (ง) 30 วัน.....	96
4.58	ลักษณะของต้นกล้าถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze (ก) ที่นำออกปลูก (ข) ระยะเวลา 12 สัปดาห์ (ง) ระยะเวลาผ่านไป 20 สัปดาห์.....	96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	ชื่อเต็ม
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
AC	Activated Charcoal
BAP, BA	6-Benzylaminopurine
$HgCl_2$	Mercuric Chloride
KN	6-Furfurylaminopurine
MS	Murashige and Skoog (MS, 1962)
*m*T	6-(3-Hydroxybenzylamino) purine
NAA	1-Napthalene acetic acid
PPM	Preservative for Plant Tissue Culture Media Active
TDZ	N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเลี้ยงสัตว์เศรษฐกิจในประเทศไทยมีแนวโน้มที่เพิ่มมากขึ้นในทุกปี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โคนมและโคเนื้อ ซึ่งได้รับการส่งเสริมอย่างจริงจังจากภาครัฐและเอกชน ปัจจุบันประเทศไทยได้ประสบปัญหาการขาดแคลนอาหารสัตว์และต้นทุนของอาหารที่มีมูลค่าสูง ซึ่งส่งผลกระทบเป็นอย่างมากต่อเกษตรกร และพบว่าผลผลิตทางการเกษตรนั้นไม่เพียงพอต่อการบริโภคของสัตว์เศรษฐกิจในปัจจุบัน เพื่อเป็นการแก้ปัญหาและลดภาระต้นทุนให้แก่เกษตรกร จึงมีการปลูกพืชอาหารสัตว์ขึ้นมาเพื่อทดแทน เช่น หญ้า และถั่วอาหารสัตว์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ถั่วคาลวาเคต (*Centrosema pascuorum*) ถั่วไมยรา (*Desmanthus virgatus*) ถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata*) และถั่วท่าพระสะไตโล (*Stylosanthes guianensis*) เป็นต้น (สายัณห์, 2540)

การศึกษาและค้นคว้าในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาพืชอาหารสัตว์สายพันธุ์ใหม่ ๆ และปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีคุณภาพ สำหรับการนำมาเพาะปลูกเป็นพืชอาหารสัตว์ที่มีสารอาหารครบถ้วน โดยถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*Arachis glabrata*) เป็นพืชอาหารสัตว์ตระกูลถั่วที่มีมูลค่าสูง ซึ่งเจริญเติบโตอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ ได้แก่ อาร์เจนตินา ปารากวัย อุรุกวัย ออสเตรเลีย รัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา และบราซิล เป็นต้น (เฉลิมพล, 2530) โดยประเทศไทยได้นำเข้ามาเพาะปลูกโดยกรมปศุสัตว์และองค์กรการส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย *Arachis glabrata* หรือ Rhizomatous peanut เป็นพวก perennial herb มีลำต้นอยู่ใต้ดินที่เรียกว่า “เหง้า” ถั่วลิสงเถาชนิดนี้จึงสามารถตรึงไนโตรเจนโดยอาศัยไรโซเบียม ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการเพิ่มปริมาณของโปรตีนในต้นพืช อีกทั้งไรโซเบียมยังช่วยเป็นธาตุอาหารให้ดินได้อีกด้วย (ศศิธร และคณะ, 2545) การมีรากจำนวนมากส่งผลให้ถั่วลิสงเถาชนิดนี้นั้นสามารถทนแล้งได้ดี (สายัณห์, 2540) เจริญเติบโตได้ในดินทรายถึงดินเหนียวที่มีการระบายน้ำดี ชอบดินที่เป็นกรดถึงพีเอช 4.5 แต่ก็ทนต่อสภาพดินที่เป็นกลางถึงด่างถึงพีเอช 8.5 เจริญเติบโตได้ดีทั้งในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำถึงสูง (ศศิธร และคณะ, 2545) ทนต่อการเหยียบย่ำและการแทะเล็มของสัตว์ นอกจากนี้ยังเป็นพืชที่ช่วยคลุมดินและเป็นไม้ประดับได้อีกด้วย (French *et al.*, 1993)

ในการเจริญเติบโตของถั่วลิสงเถากลาบราต้านั้นสามารถปลูกร่วมกับหญ้าพื้นเมืองได้โดยไม่ต้องใส่ปุ๋ยเพิ่มเติม ช่วยให้เกษตรกรลดการใส่ปุ๋ยได้ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ (Rouse and Mullahey, 1997) ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าถั่วลิสงเถาสายพันธุ์ Arbrook Ecoturf และ Florigraze จากต่างประเทศ เนื่องจากมีค่าทางโภชนะที่สูง ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่และยังไม่ค่อยเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในเกษตรกรไทย (มนัสนันท์ และคณะ, 2557)

ถึงแม้ว่าการเจริญเติบโตของดอกถั่วลิสงเถาชนิดนี้จะมีปริมาณมาก แต่ไม่พบผลผลิตจากเมล็ด การขยายพันธุ์ในธรรมชาติจึงต้องใช้เหง้าที่อยู่ใต้ดิน (Maas and Ocampo, 1995) อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตของพืชชนิดนี้ยังมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคจากศัตรูพืช ไฟไหม้ ภัยแห้งแล้ง (Rouse and Mullahey, 1997) จากปัญหาข้างต้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาการเจริญเติบโตของถั่วลิสงเถา *Arachis glabrata* โดยผ่านเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อทำการขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพียงพอต่อความต้องการในการบริโภคของสัตว์เศรษฐกิจ และสามารถแจกจ่ายพันธุ์พืชที่อุดมไปด้วยสารอาหารที่ครบถ้วนให้กับเกษตรกรต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพต่อชิ้นส่วนใบและข้อ สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook Ecoturf และ Florigraze ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

1.2.2 ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้นใหม่จากชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถา สายพันธุ์ Arbrook Ecoturf และ Florigraze

1.2.3 ศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

1.2.4 ศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook Ecoturf และ Florigraze อีกทั้งชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นยอดใหม่อย่างสมบูรณ์

1.2.5 ศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากและออกปลูกต้นกล้าของถั่วลิสงเถากลาบราต้าในธรรมชาติ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อ สูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอด การชักนำใบให้เกิดแคลลัส และเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ อีกทั้งการชักนำให้เกิดรากให้ได้ต้นพืชที่สมบูรณ์และแข็งแรง สามารถนำออกปลูกสู่สภาพแวดล้อมในธรรมชาติได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพต่อชิ้นส่วนใบและข้อ สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook Ecoturf และ Florigraze

1.4.2 ทราบสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้นใหม่จากชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook Ecoturf และ Florigraze

1.4.3 ทราบรูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

1.4.4 ทราบสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook Ecoturf และ Florigraze อีกทั้งชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นยอดอย่างสมบูรณ์

1.4.5 ทราบสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของถั่วลิสงเถากลาบราต้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของถั่วลิสงเถากลาบราต้า

2.1.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom: Plantae

Order: Fabales

Family: Fabaceae

Genus: *Arachis*

Species: *A. glabrata*

2.1.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*Arachis glabrata*)

Arachis อยู่ใน tribe Aeschynomene มีทั้งหมด 20-30 ชนิด ซึ่งมีแหล่งกำเนิดดั้งเดิมอยู่ที่ปาราไกว และต่อมาได้แพร่กระจายไปทั่วอเมริกาใต้ มีทั้งพวกฤดูเดียวและหลายฤดู ลำต้นมีลักษณะตั้งตรง กึ่งตั้งหรือเลื้อย ที่รู้จักกันดีได้แก่ ถั่วลิสง (*A. hypogaeae*) นำมาเพาะปลูกเพื่อใช้เป็นพืชสกัดน้ำมัน ในส่วนที่นำมาใช้เป็นพืชอาหารสัตว์ ได้แก่ *A. glabrata* หรือเรียกเป็นภาษาไทยว่าถั่วลิสงเถา ซึ่งปัจจุบันสายพันธุ์ที่ใช้กันในต่างประเทศได้แก่ พันธุ์ Florigraze ปลูกมากในรัฐฟลอริดา (อเมริกา) ประเทศไทยได้มีการนำเข้ามาปลูกในประเทศหลายชนิดด้วยกัน โดยกรมปศุสัตว์และองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย

ถั่วลิสงเถากลาบราต้า มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Arachis glabrata* ชื่อสามัญว่า rhizome peanut (รูปที่ 2.1 ก) ถั่วลิสงเถานี้มีอายุหลายปี ลักษณะต้นเตี้ย มีลำต้นใต้ดินจำนวนมากเรียกว่า “เหง้า” (rhizomes) อยู่ใต้ผิวดินลึกประมาณ 5-7 เซนติเมตร ลำต้นที่อยู่เหนือพื้นดินจะตั้งตรง แต่เมื่อปล่อยให้เจริญเติบโต ต้นก็จะนอนและชูยอดขึ้น ไม่มีแขนง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร ความสูง 5-35 เซนติเมตร แตกมาจากตอหรือ rhizomes และมีรากมากมาย (รูปที่ 2.1 ข) ซึ่งทำให้ถั่วลิสงเถานั้นสามารถทนแล้งได้ดีมาก ปรับตัวได้ในดินที่มีการระบายน้ำได้ดี (สายัณห์, 2540) ใบค่อนข้างแหลมกว้าง 2 เซนติเมตร ความยาว 4 เซนติเมตร ก้านดอกยาว 10 เซนติเมตร ดอกค่อนข้างกลมขนาดกว้าง 15-25 มิลลิเมตร สีเหลืองส้มอ่อน (รูปที่ 2.2) เจริญเติบโตได้ในดินทรายถึงดินเหนียวที่มีการระบายน้ำดี ชอบดินที่เป็นกรดถึงพีเอช 4.5 แต่ก็ทนต่อสภาพดินที่เป็นกลางถึงด่าง (พีเอช 8.5) เจริญเติบโตได้ดีทั้งในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำถึงสูง ต้องการปริมาณน้ำฝน 1,000 – 2,000 มิลลิเมตรต่อปี ทนทานต่อสภาพแห้งแล้ง ระหว่างฤดูแล้งถึงแม้ต้นและใบบนผิวดินจะแห้งตายไป แต่เหง้าใต้ดินยังมีชีวิตอยู่ และสามารถเจริญเติบโตขึ้นมาใหม่เมื่อเข้าสู่ต้นฤดูฝน สามารถทนทานต่อสภาพน้ำท่วมขังได้ในระยะเวลาสั้น ๆ จะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส และชะงักการเจริญเติบโตในช่วงฤดูหนาว เหมาะสำหรับปลูกเป็นแปลงหญ้าคุณภาพสูงให้สัตว์แทะเล็ม หรือทำเป็นถั่วแห้ง หรือใช้เป็นพืชคลุมดินก็ได้ (โสภณ, 2562) ออกดอกได้มากเมื่อผ่านช่วง stress เช่น หลังการตัดต้น หรือผ่านช่วงแล้งมาแล้วได้น้ำอย่างเต็มที่ ให้ผลผลิตน้ำหนักแห้งกว่า 400 กิโลกรัม/ไร่ที่อายุ 50 วันหลังตัด การใช้ถั่วประเภทนี้ปลูกรวมกับหญ้านั้นจะทำให้ได้ผลผลิตที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกหญ้าเพียงอย่างเดียว อีกทั้งยังมีคุณค่าทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารที่มากอีกด้วย (เฉลิมพล, 2530) ถึงแม้ว่าการออกดอกของถั่วกลาบราต้าจะมีมาก แต่ข้อจำกัดของถั่วลิสงเถาชนิดนี้คือ มีการเกิดเมล็ดที่น้อยมาก ๆ หรือแทบจะไม่ติดเมล็ด จึงต้องใช้ส่วนของลำต้นเหนือดินหรือไหล (stolon) นำมาเพาะปลูกซึ่งเป็นข้อจำกัดในการขยายพันธุ์ถั่ว *A. glabrata* (ศศิธร และคณะ, 2545)

รูปที่ 2.1 (ก) ลักษณะของถั่วลิสงเถากลาบราต้า (ข) ลักษณะลำต้นและเหง้าของถั่วลิสงเถากลาบราต้า
ที่มา : http://nutrition.dld.go.th/nutrition/index.php/using-joomla

รูปที่ 2.2 ลักษณะดอกของถั่วลิสงเถากลาบราต้า
ที่มา : ภาพจากผู้จัดทำ

2.1.3 การเพาะปลูกในธรรมชาติของถั่วลิสงเถากลาบราต้า (โสภณ, 2562)

2.1.3.1 การเตรียมวัสดุเพาะปลูก

การเตรียมวัสดุเพาะปลูกจะประกอบไปด้วย ดินที่ทุบย่อยและร่อนผ่านตะแกรงให้มีขนาดเล็ก หลังจากนั้นนำมาผสมกับปุ๋ยหมัก และขี้เถ้าแกลบโดยมีอัตราส่วน 1:1:3 คลุกเคล้าให้เข้ากัน ไม่ควรใช้มูลวัวที่ยังไม่ย่อยสลาย เพราะนอกจากจะมีเมล็ดวัชพืชปะปนแล้วยังส่งผลให้ต้นกล้าเหลืองหรืออาจเป็นเชื้อราได้ หรืออาจจะผสมขุยมะพร้าวลงไปด้วยก็ได้ กรอกส่วนผสมที่ได้ใส่ถุงพลาสติกเพาะกล้าขนาด 2 นิ้ว × 6 นิ้ว หรือกระถางพลาสติกขนาด 6 นิ้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.2 การเพาะกล้าด้วยท่อนพันธุ์

การเพาะต้นกล้าถั่วลิสงเถาโดยทั่วไปนั้น จะใช้ส่วนของลำต้นนำมาเสียบลงในถุงเพาะประมาณ 4-5 ท่อนต่อถุง การเพาะถั่วกลาบราต้าจะใช้ “เหง้า” ซึ่งอยู่ใต้ผิวดิน โดยการใช้จอบขุดขึ้นมาเป็นก้อน ๆ นำท่อนพันธุ์มาตัดออกเป็นท่อน ๆ ให้มีความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร (รูปที่ 2.3) จุ่มท่อนพันธุ์ในน้ำยาฆ่าเชื้อราผสมกับฮอร์โมนเร่งราก

รูปที่ 2.3 ท่อนพันธุ์ถั่วลิสงเถากลาบราต้า (เหง้า)
ที่มา : : http://nutrition.dld.go.th/nutrition/index.php/using-joomla

2.1.3.3 การดูแลต้นกล้าพันธุ์

นำถุงต้นกล้าพันธุ์ไปวางเรียงบนพื้นซีเมนต์กลางแจ้ง จากนั้นคลุมปิดด้วยสแลนพลางแสง เพื่อลดการคายน้ำของต้นกล้า ในวันที่ฝนไม่ตกให้รดน้ำเช้าและเย็น คอยสังเกตการณ์แตกใบอ่อนของต้นกล้า เมื่อมีใบมากพอแล้ว ให้เปิดสแลนพลางแสงออก ซึ่งถั่วกลาบราต้าจะใช้เวลาประมาณ 21 วัน จากนั้นต้องหมั่นถอนต้นวัชพืชที่อาจติดมากับวัสดุเพาะ หากมีวัชพืชติดไปกับต้นกล้าจะกลายเป็นปัญหาภายหลัง ต้นกล้าที่อายุได้ 45 วันจะมีรากที่แข็งแรงแล้วให้ใช้ปุ๋ยยูเรียประมาณ 2 ขีดละลายน้ำใส่บัวรดต้นกล้า จะช่วยให้ต้นกล้าเจริญเติบโตได้เร็วขึ้น เมื่อต้นกล้าอายุ 2-3 เดือน จึงสามารถนำไปปลูกได้

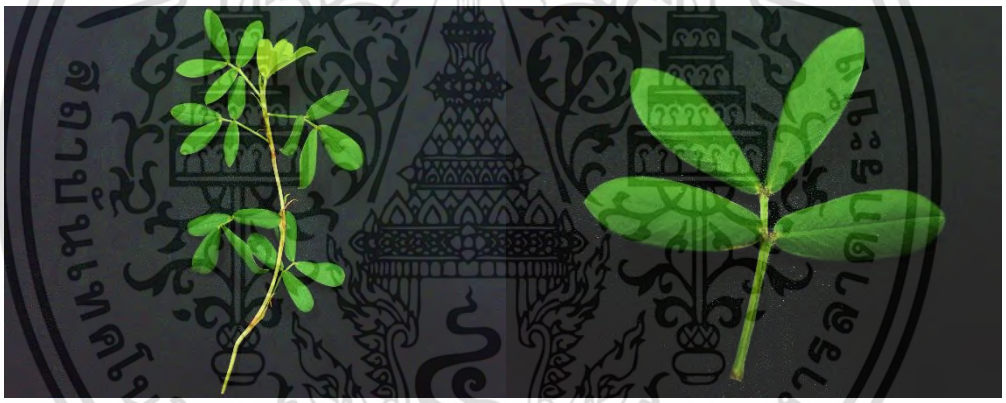
2.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook

ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook เป็นพืชอาหารสัตว์ที่มีการเผยแพร่ในปี ค.ศ. 1985 เหมาะสำหรับการเพาะปลูกในดินทรายของคาบสมุทรฟลอริดา เช่นเดียวกับสายพันธุ์ Florigraze มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในฤดูใบไม้ผลิและทนต่อความแห้งแล้ง (Prine *et al.,* 1990) ลักษณะทั่วไปของถั่วสายพันธุ์นี้มีลำต้นใต้ดินที่เรียกว่า “เหง้า” มีอายุหลายปี ลำต้นเหนือดินตั้งตรง (รูปที่ 2.4) ลักษณะของใบเป็นใบประกอบที่มี 4 ใบย่อย ลักษณะใบคล้ายหอกแต่มีความกว้าง มีขนเล็กน้อย (รูปที่ 2.5) มีค่าทางโภชนะอย่างมาก โดยมีรายงานว่ามีค่าโปรตีนหยาบสูงที่สุดถึง 19.780 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับทั้ง 3 สายพันธุ์ (มนัสนันท์ และคณะ, 2557) เหมาะกับการเป็นอาหารโคนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าจากต่างประเทศ และยังไม่มีการแพร่หลายเป็นที่รู้จักกันมากนัก (เฉลิมพล, 2530)

รูปที่ 2.4 ลักษณะต้นของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook
ที่มา : ภาพจากผู้จัดทำ



รูปที่ 2.5 ลักษณะใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook
ที่มา : ภาพจากผู้จัดทำ

2.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf

ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ปัจจุบันประเทศไทยนำเข้ามาจากต่างประเทศเช่นเดียวกับสายพันธุ์ Arbrook มีรายงานว่ายังไม่มีการแพร่หลายในหมู่ของเกษตรกรอีกทั้งยังไม่มีการเพาะปลูกในประเทศไทยมากนัก (มนัสนันท์ และคณะ, 2557) ลักษณะทั่วไปของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์นี้มีลำต้นใต้ดินที่เรียกว่าเหง้า มีอายุหลายปี ลำต้นที่อยู่เหนือพื้นดินนั้นตั้งตรง เหมาะสำหรับใช้ในการคลุมหน้าดิน (รูปที่ 2.6) มีการออกดอกสีเหลืองตลอดทั้งปี สามารถทนต่อความแห้งแล้งได้ดี ไม่ต้องการน้ำในการดูแลรักษามากนัก อีกทั้งยังสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศไว้ที่ปมรากได้ จึงไม่ต้องมีการเติมปุ๋ยไนโตรเจน ลักษณะของใบเป็นใบประกอบที่มี 4 ใบย่อย (tetrafoliolate) ลักษณะใบคล้ายใบหอก ไม่มีขน หรือมีขนเล็กน้อย และมีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ Florigraze (รูปที่ 2.7) เป็นพืชอาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางโภชนะเป็นอย่างมาก โดยมีค่าโปรตีนหยาบเท่ากับ 16.833 เปอร์เซ็นต์ (มนัสนันท์ และคณะ, 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.6 ลักษณะต้นของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf
ที่มา : ภาพจากผู้จัดทำ

รูปที่ 2.7 ลักษณะใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf
ที่มา : ภาพจากผู้จัดทำ

2.4 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze

ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ Arb (PI 118457) กับ PI 151982 (CPI 22762) ในแปลงทดลองของมหาวิทยาลัยฟลอริดา สหรัฐอเมริกา ถูกนำออกมาเผยแพร่ และกระจายพันธุ์ในปี ค.ศ. 1978 หรือปี พ.ศ. 2521 และถูกปล่อยพันธุ์ (released) โดย Prine และคณะในปี ค.ศ. 1978 นำเข้ามาจากประเทศออสเตรเลีย เพื่อนำมาปลูกทดสอบในประเทศไทยในปี ค.ศ. 1989 หรือปี พ.ศ. 2532 โดย Dr. D.S. Loch และมีการคัดเลือกทดสอบพันธุ์จนสามารถปรับตัวขึ้นได้ดีในประเทศไทย (กรมปศุสัตว์, 2558)

ลักษณะทั่วไปของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze นั้นจะมีรากหรือหัว ระบบรากเป็นแบบไหลหรือเหง้า (rhizomes) ซึ่งสานกันหนาแน่นอยู่บริเวณใต้ผิวดินลึก ประมาณ 5-7 เซนติเมตร เหง้ามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร เมื่อเจริญเต็มที่จะมีสีน้ำตาลส้มหรือสีเปลือกไม้ มีลักษณะต้นเตี้ย (รูปที่ 2.8) เป็นพืชที่ทนอากาศหนาวเย็นได้ดี ตอบสนองต่อการให้น้ำดี สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีพีเอชต่ำ ลักษณะของใบเป็นใบประกอบที่มี 4 ใบย่อย (tetrafoliolate) ลักษณะใบคล้ายใบหอก ไม่มีขน หรือมี ขนเล็กน้อย โดย 2 ใบคู่บน มีความกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร ยาวประมาณ 3-3.5 เซนติเมตร ที่ส่วนปลายของหูใบมีรยางค์แข็ง (awn) ยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบอ่อนมีสีเขียวอ่อน ใบแก่มีสี เขียวอมเทา (รูปที่ 2.9) เหมาะกับการเป็นพืชอาหารสัตว์เป็นอย่างมาก ซึ่งมีรายงานว่ามีค่าโปรตีนหยาบเท่ากับ 17.780 เปอร์เซ็นต์ สูงรองลงมาจากสายพันธุ์ Arbrook (มนัสนันท์ และคณะ, 2557)

รูปที่ 2.8 ลักษณะต้นของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze
ที่มา : ภาพจากผู้จัดทำ

รูปที่ 2.9 ลักษณะใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze
ที่มา : ภาพจากผู้จัดทำ

2.5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ในปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพของพืชนั้นมีความสำคัญมาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือสามารถนำเอาทุกส่วนของต้นพืช เช่น เมล็ด (seed) ปลายราก (root tip) ปลายยอด (shoot tip) เนื้อเยื่อเจริญ (meristem) ใบเลี้ยง (cotyledon) ใบ (leaf) ตาข้าง (axillary bud) เอ็มบริโอ (embryo) เรณู (pollen) รังไข่ (ovary) และ ดอก (flower) มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรสังเคราะห์ที่ประกอบไปด้วยแร่ธาตุอาหารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น น้ำตาล วิตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นต้น โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อจุลินทรีย์ ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ ความเข้มข้นของแสง และความชื้นได้ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้ยังรวมถึงการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (cell suspension) และโพรโทพลาสต์ (protoplast) อีกด้วย (อนุรักษ์, 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทบาทของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นมีมากมายหลายด้าน ทั้งในด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐาน เกษตรกรรม อุตสาหกรรม และการแพทย์ ในปัจจุบันได้นำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามาประยุกต์ใช้ในงานหลากหลายวิชา เช่น พันธุศาสตร์ของเซลล์ พันธุศาสตร์ของพืช ชีวเคมี ชีวโมเลกุล สรีรวิทยาของพืช โรคพืช และเภสัชศาสตร์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ที่สำคัญในหลายๆ ด้าน คือ ใช้ในการขยายพันธุ์พืชภายในระยะเวลาอันสั้น การผลิตพืชที่ปราศจากโรค การผลิตยาและสารเคมีจากพืช การปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น และการเก็บรักษาพันธุ์พืช (รังสฤษดิ์, 2541)

2.6 ธาตุอาหารและอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.6.1 ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์ (inorganic substances) (อนุรักษ์, 2550)

2.6.1.1 แร่ธาตุอาหารหลัก ได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และซัลเฟอร์ (S) ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่พืชต้องการนำไปใช้ในการเจริญเติบโตปริมาณมาก และขาดไม่ได้ โดยปกติพืชต้องการนำไปใช้ประมาณ 25-60 มิลลิโมลาร์ หรือมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.6.1.2 แร่ธาตุอาหารรอง ได้แก่ เหล็ก (Fe) ใช้ประมาณ 1 ไมโครโมลาร์ แมงกานีส (Mn) ใช้ประมาณ 20-90 ไมโครโมลาร์ โคบอลต์ (Co) ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมลาร์ สังกะสี (Zn) ใช้ประมาณ 5-30 ไมโครโมลาร์ ทองแดง (Cu) ใช้ประมาณ 0.1 ไมโครโมลาร์ โมลิบดีนัม (Mo) ใช้ประมาณ 1 ไมโครโมลาร์ และโบรอน (B) ประมาณ 25-100 ไมโครโมลาร์ โดยทั่วไปพืชต้องการแร่ธาตุอาหารรองในปริมาณที่น้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.6.2 ธาตุอาหารพวกอินทรีย์ (organic substances) (อนุรักษ์, 2550)

2.6.2.1 คาร์โบไฮเดรต เป็นแหล่งพลังงานคาร์บอนที่มีส่วนสำคัญในการให้พลังงานแก่พืชที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ น้ำตาลที่ใช้มีทั้งน้ำตาลที่เป็นโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ โดยปกติจะใช้ประมาณ 20-40 กรัมต่อลิตร ตัวอย่างเช่น กลูโคส (glucose) ฟรักโทส (fructose) กาแลกโทส (galactose) ซอบิทอล (sobitol) แมนนิทอล (mannitol) ซูโครส (sucrose) มอลโทส (maltose) ซูคราโรส (sucralose)

2.6.2.2 วิตามิน ที่ใช้กันมากได้แก่ ไทอะมีน (thiamine) กรดนิโคทินิค (nicotinic acid) ไพริดอกซิน (pyridoxine) อินโนซิทอล (inositol) ไบโอติน (biotin) กรดแพนโททินิค (panthothenic acid) กรดฟอลิค (folic acid) โคลีน คลอไรด์ (choline chlorine) ไรโบเฟลวิน (riboflavin) กรดแอสคอร์บิค (ascorbic acid)

2.6.2.3 กรดอะมิโน ได้แก่ กรดอะมิโนมีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชเป็นอย่างมาก กรดอะมิโนมีประมาณ 20 ชนิด และมีการใช้ในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น ไกลซีน (glycine) ใช้ปริมาตรประมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อะลานีน (alanine) และ อาร์จีนีน (arginine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แอสปาราจีน (asparagine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแอสปาติก (aspartic acid) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีสทีน (cystein) ใช้ประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร กลูตามีน (glutamine) และกรดกลูตามิก (glutamic acid) ใช้ประมาณ 8 มิลลิโมลาร์ ลิวซีน (leucine) ทริปโตเฟน (trytophan) และไทโรซีน (tyrosine) ใช้ประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นต้น โดยทั่วไปประสิทธิภาพในการทำงานของกรดอมิโนที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะอยู่ในรูปของ L มากกว่าในรูปของ D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช การเติมสารที่ช่วยการเจริญลงไปในอาหารนั้นมีความสำคัญในการช่วยให้เนื้อเยื่อเหล่านั้นเจริญได้ดีขึ้น เช่น ออกซิน (auxin) ไซโทไคนิน (cytokinin) และจิบเบอเรลลิน (gibberellin) อย่างไรก็ตามความต้องการของเนื้อเยื่อต่อสารเหล่านี้ก็แตกต่างกันไปและยังเกี่ยวข้องกับระดับของฮอร์โมนที่มีอยู่ภายในพืชชนิดนั้นอีกด้วย

ออกซิน (auxin) : ช่วยชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ และการรวมเป็นกลุ่มของแคลลัส ส่งเสริมการขยายตัวของเซลล์โดยเร่งการขยายตัวของเซลล์ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ แต่ไม่มีผลต่อการขยายตัวของเซลล์ที่มีเซลลูโลส และการเจริญของลำต้น ส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์ เร่งการแบ่งตัวของเซลล์ในแคมเบียม โดยกระตุ้นการสร้างโปรตีน และกรดนิวคลีอิก กระตุ้นการเกิดรากบริเวณลำต้นที่ถูกตัด และพัฒนาการเกิดรากแขนงให้สมบูรณ์ก่อนนำออกปลูก การเกิดรากมีความสัมพันธ์กับระดับของออกซินในต้นพืชกับสภาพแวดล้อม ส่งเสริมให้มีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่ใช้ลำเลียงน้ำและอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินมีดังนี้

- กรดอินโดลอะซิติก (indol-3-yl acetic acid) หรือ 3-indolacetic acid เรียกย่อ ๆ ว่า IAA
- กรดแอลฟาแนพทาลีนอะซิติก (α-napthalene acetic acid) หรือ 1-napthalene acetic acid หรือเรียกย่อ ๆ ว่า NAA
- กรด 2,4 ไดคลอโรฟีนอกซีอะซิติก (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) หรือเรียกย่อ ๆ ว่า 2,4-D
- กรด 2,4,5-ไตรคลอโรฟีนอกซีอะซิติก (2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid) หรือเรียกย่อ ๆ ว่า 2,4,5-T
- กรดอินโดล-3-บิวทีริก (3-idole butyric acid) หรือ indol-3-butyric acid หรือ4-[3-indoly] butyric acid หรือ เรียกย่อ ๆ ว่า IBA
- กรดพารา-คลอโรพีนอกซีอะซิติก (p-chlorophenoxyacetic acid) หรือ เรียกย่อ ๆ ว่า 4-CPA หรือ PCPA
- กรด 2-แนพทอกซีอะซิติก (2-napththoxyacetic acid) หรือ เรียกย่อ ๆ ว่า NOA
- กรด 3,6-ไดคลอโร-ออโท-อะนิสิก (3,6-dichloro-o-anisic acid) หรือ3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid หรือ 3,6-dichloroaisic acid หรือเรียกย่อ ๆ ว่า dicamba
- กรด 4-อะมิโน-3,5,6-ไตรคลอโรพิโคลินิก (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid) หรือเรียกย่อ ๆ ว่า picloram
- กรดฟีนิลอะซิติก (phenylacetic acid) หรือเรียกย่อ ๆ ว่า PAA

ไซโทไคนิน (cytokinin) : เป็นอนุพันธ์ของอะดีนินซึ่งพบได้หลายชนิดในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ไซโทไคนินเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของอะดีนิน โดยจะเกิดบริเวณปลายราก และเอ็มบริโอที่กำลังเจริญ มีผลต่อการแสดงออกของพืช คือสามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และสามารถชักนำให้เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในพืชที่เกิดเป็นปุ่มปม อีกทั้งยังสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดยอดอ่อนหลาย ๆ ยอดได้ (multiple shoots) นอกจากนี้ยังกระตุ้นในการเจริญทางด้านข้างของพืช กระตุ้นการเจริญของตาข้าง ชะลอการแก่ของพืช นอกจากนั้นยังมีผลเล็กน้อยต่อการพัฒนาของผลโดยสารในกลุ่มนี้ที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่

- 6-เฟอร์เฟอริลอะมิโนเพียวรีน (6-furfurylaminopurine) หรือเรียกย่อ ๆ ว่า ไคนีทิน (kinetin)
- 6-เบนซิลอะมิโนเพียวรีน (6-benzylaminopurine) หรือเรียกย่อ ๆ ว่า BA หรือ BAP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2-ไอโซเพนทินิลอะมิโนพียวรีน (2-isopentenyaminopurine) หรือเรียกว่า 2iP
- ซีเอทิน (zeatin) หรือ 6-(4-ไฮดรอกซี-3-เมทิล-ทราน-2-บิวทีนิวอะมิโน) เพียวรีน (6-(4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butenylamino) purine) หรือเรียกย่อ ๆ ว่า zea

จิบเบอร์เรลลิน : สารกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้น้อยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ กรดจิบเบอร์เรลลิก (gibberellic acid) สังเคราะห์จากกรดเมวาโลนิก (mevalonic acid) ในเนื้อเยื่อพืช หรือในเอ็มบริโอที่มีการเจริญขึ้น กรดจิบเบอร์เรลลิกสามารถที่จะเคลื่อนย้ายผ่านท่อน้ำและท่ออาหารได้ กระตุ้นทั้งการแบ่งเซลล์ และการขยายขนาดของเซลล์กรดจิบเบอร์เรลลิก ชักนำให้เมล็ดเกิดการงอกโดยการกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์จำนวนมากโดยเฉพาะแอลฟาอะไมเลส (α-amylase) ในพืชที่กำลังงอกหรือเรียกย่อ ๆ ว่า GA_3

2.6.2.5 วุ้น

อาหารสังเคราะห์ที่มีวุ้นละลายอยู่เรียกว่า อาหารวุ้น หรืออาหารแข็ง (agar media หรือ solid media) ความเข้มข้นของวุ้นที่ใช้ประมาณ 0.6-1 เปอร์เซ็นต์ ถ้าละลายวุ้นใส่อาหารให้มีความเข้มข้นมากจะทำให้อาหารที่ได้ค่อนข้างแข็ง จึงเป็นผลให้สารอาหารที่ปะปนอยู่ในวุ้นนั้นไม่สามารถเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชได้ การใช้วุ้นละลายลงไปในอาหารเป็นที่นิยมมากเนื่องจากสามารถนำไปใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้อย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตามวุ้นไม่ใช่ส่วนประกอบที่สำคัญของอาหาร วุ้นเป็นสารประกอบพวก polysaccharide ที่ได้มาจากสาหร่ายทะเล วุ้นจึงทำหน้าที่เป็นตัวยึดเกาะของเนื้อเยื่อ (บุญยืน, 2544)

2.6.2.6 ผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal , AC)

เมื่อนำเนื้อเยื่อพืชไปเลี้ยงในอาหารในช่วงระยะเวลาหนึ่งก็จะพบว่าในอาหารนั้นมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น เช่น อาหารมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลของสารจำพวก phenolic compound หรืออาจมีสารพิษบางอย่างที่ไม่สามารถมองเห็นได้ ดังนั้น การกำจัดสารเหล่านี้ไม่สามารถทำได้ง่าย ๆ วิธีการที่ทำได้ง่ายคือ การย้ายเนื้อเยื่อไปเลี้ยงในอาหารใหม่หลาย ๆ ครั้ง แต่อาจจะเพิ่มค่าใช้จ่ายและแรงงานมากขึ้น การแก้ปัญหาอีกวิธีหนึ่งก็คือ การเติมผงถ่านลงไปในอาหารนั้นประมาณ 0.5-30 เปอร์เซ็นต์ การใส่ผงถ่านนั้นมีทั้งข้อดีและข้อเสีย ซึ่งอิทธิพลของผงถ่านอาจเกิดขึ้นได้ดังต่อไปนี้ ช่วยดูดซับสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญ ช่วยดูดซับสารเร่งการเจริญจากอาหาร ทำให้อาหารมีสีดำ เป็นต้น การเติมผงถ่านลงในอาหารส่งผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อนั้น เนื่องจากผงถ่านได้ทำการดูดซับพวกฮอร์โมนที่ใส่ลงในอาหาร แต่ในทางตรงกันข้ามผงถ่านช่วยดูดซับสารประกอบที่เป็นพิษ (phenolic compound) ที่เนื้อเยื่อปล่อยออกมา จึงทำให้เนื้อเยื่อพืชไม่ได้รับอันตรายจากสารเหล่านี้ หรือไม่ได้ไปยับยั้งการดูดซึมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญ จึงทำให้เนื้อเยื่อพืชมีการเจริญได้ดีขึ้น (บุญยืน, 2544)

2.6.2.7 ความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช)

ความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช) ในสารละลายก็คือการวัดความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออน (Hydrogen ion, H^+) ในสารละลายนั่นเอง มาตราส่วนที่ใช้วัดพีเอช เริ่มจากที่เป็นกรดมาก (พีเอช 0) จนถึงเป็นด่างมาก (พีเอช 14) และจุดสมดุลหรือเป็นกลาง (พีเอช 7) ความเป็นกรด-ด่างของอาหารโดยทั่วไปจะปรับอยู่ในช่วง 5.6-5.8 ก่อนที่จะนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน อย่างไรก็ตาม พีเอชมีอิทธิพลต่อการละลายของอิออนในอาหาร ความสามารถในการละลายของวุ้นและมีผลต่อการเจริญของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นการกำหนดค่าที่ถูกต้องและการควบคุมความเป็นกรด-ด่างให้คงที่จึงเป็นสิ่งจำเป็น โดยทั่วไปในการกำหนดค่าของพีเอช ก็จะใช้เครื่องวัดพีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Straus and Larue (1954) พบว่าการเจริญของเอนโดสเปิร์ม แคลลัสเจริญได้ดีที่พีเอช 7.0 โดยทั่วไปพีเอชที่สูงกว่า 6.0 จะทำให้อาหารค่อนข้างแข็ง และถ้าต่ำกว่า 5.0 จะทำให้วุ้นไม่แข็งตัว

2.7 การฟอกฆ่าเชื้อ

2.7.1 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

- โซเดียมไฮโปรคลอไรด์ (NaOCl) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5-5 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี
- แคลเซียมไฮโปรคลอไรด์ ($Ca(OCl_2)$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 9-10 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก
- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 3-12 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-15 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ
- คลอกรอกซ์ (clorox) เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้กันทั่วไปตามบ้านเรือน หรือน้ำยาซักผ้าขาวที่มีชื่อทางการค้าว่า ไฮเตอร์ โดยภายในส่วนประกอบของสารเหล่านี้จะมีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 5-15 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-20 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก
- สารละลายโบรไมด์ (bromide solution) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 2-10 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก
- ซิลเวอร์ไนเทรต ($Ag(NO_3)$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-30 นาที ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี
- สารละลายไอโอดีน (iodine solution) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี
- เมอคิวริคลไรด์ ($HgCl_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.1-1.0 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 2-10 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อพอสมควรเมอคิวริคไอโอไดด์ (HgI_2) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ประมาณ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี
- เมอคิวริคโบรไมด์ ($HgBr_2$) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี
- เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ความเข้มข้นที่ใช้ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 1-5 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก
- กรดกำมะถัน หรือกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0-70 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-20 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก
- เบนซาโคเมียมคลอไรด์ (benzalkonium chloride) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.01-0.1 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-20 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี (อนุรักษ์, 2550)

2.8 การเพาะเลี้ยงแคลลัส

แคลลัสหมายถึงเซลล์ที่อยู่รวมตัวกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการพัฒนาหรือเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะอื่น ๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma) แต่เพียงอย่างเดียวภายในมีแวคิวโอลจำนวนมาก มีรูปร่างและขนาดที่ไม่แน่นอนส่วนใหญ่จะไม่มีรงควัตถุ แต่อาจจะมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ มีสีเหลืองเนื่องจากแคโรทีนอยด์และฟลาโวนอยด์ หรือสีม่วงจากแอนโทรไซยานิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณและชนิดของรงควัตถุนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของพืช อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการได้รับแสงที่แตกต่างกัน แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันหนาแน่น มีความแข็ง เรียกว่า compact callus และแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันอย่างหลวม ๆ มีลักษณะฉ่ำน้ำ เรียกว่า friable callus ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของพืชทุกชนิดสามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสได้ บางครั้งอาจพบแคลลัสทั้งสองแบบอยู่ภายในก้อนหรือเนื้อเยื่อเดียวกัน (รังสฤษณ์, 2541)

2.9 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยคือการนำเซลล์เดี่ยว (single cell) หรือกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (aggregate cells) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื้อเยื่อที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยก็คือ แคลลัสที่มีการเกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ (friable callus) ซึ่งง่ายต่อการแยกหรือกระจายเซลล์ออกจากกัน ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยคือ เพื่อศึกษาเมแทบอลิซึมของเซลล์ โดยเฉพาะที่เกี่ยวกับการสร้างสาร secondary metabolites การสร้างเอนไซม์ และสภาพของเซลล์ที่ขาดสารคลอโรฟิลล์และสารแคโรทีนอยด์ ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการแยกหรือสกัดเอนไซม์และสารเคมีที่เป็นประโยชน์ เพื่อการผลิตเอมบริออยด์ (คัพภะ) และโพรโทพลาสต์ เพื่อชักนำให้เจริญเติบโตเป็นต้นอย่างสมบูรณ์ อีกทั้งยังช่วยในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ และการแสดงออกของยีน เป็นต้น (รังสฤษณ์, 2541)

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.10.1 การฟอกฆ่าเชื้อ

การฟอกฆ่าเชื้อถือว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะประสบผลสำเร็จหรือไม่ก็ขึ้นอยู่กับขั้นตอนในการฟอกฆ่าเชื้อเป็นลำดับต้น ๆ การฟอกฆ่าเชื้อคือการทำให้เนื้อเยื่อเหล่านั้นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อนการนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เชื้อจุลินทรีย์เป็นสาเหตุของการทำให้อาหารเน่าเสีย และชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชนั้นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และตายในที่สุด

Al-Joboury (2012) ได้ทำการขยายพันธุ์ถั่ว *A. pypogaea* L. ซึ่งเป็นถั่วที่สามารถนำมาสกัดน้ำมันได้ และยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่ใช้เป็นอาหารสัตว์กันอย่างแพร่หลายในประเทศเขตร้อนที่มีความแห้งแล้ง โดยเริ่มจากการคัดเลือกชิ้นส่วนข้อของถั่ว *A. hypogaea* L. นำมาตัดให้มีขนาดประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร ฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอคิวริคคลอไรด์ เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยน้ำสะอาดที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์อีก 3 ครั้ง เปรียบเทียบกับชิ้นส่วนข้อที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ร่วมกับ tween-20 ปริมาตร 3-5 หยด (ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิว) เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์อีก 3 ครั้ง หลังจากที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงผ่านไป 21 วัน พบว่าชิ้นส่วนข้อที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอคิวริกคลอไรด์นั้นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์และสามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของยอดได้เป็นอย่างดี

Bera. *et al.* (2014) กล่าวว่า เมล็ดถั่วลิสง *A. prostrata* นั้นสามารถนำมาสกัดน้ำมันได้ ซึ่งในประเทศอินเดียพืชชนิดนี้สามารถผลิตน้ำมันได้มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ แต่ปัญหาที่ประสบในการขยายพันธุ์พืชชนิดนี้คือ ความเค็มของดิน และปัญหาภัยแล้ง จึงต้องใช้เทคนิคเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์ โดยนำใบอ่อนของถั่วลิสง *A. prostrata* ความยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร ฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 1 นาที ตามด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และสามารถนำไปชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสได้

Dolce. *et al*. (2017) ได้ทำการคัดเลือกชิ้นส่วนปลายยอด ข้อ และใบของ *A. glabrata* ที่เพาะปลูกในเรือนกระจก หลังจากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ 12 นาที และสุดท้ายล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง หลังจากการเพาะเลี้ยง 10 วัน พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อดังกล่าวไม่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในชิ้นส่วนปลายยอดและข้อได้ ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ 100 เปอร์เซ็นต์ หรือพืชนั้นได้รับบาดเจ็บเนื่องจากความเข้มข้นที่สูงเกินไปจากสารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ สำหรับในส่วนของใบ พบว่าโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้สูงถึง 93.3 เปอร์เซ็นต์ และยังมีรายงานอีกว่าการคัดเลือกชิ้นส่วนจากธรรมชาติหรือชิ้นส่วนที่เพาะปลูกอยู่ในเรือนกระจกนั้นก็มีความสำคัญ และการลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์นั้นก็ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้สารเคมีในการฟอกฆ่าเชื้อนั่นเอง

Maina. *et al*. (2010) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารโซเดียมไฮโปคลอไรด์กับเมอคิวริคคลอไรด์ที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อและส่งผลต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของถั่ว *A. hypogaea* L. ทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ ICGV-12991 CGV-99568 CGV-90704 CG-2 และ Chalimbana โดยเริ่มจากการนำเมล็ดฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอททิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.018 0.35 0.53 0.70 และ 1.05 เปอร์เซ็นต์ เวลา 5 10 15 30 นาที และข้ามคืน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการใช้เมอคิวริคคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 นาที เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับวิตามิน B5 เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน หลังจากการทดลองพบว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอคิวริกคลอไรด์นั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ดีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ทุกความเข้มข้น ส่งผลให้เมล็ดนั้นมีอัตราการรอดชีวิต 82-100 เปอร์เซ็นต์ในทุกสายพันธุ์ และยังพบอีกว่าเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอคิวริคคลอไรด์นั้นมีการเจริญเป็นยอดใหม่ได้มากกว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์

2.10.2 การชักนำให้เกิดยอดจากข้อ

Al-Joboury (2012) ได้ทำการขยายพันธุ์ถั่ว *A. pypogaea* L. โดยใช้ชิ้นส่วนข้อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 ความเข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น 6 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 5.7 เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 21 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยง พบว่าอาหารสังเคราะห์ที่เสริมด้วย BA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญเติบโตของยอดสูงสุดเท่ากับ 90.22 เปอร์เซ็นต์ ตามมาด้วยอาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตของยอดเท่ากับ 72.49 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fajinmi. *et al.* (2014) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองของ *Coleonema album* (ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์มาก รวมทั้งเป็นไม้ประดับอีกด้วย) โดยนำปลายยอดความยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ BA KN *meta*-topolin (*m*T) *meta*-methoxytopolin riboside (Me*m*TR) *meta*-topolin riboside (*m*TR) *meta*-methoxytopolin tetrahydropyran-2 - yl (Me*m*TTHP) และ TDZ หลังจากการเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงใน *m*T ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ มีการเจริญเติบโตของยอดใหม่มากที่สุด เท่ากับ 14.5 ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ และมีความยาวยอดสูงสุด เท่ากับ 13.2 มิลลิเมตร

Kanyard. *et al*. (1997) ศึกษาความแตกต่างของชิ้นส่วนต้นถั่ว *A. hypogaea* L. ในการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ โดยพบว่าเมื่อนำชิ้นส่วนข้อตรงใบเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร เสริมด้วย myo-inositol ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร magnesium chloride ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.5 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เมื่อระยะเวลาผ่านไป 18 วัน พบว่าชิ้นส่วนข้อมีการบวมเกิดขึ้น และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 45 วัน มีการเจริญเติบโตของยอดใหม่เกิดขึ้น

2.10.3 การชักนำให้เกิดแคลลัส และการเจริญเป็นต้นใหม่

วุฒิชัย และคณะ (2557) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสของกล้วยไม้เขากวางอ่อน พบว่าการเติมผงถ่านกัมมันต์ (AC) ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดการเกิดเนื้อเยื่อสีน้ำตาล อีกทั้งยังส่งเสริมการเจริญเติบโตและสามารถพัฒนาแคลลัสไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสได้สูงขึ้นอีกด้วย ส่วนการเติมซิลเวอร์ไนเตรทลงไปในอาหารสังเคราะห์ยังสามารถช่วยลดอาการเกิดเนื้อเยื่อสีน้ำตาลได้เช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างและการเจริญเติบโตของแคลลัสได้อย่างรวดเร็ว

Akasaka. *et al.* (2000)ได้ศึกษาการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ของถั่ว *Arachis hypogaea* L. สายพันธุ์ Chico โดยนำชิ้นส่วนใบมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA 2iP KN 4PU TDZ และ zeatin พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 2 เดือน อาหารที่มี TDZ และ BA ส่งเสริมการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ของถั่วได้ดีที่สุด แต่พบว่ายอดที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงด้วย TDZ นั้นมีความผิดปกติทางสัณฐานวิทยา โดยไม่พบเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และการจัดเรียงตัวของ vascular bundles ภายในลำต้นของพืชนั้นไม่เป็นระเบียบ โดยยอดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงใน BA นั้นมีลักษณะที่ปกติ โดยพบการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่เท่ากับ 10.5 เปอร์เซ็นต์

Bera. *et al*. (2014) ได้ทำการชักนำแคลลัสจากใบของถั่วลิสง *A. prostrata* โดยทำการศึกษาผลการตอบสนองของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA 2,4-D Picloram และสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA TDZ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 6 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินเพียงอย่างเดียว 10 ความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อเปรียบเทียบกับการใช้ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโทไคนินอีก 3 ความเข้มข้น เมื่อทำการเปรียบเทียบแค่สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินเพียงอย่างเดียว พบว่า Picloram ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเจริญของแคลลัสสูงที่สุดถึง 96.6 เปอร์เซ็นต์ และในทุกความเข้มข้น Picloram ก็สามารถชักนำให้เกิดการเจริญของแคลลัสมากกว่า 2,4-D และ NAA ตามลำดับ และเมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบ NAA ร่วมกับ BA กับ TDZ ปรากฏว่า อัตราการเกิดของแคลลัสเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มี NAA ร่วมกับ BA กล่าวได้ว่า BA เป็นสาเหตุของการเจริญเติบโตของแคลลัสที่เพิ่มมากขึ้น และการใช้ 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้อัตราการเจริญของแคลลัสสูงขึ้น และเช่นเดียวกันเมื่อใช้ Picloram ร่วมกับ BA หรือ TDZ ก็ส่งผลให้อัตราการเจริญของแคลลัสเพิ่มขึ้นเช่นกัน ดังนั้นผลการตอบสนองของออกซินจะเพิ่มมากขึ้นก็ต่อเมื่อใช้ร่วมกับไซโทไคนิน มากกว่าการใช้ออกซินเพียงชนิดเดียว สำหรับการชักนำการเจริญเป็นต้นใหม่จากแคลลัส พบว่า NAA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดการเจริญเป็นต้นใหม่สูงที่สุด ซึ่งเท่ากับ 14 เปอร์เซ็นต์

Dolce. *et al*. (2017) ได้ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *A. glabrata* ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 6 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมีแสง 14 ชั่วโมง ปราศจากแสง 10 ชั่วโมง อุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส และหลังจากการเพาะเลี้ยง 10 วัน ได้ทำการย้ายเนื้อเยื่อไปยังอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อทำการชักนำให้เกิดการแตกยอดออกมาจากด้านข้างของใบอีก 35 วัน พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของถั่ว *A. glabrata* ใน TDZ ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของยอดออกจากด้านข้างของใบมากที่สุดถึง 58.3 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนใบเท่ากับ 13.2 ยอด โดยยอดที่เกิดขึ้นนั้นไม่ได้ผ่านการเกิดแคลลัส ปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่นั้น ขึ้นอยู่กับความสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินต่อออกซิน ยังมีรายงานอีกว่า การเพาะเลี้ยงใน NAA หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ Kinetin สามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของยอดได้สำเร็จในหลายสายพันธุ์ของ *Arachis* และยังกล่าวอีกว่า TDZ นั้นมีประสิทธิภาพสูงสุดในการชักนำให้เกิดยอดของถั่วลิสงเถา *Arachis glabrata* เมื่อเปรียบเทียบกับ BA KN และ 2iP ในปัจจุบันการตอบสนองของ TDZ สามารถชักนำให้เกิดออแกโนเจเนซิส จากใบของ *Arachis glabrata*

Limbua. *et al*. (2019) ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นถั่ว *A. hypogaea* L. ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ คือ ICGV12991 CG7 และ Red Valencia โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงจากเมล็ดในสภาวะปราศจากแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 12 วัน เพื่อชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของยอด หลังจากนั้นทำการตัดข้อตรงใบเลี้ยงของพืชมาชักนำให้เกิดยอด โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ วิตามิน B5 น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 4 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่า ชิ้นส่วนพืชมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าจากขนาดปกติ และมีสีเขียว พร้อมทั้งเกิดยอดภายใน 14 วัน โดยพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงใน BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น สามารถชักนำการเกิดยอดสูงที่สุด (90-98 เปอร์เซ็นต์) ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในทางกลับกันชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี BA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เกิดการชักนำยอด 76-83 เปอร์เซ็นต์ (ทั้ง 3 สายพันธุ์) หลังจากนั้นทำการย้ายยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำยอดและมีความยาวประมาณ 0.6 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS วิตามิน B5 น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 4 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อทำการเร่งให้ยอดยาวขึ้น เป็นเวลามากกว่า 2 สัปดาห์ จากการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นส่งผลให้ยอดมีความยาวขึ้นมากที่สุด (73-80 เปอร์เซ็นต์ในทุกสายพันธุ์) ซึ่งความเข้มข้นที่สูงของ BA นั้น (มากกว่า 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถไปยับยั้งความยาวของยอดได้ในทุกสายพันธุ์

Rey. *et al.* (2000) ได้ศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่จากใบของ *A. pintoi* (Leguminosae) ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับนำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ที่เสริมด้วย 2,4-D หรือ NAA ร่วมกับ BA KN หรือ 2iP พบว่าในอาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสได้ หลังจากนั้นทำการย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงใน BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของยอด และพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย Picloram ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA หรือ 2iP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ หลังจากนั้นย้ายเพาะเลี้ยงใน BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดการเจริญเป็นต้นใหม่

Vidoz. *et al*. (2004) ได้ทำการศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่จากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถา *Arachis glabrata* สายพันธุ์ A6138 และ AF385 โดยผ่านกระบวนการโซมาติกเอมบริโอเจนเนซิส พบว่าแคลลัสของ *Arachis glabrata* สายพันธุ์ A6138 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริมด้วย Picloram ความเข้มข้น 10 หรือ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดโซมาติกเอมบริโอสูงที่สุด สำหรับ *Arachis glabrata* สายพันธุ์ AF385 พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย Picloram ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดโซมาติกเอมบริโอสูงที่สุด หลังจากนั้นในสายพันธุ์ A6138 นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เสริมด้วยผงถ่านกัมมันต์ (AC) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตไปเป็นเอมบริโอในรูปแบบของ matured shape ในระยะเวลา 30 วัน และสุดท้ายเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่าเอมบริโอมีการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้เท่ากับ 6 เปอร์เซ็นต์

2.10.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

รัตนาภรณ์ และอนุรักษ์ (2554) ได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วท่าพระสไตโล (*Stylosanthes guianesis* CIAT 184) โดยนำแคลลัสที่เกิดจากใบเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 15 หลังจากการเพาะเลี้ยง โดยมีน้ำหนักสดเท่ากับ 0.6304 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร น้ำหนักแห้ง 0.0360 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหารเพาะเลี้ยง และพบว่าในช่วงวันที่ 3-15 ของการเพาะเลี้ยงนั้น เซลล์อยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในระยะ log phase หลังจากนั้นทำการตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยสารสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต พบว่าเซลล์ที่มีชีวิตมีการเรืองแสงสีเขียว และเซลล์ตายจะไม่พบการติดสีนั่นเอง

ลีลาวดี (2562) ได้ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของถั่วฮามาต้าในรูปแบบของเซลล์แขวนลอย โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในช่วง 15-18 วันหลังจากการเพาะเลี้ยงนั้น เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงขึ้น โดยอยู่ในระยะ log phase และในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยงนั้น พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุด โดยมีน้ำหนักสดเท่ากับ 2.9469 กรัมต่ออาหาร 25 มิลลิลิตร และน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.2742 กรัมต่ออาหาร 25 มิลลิลิตร

Poeaim. *et al.* (2015) ได้ทำการศึกษารูปแบบการเจริญของเซลล์แขวนลอย โดยทำการชักนำแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถา *A. glabrata* สายพันธุ์ Arbrook ในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้ม 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 42 วัน พบว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้นมีการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงสุดถึง 62.5 เปอร์เซ็นต์ ทำการศึกษารูปแบบของเซลล์แขวนลอยโดยเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลวที่ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักเซลล์เริ่มต้น 0.15 กรัม เป็นระยะเวลา 30 วัน โดยเก็บผลการทดลองทุก ๆ 3 วัน พบว่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 24 โดยมีน้ำหนัก 0.4396 กรัม และ 0.0324 กรัม ตามลำดับ เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตสูงสุดอยู่ในช่วงวันที่ 6-24 อีกทั้งยังทำการทดสอบการมีชีวิตอยู่ของเซลล์โดยการย้อมด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซิเตท (FDA) ตามปกติแล้วเซลล์ที่มีชีวิตจะมีการผลิตเอนไซม์เอสเตอร์เรสอยู่ภายในเซลล์ ดังนั้นเมื่อนำเซลล์แขวนลอยมาย้อมด้วย FDA สีดังกล่าวจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เอสเตอร์เรสที่อยู่ภายในเซลล์ เกิดการเรืองแสงสีเหลือง-เขียว แสดงว่าเซลล์นั้นยังมีชีวิตอยู่

Sukhawat and Poeaim (2008) ได้ทำการศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่ของเซลลแขวนลอยของหญ้าไนล์ โดยการนำเอมบริโอเจนิคแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร LS ที่เสริมด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมตอลิตร แอลฟา-คีโต กลูตาริก 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีน ไฮโดรคลอไรด 4 มิลลิกรัมตอลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมตอลิตร พบว่า ในวันที่ 15-18 ของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงนั้น เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุดซึ่งอยู่ในระยะ log phase นั่นเอง

2.10.5 การชักนำให้เกิดราก

Dolce. *et al*. (2017) ได้ทำการคัดเลือกยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่ว *A. glabrata* ในหลอดทดลอง โดยมีความยาวประมาณ 15-20 มิลลิเมตร นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วย AC ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 6.5 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมีแสง 14 ชั่วโมง ปราศจากแสง 10 ชั่วโมง อุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส ทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4-6 สัปดาห์ พบว่ายอดดังกล่าวสามารถเกิดรากได้ถึง 90-95 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 10-15 วัน

Limbua. *et al*. (2019) ได้ทำการชักนำให้เกิดรากของต้นถั่ว *A. hypogaea* L. ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ คือ ICGV12991 CG7 และ Red Valencia โดยคัดเลือกยอดในสภาวะปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดประมาณ 3 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยวิตามิน B5 น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่าอาหารที่เสริมด้วย NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น ส่งเสริมให้เกิดการเจริญเติบโตของรากเฉลี่ย 58-61 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่เสริมด้วย NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น พบว่ามีการเจริญเติบโตของรากเฉลี่ยเท่ากับ 71-78 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารที่เสริมด้วย NAA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบการเจริญเติบโตของรากเฉลี่ยเท่ากับ 65-70 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่เสริมด้วย NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเจริญเติบเติบโตของรากเฉลี่ยเท่ากับ 45-50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบร้อยละการเจริญเติบโตของรากที่เกิดขึ้นในทุกความเข้มข้นของ NAA นั้น พบว่า NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดรากมากที่สุดในทุกสายพันธุ์

Mroginski. *et al.* (2004) ทำการชักนำให้เกิดรากของถั่ว *A. correntina* โดยเริ่มจากการคัดเลือกยอดที่เจริญเติบโตจากแคลลัส โดยมีความยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA พบว่า NAA ความเข้มข้น 0.9310 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดรากได้เร็วที่สุดในระยะเวลา 5-10 วันหลังจากการเพาะเลี้ยง และพบการเจริญเติบโตของรากเท่ากับ 54 เปอร์เซ็นต์

Rey. *et al*. (2000) ได้ชักนำการเกิดรากของถั่ว *A. pintoi* (Leguminosae) โดยพบว่ายอดที่เกิดจากออร์แกโนเจเนซิสสามารถชักนำให้เกิดรากได้ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี NAA ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และยอดที่เกิดจากโซมาติกเอมบริโอนั้นสามารถชักนำให้เกิดรากในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี AC ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

2.10.6 การออกปลูกต้นกล้า

Dolce. *et al*. (2017) ได้ทำการคัดเลือกต้นอ่อนของ *A. glabrata* ที่เกิดรากประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ นำมาล้างด้วยน้ำประปาเบา ๆ เพื่อเอาวุ้นออกจากรากให้สะอาด และวางลงในกระถางพลาสติกที่ประกอบด้วย ดิน พีทมอส และทราย (อัตราส่วน 1:1:1 v/v/v) คลุมกระถางด้วยถุงพลาสติกและปรับสภาพเช่นเดียวกันกับสภาวะในหลอดทดลองประมาณ 3-4 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายต้นกล้าไปเพาะเลี้ยงในสภาวะเรือนกระจก พบว่าพืชมีความแข็งแรงและแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปกติ

Venkatachalarn and Jayabalan (1997) นำต้นกล้าที่ได้จากเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกมาจากหลอดทดลอง และล้างวุ้นออกจากรากด้วยน้ำประปาให้สะอาด หลังจากนั้นทำการย้ายต้นกล้าไปยังถ้วยพลาสติกที่ประกอบด้วย ทราย ดินแดง และปุ๋ยคอก ในอัตราส่วน 1:1:1 คลุมต้นกล้าด้วยถุงพลาสติกเพื่อทำการรักษาระดับความชื้น เพาะเลี้ยงในสภาวะปกติของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 15 วัน หลังจากนั้นทำการย้ายต้นกล้าออกไปยังแปลงเพาะปลูก

Verma. *et al.* (2009) ได้ทำการคัดเลือกต้นอ่อนของ *A. hypogaea* L. สายพันธุ์ PBS24030 HNG-10 M-13 และ M-335 ที่มีรากอย่างสมบูรณ์ นำมาย้ายลงถุงเพาะชำต้นกล้าโดยประกอบด้วยดิน: ทราย: ปุ๋ยคอก/ปุ๋ยหมักมูลไส้เดือน (อัตราส่วน 3:1:1 w/w) หลังจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเวลา 7-10 วัน เพื่อเป็นการปรับสภาพต้นอ่อนของพืช หลังจากนั้นทำกาย้ายต้นอ่อนออกปลูกสู่ธรรมชาติได้อย่างสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 สายพันธุ์ถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*A. glabrata*) ที่ใช้ในการทดลอง

- ถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook
- ถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf
- ถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Florigraze

ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์มาจาก สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ตำบลบางกะดี อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี

3.1.2 ภาชนะและอุปกรณ์

- กระบอกตวง (Cylinder) ; Vit Lab
- กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 ไมครอน ; Whatman เบอร์ 1
- ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Bottle); Wellgrow Glass Industry Co.Ltd
- ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- จานแก้ว (Petri dish) ; ANUMBRA
- ช้อนตักสารเคมี (Spectula)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- แท่งแก้วคนสาร
- บีกเกอร์ (Beaker) ; Kartell
- ปากคีบ (Forceps) ; AMICO Germany stainless
- มีดผ่าตัด (Knives) ; Dura
- ตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร
- หลอดทดลอง (Microcentrifuge tube) ขนาด 0.2 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร ; Quality Scientific Plastics
- อลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum Foil)
- ตัวกรองแบคทีเรีย ขนาด 0.45 ไมครอน

3.1.3 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

- เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและหยาบ (Balance); AG204, Metler Toledo
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow) ; Faster BHA 48
- กล้องถ่ายภาพ (Camera)
- เวอร์เนียคาลิปเปอร์ (Vernier Calipers14) ; Labnet
- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
- ปิเปต (Pipet)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)
- ปิเปตปลายตัด (Pipette)
- ทิปขนาดต่าง ๆ (Tip) ; Quality Scientific Plastics
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ; Eppendorf
- เตาอบไมโครเวฟ (Microwave)
- เครื่องเขย่า (Shaker) ; Innova 2000, New Brunswick Scientific
- ตู้เย็น 4 และ -20 องศาเซลเซียส (Refrigerator)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ; Heto CBN 28-30
- โถดูดความชื้น (Desiccator)
- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Stereo Microscope)

3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.4.1 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ

- เมอคิวริคคลอไรด์ (Mercuric Chloride)
- แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์
- สารลดแรงตึงผิว tween-20
- เซฟโฟแทกซีม (Cefotaxime); Nida pharma Incorporation
- สารป้องกันการปนเปื้อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Preservative for Plant Tissue Culture Media Active (PPM)) ; Plant cell technology
- แอนติไบโอติก (Antibiotic Antimycotic Solution [100X]) ; Sigma

3.1.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการปรับความเป็นกรด-ด่าง

- ไฮโดรคลอริก (HCl)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.1.4.3 อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (MS, 1962)
- น้ำตาลซูโครส (Sucrose)
- ผงถ่านกัมมันต์ (Activated Chacoal; AC)
- เจลแลนกัม (Gellan gum) ; Phytotech

3.1.4.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

สารในกลุ่มออกซิน (Auxins)

- 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ; Phytotech
- 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) ; Phytotech

สารในกลุ่มไซโทไคนิน (Cytokinin)

- 6-benzlyaminopurine (BAP หรือ BA) ; Phytotech
- N6-furfuryladenine (Kinetin) ; Phytotech
- *meta*-Topolin (*m*T) ; Phytotech
- Thidiazuron (TDZ) ; Phytotech

สารในกลุ่มจิบเบอเรลลิน

- Gibberellic acid (GA_3) ; Phytotech

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช (ดัดแปลงมาจาก จิรัชญา และคณะ, 2558)

3.2.1.1 ชิ้นส่วนข้อ

คัดเลือกชิ้นส่วนข้อที่สมบูรณ์ของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook Ecoturf และ Florigraze จากธรรมชาติ โดยทำการตัดให้มีขนาดประมาณ 2 เซนติเมตร ล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด หลังจากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที และนำชิ้นส่วนข้อของพืชที่ได้มาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีดังต่อไปนี้ ขั้นตอนที่ 1 น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ 80 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย Mercuric chloride ($HgCl_2$) ความเข้มข้น 0.18 เปอร์เซ็นต์ (สายพันธุ์ Arbrook และ Ecoturf) และ $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (สายพันธุ์ Florigraze) ร่วมกับ antibiotic cefotaxime PPM ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เติมสารลดแรงตึงผิว tween-20 จำนวน 3 หยด เขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 15 นาที ขั้นตอนที่ 2 ย้ายชิ้นส่วนข้อลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ 80 มิลลิลิตร ที่ประกอบไปด้วย antibiotic cefotaxime PPM ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ tween-20 จำนวน 3 หยด เขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 10 นาที และตามด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทุกขั้นตอนจะทำภายใต้สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที หลังจากทำการฟอกฆ่าเชื้อเสร็จแล้วนั้น นำชิ้นส่วนพืชมาตากให้แห้งภายในตู้ปลอดเชื้อ ตัดแต่งชิ้นส่วนให้มีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร ที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 5.8 โดยอาหารเพาะเลี้ยงนั้นผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทุก ๆ 1 สัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ข้อ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26 บันทึกผลประสิทธิภาพการฟอกฆ่าเชื้อดังสมการที่ 3.1

$$\text{ร้อยละการรอดจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์} = \frac{\text{จำนวนข้อที่รอดจากการปนเปื้อน (ชิ้น)}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนข้อทั้งหมด (ชิ้น)}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.1.2 ชิ้นส่วนใบ

คัดเลือกใบที่สมบูรณ์ของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook Ecoturf และ Florigraze จากธรรมชาติ โดยลักษณะของใบนั้นต้องไม่แก่เกินไปและไม่อ่อนเกินไป ล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด ทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้ ขั้นตอนที่ 1 ฟอกฆ่าเชื้อในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย mercuric chloride ($HgCl_2$) ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ antibiotic cefotaxime PPM ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร และสารลดแรงตึงผิว tween-20 จำนวน 3 หยด เขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 10 นาที ขั้นตอนที่ 2 ย้ายชิ้นส่วนใบของพืชลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากจุลินทรีย์ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

antibiotic cefotaxime PPM ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร และ tween-20 จำนวน 3 หยด เขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 10 นาที และขั้นตอนสุดท้าย ทำการย้ายชิ้นส่วนใบของพืชมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่สะอาดปราศจากเชื้อจุลินทรีย์อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทุกขั้นตอนจะทำภายใต้สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ทำการผึ่งชิ้นส่วนพืชให้แห้งภายในตู้ปลอดเชื้อ เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 5.8 โดยอาหารที่เพาะเลี้ยงนั้นจะผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตัดแต่งชิ้นส่วนใบให้มีขนาดประมาณ 0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทุก ๆ 1 สัปดาห์ จนครบ 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ข้อ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26 บันทึกผลประสิทธิภาพการฟอกฆ่าเชื้อดังสมการที่ 3.2

$$\text{ร้อยละการรอดจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์} = \frac{\text{จำนวนใบที่รอดจากการปนเปื้อน (ชิ้น)}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนใบทั้งหมด (ชิ้น)}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.2 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำข้อให้เกิดยอด

3.2.2.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook

นำชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook ที่ผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพจากการทดลองในข้อ 3.2.1.1 ตัดแต่งชิ้นส่วนให้มีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 0.75 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 5.8 โดยอาหารที่เพาะเลี้ยงจะผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์ สังเกตและบันทึกผลร้อยละการเกิดยอด (สมการที่ 3.3) จำนวนยอดที่เกิดขึ้น และวัดความยาวยอดด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ทุก 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ข้อ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26

3.2.2.2 ถั่วลิสงเถา สายพันธุ์ Ecoturf

นำชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ที่ผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพจากการทดลองในข้อ 3.2.1.1 ตัดแต่งชิ้นส่วนให้มีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 0.5 0.75 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 5.8 โดยอาหารจะผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์ สังเกตและบันทึกผลร้อยละการเกิดยอด ดังสมการที่ 3.3 จำนวนยอดที่เกิดขึ้น และวัดความยาวยอดด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ทุก 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ข้อ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26

3.2.2.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze

นำชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze ที่ผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพจากการทดลองในข้อ 3.2.1.1 ตัดแต่งชิ้นส่วนให้มีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร PPM 1 มิลลิลิตรต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA KN *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 0.75 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 5.8 โดยอาหารที่เพาะเลี้ยงนั้นผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์ สังเกตและบันทึกผลร้อยละการเกิดยอด ดังสมการที่ 3.3 จำนวนยอดที่เกิดขึ้น และวัดความยาวยอดด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ทุก 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ข้อ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26

$$\text{ร้อยละการเกิดยอด} = \frac{\text{ชิ้นส่วนข้อที่เกิดยอด (ยอด)}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนข้อทั้งหมด (ชิ้น)}} \times 100 \qquad (3.3)$$

3.2.3 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำใบให้เกิดแคลลัส

3.2.3.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook

ชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook ที่ผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพในการทดลองที่ 3.2.1.2 นำมาตัดแต่งชิ้นส่วนให้มีขนาดประมาณ 0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 5.8 โดยอาหารที่เพาะเลี้ยงผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเจริญเติบโตหลังการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ โดยสังเกตการเกิดแคลลัส ลักษณะของแคลลัส สีของแคลลัส คำนวณร้อยละการเกิดแคลลัส ดังสมการที่ 3.4 และชั่งน้ำหนักแคลลัสที่เกิดขึ้นภายในตู้ปลอดเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ชิ้น วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26

3.2.3.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf

ชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ที่ผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพในการทดลองที่ 3.2.1.2 นำมาตัดแต่งชิ้นส่วนให้มีขนาดประมาณ 0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 5.8 โดยอาหารที่เพาะเลี้ยงจะผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเจริญเติบโตหลังการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ โดยสังเกตการเกิดแคลลัส ลักษณะของแคลลัส สีของแคลลัส คำนวณร้อยละการเกิดแคลลัส ดังสมการที่ 3.4 และชั่งน้ำหนักแคลลัสที่เกิดขึ้นภายในตู้ปลอดเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ชิ้น วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26

3.2.3.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze

ชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze ที่ผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพในการทดลองที่ 3.2.1.2 นำมาตัดแต่งชิ้นส่วนให้มีขนาดประมาณ 0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 5.8 โดยอาหารที่เพาะเลี้ยงจะผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเจริญเติบโตหลังการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ โดยสังเกตการเกิดแคลลัส ลักษณะของแคลลัส สีของแคลลัส คำนวณร้อยละการเกิดแคลลัส ดังสมการที่ 3.4 และชั่งน้ำหนักแคลลัสที่เกิดขึ้นภายในตู้ปลอดเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ชิ้น วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26

$$\text{ร้อยละการเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนใบที่เกิดแคลลัส (ชิ้น)}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนใบที่รอดชีวิต (ชิ้น)}} \times 100 \qquad (3.4)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

3.2.4.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook

นำแคลลัสถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook ที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.3.1เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ดีสุดในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบ ในการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยนั้นจะชั่งน้ำหนักสดของแคลลัสเริ่มต้น 0.15 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ดีที่สุด ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 5.8 ทำการคัดแยกแคลลัสโดยใช้ช้อนโลหะ กดเซลล์ผ่านตะแกรงสแตนเลสที่มีขนาด 1.0 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงเซลล์ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 10 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส (อนุรักษ์, 2550) เพื่อทำการศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยทุก 3 วัน เป็นระยะเวลา 0-36 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละช่วงเวลา เมื่อเพาะเลี้ยงครบตามระยะเวลาที่กำหนด นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาหาน้ำหนักสด โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 (ที่ผ่านการหาน้ำหนักของกระดาษที่แท้จริงโดยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง) ด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ต่อกับเครื่องดูดอากาศ ทำการล้างเซลล์แขวนลอยบนกรวยกรองด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นทำการกรองเป็นเวลา 1 นาที เพื่อดูดน้ำออกจากตัวอย่างให้มากที่สุด นำเซลล์แขวนลอยที่ได้พร้อมกระดาษกรองมาชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาน้ำหนักสดของเซลล์แขวนลอย ดังสมการที่ 3.5 และ 3.6 จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการหาน้ำหนักสดเรียบร้อยแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำมาอบในโถดูดความชื้นต่อจนกระทั่งน้ำหนักไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง จึงจะสามารถนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งได้ ดังสมการที่ 3.7 และ 3.8

3.2.4.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf

นำแคลลัสถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.3.2 เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ดีสุดในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบ ในการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยนั้นจะชั่งน้ำหนักสดของแคลลัสเริ่มต้น 0.15 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร ที่ประกอบน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ดีที่สุด ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 5.8 ทำการคัดแยกแคลลัสโดยใช้ช้อนโลหะกดเซลล์ผ่านตะแกรงสแตนเลสที่มีขนาด 1.0 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงเซลล์ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 10 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เพื่อทำการศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยทุก 3 วัน เป็นระยะเวลา 0-36 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละช่วงเวลา เมื่อเพาะเลี้ยงครบตามระยะเวลาที่กำหนด นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาหาน้ำหนักสด โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ที่ผ่านการหาน้ำหนักของกระดาษที่แท้จริงโดยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปอบในโถดูดความชื้นจนน้ำหนักไม่มีการเปลี่ยนแปลง) ด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ต่อกับเครื่องดูดอากาศ ทำการล้างเซลล์แขวนลอยบนกรวยกรองด้วยน้ำกลั่นและกรองเซลล์เป็นเวลา 1 นาที เพื่อดูดน้ำออกจากตัวอย่างให้มากที่สุด จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่ได้พร้อมกระดาษกรองมาชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาน้ำหนักสดของเซลล์แขวนลอย ดังสมการที่ 3.5 และ 3.6 หลังจากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการหาน้ำหนักสดเรียบร้อยแล้วมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปอบในโถดูดความชื้นต่อจนกระทั่งน้ำหนักไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง จึงจะสามารถนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งได้ ดังสมการที่ 3.7 และ 3.8

3.2.4.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze

นำแคลลัสถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze ที่ได้จากข้อ (การทดลองที่ 3.2.2.3) มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อทำการปรับสภาพแคลลัสที่มาจากความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน หลังจากนั้นทำการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยโดยเริ่มจากการชั่งน้ำหนักสดของแคลลัสเริ่มต้น 0.15 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสจากข้อที่ดีที่สุด ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 5.8 ทำการคัดแยกแคลลัสโดยใช้ช้อนโลหะกดเซลล์ผ่านตะแกรงสแตนเลสที่มีขนาด 1.0 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงเซลล์ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 10 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เพื่อทำการศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยทุก 3 วัน ในช่วง 0-36 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละช่วงเวลา เมื่อเพาะเลี้ยงครบตามระยะเวลาที่กำหนด นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาหาน้ำหนักสด โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 (ที่ผ่านการหาน้ำหนักของกระดาษที่แท้จริงโดยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปอบในโถดูดความชื้นจนน้ำหนักไม่มีการเปลี่ยนแปลง) ด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ต่อกับเครื่องดูดอากาศ ทำการล้างเซลล์แขวนลอยบนกรวยกรองด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นทำการกรองเป็นเวลา 1 นาทีเพื่อดูดน้ำออกจากตัวอย่างให้มากที่สุด นำเซลล์แขวนลอยที่ได้พร้อมกระดาษกรองมาชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาน้ำหนักสดของเซลล์แขวนลอย ดังสมการที่ 3.5 และ 3.6 หลังจากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการหาน้ำหนักสดเรียบร้อยแล้วมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปอบในโถดูดความชื้นต่อจนกระทั่งน้ำหนักไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง จึงจะสามารถนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งได้ดังสมการที่ 3.7 และ 3.8

$$\text{น้ำหนักสดที่แท้จริง} = \text{น้ำหนักสดที่ชั่งได้} - \text{น้ำหนักกระดาษกรอง} \qquad (3.5)$$

$$\text{ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดที่แท้จริง} = \frac{\text{ผลรวมของน้ำหนักสดที่แท้จริง}}{\text{จำนวนซ้ำ}} \qquad (3.6)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำหนักแห้งที่แท้จริง = น้ำหนักแห้งที่ชั่งได้ - น้ำหนักกระดาษกรอง (3.7)

$$\text{ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งที่แท้จริง} = \frac{\text{ผลรวมของน้ำหนักแห้งที่แท้จริง}}{\text{จำนวนซ้ำ}} \quad (3.8)$$

ทั้ง 3 สายพันธุ์ของถั่วลิสงเถากลาบราต้าวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26

3.2.5 การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการพัฒนาแคลลัสให้เกิดยอดใหม่อย่างสมบูรณ์

3.2.5.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook

นำแคลลัสของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook ที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.3.1 เจริญเติบโตในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ดีสุดในการชักนำใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าให้เกิดแคลลัส หลังจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.8 ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์ บันทึกผลการเจริญเติบโตและสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงทุก 4 สัปดาห์ โดยสังเกตการเกิดลักษณะของแคลลัส สีของแคลลัส คำนวณร้อยละการเกิดยอดจากแคลลัสดังสมการที่ 3.9 จำนวนยอดที่เกิดขึ้น วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ชิ้น วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26

3.2.5.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf

แคลลัสของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.3.2 เจริญเติบโตในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ดีสุดในการชักนำใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าให้เกิดแคลลัส หลังจากนั้นจะทำการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นยอดโดยมีขั้นตอนดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 นำแคลลัสที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.8 ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์ บันทึกผลการเจริญเติบโตและสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงทุก 4 สัปดาห์ โดยสังเกตการณ์เกิดลักษณะของแคลลัสสีของแคลลัสที่เกิดขึ้น และจากผลการทดลองพบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงใน BA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น ส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสได้ดีที่สุดและยังพบอีกว่าแคลลัสนั้นมีสีเขียวเพิ่มขึ้น แต่ยังมีลักษณะที่ฉ่ำน้ำอยู่มาก (friable callus) ขั้นตอนที่ 2 จึงนำแคลลัสที่ได้มาเพาะเลี้ยงใน BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 0.1 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในแสง 2 สภาวะ เพื่อทำการเปรียบเทียบผลการทดลอง ได้แก่ สภาวะที่มีแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน และสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์ บันทึกผลการเจริญเติบโตและสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงทุก 4 สัปดาห์ โดยสังเกตการณ์เกิดลักษณะของแคลลัส สีของแคลลัส คำนวณร้อยละการเกิดยอดอ่อนจำนวนมากจากแคลลัส ดังสมการที่ 3.9 ขั้นตอนที่ 3 นำกลุ่มยอดอ่อนจำนวนมาก (multiple shoot) ที่เกิดขึ้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย GA_3 ความเข้มข้น 0.1 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ไม่สามารถทนความร้อนในอุณหภูมิที่สูงได้ จึงต้องทำการเตรียมสารผ่านตัวกรองแบคทีเรียขนาด 0.45 ไมครอน ภายในตู้ปลอดเชื้อ) เพื่อให้เกิดการยืดของยอดจากแคลลัส เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมง ปราศจากแสง 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารและบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุก 4 สัปดาห์ โดยบันทึกจำนวนยอดเฉลี่ยที่เกิดขึ้น ดังสมการที่ 3.10 วัดความยาวของยอดจากแคลลัสด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ ดังสมการที่ 3.11 วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ชิ้น วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26

3.2.5.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze

นำแคลลัสของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze ที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.3.3 ที่เจริญเติบโตในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ดีสุดในการชักนำใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าให้เกิดแคลลัส หลังจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์ บันทึกผลการเจริญเติบโตและสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงทุก 4 สัปดาห์ โดยสังเกตการณ์เกิดลักษณะของแคลลัส สีของแคลลัส คำนวณร้อยละการเกิดยอดจากแคลลัส ดังสมการที่ 3.9 และจากการทดลองพบว่า แคลลัสจากใบของ Florigraze มีการเจริญเติบโตที่ช้าและลักษณะที่เกิดขึ้นไม่เหมาะสมต่อการนำไปชักนำให้เกิดยอดได้ จึงนำแคลลัสที่ได้จากข้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินเช่นเดียวกัน ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมง ปราศจากแสง 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารและบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุก 4 สัปดาห์ โดยบันทึกร้อยละการเกิดยอดจากแคลลัส จำนวนยอดที่เกิดขึ้น วางแผนการทดลองแบบ (completely randomized design) CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ชิ้น วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{ร้อยละการเกิดยอดจากแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนแคลลัสที่เกิดยอด}}{\text{จำนวนแคลลัสทั้งหมด (ชิ้น)}} \times 100 \quad (3.9)$$

$$\text{จำนวนยอดเฉลี่ยจากแคลลัส} = \frac{\text{ผลรวมของจำนวนยอดที่เกิดจากแคลลัส}}{\text{จำนวนแคลลัสทั้งหมด (ชิ้น)}} \quad (3.10)$$

$$\text{ความยาวยอดเฉลี่ยจากแคลลัส} = \frac{\text{ผลรวมของความยาวยอดที่เกิดจากแคลลัส}}{\text{จำนวนยอดทั้งหมด (ยอด)}} \quad (3.11)$$

3.2.6 การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากและการออกปลูกต้นกล้าในธรรมชาติ

3.2.6.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf

นำยอดของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.5.2 ซึ่งเป็นยอดที่เกิดจากการชักนำผ่านแคลลัส ความยาวประมาณ 4-5 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเสริมด้วย NAA ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร (Dolce *et al.*, 2017) เจลแลมกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชให้มีค่าเท่ากับ 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารและบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุก 4 สัปดาห์ โดยบันทึกจำนวนรากที่เกิดขึ้น ร้อยละการเกิดราก ดังสมการที่ 3.12 วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ยอด วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26

3.2.6.2 ยอดที่สมบูรณ์ของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze

นำยอดของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze ที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.2.3 ซึ่งเป็นยอดที่เกิดจากการชักนำจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า อายุมากกว่า 12 สัปดาห์ ความยาวประมาณ 7-8 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชให้มีค่าเท่ากับ 5.8 เจลแลมกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเสริมด้วย NAA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร (Dolce *et al.*, 2017) เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมง ปราศจากแสง 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารและบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทุก 4 สัปดาห์ โดยบันทึกร้อยละการเกิดราก ดังสมการที่ 3.12 จำนวนรากที่เกิดขึ้น วางแผนการทดลองแบบ (completely randomized design) CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ยอด วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{ร้อยละการเกิดราก} = \frac{\text{จำนวนยอดที่เกิดราก (ราก)}}{\text{จำนวนยอดทั้งหมด (ยอด)}} \times 100 \qquad (3.12)$$

นำต้นกล้าถั่วลิสงเถาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในทุกขั้นตอนมาทำการออกปลูก ซึ่งต้นถั่วลิสงเถากลาบราต้าที่ได้นั้นต้องเป็นต้นที่มีความสมบูรณ์และแข็งแรง คือ มีครบทั้งราก ลำต้น และใบ ล้างอาหารแข็งออกจากต้นถั่วให้สะอาด และแช่ในสารละลายที่ใส่ยาฆ่าเชื้อรา carbendazim ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 15-20 นาที จากนั้นนำมาปลูกลงในกระถางที่ประกอบด้วยดินและเพอร์ไลท์ในอัตราส่วน 1:1 (ดัดแปลงมาจาก Rey and Mroginski, 2003) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำถุงพลาสติกมาครอบไว้ เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก่อนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อค่อย ๆ ทำการปรับสภาพพืช หลังจากนั้นนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง รดน้ำตามปกติ สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงทุก 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชในสภาวะปลอดเชื้อ

4.1.1 ชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า Arbrook Ecoturf และ Florigraze โดยคัดเลือกชิ้นส่วนข้อที่มีความสมบูรณ์ โดยลักษณะของตาข้างจะต้องเป็นสีเขียว ถ้าหากลักษณะของตาข้างเป็นสีน้ำตาลจะทำให้ข้อนั้นไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นยอดต่อไปได้ (รูปที่ 4.1) หลังจากนั้นทำการตัดชิ้นส่วนข้อให้มีขนาดประมาณ 2 เซนติเมตร นำมาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด ฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีการในข้อ 3.2.1.1 โดยใช้เมอคิวริคคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.18 เปอร์เซ็นต์ และเสริมด้วย antibiotic cefotaxime PPM ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งเป็นสารที่สามารถช่วยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้โดยที่ไม่ส่งผลเสียต่อตัวอย่างพืชที่นำมาทำการทดลอง หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS และปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้น หลังจากการเพาะเลี้ยงเพียง 1 สัปดาห์ พบว่าสายพันธุ์ Arbrook และ Ecoturf มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 90 และ 100 ตามลำดับ ลักษณะของข้อเป็นปกติ มีสีเขียว สามารถนำไปชักนำให้เกิดเป็นยอดได้ ส่วนในสายพันธุ์ Florigraze นั้นพบว่ามีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 40 เท่านั้น (ตารางที่ 4.1) ซึ่งพบว่ามีการปนปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในของท่อลำเลียงของพืชนั้นไหลออกมาลงสู่อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ทำให้พืชไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้อย่างสมบูรณ์ จึงได้ทำการเพิ่มความเข้มข้นของเมอคิวริกคลอไรด์เป็น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และเสริมด้วย antibiotic cefotaxime PPM ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเสริมด้วย PPM ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร ลงไปในอาหาร จากการทดลองพบว่าร้อยละการรอดชีวิตของข้อถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze นั้นเพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 70 หลังจากการเพาะเลี้ยงเพียง 1 สัปดาห์ เนื่องจากความเข้มข้นของเมอคิวริกที่เพิ่มขึ้นนั้นไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ และ PPM ส่งผลให้จุลินทรีย์ที่อยู่ในท่อลำเลียงของพืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Rihan *et al.,* 2012) ลักษณะข้อมีความแข็งแรง สมบูรณ์และมีสีเขียว สามารถนำไปชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของยอดต่อไปได้ ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้พบว่าในชิ้นส่วนข้อของ *A. hypogaea* L. ก็ใช้เมอคิวริกคลอไรด์ในการฟอกฆ่าเชื้อเช่นกัน (Al-Joboury, 2012) และ Dolce. *et al.* (2017) ได้ทำการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของ *A. glabrata* ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ 12 นาที หลังจากการเพาะเลี้ยง 10 วัน พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อดังกล่าวนั้นเกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ 100 เปอร์เซ็นต์ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอคิวริกคลอไรด์นั้นส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้มากกว่าโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (maina *et al.*, 2010) แต่ในการฟอกฆ่าเชื้อแต่ละครั้งนั้นต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่น ๆ ด้วย ได้แก่ สภาพแวดล้อม ฤดูกาลของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างที่นำมาทำการทดลอง ความเข้มข้นของสารเคมี และเวลาที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ (Cassells, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อนั้นมีความสำคัญมาก โดย George (1993) ได้กล่าวไว้ว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นจะประสบผลสำเร็จได้นั้นก็ขึ้นอยู่กับวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

ตารางที่ 4.1 ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้าทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยการใช้เมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.18 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ antibiotic PPM cefotaxime 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 15 นาที เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

สายพันธุ์ถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*A. glabrata*)	จำนวนข้อ	ร้อยละการรอดชีวิต[1/2]	ลักษณะของข้อ
Arbrook	10	90[b]±0.00	ไม่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์
Ecoturf	10	100[a] ±0.00	ไม่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์
Florigraze	10	40[c]±0.00	ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 3 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

รูปที่ 4.1 (ก) แสดงลักษณะตาข้างของถั่วลิสงเถากลาบราต้าที่สมบูรณ์ (ข) ตาข้างของถั่วลิสงเถาที่ไม่สมบูรณ์

รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigaze ที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ Arbrook Ecoturf และ Florigraze โดยทำการคัดเลือกใบในธรรมชาติมาทำการทดลอง ลักษณะของใบจะต้องสะอาด ปราศจากศัตรูพืช ไม่แก่เกินไปและไม่อ่อนมากจนเกินไป เนื่องจากความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้ออาจทำให้ใบเกิดความเสียหายและไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในขั้นตอนต่อไปได้ ทำการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าด้วยวิธีการตามขั้นตอนที่ 3.2.1.2 ในขั้นตอนแรก ทำการล้างชิ้นส่วนใบให้สะอาดด้วยน้ำประปา ไม่ควรใช้มือไปขยี้ใบ ซึ่งจะทำให้ชิ้นส่วนเกิดอาการช้ำและตายได้หลังจากการเพาะเลี้ยง ทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ antibiotic cefotaxime PPM ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เขย่าอย่างเนื่องเป็นเวลา 10 นาที เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ พบว่าใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Arbrook Ecoturf และ Florigraze ไม่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และมีร้อยละการรอดชีวิตจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 100 (ตารางที่ 4.2) ซึ่งความเข้มข้นของสารเคมีและระยะเวลาที่ใช้นั้นเหมาะสมต่อชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการทดลอง โดยพบว่าลักษณะของใบในสายพันธุ์ Arbrook มีสีเขียวปนน้ำตาลอ่อน สำหรับสายพันธุ์ Ecoturf ใบมีสีเขียวปนเหลือง และตรงขอบใบที่เกิดการตัดมีสีน้ำตาลเล็กน้อย ส่วนในสายพันธุ์ Florigraze พบว่าใบมีสีเขียวเป็นปกติเหมือนใบก่อนการฟอกฆ่าเชื้อ ตรงขอบใบอาจจะมีสีน้ำตาลเล็กน้อยตามรอยที่ได้ทำการตัดแต่งใบ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (รูปที่ 4.3) การใช้สารเมอคิวริกคลอไรด์ในระยะเวลานานส่งผลให้ชิ้นส่วนพืชเกิดสีน้ำตาลและตายได้ (Johnson *et al.*, 2005 ; Johnson *et al.*, 2011 : Wesely *et al.*, 2011 ; Sen *et al.*, 2013) โดยงานวิจัยของ Bera. *et al*. (2014) ได้นำใบอ่อนของถั่วลิสง *A. prostrata* ฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และสามารถนำไปชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสได้ และงานวิจัยของ Das. *et al*. (2012) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเมอคิวริกคลอไรด์ที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าเมอคิวริกคลอไรด์เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่รุนแรง สำหรับความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการทดลองนั้น ก็ขึ้นอยู่กับความสะอาดของตัวอย่างพืชที่นำมาทำการทดลอง สภาพแวดล้อม พื้นที่เพาะปลูก และฤดูกาล ทำให้ความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อนั้นมีความแตกต่างกันนั่นเอง (Cassells, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยการใช้เมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ antibiotic PPM cefotaxime 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 10 นาที เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

สายพันธุ์ถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*A. glabrata*)	จำนวนใบ	ร้อยละการรอดชีวิต[1/2]	ลักษณะของใบ
Arbrook	10	100[a]±0.00	ไม่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์
Ecoturf	10	100[a] ±0.00	ไม่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์
Florigraze	10	100[a]±0.00	ไม่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 3 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

รูปที่ 4.3 ลักษณะของใบถั่วลิสงเถากลาบราต้าที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ หลังจากการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ (ก) สายพันธุ์ Arbrook (ข) สายพันธุ์ Ecoturf (ค) สายพันธุ์ Florigrze

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำข้อให้เกิดยอดอย่างสมบูรณ์

4.2.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook

จากการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำข้อให้เกิดยอดอย่างสมบูรณ์ของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 0.75 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงใน *m*T นั้นส่งเสริมให้เกิดการชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่า BA และ TDZ (ตารางที่ 4.3) ชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook ที่เพาะเลี้ยงใน *m*T นั้นสามารถชักนำให้ยอดมีความยาวมากในเกือบทุกความเข้มข้น (รูปที่ 4.5) เมื่อเปรียบเทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการทดลอง พบว่า *m*T ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของยอดสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 60 และมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 22.42 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ) ลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นนั้นตั้งตรง มีความแข็งแรงสมบูรณ์ ยอดที่เกิดขึ้นมีสีเขียว พร้อมที่จะเจริญเติบโตต่อไปได้ (รูปที่ 4.6) ในทุกความเข้มข้นของ *m*T นั้นพบว่าส่งผลให้เกิดการเจริญของแคลลัสร่วมด้วยที่บริเวณฐานของยอดเล็กน้อย (ตารางที่ 4.3) สำหรับชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงใน BA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น พบการเกิดยอดเท่ากับร้อยละ 50 (รูปที่ 4.4) แต่มีความยาวยอดเฉลี่ยเพียง 5.90 มิลลิเมตร ลักษณะของยอดนั้นปกติมีสีเขียว ดังรูปที่ 4.7 (ก) เกือบทุกความเข้มข้นของ BA นั้นส่งผลให้เกิดความยาวยอดที่ใกล้เคียงกัน การเจริญเติบโตของยอดนั้นไม่ค่อยสูงมาก และพบว่ามีการเกิดแคลลัสร่วมด้วยที่บริเวณฐานของการเกิดยอดเล็กน้อย (ตารางที่ 4.1 และ รูปที่ 4.7 ก) ส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงในสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่าร้อยละการเจริญของยอดนั้นใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.4) ความยาวยอดเฉลี่ยไม่ค่อยสูงมาก ลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นนั้นไม่สมบูรณ์ และมีความฉ่ำน้ำ เกิดแคลลัสร่วมที่บริเวณฐานของการเกิดยอดจำนวนมาก (รูปที่ 4.7 ข) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Akasaka. *et al.* (2000) ได้กล่าวว่า ยอดของ *Arachis hypogaea* L. สายพันธุ์ Chico ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี TDZ นั้น ส่งผลให้สัณฐานวิทยาของต้นถั่วมีความผิดปกติ โดยพบว่ายอดที่เจริญนั้นไม่มีเนื้อเยื่อปลายยอด และภายในการเรียงตัวของ vascular bundles นั้นไม่เป็นระเบียบ ส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงใน TDZ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีการเจริญเติบโตของยอดเกิดขึ้นเลย (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.7 ค) จากการทดลองพบว่าผลของ TDZ นั้นส่งผลให้เกิดการชักนำของแคลลัสสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3)

จากการศึกษาจึงเลือกชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนถัดไป เนื่องจากมีร้อยละการเกิดยอดร่วมกับมีความยาวยอดเฉลี่ยที่สูง รวมทั้งลักษณะการเกิดยอดที่มีความสมบูรณ์เหมาะต่อการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดราก ซึ่งงานวิจัยของ Souza. *et al*. (2019) พบว่ายอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของ *Opuntia stricta* ที่เกิดจาก *m*T มีความแข็งแรงและสมบูรณ์มากกว่ายอดที่เกิดจาก BA และพบว่า *m*T สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากให้มีความแข็งแรงและเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของพืชในระยะที่ปรับสภาพก่อนการออกปลูก (Valero-Aracama *et al.*, 2009 ; Aremu *et al.*, 2012)

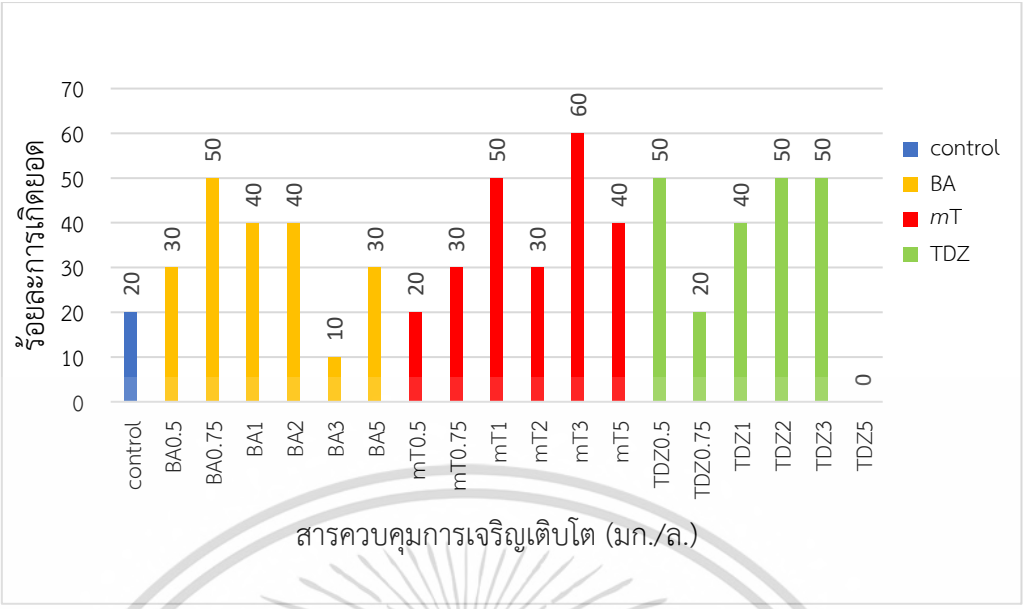
ตารางที่ 4.3 ผลการชักนำข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook ให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มก./ล.)	จำนวนข้อ	ร้อยละการเกิดยอด	ค่าเฉลี่ยความยาวยอด/ข้อ[1/2] (มม.)	ร้อยละการเกิดแคลลัสร่วม/ข้อ
ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (control)	0	10	20	1.73^{kl}±0.28	20
BA	0.5	10	30	4.69^{hij}±0.47	0
	0.75	10	50	5.90^{h} ±0.25	20
	1	10	40	3.01^{jk}±0.22	20
	2	10	40	11.19^{e}±0.42	20
	3	10	10	2.03^{kl}±0.03	10
	5	10	30	8.30^{g}±0.20	20
*m*T	0.5	10	20	11.53^{e}±0.01	10
	0.75	10	30	3.29^{ijk}±0.16	20
	1	10	50	15.26^{d}±0.28	20
	2	10	30	20.24^{b}±0.12	20
	3	10	60	22.42^{a}±0.22	30
	5	10	40	17.29^{c}±0.89	30
TDZ	0.5	10	50	10.44^{ef}±0.36	50
	0.75	10	20	3.12^{ijk}±0.06	10
	1	10	40	8.51^{fg}±0.36	10
	2	10	50	5.34^{hi}±0.11	20
	3	10	50	3.69^{ijk}±0.08	40
	5	10	0	0	50

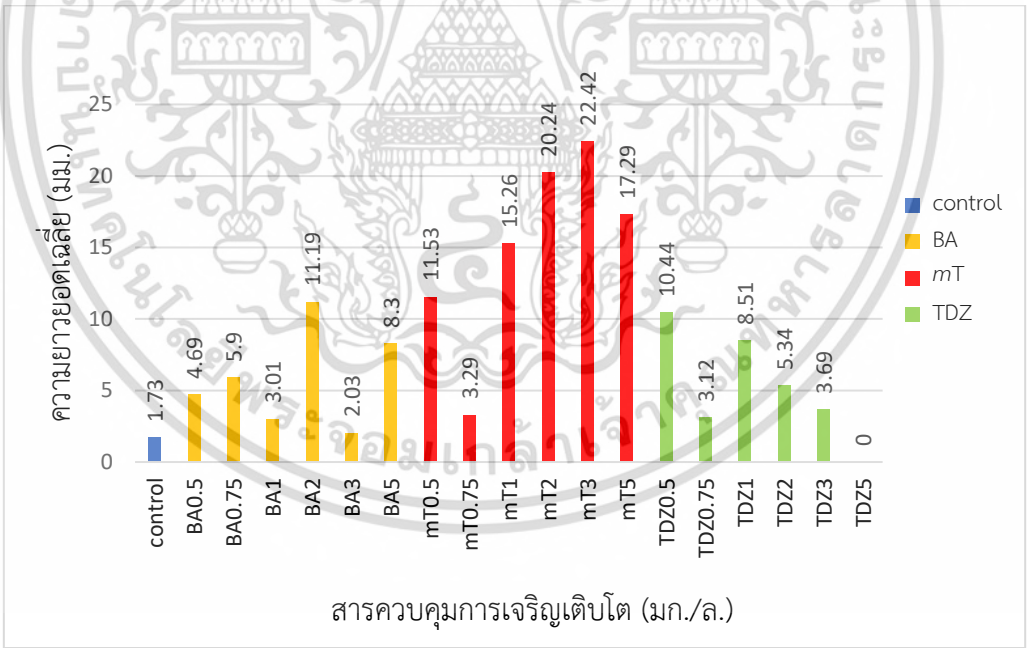
*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 3 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

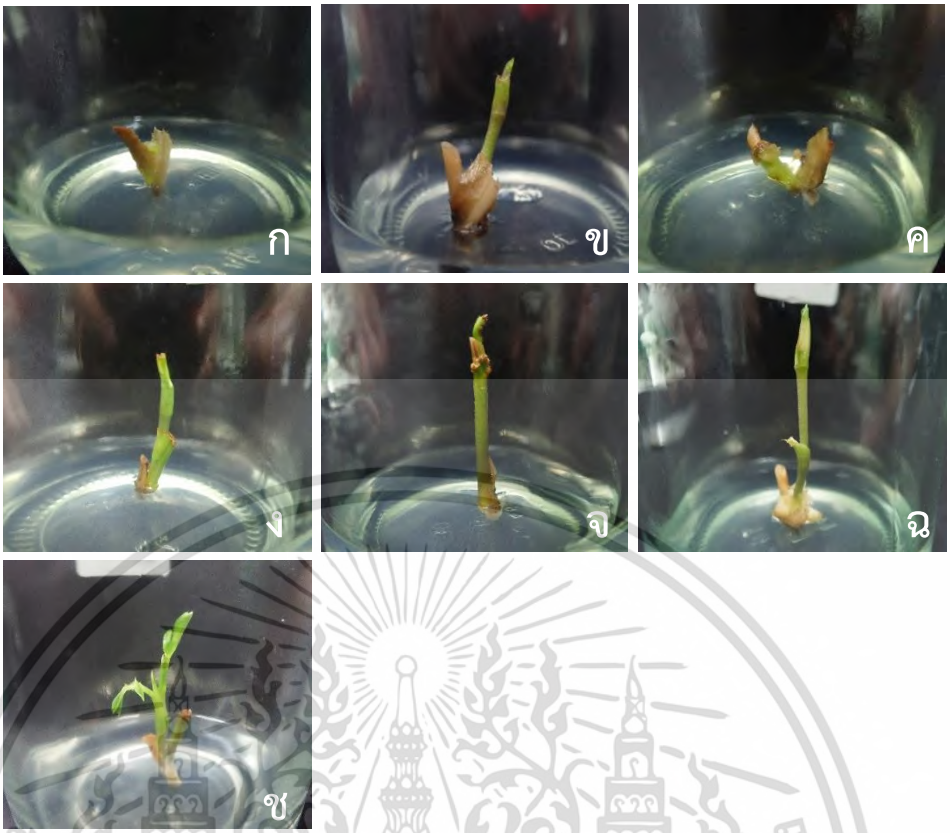


รูปที่ 4.4 ผลการเปรียบเทียบร้อยละการเกิดยอดของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.5 ผลการเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ช) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ที่ความเข้มข้น 0.5 0.75 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

รูปที่ 4.7 ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (ค) TDZ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf

จากการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 0.75 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T มีประสิทธิภาพในการชักนำข้อให้เกิดยอดสูงกว่า BA และ TDZ (ตารางที่ 4.3) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี *m*T ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น ส่งผลให้เกิดยอดสูงสุดถึงร้อยละ 60 และมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 18.75 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.8 และ 4.9 ตามลำดับ) ลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นนั้นตั้งตรง สมบูรณ์และมีความแข็งแรง มีสีเขียว แต่พบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี *m*T ความเข้มข้นอื่น ๆ นั้นมีความฉ่ำน้ำเกิดขึ้น ที่ปลายยอดมีสีน้ำตาล และฐานของการเกิดยอดนั้นมีแคลลัสเกาะกันอย่างหลวม ๆ เกิดร่วมด้วย (รูปที่ 4.10) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เกิดการเจริญของยอดเท่ากับร้อยละ 40 และมีความยาวยอดเท่ากับ 11.65 มิลลิเมตร ซึ่งรองลงมาจาก *m*T ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.4) ลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นมีความแข็งแรงและสมบูรณ์ มีสีเขียวตามธรรมชาติ (รูปที่ 4.11 ก) ในความเข้มข้นอื่น ๆ ของ BA นั้นส่งผลให้ยอดที่เกิดขึ้นนั้นมีความยาวที่ใกล้เคียงกัน และพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบการเจริญเติบโตของยอดเกิดขึ้น แต่พบกลุ่มแคลลัสเกาะกันอย่างหลวม ๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gentile. *et al.* (2014) ได้กล่าวว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบกันระหว่าง BA และ *m*T ในการเจริญเป็นต้นใหม่ของ *Prunus insititia x domestica* พบว่ากลุ่มยอดที่เจริญเติบโตใน *m*T นั้นมีลักษณะที่ดีกว่า BA โดยในส่วนของลำต้นและใบมีลักษณะที่ใหญ่และสมบูรณ์มากกว่า และยังพบอีกว่าเมื่อนำยอดไปชักนำให้เกิดราก ลำต้นที่เพาะเลี้ยงใน *m*T นั้นส่งผลให้รากมีความยาวมากกว่าต้นที่เพาะเลี้ยงใน BA นั่นเอง เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Valero-Aracama. *et al.* (2009) ในต้น *Uniola paniculate* หรือต้น Sea oats และ Bairu. *et al.* (2007) ในต้น *Aloe polyphylla* สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงที่มี TDZ ในทุกความเข้มข้น พบว่ามีร้อยละการเจริญเติบโตของยอดที่ใกล้เคียงกัน (อยู่ระหว่างร้อยละ 30-50) และมีความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 2.64-9.73 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.4) ลักษณะยอดที่เกิดขึ้นนั้นมีสีเขียว ฉ่ำน้ำ และมีกลุ่มเซลล์เกิดขึ้นที่บริเวณฐานที่เกิดยอดอย่างหลวม ๆ (รูปที่ 4.11 ข-ค) ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ El-Mahrouk. *et al.* (2016) ได้ทำการทดลองใน *Aglaonema* 'Valentine' พบว่า TDZ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้บริเวณฐานของยอดบวมขึ้น และมีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ ในทุกความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ พบว่ามีการเกิดขึ้นของแคลลัสร่วมด้วยที่บริเวณฐานของการเกิดยอดในถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf

จากการศึกษาจึงเลือกชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุดในการชักนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้เกิดยอดของ Ecoturf แต่พบว่ายอดที่เกิดขึ้นนั้น ยังมีปริมาณและการเจริญเติบโตที่ไม่เพียงพอต่อการนำไปชักนำให้เกิดรากนั่นเอง

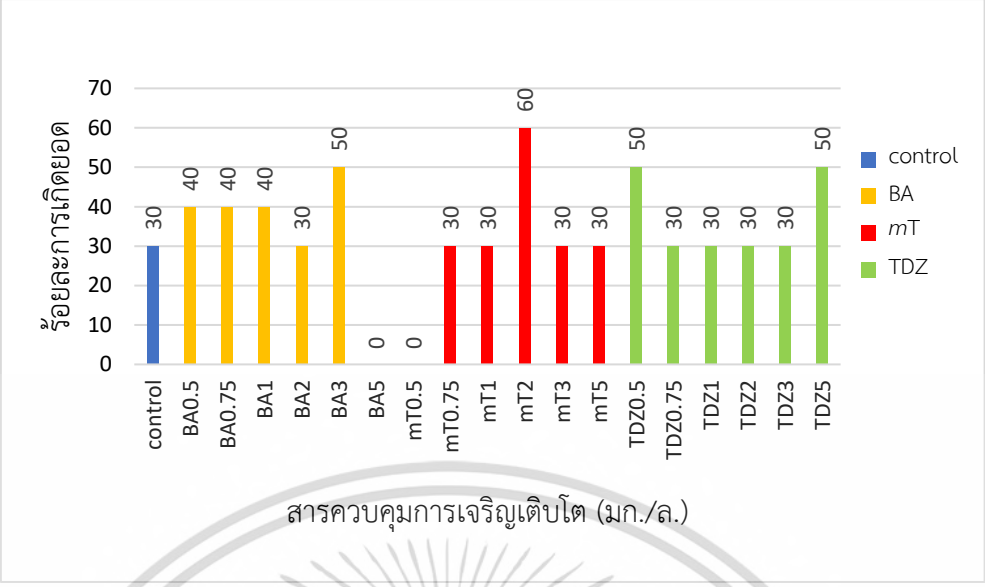
ตารางที่ 4.4 ผลการชักนำข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มก./ล.)	จำนวนข้อ	ร้อยละการเกิดยอด	ค่าเฉลี่ยความยาวยอด/ข้อ[1/2] (มม.)	ร้อยละการเกิดแคลลัสร่วม/ข้อ
ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (control)	0	10	30	3.19^{hi}±0.03	0
BA	0.5	10	40	3.17^{hi}±0.13	40
	0.75	10	40	3.36^{hi}±0.21	40
	1	10	40	11.65^{b}±0.26	20
	2	10	30	1.72^{j}±0.01	20
	3	10	50	2.93^{i}±0.39	40
	5	10	0	0	40
*m*T	0.5	10	0	0	60
	0.75	10	30	6.21^{d}±0.28	40
	1	10	30	2.75^{i}±0.07	50
	2	10	60	18.75^{a}±0.39	50
	3	10	30	3.19^{hi}±0.00	40
	5	10	30	4.41^{fg}±0.53	50
TDZ	0.5	10	50	5.28^{e}±0.24	30
	0.75	10	30	3.80^{gh}±0.40	60
	1	10	30	6.91^{d}±0.39	30
	2	10	30	9.73^{c}±0.11	20
	3	10	30	5.05^{ef}±0.09	10
	5	10	50	2.64^{i}±0.10	30

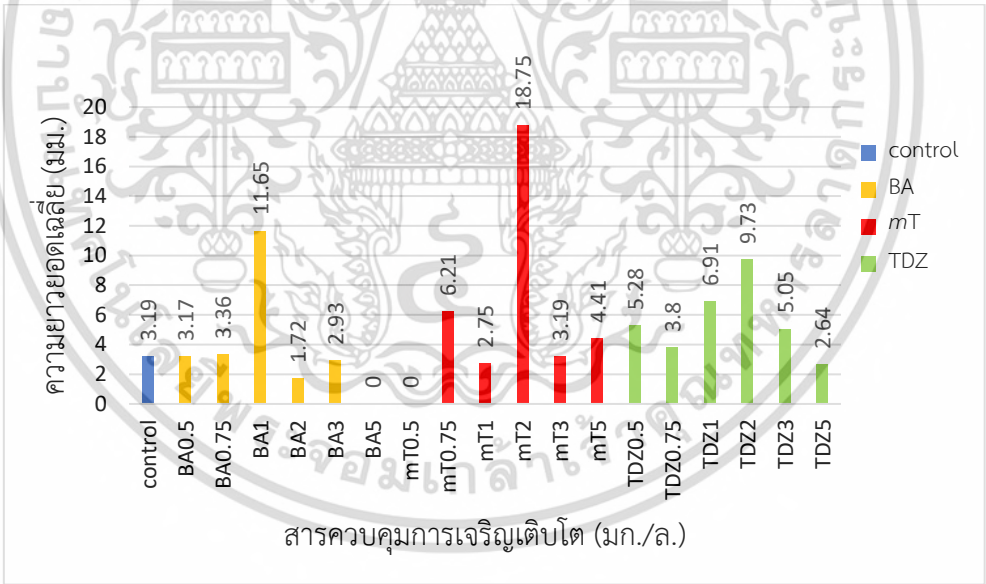
*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 3 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

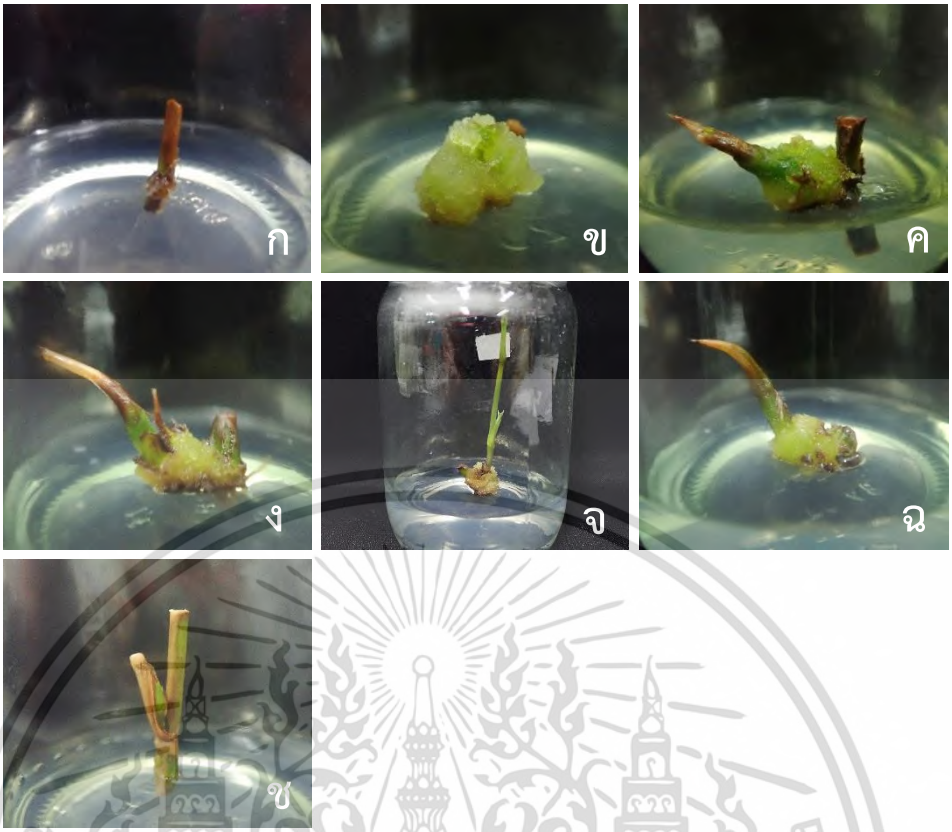


รูปที่ 4.8 ผลการเปรียบเทียบร้อยละการเกิดยอดของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.9 ผลการเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ช) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ที่ความเข้มข้น 0.5 0.75 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

รูปที่ 4.11 ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (ค) TDZ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze

จากการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Florigraze ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA KN *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 0.75 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร PPM ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 3 สัปดาห์ สังเกตเห็นว่าข้อที่เพาะเลี้ยงใน *m*T ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เริ่มมีการเจริญเติบโตของยอดใหม่เกิดขึ้นจากข้อ และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มี *m*T นั้นส่งผลให้เกิดการชักนำยอดได้ดีกว่า KN BA และ TDZ (ตารางที่ 4.5) โดยอาหารที่ประกอบด้วย *m*T ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น มีร้อยละการเกิดยอดและความยาวยอดสูงที่สุด ได้แก่ ร้อยละ 70 และ 18.43 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.12 และ 4.13) ลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นมีความตั้งตรง สมบูรณ์และแข็งแรง ยอดและใบที่เกิดขึ้นมีสีเขียว (รูปที่ 4.14) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fajinmi. *et al*. (2014) พบว่า *m*T ความเข้มข้น 1.206 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดของ *Coleonema album* สูงสุดเท่ากับ 14.5 ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ และมีความยาวสูงสุด 13.2 มิลลิเมตร เมื่อทำการเปรียบเทียบกับไซโทไคนินตัวอื่น ๆ สำหรับ Florigraze รองลงมาคืออาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย KN นั้นส่งผลให้เกิดการชักนำยอดได้ดีกว่า BA และ TDZ โดยพบว่า KN ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มียอดเกิดขึ้นร้อยละ 60 และความยาวยอดเท่ากับ 6.32 มิลลิเมตร ซึ่งข้อที่เพาะเลี้ยงใน KN นั้นจะพบการเกิดแคลลัสร่วมได้น้อยกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตตัวอื่น ๆ ได้แก่ *m*T BA และ TDZ (ตารางที่ 4.5) ลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นนั้นมีความสมบูรณ์ และแข็งแรง ยอดและใบที่เกิดขึ้นนั้นมีสีเขียวตามปกติ (รูปที่ 4.15 ก) สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย BA นั้นมีการเกิดยอดอยู่ระหว่างร้อยละ 20-40 และยอดที่เกิดขึ้นมีความยาวที่ใกล้เคียงกันในแต่ละความเข้มข้น (รูปที่ 4.12 และ 4.13 ตามลำดับ) พบว่าข้อที่เพาะเลี้ยงใน BA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น ลักษณะของยอดนั้นตั้งตรงแต่มีความลีบมากกว่ายอดที่เพาะเลี้ยงใน *m*T และ KN ตามลำดับ ยอดและใบที่เกิดขึ้นมีสีเขียวปกติ (รูปที่ 4.15 ข) ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย TDZ พบว่ามีอัตราการเกิดยอดเฉลี่ยที่ค่อนข้างต่ำกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตตัวอื่น ๆ ยอดที่เกิดขึ้นมีลักษณะฉ่ำน้ำ ไม่ค่อยแข็งแรง และพบว่ามีร้อยละการเกิดแคลลัสร่วมกับการเกิดยอดจำนวนมาก ก้อนของแคลลัสค่อนข้างใหญ่และมีความฉ่ำน้ำ มีสีเขียวเกิดขึ้นเล็กน้อย กลุ่มเซลล์เกาะกันอย่างหลวม ๆ หรือเรียกว่า friable callus ที่บริเวณฐานของการเกิดยอด (รูปที่ 4.15 ค) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ชักนำข้อของ Florigraze ให้เกิดยอดนั้นจะทำการเติม PPM ลงไปในอาหารด้วย เนื่องจากเมื่อระยะเวลาผ่านไปพบการไหลของเอนโดไฟต์ออกมาลงสู่อาหาร ซึ่งพบว่าเกิดจากการปนเปื้อนของเอนโดไฟต์อยู่ในท่อลำเลียงของพืช (Compton and Koch 2001 ; Jimenez *et al.,* 2006) และในงานวิจัยของ Faizy. *et al*. (2017) ได้กล่าวว่า PPM สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่อยู่ในท่อลำเลียงของพืชได้ โดย PPM จะเข้าไปทำลายผนังเซลล์และทำลายเอนไซม์หลายชนิดที่มีความสำคัญต่อวงจรกรดซิตริกและวงจรการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนของแบคทีเรีย จากการศึกษาจึงเลือกชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยง *m*T ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ในการชักนำให้เกิดรากในขั้นตอนถัดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

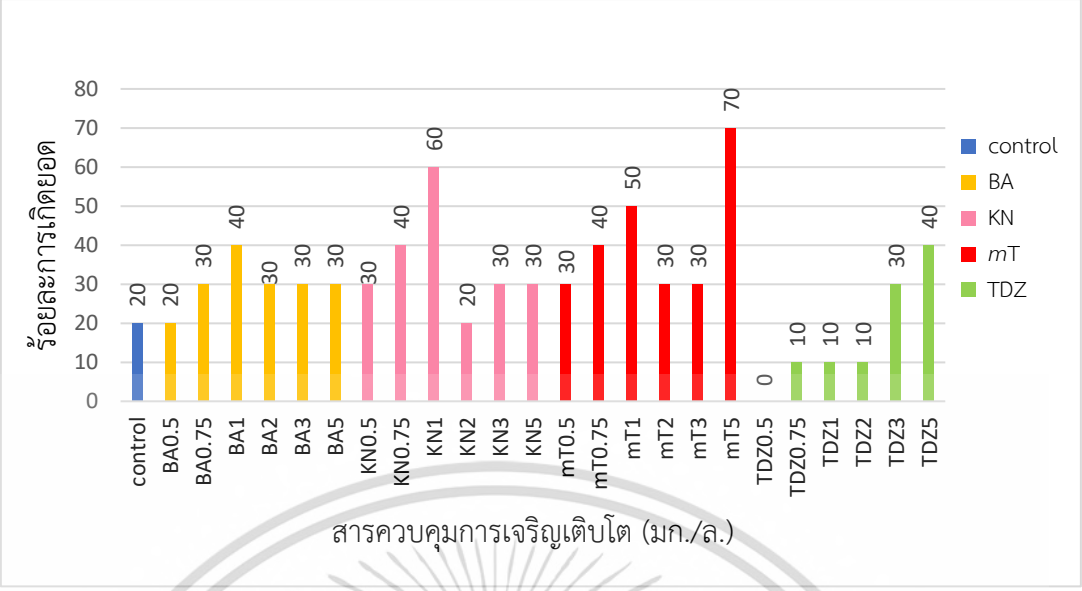
ตารางที่ 4.5 ผลการชักนำข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze ให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA KN *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มก./ล.)	จำนวนข้อ	ร้อยละการเกิดยอด	ค่าเฉลี่ยความยาวยอด/ข้อ[1/2] (มม.)	ร้อยละการเกิดแคลลัสร่วม/ข้อ
ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (control)	0	10	20	4.32^{efg} ±0.46	0
BA	0.5	10	20	5.54^{cdef}±0.48	30
	0.75	10	30	9.01^{bc} ±1.40	20
	1	10	40	4.49^{efg}±0.08	40
	2	10	30	5.77^{cdef}±1.17	20
	3	10	30	5.62^{cdef}±0.43	10
	5	10	30	5.28^{defg}±0.19	20
KN	0.5	10	30	4.64^{efg} ±0.39	10
	0.75	10	40	6.32^{cdef}±0.60	0
	1	10	60	9.89^{b} ±1.80	0
	2	10	20	3.02^{fg} ±0.24	0
	3	10	30	5.44^{cdef}±0.55	20
	5	10	30	5.61^{cdef}±0.55	10
*m*T	0.5	10	30	5.56^{cdef}±0.34	30
	0.75	10	40	3.82^{fg} ±0.29	30
	1	10	50	5.54^{cdef}±0.14	20
	2	10	30	3.78^{fg} ±0.10	10
	3	10	30	6.22^{cdef}±0.04	20
	5	10	70	18.43^{a} ±0.77	20
TDZ	0.5	10	0	0	30
	0.75	10	10	4.88^{efgh}±0.58	50
	1	10	10	1.83^{hi} ±1.83	40
	2	10	10	4.64^{fgh}±2.49	60
	3	10	30	7.98^{bcde}±1.65	50
	5	10	40	8.34^{bcd}±0.40	50

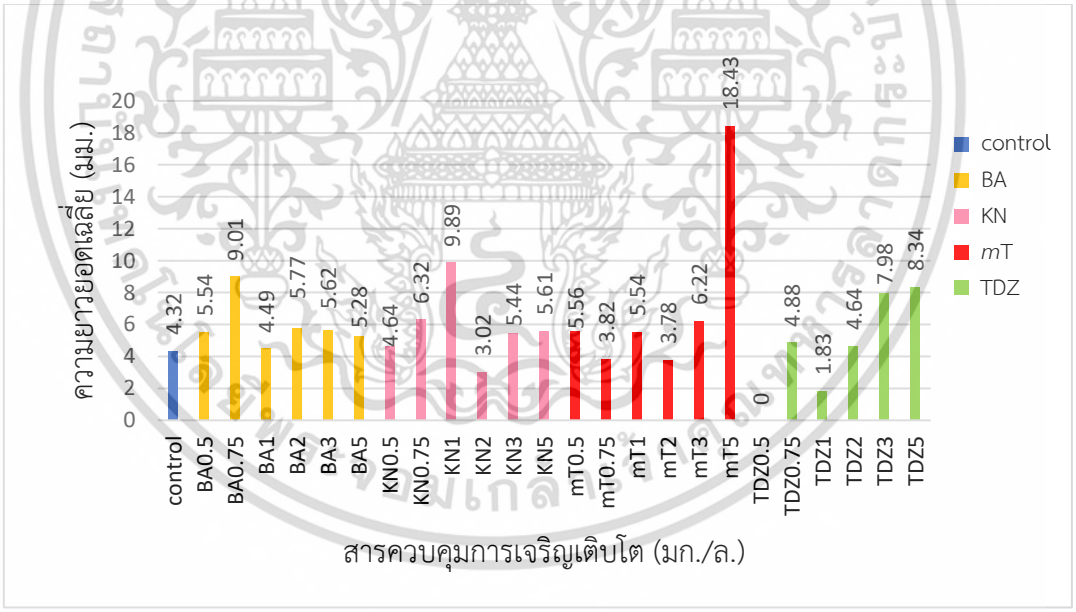
*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 3 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

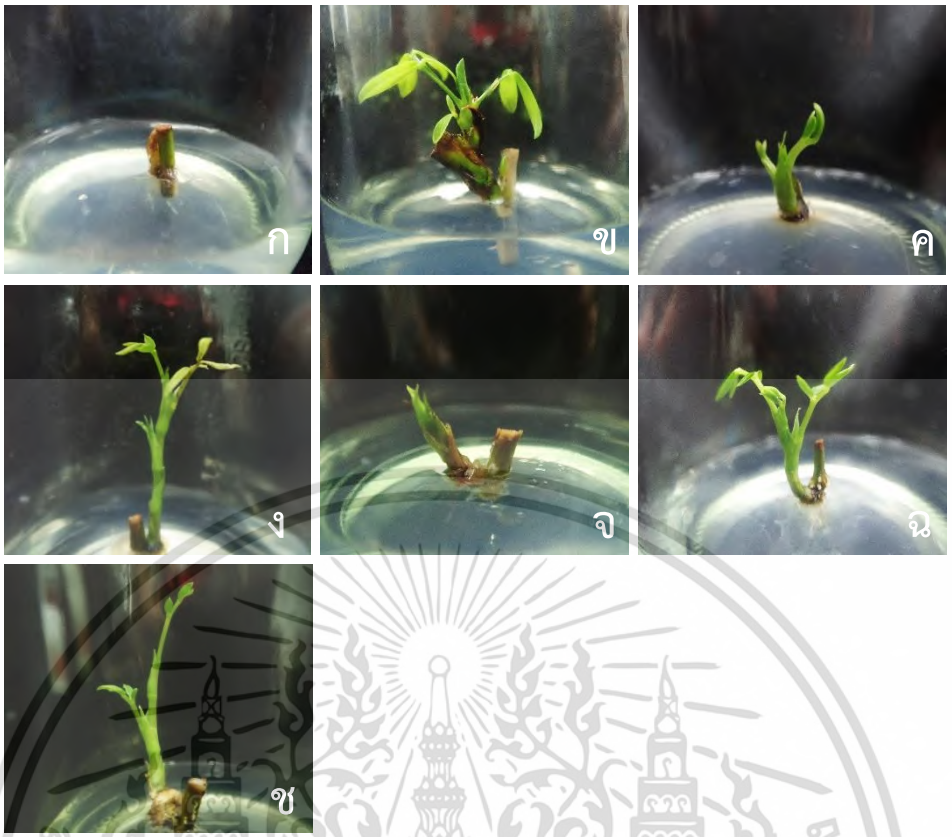


รูปที่ 4.12 ผลการเปรียบเทียบร้อยละการเกิดยอดจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA KN *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.13 ผลการเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA KN *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ช) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ที่ความเข้มข้น 0.5 0.75 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

รูปที่ 4.15 ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต KN ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) BA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (ค) TDZ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำใบให้เกิดแคลลัส

4.3.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสจากใบที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้ออย่างสมบูรณ์ในถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาวะปราศจากแสง 24 ชั่วโมง เมื่อระยะเวลาผ่านไป 3 สัปดาห์ พบว่าในทุกความเข้มข้นของ 2,4-D เริ่มมีการเจริญเติบโตของแคลลัสเกิดขึ้นที่บริเวณขอบใบ ที่เกิดจากการตัดแต่งชิ้นใบ แคลลัสที่เกิดขึ้นนั้นมีสีขาวใส เมื่อการเพาะเลี้ยงผ่านไปเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ชิ้นส่วนใบเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง โดยเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลอ่อน แคลลัสมีการเจริญเติบโตที่มากขึ้น กลุ่มเซลล์เป็นสีขาวใสอมสีเหลืองอ่อนซึ่งเป็นสีที่เข้มที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่เกิดขึ้นในสายพันธุ์อื่น ๆ ของถั่วลิสงเถากลาบราต้า มีลักษณะฉ่ำน้ำ และเกาะกันอย่างหลวม ๆ หรือที่เรียกว่า friable callus (รูปที่ 4.16) จากการทดลองพบว่าในอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วย 2,4-D ทุกความเข้มข้นนั้นส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.6) และอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นส่งผลให้เกิดแคลลัสมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 56.67 และแคลลัสมีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.810 กรัม (รูปที่ 4.17 และ 4.18 ตามลำดับ) กลุ่มของแคลลัสนั้นมีความใหญ่ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่เกิดขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี 2,4-D ความเข้มข้นอื่น ๆ แคลลัสเริ่มมีสีขาวขุ่น แต่ยังมีความฉ่ำน้ำอยู่ กลุ่มเซลล์เกาะกันอย่างหลวม ๆ (รูปที่ 4.16 จ) รองลงมาคืออาหารเพาะเลี้ยงที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบการเจริญเติบโตของแคลลัสเท่ากับร้อยละ 40 และน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 0.524 กรัม จากผลการทดลองสังเกตเห็นได้ว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น ส่งผลให้เกิดแคลลัสเท่ากับร้อยละ 50 ซึ่งมากกว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ลักษณะกลุ่มของแคลลัสนั้นมีขนาดเล็ก และน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสนั้นน้อยกว่า 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยงสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (control) พบว่าไม่มีการเจริญเติบโตของแคลลัสเกิดขึ้น (ตารางที่ 4.5) ซึ่งงานวิจัยของ Sagare. *et al*. (2000) ได้ทำการชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัส *Corydalis yanhusuo* ในสภาวะปราศจากแสง และงานวิจัยของ Narasimhulu and Reddy (1983) พบว่าในอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสสูงสุดใน *A. hypogaea* L. จากการศึกษาการชักนำแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook จึงเลือกอาหารเพาะเลี้ยงที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากสามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสและมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสสูงสุด เพื่อใช้ในการทดลองถัดไปในการศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสในรูปแบบเซลล์แขวนลอยและการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้อย่างสมบูรณ์

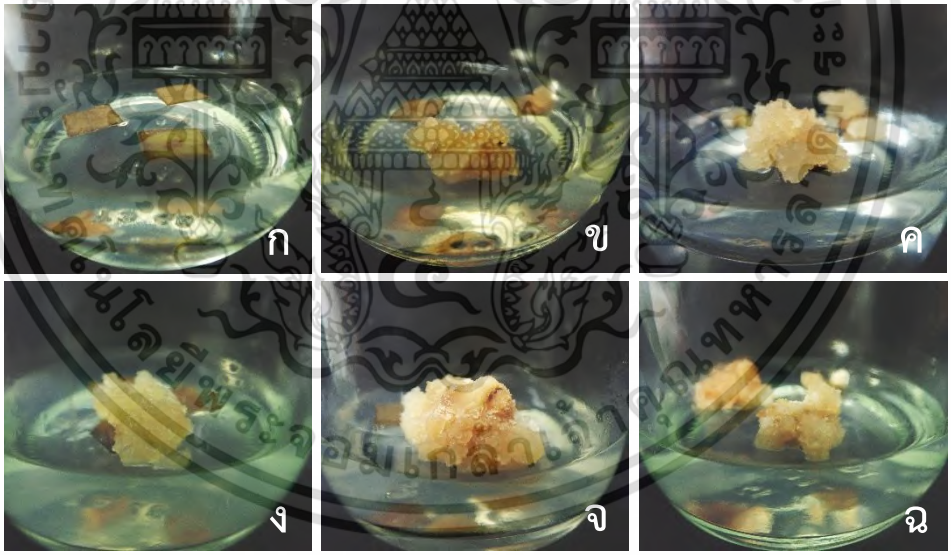
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ผลการชักนำใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook ให้เกิดแคลลัสบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D (มก./ล.)	จำนวนใบ	จำนวนและร้อยละการรอดชีวิต	จำนวนและร้อยละการเกิดแคลลัส	น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส[1/2] (กรัม)
0	30	30 (100)	0 (0)	0
0.5	30	30 (100)	5 (16.67)	0.1280[c]±0.00
1	30	30 (100)	12 (40)	0.5240[b]±0.08
2	30	23 (76.67)	5 (21.73)	0.4630[b]±0.00
3	30	30 (100)	17 (56.67)	0.8100[a]±0.15
5	30	29 (96.67)	15 (50)	0.3770[b]±0.06

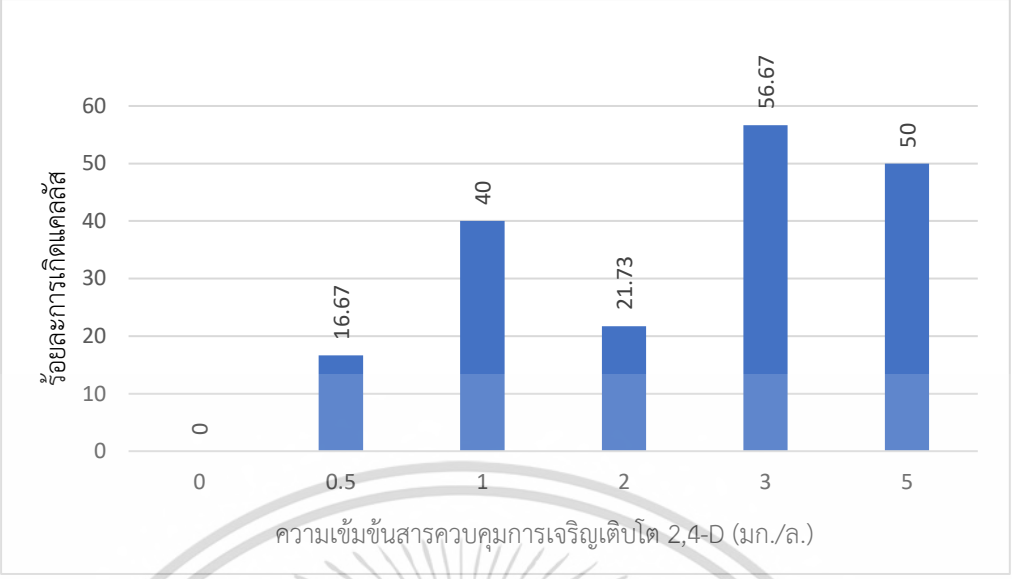
*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 10 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

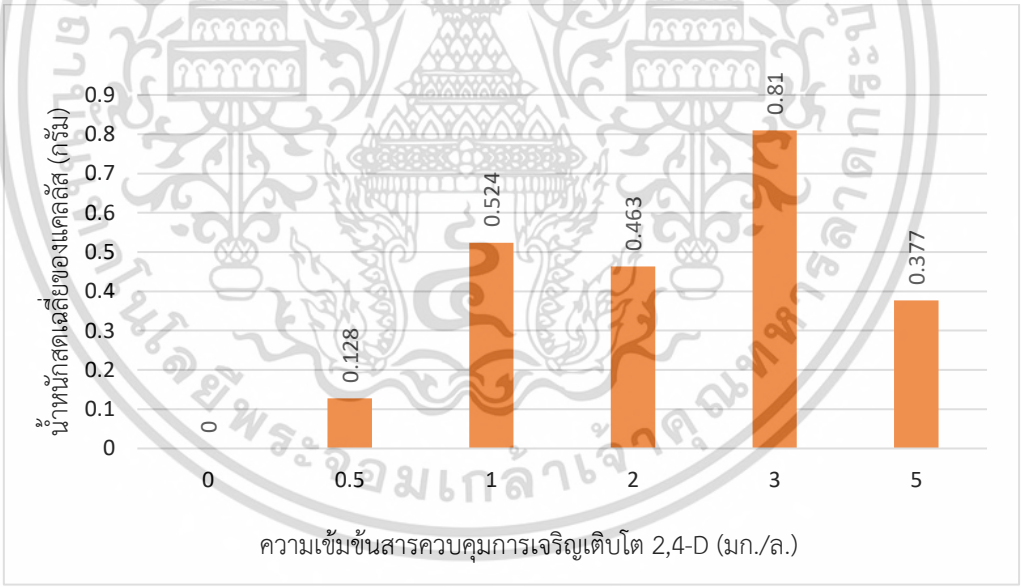


รูปที่ 4.16 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 ผลการเปรียบเทียบร้อยละการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.18 ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสจากใบที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้ออย่างสมบูรณ์ในถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาวะปราศจากแสง 24 ชั่วโมง เมื่อระยะเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนใบที่ทำการเพาะเลี้ยงเริ่มมีแคลลัสเกิดขึ้นที่บริเวณขอบใบแคลลัสมีสีขาวใส และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงผ่านไปเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วย 2,4-D ทุกความเข้มข้นนั้นส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.7) ลักษณะของแคลลัสมีความฉ่ำน้ำเล็กน้อย เกาะกันอย่างหลวม ๆ กลุ่มเซลล์เป็นสีขาวขุ่น ชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง โดยเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีเหลืองปนน้ำตาลเล็กน้อย (รูปที่ 4.19) โดยอาหารเพาะเลี้ยงที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น ส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 100 และแคลลัสมีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.685 กรัม (รูปที่ 4.20 และ 4.21) รองลงมาคืออาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีการเจริญเติบโตของแคลลัสเท่ากับร้อยละ 96.3.-100 และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสเท่ากับ 0.579 และ 0.513 กรัม ตามลำดับ อาหารเพาะเลี้ยงที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เกิดร้อยละการเจริญเติบโตของแคลลัสและน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสน้อยที่สุด เท่ากับร้อยละ 86.67 และ 0.272 กรัม ตามลำดับ สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าไม่มีการเจริญเติบโตของแคลลัสเกิดขึ้น (ตารางที่ 4.7) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Eapen and George (1993) พบว่า 2,4-D สามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอเจเนซิสจากใบเลี้ยงของถั่ว *Arachis hypogaea* L. สายพันธุ์ JLM-1 ได้ดีกว่า Picloram และงานวิจัยของ Muthusamy. *et al*. (2007) พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มี 2,4-D ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสจากชิ้นส่วนลำต้นของถั่ว *Arachis hypogaea* L. สายพันธุ์ Co-5 และ Co-7 และงานวิจัยของ ณัตฐิยา (2562) ได้ทำการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวชิวแดง พบว่าเมื่อนำเมล็ดข้าวมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสร้อยละ 85 และให้น้ำหนักแห้งเฉลี่ยเท่ากับ 0.0414 กรัม จากการศึกษาการชักนำแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf จึงเลือกอาหารเพาะเลี้ยงที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากสามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสและมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสสูงสุด เพื่อนำมาใช้ในการทดลองถัดไปในการขยายปริมาณแคลลัสหรือศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสในรูปแบบเซลล์แขวนลอย และการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้อย่างสมบูรณ์

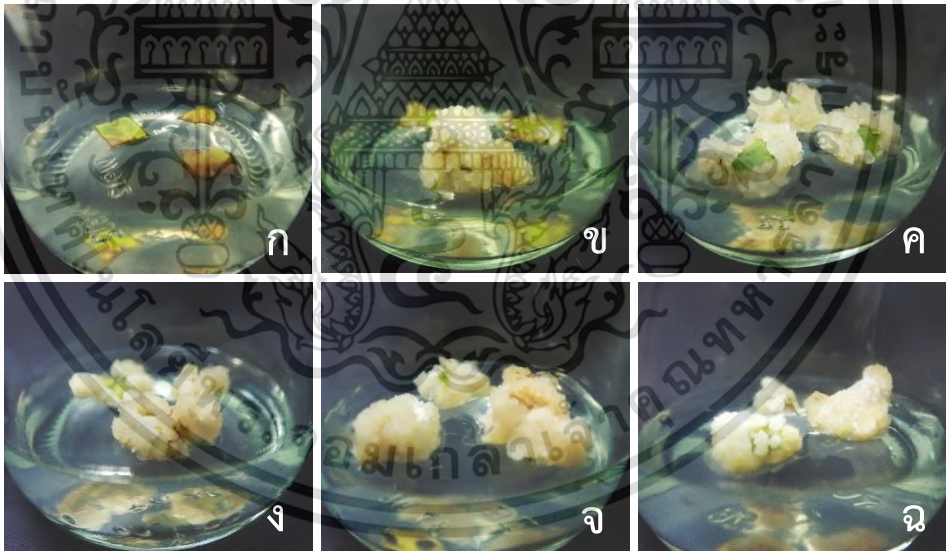
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ผลการชักนำใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ให้เกิดแคลลัสบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D (มก./ล.)	จำนวนใบ	จำนวนและร้อยละการรอดชีวิต	จำนวนและร้อยละการเกิดแคลลัส	น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส[1/2] (กรัม)
0	30	26 (86.67)	0 (0)	0
0.5	30	30 (100)	26 (86.67)	0.2720^{d}±0.02
1	30	27 (90)	26 (96.30)	0.5010^{c}±0.02
2	30	30 (100)	30 (100)	0.5130^{bc}±0.02
3	30	30 (100)	30 (100)	0.6850^{a}±0.03
5	30	27 (90)	26 (96.30)	0.5790^{b}±0.02

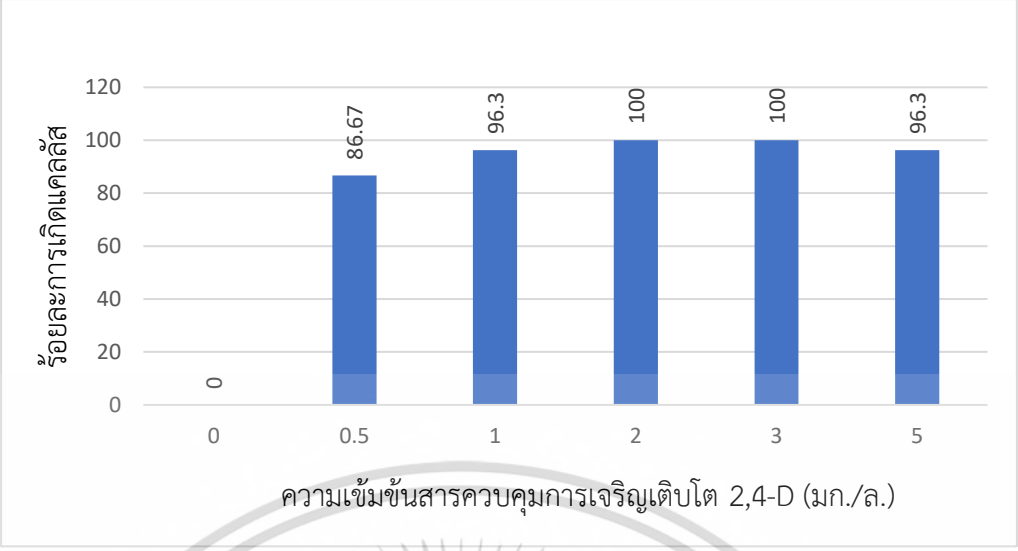
*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 10 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

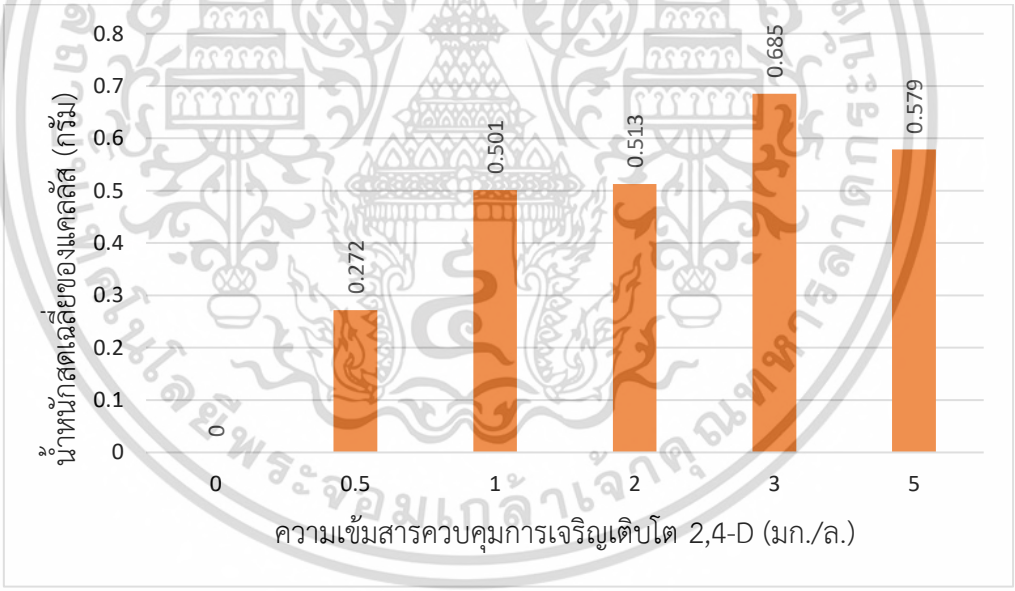


รูปที่ 4.19 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.20 ผลการเปรียบเทียบร้อยละการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.21 ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสจากใบที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้ออย่างสมบูรณ์ในถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาวะปราศจากแสง 24 ชั่วโมง เมื่อระยะเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ พบว่าเริ่มมีการเจริญเติบโตของแคลลัสเกิดขึ้นที่บริเวณขอบใบเล็กน้อย ซึ่ง 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน สามารถส่งเสริมการเบ่งตัวของเซลล์ได้ (อนุรักษ์, 2550) และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี 2,4-D ทุกความเข้มข้นนั้นส่งผลให้กลุ่มแคลลัสที่เกิดขึ้นมีการพัฒนาและเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น จากขอบใบเข้ามาที่กลางใบกลุ่มเซลล์มีสีขาวใสปนเหลือง มีความฉ่ำน้ำ เกาะตัวกันแบบหลวม ๆ หรือที่เรียกว่า friable callus สีของใบมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเป็นสีเหลืองอมน้ำตาลเล็กน้อย (รูปที่ 4.22) จากการทดลองพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เกิดแคลลัสสูงสุดถึงร้อยละ 100 และแคลลัสนั้นมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดถึง 0.513 กรัม (รูปที่ 4.23 และ 4.24) กลุ่มของแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสในความเข้มข้นอื่น ๆ แต่จะสังเกตเห็นได้ว่าแคลลัสยังมีความฉ่ำน้ำอยู่ และเกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ สีของแคลลัสค่อนข้างเหลือง (รูปที่ 4.22 จ) รองลงมาคืออาหารเพาะเลี้ยงที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการเกิดแคลลัสเท่ากับร้อยละ 73.33 และแคลลัสนั้นมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.257 กรัม ถึงแม้ว่าอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นจะมีร้อยละการเกิดแคลลัสที่น้อยกว่า 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.8) แต่กลุ่มแคลลัสที่เกิดขึ้นนั้นมีขนาดใหญ่กว่าและสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้เป็นอย่างดี (รูปที่ 4.22) ซึ่งในงานวิจัยของ Alam and Khaleque (2010) ได้กล่าวว่า 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในถั่ว *Arachis hypogeae* L. ซึ่งลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นนั้นมีสีน้ำตาล เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ (friable callus) และงานวิจัยของ ศาลักษณ์ (2536) ได้ทำการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบของถั่วเหลือง สายพันธุ์ Okuharawase Edamame โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับวิตามิน B5 และเสริมด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในส่วนอาหารเพาะเลี้ยงที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้นไม่พบการเจริญเติบโตของแคลลัสเกิดขึ้น ลักษณะของใบมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวไปเป็นสีเหลืองอมน้ำตาล (ตารางที่ 4.8 และ รูปที่ 4.22) จากการศึกษาการชักนำแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Florigraze จึงเลือกอาหารเพาะเลี้ยงที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากสามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสและมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสสูงสุด กลุ่มของแคลลัสที่เกิดขึ้นนั้นมีขนาดใหญ่และปริมาณมาก เพื่อนำไปใช้ในการทดลองถัดไปในการเพิ่มปริมาณแคลลัสหรือศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสในรูปแบบเซลล์แขวนลอย และการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้อย่างสมบูรณ์

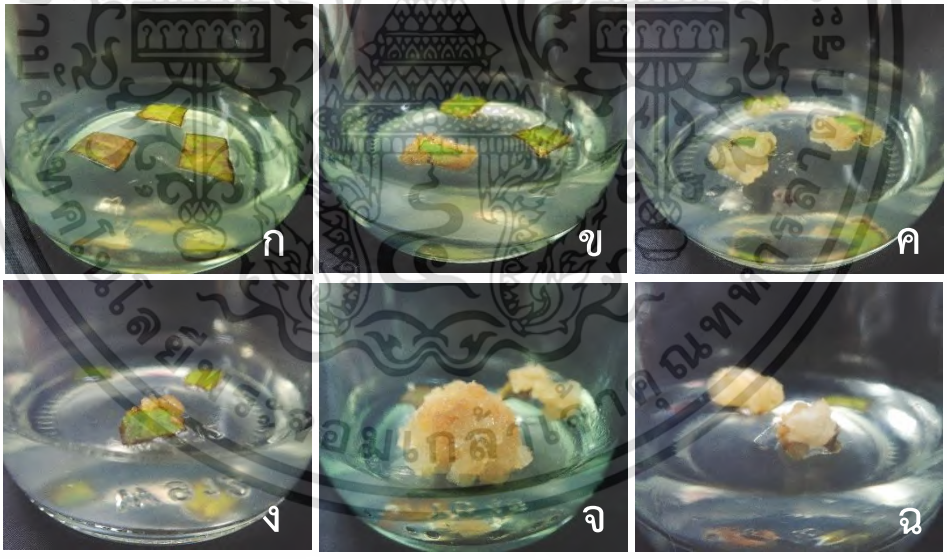
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ผลการชักนำใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze ให้เกิดแคลลัสบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D (มก./ล.)	จำนวนใบ	จำนวนและร้อยละการรอดชีวิต	จำนวนและร้อยละการเกิดแคลลัส	น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส[1/2] (กรัม)
0	30	30 (100)	0 (0)	0
0.5	30	30 (100)	11 (36.67)	0.0950[d]±0.01
1	30	27 (90)	19 (70.37)	0.1530[c]±0.00
2	30	28 (93.33)	23 (82.14)	0.1780[c]±0.00
3	30	30 (100)	30 (100)	0.5130[a]±0.02
5	30	30 (100)	22 (73.33)	0.2570[b]±0.01

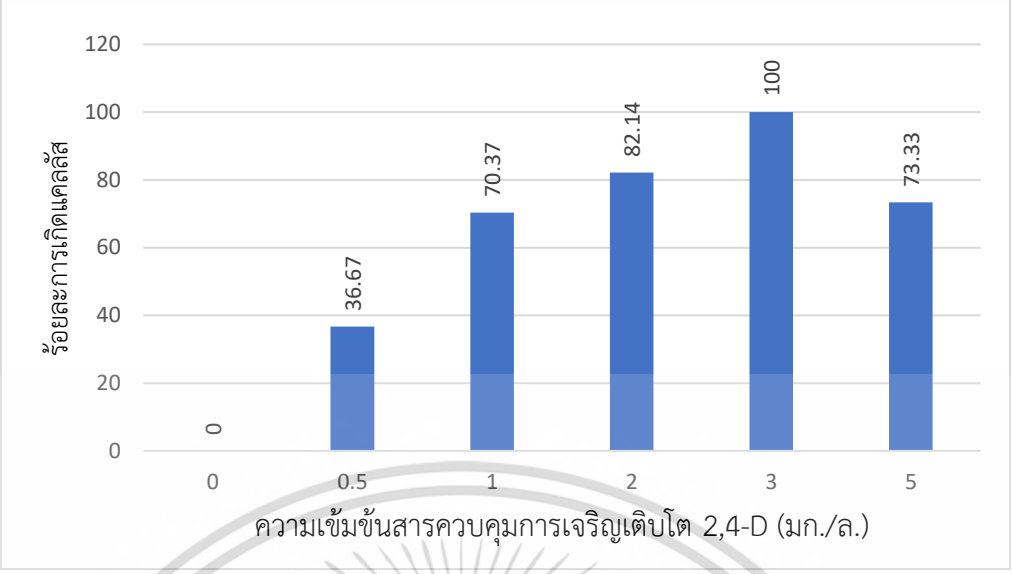
*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 10 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

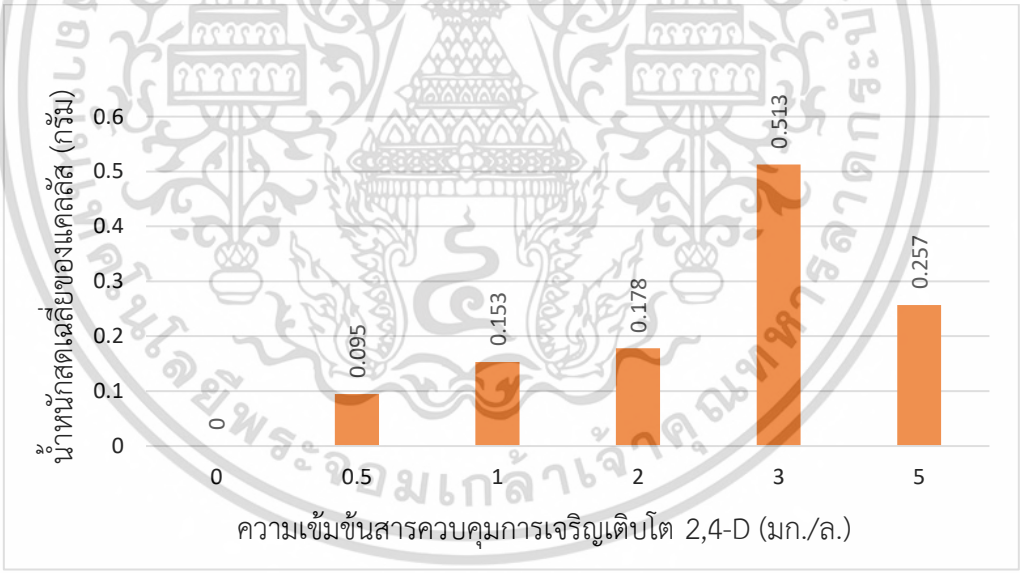


รูปที่ 4.22 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Florigraze (ก) เมื่อเพาะเลี้ยง ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.23 ผลการเปรียบเทียบร้อยละการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.24 ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

4.4.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook

จากการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook ผลการทดลองที่ 4.3.1 พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ อาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เกิดการชักนำแคลลัสจากใบได้ดีที่สุด ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นพบว่า มีการเกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ (friable callus) ซึ่งเหมาะสมในการนำไปศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (รังสฤษณ์, 2541) หลังจากนั้นทำการแบ่งแคลลัสออกเป็น 2 ส่วนของการทดลอง ได้แก่ การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย และการนำแคลลัสไปชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่อย่างสมบูรณ์ ในส่วนของการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยนั้นเริ่มจากนำแคลลัสมาบดผ่านตะแกรงที่มีขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อให้เซลล์เริ่มต้นมีขนาดที่เท่ากันมากที่สุด นำมาชั่งน้ำหนักสดเริ่มต้นในสภาวะปลอดเชื้อเท่ากับ 0.15 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร บนสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เพื่อทำการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย (ตารางที่ 4.9) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงพบว่าเซลล์มีการแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และสังเกตเห็นการเจริญเติบโตเกิดขึ้นตามระยะเวลาต่าง ๆ โดยการหาค่าน้ำหนักสด (รูปที่ 4.25 ก) และน้ำหนักแห้ง (รูปที่ 4.25 ข) จากผลการทดลองพบว่าในช่วงแรก ระยะเวลาที่ 0-12 วัน เซลล์ยังอยู่ในระยะ lag phase ซึ่งมีการเจริญเติบโตที่ช้า เนื่องจากเซลล์ต้องมีการปรับตัวเข้ากับอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ต่อมาในระยะเวลาที่ 12-24 วัน เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูง และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุด โดยมีค่าน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.3380 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยเท่ากับ 0.0211 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร (ตารางที่ 4.9) ซึ่งตรงกันกับงานวิจัยของ Poeaim. *et al.* (2015) โดยพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ Arbrook ในอาหารเหลวที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 24 หลังจากการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกัน และสอดคล้องกับงานวิจัยของ รัตนาภรณ์ และอนุรักษ์ (2554) ได้กล่าวว่าอาหารเหลวที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น เป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุดในการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยในถั่วท่าพระสไตโล (*Stylosanthes guianesis* CIAT 184) ในการทดลองนี้พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยมีค่าน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.3380 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยเท่ากับ 0.0211 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร (ตารางที่ 4.8) ซึ่งเรียกว่าช่วง expotential phase หรือ log phase นั่นเอง เซลล์มีลักษณะเป็นก้อนกลม สีขาวใสอมน้ำตาล (รูปที่ 4.26) ซึ่งจากการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าแคลลัสของ Arbrook มีสีที่ค่อนข้างจะน้ำตาลอยู่แล้ว ในระยะเวลาที่ 27-30 วัน เป็นช่วง stationary phase พบว่าเซลล์มีอัตราการเกิดใกล้เคียงกับอัตราการตาย ซึ่งเป็นช่วงสุดท้ายสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยที่ยังมีชีวิต หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะ death phase ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เซลล์แขวนลอยมีอัตราการตายมากกว่าการเจริญเติบโตนั่นเอง ในช่วงระยะเวลา 30-36 วัน พบว่าเซลล์มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งที่ลดลงไปอย่างมาก (ตารางที่ 4.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

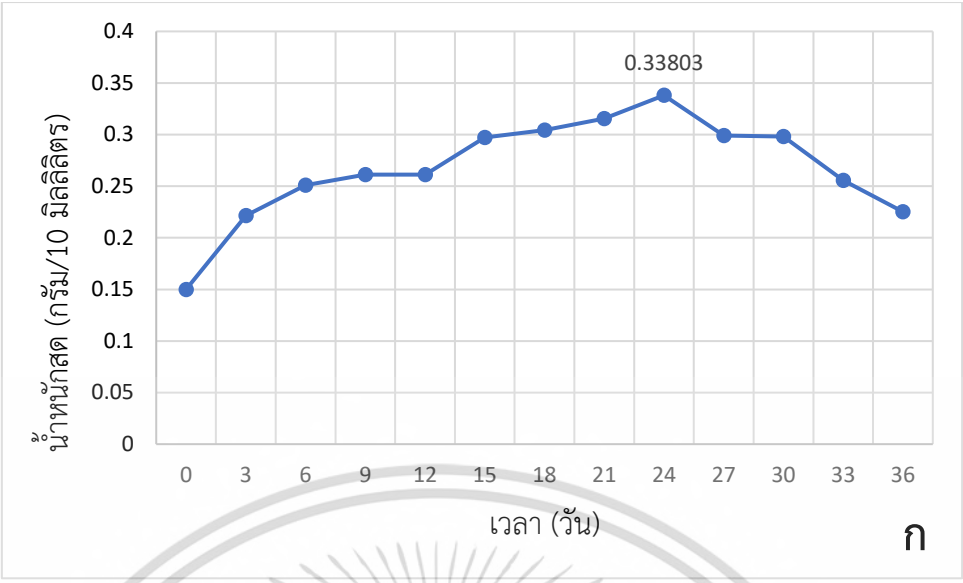
ตารางที่ 4.9 ผลแสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเซลล์แขวนลอยในถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 36 วัน

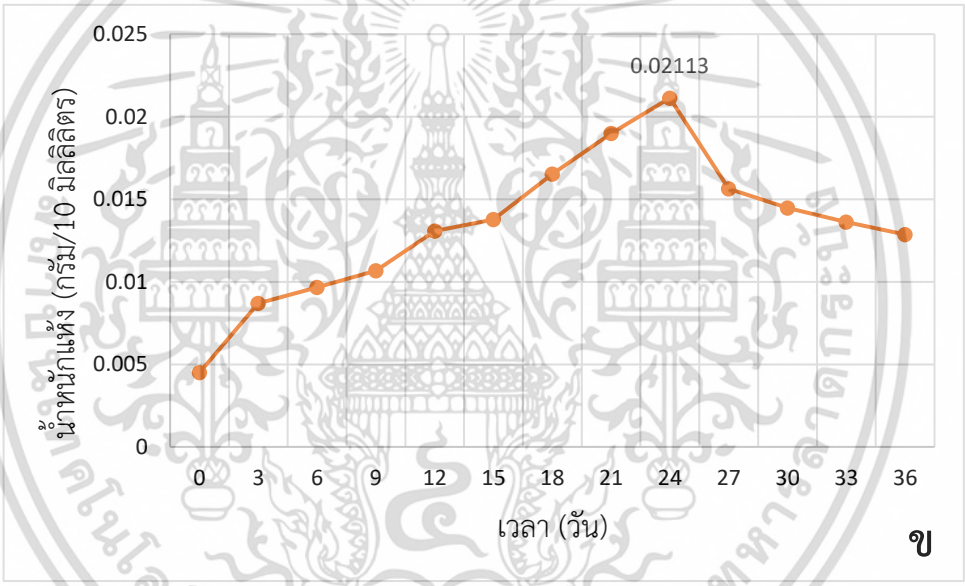
เวลา (วัน)	น้ำหนักสดเฉลี่ย[1/2] (กรัม/ 10 มิลลิลิตร)	น้ำหนักแห้งเฉลี่ย[1/2] (กรัม/ 10 มิลลิลิตร)
0	0.1500^{d}±0.00	0.0045^{b}±0.00
3	0.2214^{c}±0.00	0.0087^{ab}±0.00
6	0.2510^{bc}±0.00	0.0096^{ab}±0.00
9	0.2610^{bc}±0.02	0.0106^{ab}±0.00
12	0.2611^{bc}±0.02	0.0130^{ab}±0.00
15	0.2971^{ab}±0.01	0.0137^{ab}±0.00
18	0.3042^{ab}±0.01	0.0165^{ab}±0.00
21	0.3154^{ab}±0.01	0.0190^{a}±0.00
24	0.3380^{a}±0.02	0.0211^{a}±0.00
27	0.2989^{ab}±0.01	0.0156^{ab}±0.00
30	0.2983^{ab}±0.00	0.0144^{ab}±0.00
33	0.2557^{bc}±0.00	0.0136^{ab}±0.00
36	0.2253^{c}±0.05	0.0128 ^{ab}±0.00

*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 3 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





รูปที่ 4.25 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) น้ำหนักสด (ข) น้ำหนักแห้ง

รูปที่ 4.26 เซลล์แขวนลอยจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook เป็นเวลา 24 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf

จากการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ผลการทดลองที่ 4.3.2 ทำการแบ่งแคลลัสออกเป็น 2 ส่วน ของการทดลอง ได้แก่ การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย และการนำแคลลัสไปชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่อย่างสมบูรณ์ ในส่วนของการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยนั้นเริ่มจากนำแคลลัสมาบดผ่านตะแกรงที่มีขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อให้เซลล์เริ่มต้นมีขนาดที่เท่ากันมากที่สุด นำมาชั่งน้ำหนักสดเริ่มต้นในสภาวะปลอดเชื้อเท่ากับ 0.15 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุดในการพัฒนาและเจริญเติบโตของแคลลัสของสายพันธุ์ Ecoturf บนสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เพื่อทำการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย (ตารางที่ 4.10) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงพบว่าเซลล์มีการแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ จำนวนมาก บันทึกผลการทดลองโดยการเก็บน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส (รูปที่ 4.27 ก) และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของแคลลัส (รูปที่ 4.27 ข) เมื่อการเพาะเลี้ยงผ่านไปในระยะเวลา 0-9 วัน พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ ซึ่งอยู่ในช่วง lag phase จากนั้นในระยะเวลา 12-27 วัน เซลล์จะเข้าสู่ระยะ log phase โดยสังเกตเห็นการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก และพบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงผ่านไป 27 วัน เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด และเริ่มมีการเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นเป็นสีเขียวอ่อน (รูปที่ 4.28 ก) ซึ่งส่งผลให้มีน้ำหนักสดของแคลลัสเท่ากับ 0.4678 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร และ น้ำหนักแห้งของแคลลัสเท่ากับ 0.0810 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร (ตารางที่ 4.10) หลังจากนั้นเซลล์จะเข้าสู่ระยะ stationary phase หลังจากวันที่ 27-30 และสุดท้ายเข้าสู่ระยะ death phase ในวันที่ 30-36 พบว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเซลล์ใหม่และน้ำหนักเซลล์มีปริมาณลดลง โดยอนุรักษ์ (2550) ได้กล่าวว่าในช่วง log phase นั้นเหมาะต่อการนำเซลล์ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น การเปลี่ยนอาหารใหม่ การนำเซลล์ไปแยกโพรโทพลาสต์ การนำไปทดสอบกับสารเคมีหรือเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงได้ทำการเปลี่ยนอาหารของเซลล์แขวนลอยในช่วง log phase โดยทำการดูดเซลล์ผ่านปิเปตปลายตัดปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร โดยเซลล์แขวนลอย 1 ฟลาสต์ สามารถเปลี่ยนใส่อาหารใหม่ได้ทั้งหมด 2 ฟลาสต์ ซึ่งเป็นการขยายปริมาณของเซลล์แขวนลอย และเมื่อระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงผ่านไป 12 สัปดาห์ สังเกตได้ว่าเซลล์มีการเพิ่มปริมาณเป็นทวีคูณ มีลักษณะเป็นก้อนกลมผสมกับทรงยาวที่ใหญ่ขึ้น มีเซลล์เล็ก ๆ เกิดขึ้นใหม่จำนวนมาก โดยเซลล์มีสีเขียวและยังพบจุดสีเขียวเกิดขึ้นบนเซลล์ (รูปที่ 4.28 ข) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mansur. *et al*. (1993) ได้นำแคลลัสของถั่ว *Arachis Villosulicarpa* Hoehne ที่มีลักษณะเป็น friable มาเพาะเลี้ยงในรูปแบบของเซลล์แขวนลอย ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย picloram ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และงานวิจัยของ สมัชชา (2543) พบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของนมตำเลีย (*Hoya* spp.) ในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์สูงสุดหลังจากการเพาะเลี้ยง 14 วัน โดยเซลล์มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะจับตัวกันแบบหลวม ๆ จากการทดลองในที่นี้สามารถนำเซลล์ที่ได้ไปชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้อย่างสมบูรณ์

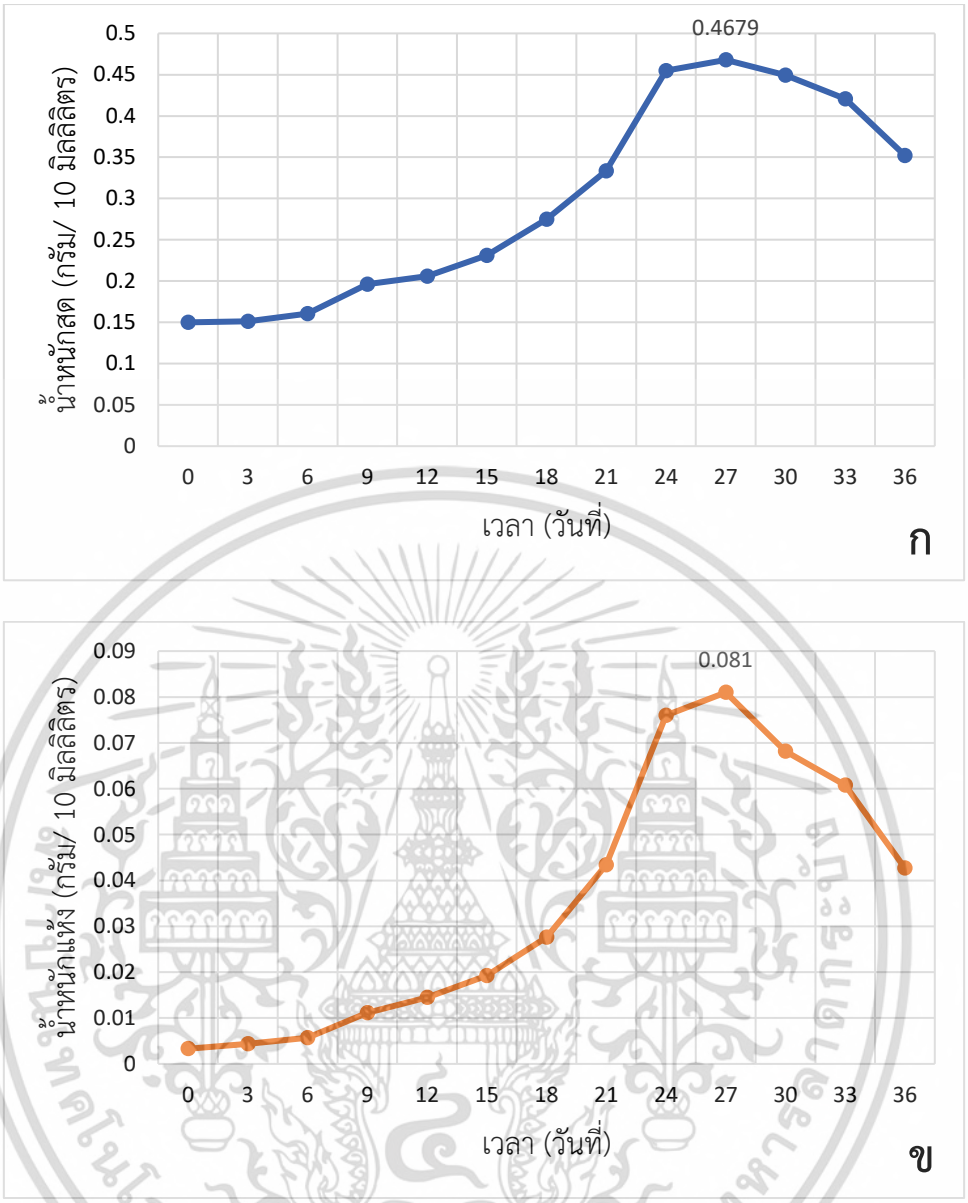
ตารางที่ 4.10 ผลแสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเซลล์แขวนลอยในถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 36 วัน

เวลา (วัน)	น้ำหนักสดเฉลี่ย[1/2] (กรัม/ 10 มิลลิลิตร)	น้ำหนักแห้งเฉลี่ย[1/2] (กรัม/ 10 มิลลิลิตร)
0	0.1500^{d}±0.00	0.0033^{e}±0.00
3	0.1513^{d}±0.01	0.0044^{e}±0.00
6	0.1607^{d}±0.02	0.0057^{e}±0.00
9	0.1961^{cd}±0.00	0.0111^{de}±0.00
12	0.2058^{cd}±0.02	0.0145^{de}±0.00
15	0.2309^{cd}±0.01	0.0192^{de}±0.00
18	0.2751^{bc}±0.01	0.0276^{cd}±0.00
21	0.3334^{b}±0.00	0.0434^{c}±0.00
24	0.4549^{a}±0.02	0.0764^{ab}±0.00
27	0.4678^{a}±0.01	0.0810^{a}±0.00
30	0.4494^{a}±0.02	0.0682^{ab}±0.01
33	0.4209^{a}±0.07	0.0608^{b}±0.01
36	0.3521^{b}±0.01	0.0427^{c}±0.00

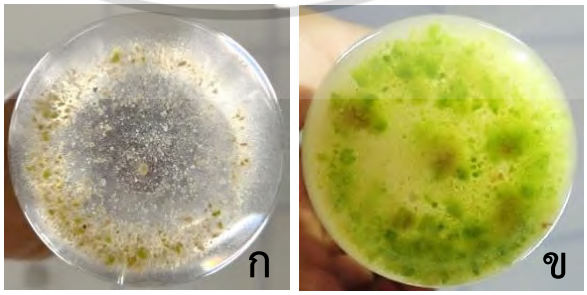
*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 3 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.27 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) น้ำหนักสด (ข) น้ำหนักแห้ง



รูปที่ 4.28 (ก) เซลล์แขวนลอยจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf ในระยะเวลา 27 วัน (ข) เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze

จากการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze พบว่ามีแคลลัสเกิดขึ้นจำนวนมากที่บริเวณฐานของการเกิดยอด มีลักษณะฉ่ำน้ำ เกาะกันอย่างหลวมๆ หรือที่เรียกว่า friable callus (ผลการทดลองที่ 4.3.3) ซึ่งแคลลัสจากข้อนั้นมีการเจริญเติบโตที่มากและรวดเร็วกว่าแคลลัสที่ได้จากใบของ Florigraze เซลล์มีสีขาวใสและเริ่มมีการเกิดสีเขียวเล็กน้อย ในขั้นตอนของการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยจึงเลือกแคลลัสจากข้อมาทำการทดลอง โดยเริ่มจากการนำแคลลัสที่เกิดจากสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อเป็นการปรับสภาพเซลล์ หลังจากนั้นนำเซลล์มาบดผ่านตะแกรงที่มีขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อให้เซลล์เริ่มต้นมีขนาดที่เท่ากันมากที่สุด นำมาชั่งน้ำหนักสดเริ่มต้นในสภาวะปลอดเชื้อเท่ากับ 0.15 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุดในการพัฒนาและเจริญเติบโตของแคลลัสจากข้อของ Florigraze บนสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เพื่อทำการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยในระยะเวลาต่าง ๆ (ตารางที่ 4.11) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของลีลาวดี (2562) พบว่าเซลล์แขวนลอยของถั่วฮามาต้าสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการบันทึกผลโดยการวัดน้ำหนักสดเฉลี่ย (รูปที่ 4.29 ก) และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของแคลลัส (รูปที่ 4.29 ข) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการเพาะเลี้ยง จากผลการทดลองพบว่าในระยะเวลาที่ 0-9 วัน เซลล์มีการปรับตัวเข้ากับอาหารใหม่และมีการเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ ซึ่งอยู่ในระยะ lag phase ในระยะเวลาที่ 9-24 วัน เป็นช่วงระยะ log phase เซลล์มีการเจริญเติบโตขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยพบว่าในวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุด ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.4258 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร และน้ำหนักแห้ง 0.0588 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร (ตารางที่ 4.11) ลักษณะของเซลล์มีการขยายใหญ่ขึ้น เป็นก้อนกลม มีสีเขียว (รูปที่ 4.30 ข) ต่อมาในช่วงเวลาที่ 27-30 วัน เซลล์อยู่ในระยะ stationary phase และวันที่ 30-36 วัน เซลล์จะอยู่ในระยะ death phase ในที่สุด ซึ่งในระยะนี้พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่อยู่ในฟลาสก์มีสีที่ขุ่นและค่อนข้างน้ำตาล โดย อรดี และชุติมา (2525) ได้กล่าวว่า เซลล์ตายจะมีการผลิตสารสีดำออกมา ทำให้เซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้รับสารพิษและตายไปด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

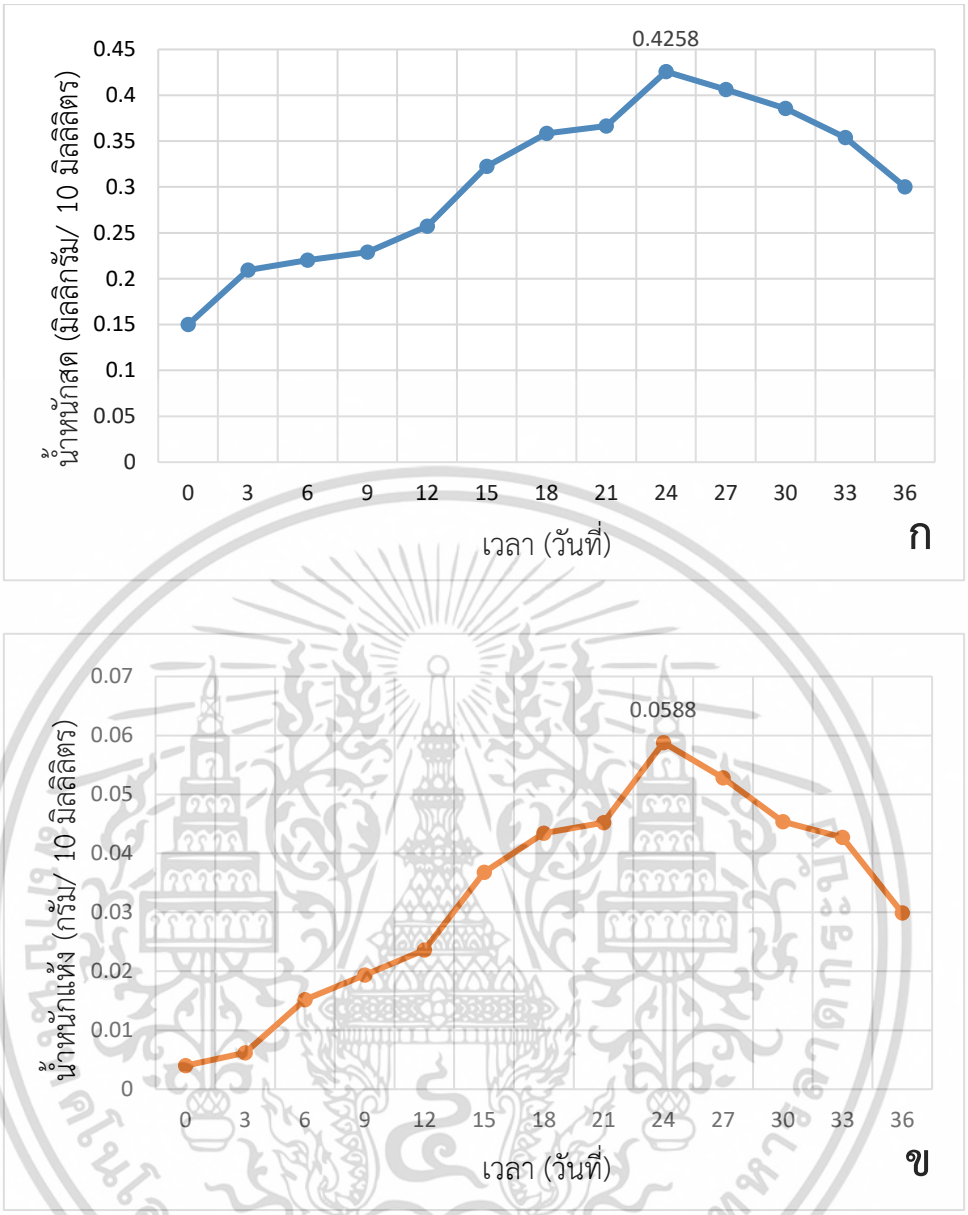
ตารางที่ 4.11 ผลแสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเซลล์แขวนลอยในถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 36 วัน

เวลา (วัน)	น้ำหนักสดเฉลี่ย[1/2] (กรัม/ 10 มิลลิลิตร)	น้ำหนักแห้งเฉลี่ย[1/2] (กรัม/ 10 มิลลิลิตร)
0	0.1500^{i}±0.00	0.0040^{f}±0.00
3	0.2094^{h}±0.00	0.0061^{f}±0.00
6	0.2201^{gh}±0.00	0.0152^{ef}±0.00
9	0.2289^{gh}±0.00	0.0194^{ef}±0.00
12	0.2573^{fg}±0.01	0.0235^{de}±0.01
15	0.3226^{de}±0.01	0.0367^{bcd}±0.00
18	0.3585^{cd}±0.01	0.0434^{abc}±0.00
21	0.3663^{bcd}±0.01	0.0452^{abc}±0.00
24	0.4258^{a}±0.03	0.0588^{a}±0.00
27	0.4064^{ab}±0.01	0.0527^{ab}±0.00
30	0.3855^{abc}±0.00	0.0454^{abc}±0.00
33	0.3539^{cd}±0.00	0.0427^{abc}±0.00
36	0.2906^{ef}±0.00	0.0299^{cde}±0.00

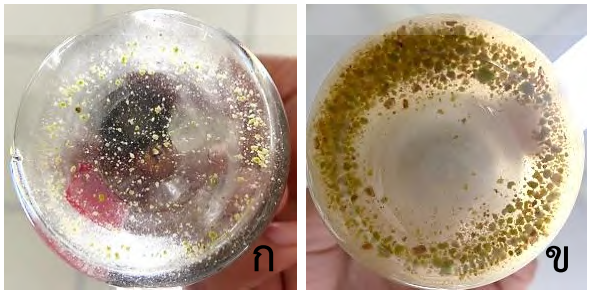
*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 3 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.29 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) น้ำหนักสด (ข) น้ำหนักแห้ง



รูปที่ 4.30 (ก) เซลล์แขวนลอยจากข้อของถั่วลิสงเถาสายพันธุ์ Florigraze วันที่ 0 (ข) เวลา 24 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการพัฒนาแคลลัสให้เกิดยอดใหม่อย่างสมบูรณ์

4.5.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook

นำแคลลัสที่ได้จากผลการทดลองที่ 4.3.1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัสให้เกิดเป็นยอดใหม่ได้อย่างสมบูรณ์ โดยแคลลัสมีน้ำหนักเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 กรัม ในทุกความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงผ่านไป 4 สัปดาห์ สังเกตได้ว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย TDZ มีการเจริญเติบโตของแคลลัสได้ดีกว่า BA และ *m*T (ตารางที่ 4.12) อาหารเพาะเลี้ยงที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลักษณะและการเจริญเติบโตของแคลลัสได้ดีกว่าในระดับความเข้มข้นอื่น ๆ โดยแคลลัสเริ่มมีการขยายตัวที่มากขึ้น และเปลี่ยนจากสีน้ำตาลอ่อนไปเป็นสีเขียวเล็กน้อย (รูปที่ 4.33) จากผลการทดลองพบว่า อาหารที่มี TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น ส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสมากที่สุดร้อยละ 100 และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสสูงที่สุดเท่ากับ 0.51 กรัม (รูปที่ 4.31) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mroginski. *et al*. (2004) ได้กล่าวว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย TDZ ความเข้มข้น 1.101 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสและตาของ *A. correntina* มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 100 ถึงแม้ว่าในการทดลองนี้อาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น จะมีการขยายตัวของแคลลัสเพิ่มมากขึ้น แต่ส่งผลให้แคลลัสมีสีน้ำตาลหรือดำเกิดขึ้น และไม่สามารถเจริญเติบโตไปเป็นต้นใหม่ได้ (รูปที่ 4.33) ส่วนในอาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย BA และ *m*T พบว่าในทุกความเข้มข้นนั้นมีการเจริญเติบโตของแคลลัสน้อยมาก ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสมบูรณ์ (ตารางที่ 4.12) ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA สังเกตได้ว่าสีของแคลลัสนั้นมีสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งไม่สามารถนำมาชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของยอดได้เช่นกัน (รูปที่ 4.32) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปเรื่อย ๆ พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี TDZ ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์ยังมีสีน้ำตาลอยู่มาก และเกิดสีเขียวอ่อนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และพบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น มีการเพิ่มปริมาณของแคลลัสมากกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงใน TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่พบว่าลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสทั้งสองความเข้มข้นนั้นยังไม่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ เนื่องจากเซลล์ยังมีการเกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ และมีความฉ่ำน้ำอยู่มากนั่นเอง (friable callus) (รูปที่ 4.34) ซึ่ง Hare and Van Staden (1994) ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาของ TDZ ที่มีผลต่อแคลลัสในถั่วเหลือง พบว่า TDZ นั้นไปยับยั้งการทำงานของปฏิกิริยาไซโทไคนินออกซิเดชั่น โดยไม่มีสารตัวใดสามารถที่จะยับยั้งได้ โดยส่งผลให้เกิดปัญหาทางโครงสร้างของกิจกรรมในไซโทไคนิน และ Huetteman and Preece (1993) ได้กล่าวว่า TDZ ที่ความเข้มข้นสูง ๆ นั้นส่งผลต่อการยังยั้งการเจริญเติบโตของพืชได้นั่นเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

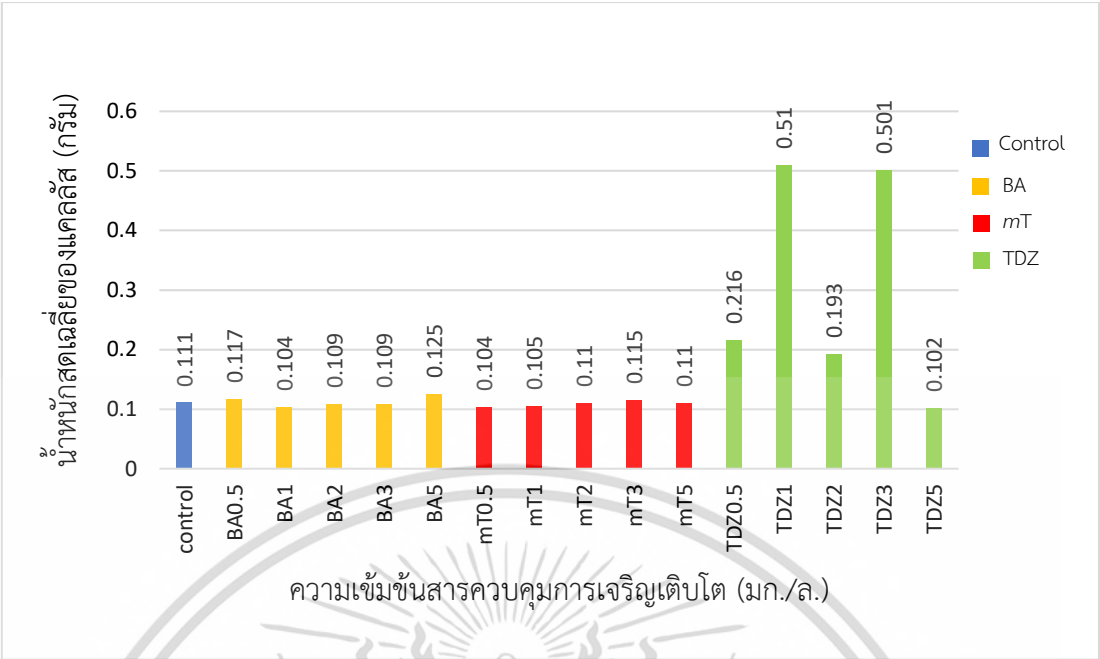
ตารางที่ 4.12 ผลการชักนำให้เกิดการเจริญของแคลลัสที่ได้จากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงที่ 0.1 กรัม ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มก./ล.)	จำนวนแคลลัส	ร้อยละการเจริญของแคลลัส	น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส[1/2] (กรัม)	สีแคลลัส
ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (control)	0	20	80	0.1110[c]±0.00	น้ำตาล
BA	0.5	20	60	0.1170[c]±0.01	น้ำตาลเข้ม
	1	20	30	0.1040[c]±0.00	น้ำตาลเข้ม
	2	20	40	0.1090[c]±0.00	น้ำตาลเข้ม
	3	20	40	0.1090[c]±0.00	น้ำตาลเข้ม
	5	20	70	0.1250[c]±0.01	น้ำตาลเข้ม
*m*T	0.5	20	40	0.1040[c]±0.00	น้ำตาล
	1	20	50	0.1050[c]±0.00	น้ำตาล
	2	20	70	0.1100[c]±0.00	น้ำตาล
	3	20	80	0.1150[c]±0.00	น้ำตาล
	5	20	70	0.1100[c]±0.00	น้ำตาล
TDZ	0.5	20	90	0.2160[b]±0.00	เขียวอ่อน
	1	20	100	0.5100[a]±0.02	เขียวอ่อน
	2	20	60	0.1930[b]±0.00	น้ำตาลดำ
	3	20	70	0.5010[a]±0.04	น้ำตาลเข้ม
	5	20	0	0.1020[c]±0.00	ดำ

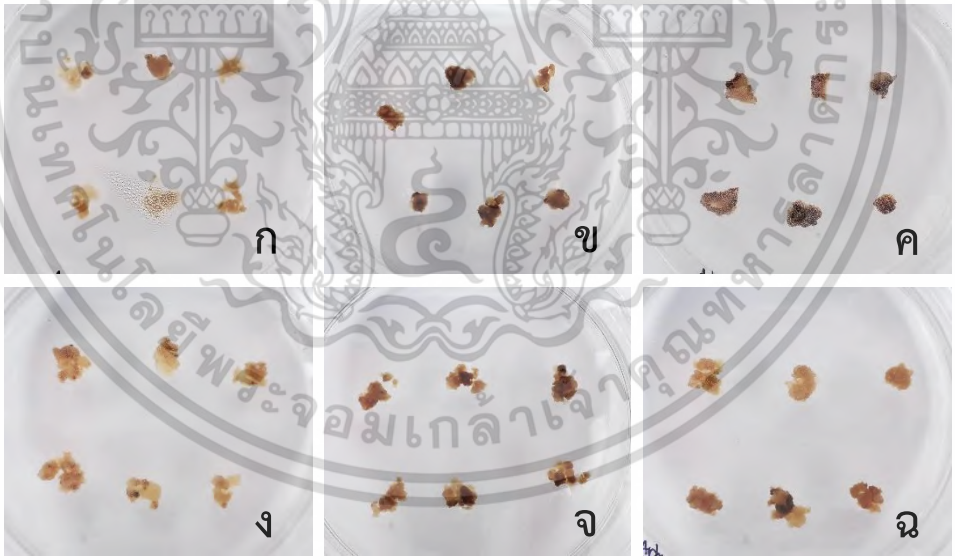
*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 10 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

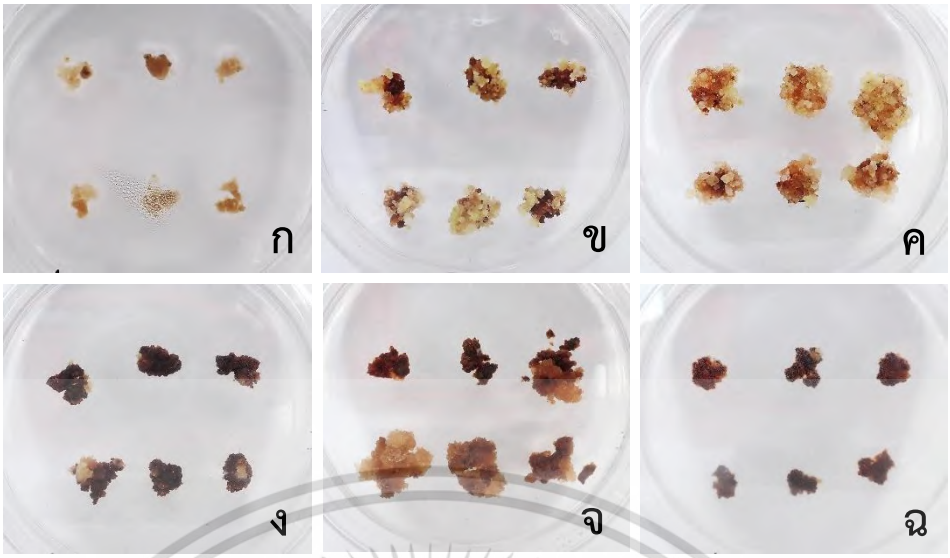


รูปที่ 4.31 ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

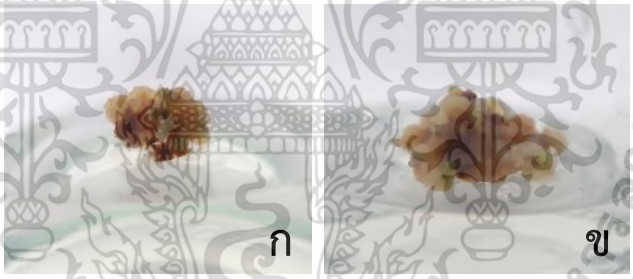


รูปที่ 4.32 ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.33 ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.34 ลักษณะแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงใน TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf

แคลลัสที่ได้จากผลการทดลองที่ 4.3.2 นำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงผ่านไป 4 สัปดาห์ สังเกตเห็นได้ว่าแคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้ในทุกความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (ตารางที่ 4.13) และพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA นั้นส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสได้ดีกว่า *m*T และ TDZ ในทุกความเข้มข้นของ BA นั้นพบว่าแคลลัสมีการเจริญเติบโตร้อยละ 100 และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.35) ลักษณะของแคลลัสมีความฉ่ำน้ำ เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ เซลล์มีสีเขียว (รูปที่ 4.36) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้แคลลัสมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 0.619 กรัม ถึงแม้ว่าในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี *m*T จะส่งผลให้เกิดแคลลัสร้อยละ 100 แต่พบว่าสีของแคลลัสที่เกิดขึ้นมีสีเขียวอ่อน และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสน้อยกว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA นั่นเอง ส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงใน TDZ พบว่ามีการเจริญเติบโตที่น้อยและเซลล์มีสีน้ำตาลอ่อน (ตารางที่ 4.13) ซึ่งไม่เหมาะต่อการนำไปชักนำให้เกิดเป็นยอดได้ในขั้นตอนถัดไป เมื่อระยะเวลาผ่านไป 16 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงใน BA มีการเพิ่มปริมาณที่มากขึ้นเรื่อย ๆ แต่เซลล์ยังมีลักษณะที่ฉ่ำน้ำอยู่ (รูปที่ 4.37) และไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปเป็นยอดได้ และยังพบอีกว่าในอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น ส่งผลให้แคลลัสมีสีเขียวมากที่สุด พบจุดสีเขียวเกิดขึ้นบนเซลล์จำนวนมาก (รูปที่ 4.38) โดยอรัญญา (2534) ได้กล่าวว่า แคลลัสที่มีจุดสีเขียว (green spot) และปมสีเขียวเกิดขึ้นนั้น (green nodule) สามารถที่จะเจริญเติบโตเป็นยอดใหม่ได้ และรากจะเจริญมาจากเซลล์ซึ่งอยู่ชั้นในของแคลลัส ซึ่งงานวิจัยของ Aman. *et al.* (2009) ได้กล่าวว่า เมื่อความเข้มข้นของ BA นั้นสูงมากขึ้นจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของยอดใหม่จากแคลลัสได้ และงานวิจัยของ Gayathri. *et al*. (2015) พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของ *A. hypogaea* L. ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของยอดใหม่เท่ากับร้อยละ 80 และยอดมีความยาวเท่ากับ 2.5 เซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sukhawat and Poeaim (2008) พบว่า ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสของหญ้าไนล์ (*Acroceras macrum*) ให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้สูงสุดร้อยละ 90 ในการทดลองนี้จึงทำการเลือกอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการชักนำให้เกิดยอดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

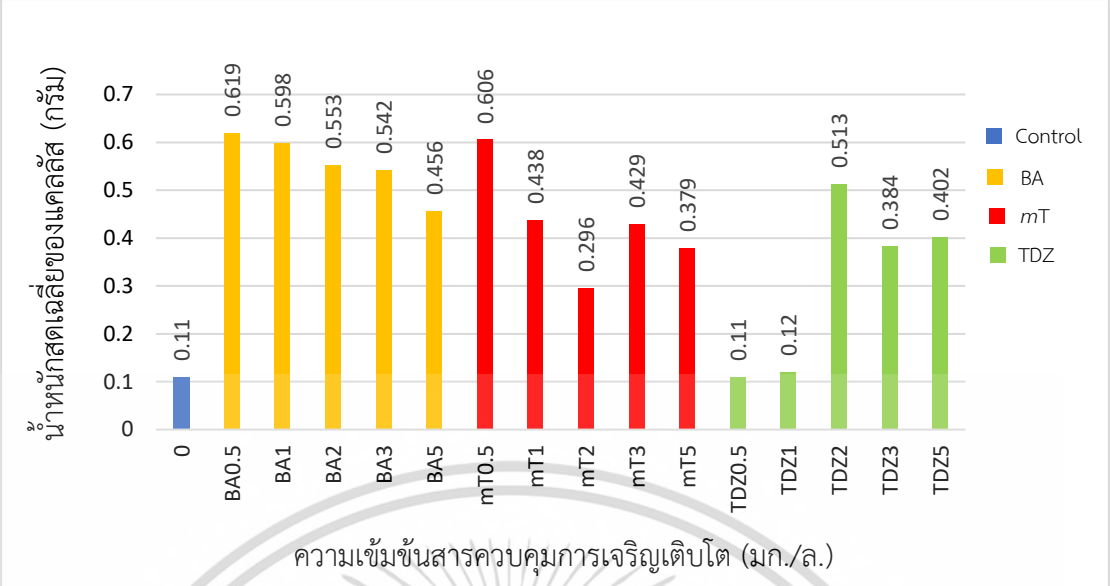
ตารางที่ 4.13 ผลการชักนำให้เกิดการเจริญของแคลลัสที่ได้จากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงที่ 0.1 กรัม ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มก./ล.)	จำนวนแคลลัส	ร้อยละการเจริญของแคลลัส	น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส[1/2] (กรัม)	สีแคลลัส
ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (control)	0	20	70	0.1100^{g}±0.00	ขาวใส
BA	0.5	20	100	0.6190^{a} ±0.04	เขียวอ่อน
	1	20	100	0.5980^{ab}±0.04	เขียว
	2	20	100	0.5530^{abc}±0.01	เขียว
	3	20	100	0.5420^{bc} ±0.02	เขียว
	5	20	100	0.4560^{de}±0.00	เขียว
*m*T	0.5	20	100	0.6060^{ab}±0.02	เขียวอ่อน
	1	20	100	0.4380^{e} ±0.03	เขียวอ่อน
	2	20	100	0.2960^{f}±0.02	เขียวอ่อน
	3	20	100	0.4290^{e}±0.03	เขียวอ่อน
	5	20	100	0.3790^{e}±0.01	เขียวอ่อน
TDZ	0.5	20	60	0.1100^{g}±0.00	น้ำตาลอ่อน
	1	20	90	0.1200^{cd}±0.00	น้ำตาลอ่อน
	2	20	100	0.5130^{cd}±0.02	น้ำตาลอ่อน
	3	20	100	0.3840^{e} ±0.00	น้ำตาลเข้ม
	5	20	100	0.4020^{e}±0.00	น้ำตาลเข้ม

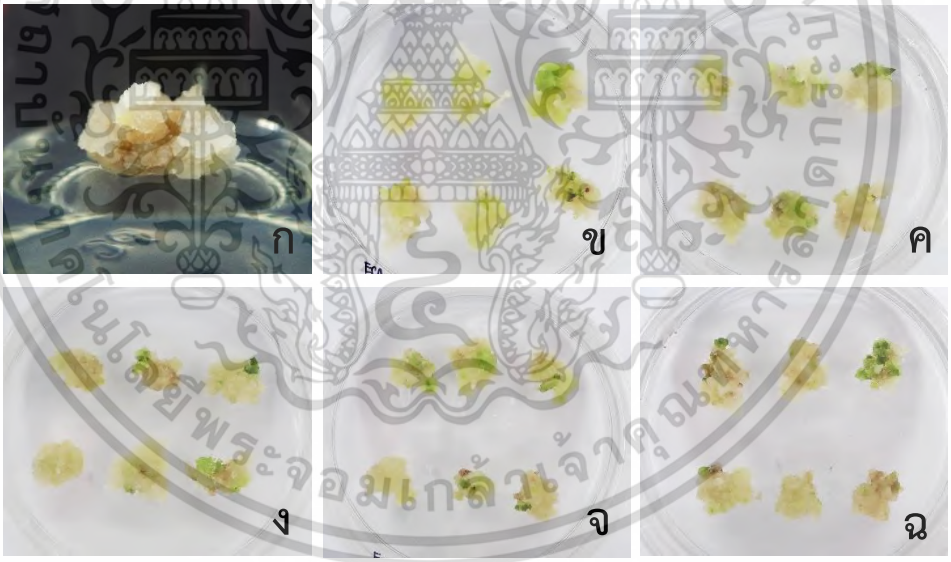
*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 10 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

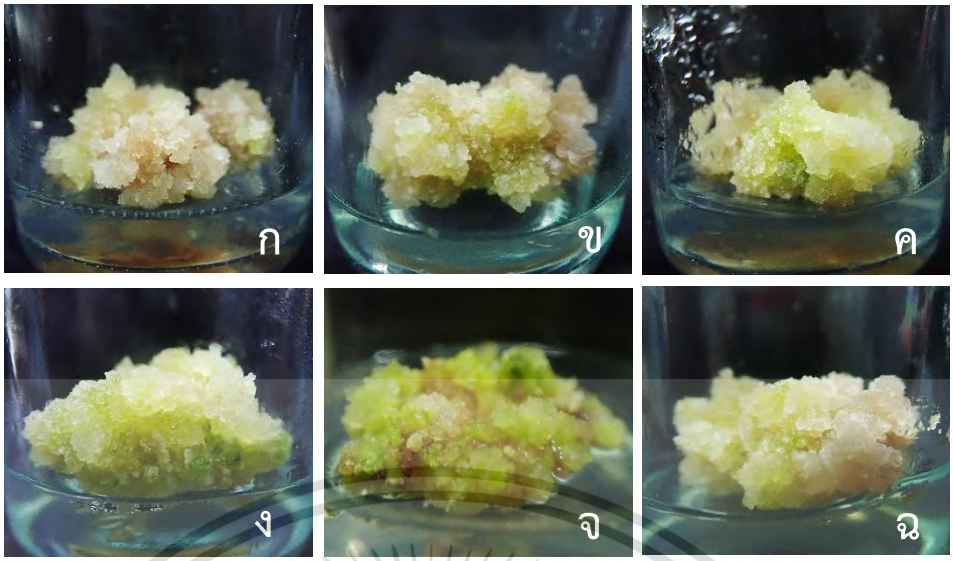


รูปที่ 4.35 ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.36 ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.37 ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 16 สัปดาห์

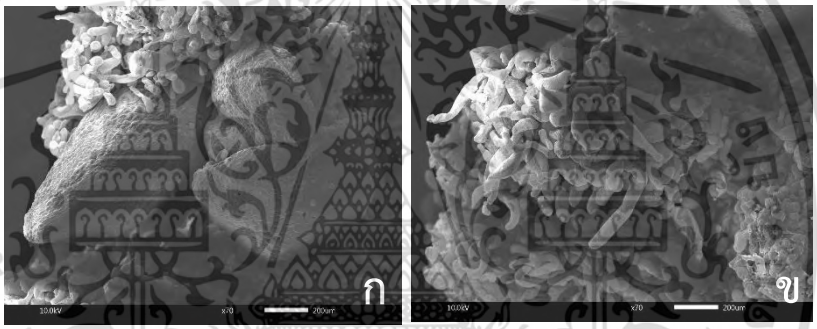
รูปที่ 4.38 ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก) แคลลัสมีจุดสีเขียว ลักษณะฉ่ำน้ำ (friable callus) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) ลักษณะของแคลลัสเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

หลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 16 สัปดาห์ นำแคลลัสที่มีจุดเขียวเกิดขึ้นมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ (AC) ที่ความเข้มข้น 0.1 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะของแสงที่แตกต่างกัน ได้แก่ สภาวะมีแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน และสภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

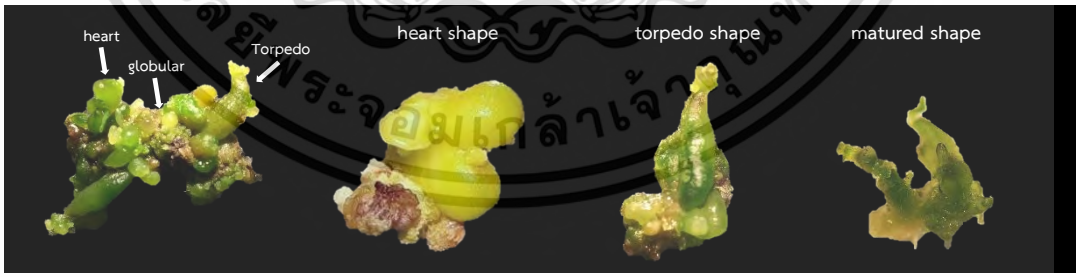
สำหรับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 4 สัปดาห์ แคลลัสมีจุดสีเขียวเกิดขึ้นมาก (รูปที่ 4.41 ก-ค) ในระยะเวลา 8 สัปดาห์พบว่าแคลลัสเริ่มมีความแข็งขึ้น (รูปที่ 4.41 ง-ฉ) และระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในสภาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น โดยเซลล์มีความแข็งเป็น compact callus (รูปที่ 4.41 ช-ฌ) และสังเกตเห็นได้ว่ายิ่งความเข้มข้นของ AC มากขึ้นเปอร์เซ็นต์การเกิด compact callus ก็จะมากขึ้นตามไปด้วย อาหารเพาะเลี้ยงที่มี AC ความเข้มข้น 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้แคลลัสมีลักษณะเป็น compact เท่ากับ 90 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.13) เมื่อนำเซลล์ไปส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบความแตกต่างระหว่างลักษณะของเซลล์ที่เป็น compact callus มีลักษณะเกาะกันอย่างแน่นหนา มีความแข็ง และ friable callus มีลักษณะเกาะกันอย่างหลวม ๆ ฉ่ำน้ำ คล้ายฟองน้ำ (รูปที่ 4.39) มีการเกิดกระบวนการโซมาติกเอมบริโอเจเนซิสเกิดขึ้น โดยแคลลัสจะพัฒนาจากเซลล์ที่มีขนาดเล็กไปเป็นเซลล์ที่เป็นก้อนกลม หรือที่เรียกว่า globular shaped หลังจากนั้นจะมีการพัฒนารูปร่างไปเป็นเซลล์ที่เรียกว่า heart shaped (มีลักษณะคล้ายรูปหัวใจ) และเซลล์จะมีการยืดตัวขึ้นมาโดยมีลักษณะเป็น torpedo shaped และขั้นตอนสุดท้ายจะพัฒนาไปเป็นยอดและรากหรือที่เรียกว่า matured shaped นั่นเอง (รูปที่ 4.40) (อนุรักษ์, 2550)



รูปที่ 4.39 ลักษณะของแคลลัสของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ก) การเกิดโซมาติกเอมบริโอ (ข) แคลลัสที่มีความฉ่ำน้ำ (friable callus)



รูปที่ 4.40 กระบวนการเกิดโซมาติกเอมบริโอเจนเนซิสจากแคลลัสของใบถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเสริมด้วย AC ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ อาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะมีแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน ส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของยอดใหม่จากแคลลัสสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 30 และมีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 7 ยอดต่อแคลลัส (ตารางที่ 4.14 และรูปที่ 4.41 ช) และเมื่อระยะเวลาเวลาผ่านไป 16 สัปดาห์ แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้เกิดยอดเฉลี่ยต่อแคลลัสเพิ่มขึ้นเท่ากับ 13 ยอดต่อแคลลัส (ตารางที่ 4.14) โดยพบว่ายอดที่เกิดขึ้นเริ่มมีการเจริญเติบโตของใบจำนวนมาก (รูปที่ 4.41 ฎ) ในสภาวะที่ให้แสง 24 ชั่วโมงติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ส่งผลให้ใบเริ่มเกิดสีน้ำตาลและมีการไหม้เกิดขึ้น ดังนั้นหลังจากระยะเวลาการเพาะเลี้ยงผ่านไป 16 สัปดาห์ จึงทำการย้ายกลุ่มยอดอ่อนจำนวนมาก (multiple shoot) ที่เกิดจากแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อทำการขยายปริมาณยอดใหม่ให้มีจำนวนมากพอที่จะนำไปชักนำให้เกิดรากได้ในขั้นตอนถัดไป

สำหรับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในสภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ในช่วงระยะเวลา 4-8 สัปดาห์ แคลลัสไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงอะไรมาก และพบว่าหลังจาก 12 สัปดาห์ แคลลัสมีจุดสีเขียวเพิ่มมากขึ้น แต่ยังมีความฉ่ำน้ำ และเซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ เมื่อระยะเวลาผ่านไป 20 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีความแข็งมากขึ้นเป็น compact callus และเริ่มมีจุดกำเนิดยอดใหม่จากแคลลัส (รูปที่ 4.42 ก-ค) และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 สัปดาห์ พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้เกิดยอดจากแคลลัสมากกว่าอาหารที่มี AC ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพบการเกิดยอดจากแคลลัสร้อยละ 50 และมีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 6 ยอดต่อแคลลัส มีการเกิด compact callus เท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.14) สังเกตได้ว่าลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นค่อนข้างแข็งแรงน้อยกว่ายอดที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในสภาวะมีแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน (รูปที่ 4.42 ข) ในระยะเวลา 28 สัปดาห์พบว่ายอดที่เกิดจากแคลลัสมีการเพิ่มปริมาณมากขึ้นในทุกความเข้มข้นของ AC (ตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.42 ช-ฌ)

จากผลการทดลอง จึงได้ทำการเลือกอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงแรกเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์หรือ 4 เดือน เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อทำการกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่จากแคลลัสจำนวนมาก ซึ่งจะใช้เวลาที่น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ตั้งแต่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยงนั่นเอง ซึ่งวุฒิชัย และคณะ (2557) ได้กล่าวว่า AC สามารถลดการเกิดเนื้อเยื่อสีน้ำตาล อีกทั้งยังส่งเสริมการเจริญเติบโตและสามารถพัฒนาแคลลัสไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสได้สูงขึ้นอีกด้วย โดยถั่วลิสงเถา *A. glabrata* นั้นเป็นพืชเขตร้อน มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ (กรมปศุสัตว์, 2558) ซึ่งต้องการแสงอย่างมากในการเจริญเติบโต โดยงานวิจัยของ Kanyand. *et al*. (1997) ได้กล่าวว่า ไม่เพียงแต่อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเท่านั้นที่จะส่งผลให้แคลลัสเกิดการเจริญเติบโตเป็นยอดได้ โดยแสงก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยกล่าวได้ว่า แสงก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตของพืช (อนุรักษ์, 2550) แต่ก็ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของพืชที่ใช้ในการทดลองด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 ผลการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจำนวนมาก (multiple shoot) จากแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาวะแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในระยะเวลา 12 และ 16 สัปดาห์

สูตรอาหาร	12 สัปดาห์ (3 เดือน)					16 สัปดาห์ (4 เดือน)			
	จำนวนแคลลัส	จำนวนและร้อยละการเกิดยอดจากแคลลัส	จำนวนยอดเฉลี่ย/แคลลัส[1/2]	ลักษณะแคลลัส		จำนวนและร้อยละการเกิดยอดจากแคลลัส	จำนวนยอดเฉลี่ย/แคลลัส[1/2]	ลักษณะแคลลัส	
				friable	compact			friable	compact
BA 3 + AC 0.10%	20	2 (10)	1.67[b]±0.66	65%	35%	2 (10)	1.67[b]±0.66	65%	35%
BA 3 + AC 0.15%	20	6 (30)	7.00[a]±1.00	10%	90%	6 (30)	13.00[a]±1.00	10%	90%
BA 3 + AC 0.20%	20	1 (5)	1.00[b]±0.00	5%	95%	1 (5)	1.00[b]±0.00	5%	95%

*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 3 ซ้ำ

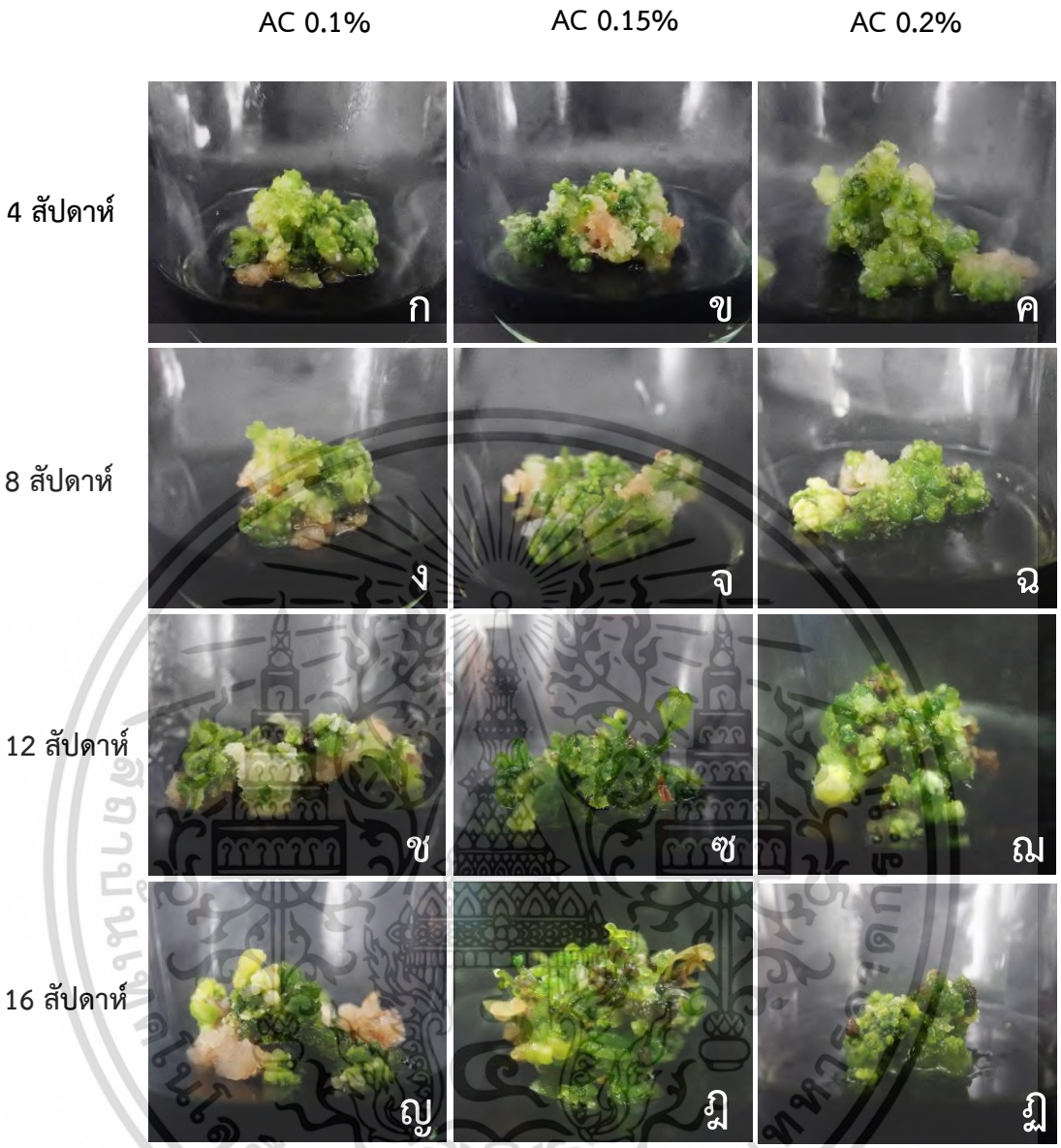
[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

ตารางที่ 4.15 ผลการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจำนวนมาก (multiple shoot) จากแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาวะแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 28 สัปดาห์

สูตรอาหาร	24 สัปดาห์ (6 เดือน)					28 สัปดาห์ (7 เดือน)			
	จำนวนแคลลัส	จำนวนและร้อยละการเกิดยอดจากแคลลัส	จำนวนยอดเฉลี่ย/แคลลัส[1/2]	ลักษณะแคลลัส		จำนวนและร้อยละการเกิดยอดจากแคลลัส	จำนวนยอดเฉลี่ย/แคลลัส[1/2]	ลักษณะแคลลัส	
				friable	compact			friable	compact
BA 3 + AC 0.10%	20	6 (30)	3.67[b]±0.33	45%	55%	10 (50)	4.00[b]±0.00	30%	70%
BA 3 + AC 0.15%	20	10 (50)	6.00[a]±0.00	25%	75%	10 (50)	6.00[a]±0.00	10%	90%
BA 3 + AC 0.20%	20	2 (10)	2.00[c]±0.57	25%	75%	3 (15)	3.33[c]±0.33	25%	75%

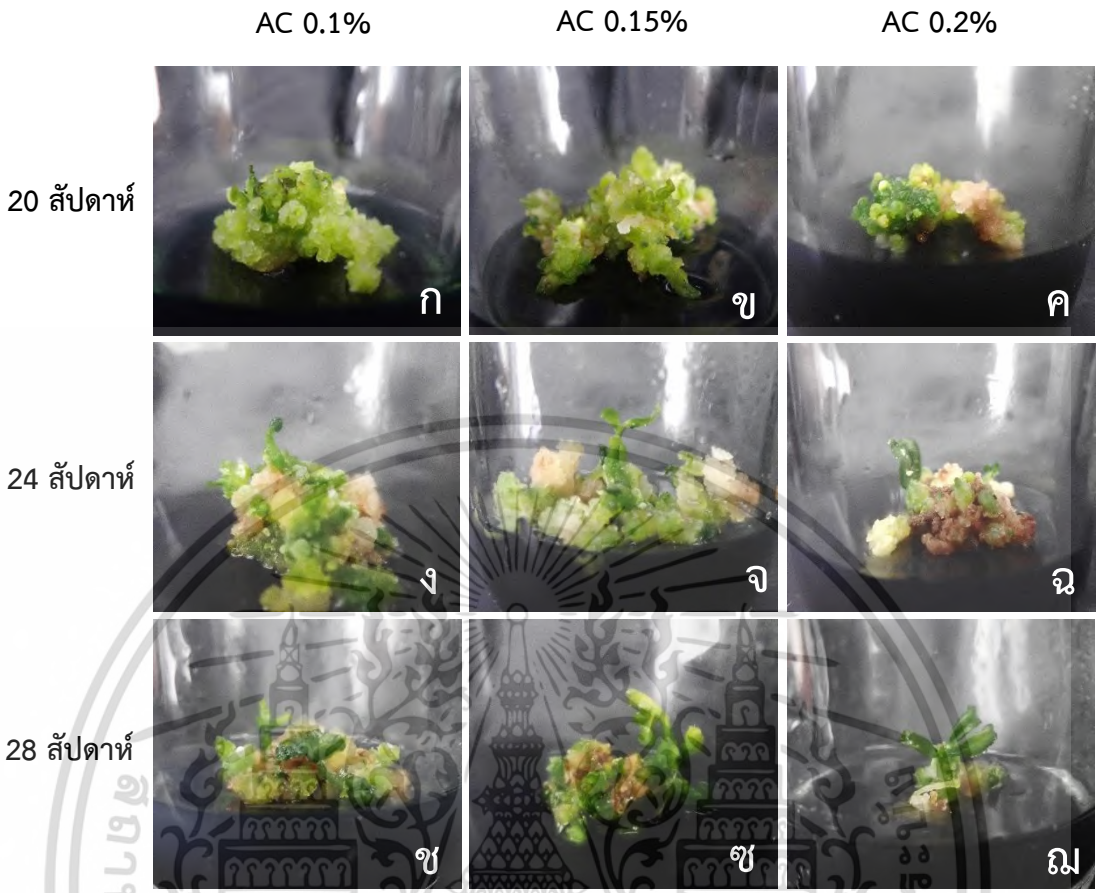
*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 3 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.41 แสดงผลการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจำนวนมาก (multiple shoot) จากแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาวะแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในระยะเวลา (ก-ค) 4 สัปดาห์ (ง-ฉ) 8 สัปดาห์ (ช-ฌ) 12 สัปดาห์ และ (ญ-ฏ) 16 สัปดาห์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.42 แสดงผลการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจำนวนมาก (multiple shoot) จากแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ในระยะเวลา (ก-ค) 20 สัปดาห์ (ง-ฉ) 20 สัปดาห์ และ (ช-ฌ) 24 สัปดาห์

ยอดที่ได้จากการชักนำผ่านแคลลัสมีลักษณะเกาะกันเป็นกลุ่มจำนวนมาก (multiple shoot) ความยาวยอดไม่สูง ซึ่งไม่สามารถแยกออกมาเป็นยอดเดี่ยว ๆ ได้ จึงนำกลุ่มยอดดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้น 0.1 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ AC ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในสภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากระยะเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ ทำการวัดจำนวนยอดและความยาวยอดที่เกิดขึ้น (รูปที่ 4.44 ก-ข) พบว่ายอดมีความยาวขึ้นในทุกความเข้มข้นของอาหารที่ทำการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.43 และ 4.44 ค) โดยยอดมีลักษณะแข็งแรงสมบูรณ์ มีการเพิ่มปริมาณมากขึ้น และพบว่ามีใบเกิดขึ้นใหม่จำนวนมาก สีของใบและยอดที่เกิดขึ้นเป็นสีเขียวตามปกติ (รูปที่ 4.45) โดยอาหารที่มี GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีจำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 28.33 ยอดต่อแคลลัส และ 13.04 มิลลิเมตรต่อแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับ รองลงมาคือ GA_3 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 19.67 ยอดต่อแคลลัส และ 11.42 มิลลิเมตรต่อแคลลัส ตามลำดับ (ตารางที่ 4.16) ซึ่งจิบเบอเรลลินเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่สามารถส่งเสริมความยืดยาวของลำต้นและการแบ่งเซลล์ได้ (อนุรักษ์, 2550) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Venkatachalarn and Jayabalan (1997) พบว่า BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดอ่อนจำนวนมาก (multiple shoot) ของ *Arachis hypogaea* L. สายพันธุ์ VRI-2 และ TMV-7 โดยพบอัตราการเจริญเติบโตของยอดเท่ากับร้อยละ 100 และจำนวนยอดสูงสุดเท่ากับ 35.4 ยอด และงานวิจัยของ Al-Joboury (2012) ได้ศึกษาการใช้สารในกลุ่มไซโทไคนินร่วมกับ GA_3 เพื่อเพิ่มปริมาณและยืดความยาวของยอด พบว่าอาหารสังเคราะห์ที่เสริมด้วย BA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้การเจริญเติบโตของยอดอ่อนจำนวนมาก (multiple shoot) ของถั่ว *A. hypogaea* L. เท่ากับ 72.49 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยของ Sagase. *et al.* (2000) พบว่าอาหารสังเคราะห์ ½ MS ที่เสริมด้วย GA_3 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยืดความยาวของโซมาติกเอมบริโอใน *Corydalis yanhusuo* และเช่นเดียวกัน งานวิจัยของ Gaj (2004) พบว่า *Arabidopsis thaliana* L. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย GA_3 สามารถเร่งให้เกิดการพัฒนาของโซมาติกเอมบริโอให้เจริญเติบโตเป็นยอดได้

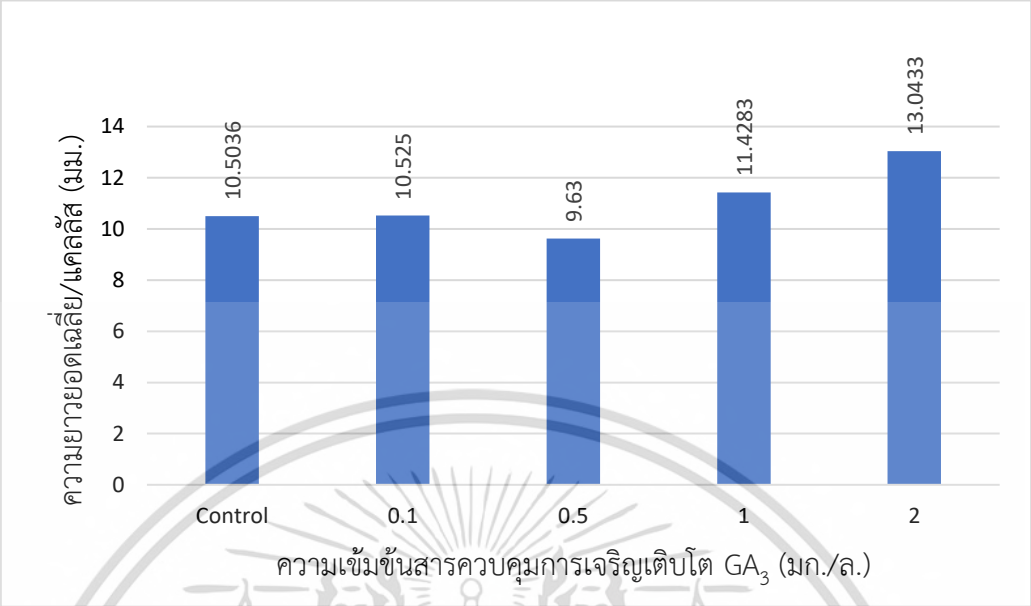
ตารางที่ 4.16 ผลการยืดยอดของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ GA_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)	จำนวนกลุ่มยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย/แคลลัส	ความยาวยอดเฉลี่ย (มม.)[1/2]/แคลลัส
BA 3	20	11.33	10.5036^{b}±0.34
BA 3 + GA_3 0.1	20	13.33	10.5250^{b}±0.20
BA 3 + GA_3 0.5	20	17.33	9.6300^{b}±0.74
BA 3 + GA_3 1	20	19.67	11.4283^{ab}±0.97
BA 3 + GA_3 2	20	28.33	13.0433^{a}±0.49

*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 3 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

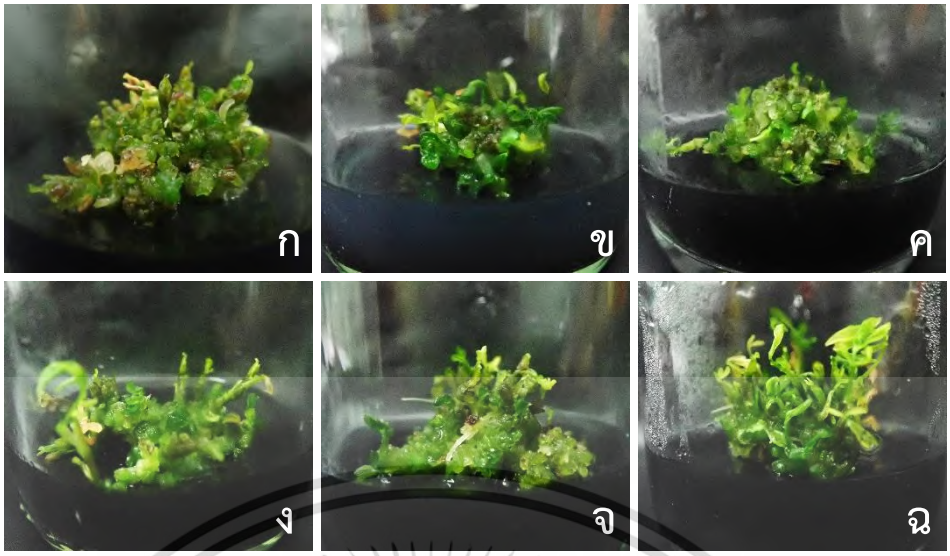
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.43 ผลการเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยต่อแคลลัสของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 0.15% และ GA_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 8 สัปดาห์

รูปที่ 4.44 การเก็บผลการทดลองของยอดอ่อนจำนวนมากของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก) การแยกต้นอ่อน (ข) การวัดความยาวด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ (มม.) (ค) กลุ่มยอดที่เพาะเลี้ยงใน GA_3 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.45 การเจริญเติบโตของยอดอ่อนจำนวนมากของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก) กลุ่มยอดอ่อนก่อนการยืดยอด (ข) กลุ่มยอดอ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ (ค-ฉ) กลุ่มยอดอ่อนที่เสริมด้วย GA_3 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.3 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze

แคลลัสที่เกิดจากการชักนำจากใบ

นำแคลลัสที่ได้จากการชักนำจากใบ (ผลการทดลองที่ 4.3.3) มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ สังเกตได้ว่าในทุกความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้นส่งผลให้แคลลัสจากใบมีการเจริญเติบโตไม่มากเท่าที่ควร โดยส่งผลให้น้ำหนักสดของแคลลัสนั้นมีค่าน้อยมาก (ตารางที่ 4.17) เมื่อทำการเปรียบเทียบกันแล้ว พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA ส่งเสริมให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสจากใบของ Florigarze มากกว่า *m*T และ TDZ (รูปที่ 4.46) โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสมีการเจริญเติบโตร้อยละ 100 และน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 0.335 กรัม ซึ่งใกล้เคียงกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงใน BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.17) โดย Skoog และ Miller (1965) ได้กล่าวว่า BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ซึ่งมีสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์เมื่อใช้ร่วมกับออกซิน และสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตเป็นยอดได้ถ้าหากมีปริมาณที่เหมาะสม แต่จากการทดลองในที่นี้พบว่ายิ่งความเข้มข้นของ BA มากขึ้นเท่าใดก็จะส่งผลให้แคลลัสมีสีที่เข้มขึ้นตามไปด้วย ลักษณะของเซลล์ที่เกิดขึ้นนั้นมีการเกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ และฉ่ำน้ำ โดยรวมสีของแคลลัสจะเป็นสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งไม่เหมาะต่อการนำไปพัฒนาให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้ (รูปที่ 4.47) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี *m*T ในทุกความเข้มข้น พบว่ามีการเจริญเติบโตของแคลลัสค่อนข้างที่จะน้อยมาก โดยแคลลัสมีความเหลวเนื่องจากมีความฉ่ำน้ำที่สูง เซลล์เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ มีสีน้ำตาลอ่อน เช่นเดียวกันกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี TDZ พบว่ามีการเจริญเติบโตของแคลลัสที่น้อยเช่นกัน (ตารางที่ 4.17) โดยเซลล์ส่วนใหญ่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี TDZ นั้นพบว่ามีสีค่อนข้างที่จะดำ ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้และตายไปในที่สุด และเมื่อระยะเวลาผ่านไปก็ยังคงพบว่าเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนจากสีน้ำตาลไปเป็นสีเขียว ซึ่งไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปเป็นยอดได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mok. *et al*. (1982) ได้กล่าวว่า TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า BA ซึ่งช่วยชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อพืชจำนวนมาก ในการใช้ต้องศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในแต่ละชิ้นส่วนของพืช และ Han and Park (2008) พบว่าแคลลัสของ *Philodendron cannifolium* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี TDZ มีปริมาณของคลอโรฟิลล์ลดลงและเกิดการตายของเซลล์เกิดขึ้น

จากผลการทดลองพบว่าแคลลัสที่ได้จากการชักนำโดยใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze นั้นมีการเจริญเติบโตของเซลล์ที่น้อยและช้ามาก ซึ่งลักษณะและสีของเซลล์ไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาไปเป็นยอดได้ ในการทดลองจึงเลือกแคลลัสที่เกิดขึ้นร่วมกับการเกิดยอดจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์นี้ ในการชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตในขั้นตอนถัดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

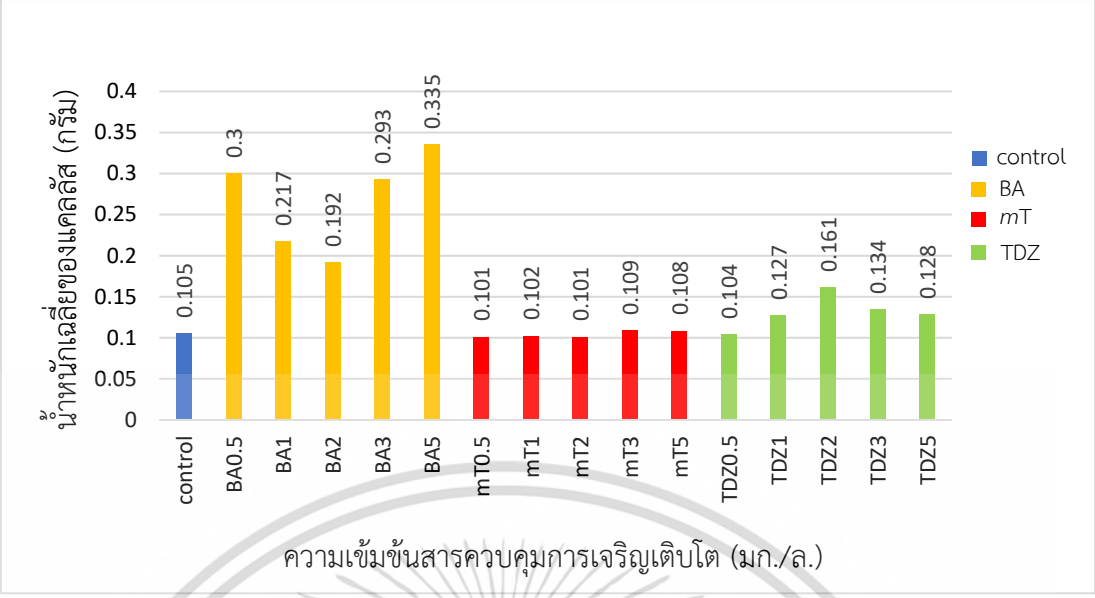
ตารางที่ 4.17 ผลการชักนำให้เกิดการเจริญของแคลลัสที่ได้จากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงที่ 0.1 กรัม ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มก./ล.)	จำนวนแคลลัส	ร้อยละการเจริญของแคลลัส	น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส[1/2] (กรัม)	สีแคลลัส
ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต control	0	20	40	0.1050^{e}±0.00	ขาวใส
BA	0.5	20	100	0.3000^{a}±0.03	น้ำตาลอ่อน
	1	20	100	0.2170^{b}±0.01	น้ำตาลเข้ม
	2	20	100	0.1920^{bc}±0.01	น้ำตาลเข้ม
	3	20	100	0.2930^{a}±0.02	น้ำตาลเข้ม
	5	20	100	0.3350^{a}±0.03	น้ำตาลเข้ม
*m*T	0.5	20	40	0.1010^{e}±0.00	น้ำตาลอ่อน
	1	20	40	0.1020^{e}±0.00	น้ำตาลอ่อน
	2	20	50	0.1010^{e}±0.00	น้ำตาลอ่อน
	3	20	50	0.1090^{de}±0.00	น้ำตาลเข้ม
	5	20	40	0.1080^{de}±.00	น้ำตาลเข้ม
TDZ	0.5	20	40	0.1040^{e}±0.00	ดำ
	1	20	100	0.1270^{de}±0.00	ขาวใส
	2	20	50	0.1610^{cd}±0.03	ขาวใส
	3	20	80	0.1340^{de}±0.00	ดำ
	5	20	70	0.1280^{de}±0.00	ดำ

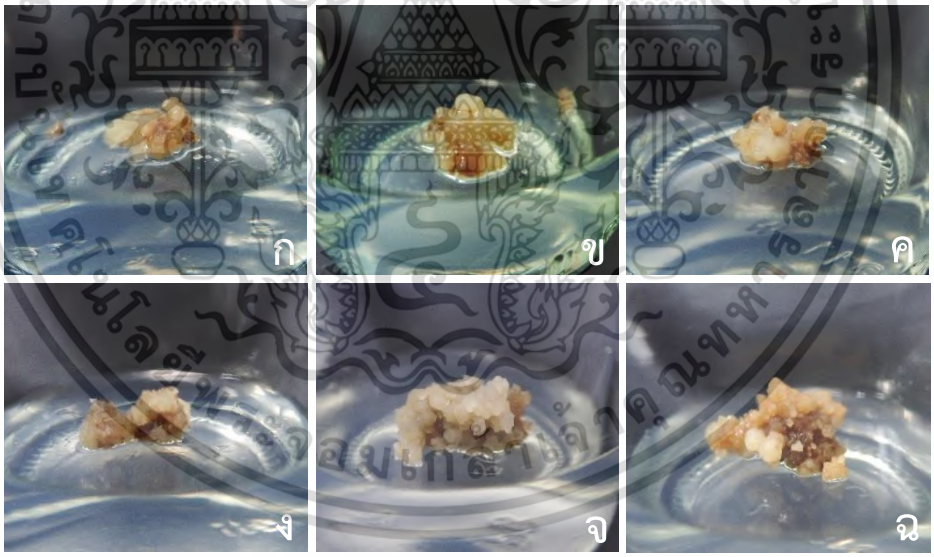
*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 10 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.46 ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.47 ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคลลัสที่เกิดจากการชักนำจากข้อ

แคลลัสที่ได้จากผลการทดลองที่ 4.2.3 ซึ่งเกิดขึ้นร่วมกับการชักนำยอดจากข้อ โดยแคลลัสมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและมีจำนวนมาก สีของแคลลัสมีสีเขียวอ่อน ซึ่งแตกต่างจากแคลลัสที่ได้จากใบของ Florigraze นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากระยะเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ สังเกตได้ว่าแคลลัสมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในทุกความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (ตารางที่ 4.18) โดยพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วย BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตของแคลลัสร้อยละ 100 และน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสสูงที่สุดเท่ากับ 0.507 กรัม (รูปที่ 4.48) ถึงแม้ว่า BA จะสามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสมากที่สุดก็ตาม แต่พบว่าลักษณะของแคลลัสมีความฉ่ำน้ำ เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ และในอาหารที่มี BA ความเข้มข้นมากกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น ส่งผลให้เซลล์เริ่มมีสีเขียวอ่อนเกิดขึ้นเล็กน้อย สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย TDZ นั้นพบว่าในทุกความเข้มข้นสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัสได้ดีเช่นเดียวกัน แคลลัสมีความฉ่ำน้ำ และเกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ เมื่อความเข้มข้นของ TDZ นั้นมากขึ้นจึงส่งผลให้เซลล์มีสีเขียวเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน จากผลการทดลองพบว่า TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักสดของแคลลัสเฉลี่ยเท่ากับ 0.446 กรัม ซึ่งรองลงมาจาก BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นเอง สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วย *m*T พบว่ามีการเจริญเติบโตของแคลลัสที่น้อยกว่า BA และ TDZ แคลลัสมีสีขาวขุ่น ซึ่งไม่เหมาะต่อการนำไปชักนำให้เกิดเป็นยอดได้ (ตารางที่ 4.18)

หลังจากระยะเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงใน BA เริ่มมีสีม่วงอมแดงเกิดขึ้นจำนวนมาก (รูปที่ 4.49) และเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอพบว่าเซลล์ยังมีความฉ่ำน้ำอยู่ (รูปที่ 4.50 ก) โดย รังสฤษณ์ (2541) ได้กล่าวว่า สารสีม่วงอมแดงที่พบได้ในแคลลัสนั้นก็คือแอนโทรไซยานิน ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้จากอาหารและสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงนั่นเอง และงานวิจัยของ ยุพาภรณ์ และวุฒิชัย ศรีช่วย (2560) พบสารแอนโทรไซยานินในแคลลัสของต้นกุหลาบหนู เมื่อทำการเพาะเลี้ยงอาหารที่มี dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร พบปริมาณแอนโธไซยานินสูงสุด 0.118 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วย TDZ พบว่าแคลลัสเริ่มมีสีเขียวเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ แต่ในความเข้มข้นสูง ๆ ของ TDZ ในที่นี้ก็คือ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นส่งผลให้เซลล์เริ่มมีสีดำเกิดขึ้น (รูปที่ 4.50 ฉ) ในงานวิจัยของ Kanyand. *et al*. (1997) พบว่า ในระยะเวลา 3 สัปดาห์ TDZ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้นส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีวิทยาของแคลลัสและสามารถชักนำแคลลัสให้เกิดการเจริญเติบโตของยอดได้ในถั่ว *A. hypogaea* L. ซึ่งตรงข้ามกับงานวิจัยของ Dolce. *et al.* (2017) ได้กล่าวว่า ความเข้มข้นของ TDZ ที่มากเกินไปสามารถส่งผลเสียต่อแคลลัสของ *A. glabrata* ได้ โดยในการทดลองนี้พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงใน TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นและมีสีเขียวปริมาณมาก เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอพบว่าเซลล์เริ่มมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุดสีเขียวเกิดขึ้น (รูปที่ 4.51 ข-ค) แต่ยังไม่พบการเจริญเติบโตของยอด เนื่องจากแคลลัสยังมีความฉ่ำน้ำมาก และเกาะกันอย่างหลวม ๆ (friable callus)

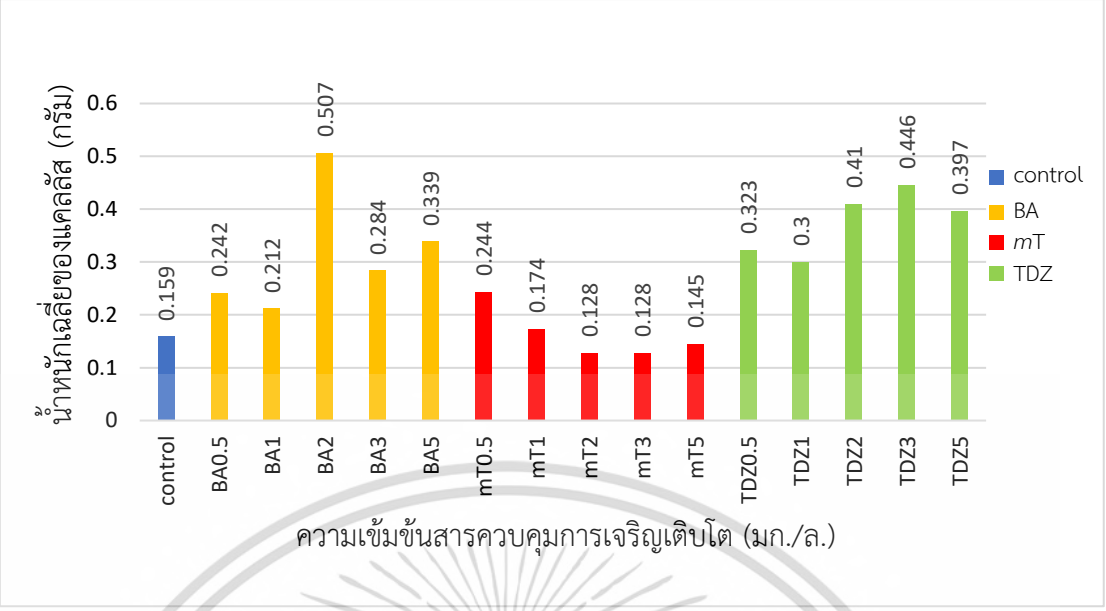
ตารางที่ 4.18 ผลการชักนำให้เกิดการเจริญของแคลลัสที่ได้จากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงที่ 0.1 กรัม ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มก./ล.)	จำนวนแคลลัส	ร้อยละการเจริญของแคลลัส	น้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัส[1/2] (กรัม)	สีแคลลัส
ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต control	0	20	100	0.1590^{fg}±0.01	ขาวใส
BA	0.5	20	100	0.2420^{de}±0.01	ขาวใส
	1	20	100	0.2120^{ef}±0.00	ขาวใส
	2	20	100	0.5070^{a}±0.04	เขียวอ่อน
	3	20	100	0.2840^{cd}±0.02	เขียวอ่อน
	5	20	100	0.3390^{c}±0.02	เขียวอ่อน
*m*T	0.5	20	100	0.2440^{de}±0.02	ขาวขุ่น
	1	20	100	0.1740^{fg}±0.01	ขาวขุ่น
	2	20	80	0.1280^{g}±0.00	ขาวขุ่น
	3	20	90	0.1280^{g}±0.00	ขาวขุ่น
	5	20	90	0.1450^{g}±0.00	ขาวขุ่น
TDZ	0.5	20	100	0.3230^{c}±0.01	เขียวอ่อน
	1	20	100	0.3000^{c}±0.00	เขียวอ่อน
	2	20	100	0.4100^{b}±0.01	เขียวอ่อน
	3	20	100	0.4460^{b}±0.01	เขียว
	5	20	100	0.3970^{b}±0.00	เขียว

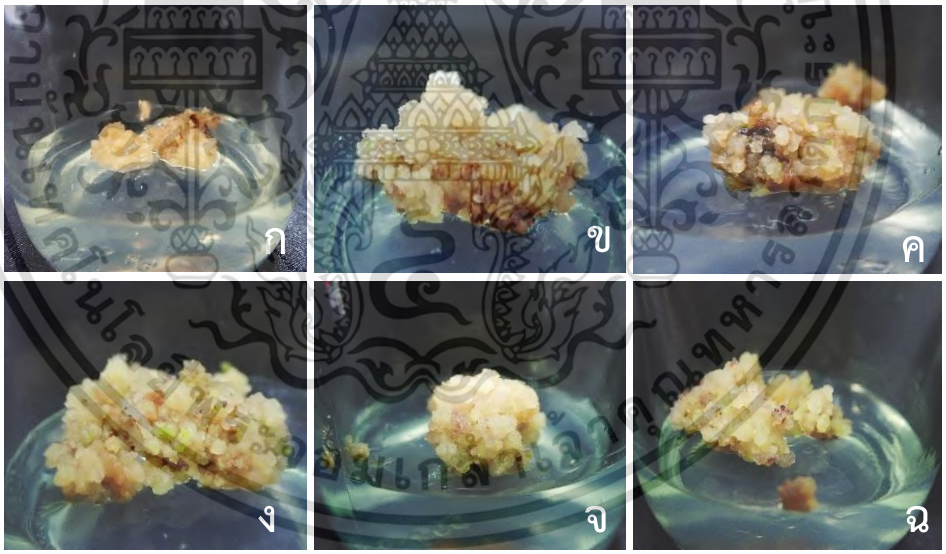
*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 10 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

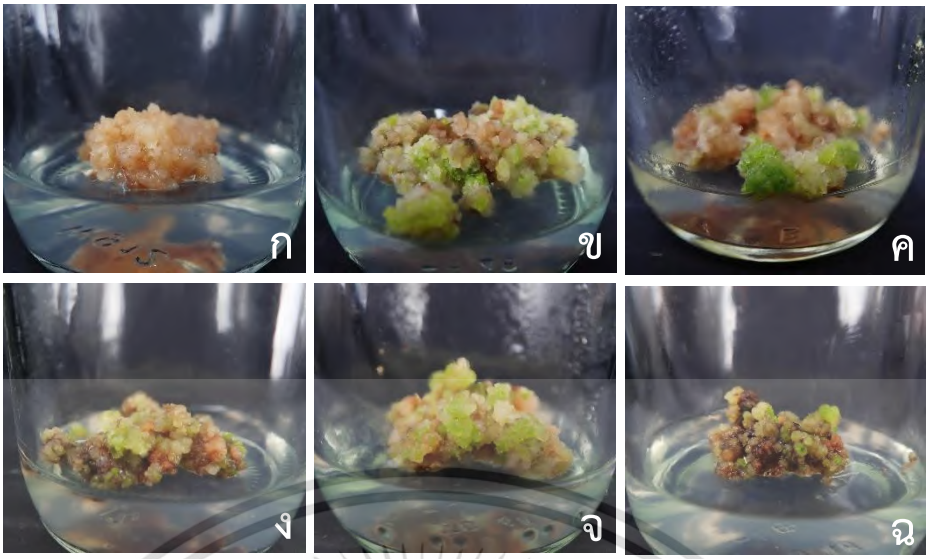


รูปที่ 4.48 ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยแคลลัสจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *m*T และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.49 ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.50 ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข-ฉ) ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 8 สัปดาห์

รูปที่ 4.51 ลักษณะของแคลลัสจากข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze ด้วยกล้องสเตอริโอไมโครสโคป (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข-ค) เมื่อเพาะเลี้ยงใน TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำรากและการออกปลูกต้นกล้าในธรรมชาติ

4.6.1 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf

นำยอดที่ได้จากการทดลองที่ 4.5.2 โดยคัดเลือกยอดที่มีความยาวประมาณ 4-5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.5 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ สังเกตเห็นได้ว่าในทุกความเข้มข้นของ NAA นั้นมีการเกิดตุ่มรากน้อยมาก แต่ในทางกลับกันพบว่า มีการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ฐานของยอดเกิดขึ้นแทน โดยมีลักษณะฉ่ำน้ำ เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ และส่งผลให้ยอดที่นำไปเพาะเลี้ยงมีความฉ่ำน้ำเกิดขึ้นตามไปด้วย ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น พบว่ามีการเจริญเติบโตของแคลลัสมากที่สุด (รูปที่ 4.53) จากผลการทดลองพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงดังกล่าวไม่สามารถชักนำยอดของ Ecoturf ให้เกิดรากอย่างสมบูรณ์ได้ จึงได้ทำการทดลองใหม่ โดยนำยอดที่สมบูรณ์ความยาวประมาณ 4-5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (เพื่อชักนำการเจริญเติบโตของยอดต่อไป) ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ AC ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในสภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์พบว่า เริ่มมีการเจริญเติบโตของรากเกิดขึ้น (รูปที่ 4.54) โดยอาหารเพาะเลี้ยงที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA (control) และอาหารที่มี NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น มีการเจริญเติบโตของรากมากที่สุดร้อยละ 70 (ตารางที่ 4.19) และมีจำนวนรากเฉลี่ยเท่ากับ 3 รากต่อยอดนั่นเอง (รูปที่ 4.52) ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า Limbua. *et al*. (2019) ได้ทำการชักนำรากของถั่ว *A. hypogaea* L. สายพันธุ์ ICGV1299 CG7 และ Red Valencia ด้วย NAA เช่นกัน โดยพบว่า NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยถึงร้อยละ 71-78 และงานวิจัยของ Rey. *et al.* (2000) พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มี AC ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดรากของ *A. pintoi* และพบว่ายอดมีความแข็งแรง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dolce. *et al.* (2017) ได้ทำการชักนำให้เกิดรากของถั่วลิสงเถา *A. glabrata* ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี AC ความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถเกิดรากได้ถึง 90-95 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 10-15 วัน หลังจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงต้นถั่วลิสงเถากลาบราต้าต่อไปให้รากมีการเจริญเติบโตที่เพิ่มมากขึ้น จนได้ต้นกล้าของถั่วลิสงเถาสายพันธุ์ Ecoturf ที่มีความแข็งแรงและสมบูรณ์ทั้งยอดและราก (รูปที่ 4.55 ก-ข) นำต้นกล้าถั่วลิสงเถากลาบราต้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในทุกขั้นตอนมาทำการออกปลูก ล้างวุ้นออกจากต้นถั่วให้สะอาด และแช่ในสารละลายที่ใส่ยาฆ่าเชื้อรา carbendazim ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร จากนั้นนำมาปลูกลงในกระถางที่ประกอบด้วยดินและเพอร์ไลท์ในอัตราส่วน 1:1 (ดัดแปลงมาจาก Rey and Mroginski, 2003 ; Dolce *et al.*, 2017) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (รูปที่ 4.55 ค) แล้วนำถุงพลาสติกมาครอบไว้เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก่อนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อค่อย ๆ ทำการปรับสภาพพืช (รูปที่ 4.55 ง) หลังจากนั้นนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง รดน้ำตามปกติ สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงทุก 4 สัปดาห์ พบว่าต้นถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf นั้นสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

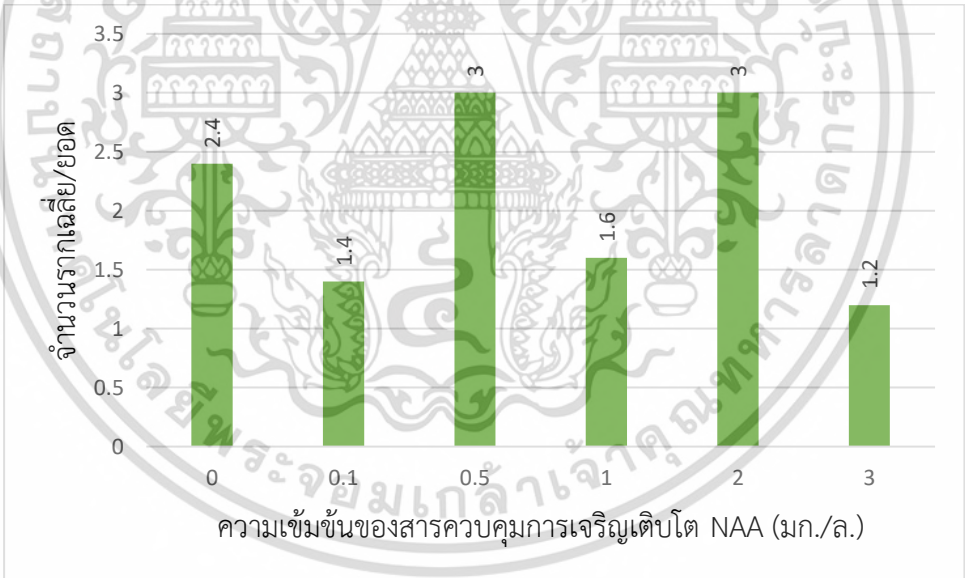
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.19 ผลการชักนำรากจากยอดของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ AC ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA (มก./ล.)	จำนวนยอด	ร้อยละการเกิดราก	จำนวนรากเฉลี่ย/ยอด[1/2]
BA 3	10	70	2.40^{ab}±0.51
BA 3 + NAA 0.1	10	50	1.40^{b} ±0.24
BA 3 + NAA0.5	10	50	3.00^{a} ±0.31
BA 3 + NAA 1	10	40	1.60^{b} ±0.40
BA 3 + NAA 2	10	70	3.00^{a} ±0.54
BA 3 + NAA 3	10	40	1.20^{b} ±0.20

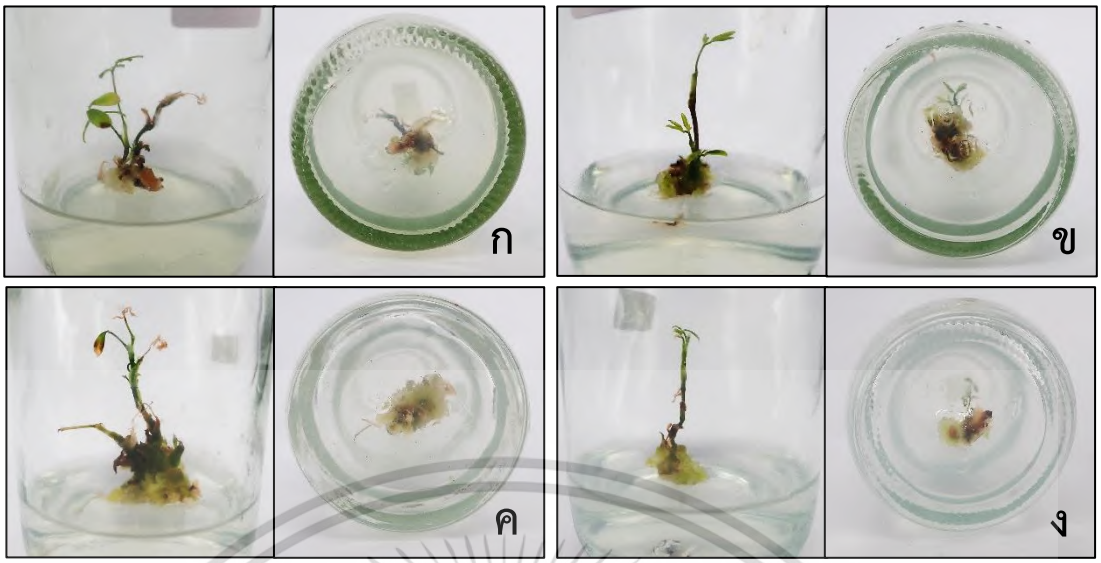
*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 5 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.52 ผลการเปรียบเทียบจำนวนรากเฉลี่ยของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยอดในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

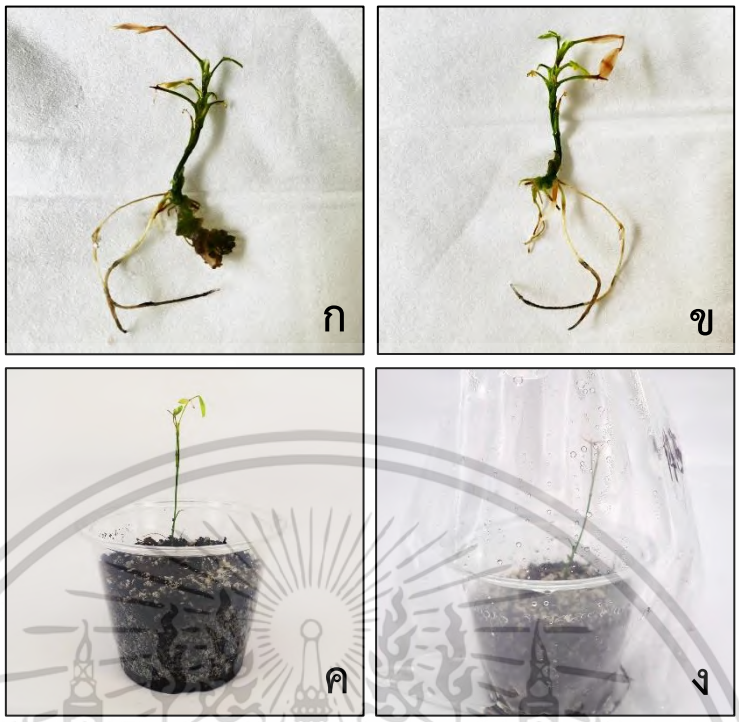
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.53 ลักษณะของต้นถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก-ง) เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย NAA ความเข้มข้น 0.5 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

รูปที่ 4.54 ลักษณะของต้นถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก-ฉ) เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.55 ลักษณะของต้นกล้าถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf (ก-ข) ที่เจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ ทั้งยอดและราก (ค) ออกปลูก (ง) ระยะเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze

นำยอดที่ได้จากผลการทดลองที่ 4.2.1 มาชักนำให้เกิดราก โดยคัดเลือกยอดที่มีความยาวประมาณ 7-8 เซนติเมตร อายุมากกว่า 12 สัปดาห์ (รูปที่ 4.57 ก) นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย *m*T ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ AC ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 11 สัปดาห์ พบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เริ่มมีการเจริญเติบโตของรากเกิดขึ้น (รูปที่ 4.57 ข) ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากหลังจาการเพาะเลี้ยงผ่านไป 21 วัน ในถั่ว *A. hypogaea* สายพันธุ์ ICGV12991 CG7 และ Red Valencia (Limbua *et al.*, 2019) และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 18 วัน พบว่าในอาหารทุกความเข้มข้นเริ่มมีการเจริญเติบโตของรากเช่นเดียวกัน แต่ NAA ความเข้มข้น 2 มิลิกรัมต่อลิตรนั้น มีการเจริญเติบโตของรากมากที่สุด (รูปที่ 4.57 ค) และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงที่ปราศจาก NAA (control) และที่มี NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากมากที่สุดร้อยละ 50 แต่อาหารเพาะเลี้ยงที่มี NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นส่งผลให้มีจำนวนรากมากที่สุด เท่ากับ 3.75 รากต่อยอด (ตารางที่ 4.20 และรูปที่ 4.56) และงานวิจัยของ Aman. *et al.* (2009) พบว่าถั่ว *A. hypogaea* สายพันธุ์ PBS24030, HNG-10, M-13 และ M-335 สามารถเกิดรากได้ในอาหารที่มี NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าในถั่ว *A. hypogaea* สามารถชักนำการเจริญเติบโตของรากด้วยกับ NAA เช่นกัน (Akasaka *et al.*, 2000) โดยต้นกล้าของถั่วลิสงเถากลาบราต้าที่ได้นั้นมีความแข็งแรงและสมบูรณ์ทั้งยอดและราก พร้อมที่จะนำไปอนุบาลให้เจริญเติบโตในธรรมชาติได้ (รูปที่ 4.57 ง) นำต้นกล้าถั่วลิสงเถากลาบราต้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาทำการออกปลูกล้างอาหารแข็งออกจากต้นถั่วให้สะอาด และแช่ในสารละลายที่ใส่ยาฆ่าเชื้อรา carbendazim ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร จากนั้นนำมาปลูกลงในกระถางที่ประกอบด้วยดินและเพอร์ไลท์ในอัตราส่วน 1:1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำถุงพลาสติกมาครอบไว้ เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก่อนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อค่อย ๆ ทำการปรับสภาพพืช (รูปที่ 4.58 ก) หลังจากนั้นนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง รดน้ำตามปกติ สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงทุก 4 สัปดาห์ (ดัดแปลงมาจาก Rey and Mroginski, 2003 ; Dolce *et al.*, 2017) พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 12 สัปดาห์ พบว่าต้นถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Florigraze นั้นสามารถเจริญเติบโตได้โดยมีการแตกยอดและใบเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.58 ข) และที่ระยะเวลา 20 สัปดาห์ ต้นถั่วลิสงเถายังมีความแข็งแรงและเจริญเติบโตต่อไปได้ (รูปที่ 4.58 ค) ซึ่งงานวิจัยของ Werbrouck. *et al.* (1996) กล่าวว่าในระหว่างการปรับสภาพของต้นพืชให้ชินกับสภาพแวดล้อมนั้น ยอดที่เกิดจากการชักนำด้วย *m*T จะสามารถเกิดการเจริญเติบโตของรากได้ดีกว่ายอดที่ชักนำจาก BA ในความเข้มข้นเดียวกัน

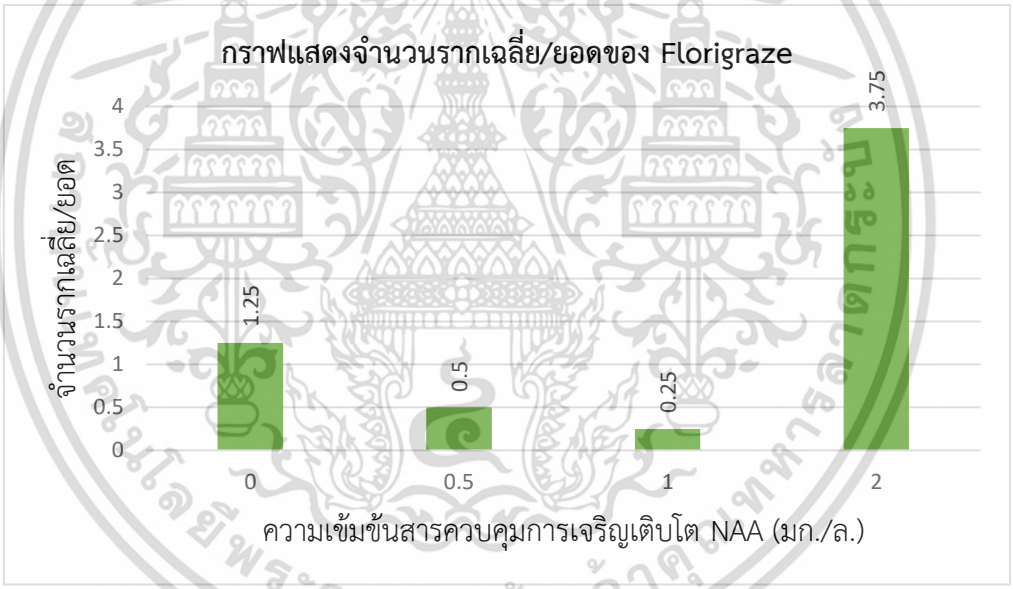
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.20 ผลการชักนำรากจากยอดของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย *m*T ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ AC ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA (มก./ล.)	จำนวนยอด	ร้อยละการเกิดราก	จำนวนรากเฉลี่ย/ยอด[1/2]
*m*T 5	4	50	1.25[b]±0.01
*m*T 5 + NAA 0.5	4	50	0.50[c]±0.01
*m*T 5 + NAA 1	4	25	0.25[c]±0.02
*m*T 5 + NAA 2	4	50	3.75[a]±0.01

*หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ย±SE แสดงจากการนับ 3 ซ้ำ

[2/]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P \leq 0.05$ ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.56 ผลการเปรียบเทียบจำนวนรากเฉลี่ยของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยอดในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย AC ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.57 ลักษณะการเจริญเติบโตของยอดของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze (ก) ที่เหมาะต่อการนำไปชักนำให้เกิดราก และการเจริญเติบโตของรากที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วย AC ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และสารควบคุมการเจริญเติบโต *m*T ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) ในระยะเวลา 11 วัน (ค) 18 วัน และ (ง) 30 วัน

รูปที่ 4.58 ลักษณะของต้นกล้าถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze (ก) ที่นำออกปลูก (ข) ระยะเวลา 12 สัปดาห์ (ค) ระยะเวลาผ่านไป 20 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook และ Ecoturf โดยการใช้เมอคิวริคคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.18 เปอร์เซ็นต์ และเสริมด้วย antibiotic cefotaxime PPM ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งเป็นสารที่สามารถช่วยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้โดยที่ไม่สงผลเสียต่อตัวอย่างพืชที่นำมาทำการทดลอง หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อระยะเวลาผ่านไปเพียง 1 สัปดาห์ พบว่า สายพันธุ์ Arbrook และ Ecoturf มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 90 และ 100 ตามลำดับ ลักษณะของข้อเป็นปกติ มีสีเขียว สามารถนำไปชักนำให้เกิดเป็นยอดได้ ส่วนในสายพันธุ์ Florigraze นั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และเสริมด้วย antibiotic cefotaxime PPM ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 15 นาทีเช่นเดียวกัน เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเสริมด้วย PPM ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร ลงไปในอาหารด้วย เนื่องจากพบว่ามีการปนปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในท่อลำเลียงของพืชนั้นไหลออกมาลงสู่อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ทำให้พืชไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่ง PPM นั้นส่งผลให้จุลินทรีย์ที่อยู่ในท่อลำเลียงของพืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เมื่อระยะเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ พบว่าร้อยละการรอดชีวิตของข้อถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze นั้นเพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 70 สำหรับการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ Arbrook Ecoturf และ Florigraze ได้ทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ antibiotic cefotaxime PPM ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เขย่าอย่างเนื่องเป็นเวลา 10 นาที เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ พบว่าใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Arbrook Ecoturf และ Florigraze ไม่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และมีร้อยละการรอดชีวิตจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 100

การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำข้อให้เกิดยอดอย่างสมบูรณ์ของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook และ Ecoturf ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 0.75 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ปราศจากแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 4 สัปดาห์ ในทุกสายพันธุ์ของถั่วลิสงเถากลาบราต้านั้นพบว่าชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงใน *m*T นั้นส่งเสริมให้เกิดการชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่า BA และ TDZ ชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook ที่เพาะเลี้ยงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*m*T นั้น สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงในเกือบทุกความเข้มข้น เมื่อเปรียบเทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการทดลอง พบว่า *m*T ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น ส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของยอดสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 60 และมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 22.42 มิลลิเมตร ลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นนั้นตั้งตรง มีความแข็งแรงสมบูรณ์ ยอดที่เกิดขึ้นมีสีเขียว พร้อมที่จะเจริญเติบโตต่อไปได้ สำหรับสายพันธุ์ Ecoturf พบว่าในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เสริมด้วย *m*T ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นส่งผลให้เกิดยอดสูงสุดถึงร้อยละ 60 และมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 18.75 มิลลิเมตร โดยลักษณะการเกิดยอดนั้นมีความสมบูรณ์และแข็งแรงเหมาะต่อการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดรากในขั้นตอนถัดไป ส่วนถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA KN *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 0.75 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มี *m*T นั้นส่งผลให้เกิดการชักนำยอดได้ดีกว่า KN BA และ TDZ โดยอาหารที่ประกอบด้วย *m*T ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น มีร้อยละการเกิดยอดและความยาวยอดสูงที่สุด ได้แก่ ร้อยละ 70 และ 18.43 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในสายพันธุ์ Florigraze นั้นพบว่ามีการเกิดแคลลัสร่วมด้วยที่บริเวณฐานที่เกิดยอด ซึ่งเซลล์มีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ มีความฉ่ำน้ำ เป็นสีเขียวอ่อน และมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วและจำนวนมาก จึงสามารถนำมาใช้ในการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยและชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นยอดในขั้นตอนถัดไป

การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำใบให้เกิดแคลลัสในถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook Ecoturf และ Florigraze นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเท่ากับ 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาวะปราศจากแสง 24 ชั่วโมง เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่าในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสดีที่สุดในทุกสายพันธุ์ของถั่วลิสงเถากลาบราต้าที่ใช้ในการทดลอง โดยพบว่าในสายพันธุ์ Arbrook นั้นแคลลัสมีการเจริญมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 56.67 และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.810 กรัม สำหรับสายพันธุ์ Ecoturf นั้นพบว่าแคลลัสมีการเจริญร้อยละ 100 และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.685 กรัม ในสายพันธุ์ Florigraze นั้นพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เกิดแคลลัสสูงสุดถึงร้อยละ 100 เช่นกัน และแคลลัสนั้นมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดถึง 0.513 กรัม โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นจากใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าทั้ง 3 สายพันธุ์นั้นพบว่ามีลักษณะฉ่ำน้ำ เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ หรือที่เรียกว่า friable callus นั่นเอง

การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยในถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook โดยการใช้แคลลัสที่ชักนำได้จากใบมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร บนสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เพื่อทำการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย โดยเริ่มจากเซลล์เริ่มต้น 0.15 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 36 วัน พบว่าในช่วงวันที่ 12-24 คือช่วงระยะ log phase เซลล์มีอัตรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญเติบโตที่สูง และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยมีค่าน้ำหนักสดเท่ากับ 0.3380 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยเท่ากับ 0.0211 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร สำหรับสายพันธุ์ Ecoturf ได้ใช้แคลลัสที่ชักนำได้จากใบเช่นกันเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 12-27 วัน เซลล์จะเข้าสู่ระยะ log phase โดยสังเกตเห็นการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก และพบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงผ่านไป 27 วัน เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด และเริ่มมีการเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นเป็นสีเขียวอ่อน ซึ่งส่งผลให้มีน้ำหนักสดของแคลลัสเท่ากับ 0.4678 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร และน้ำหนักแห้งของแคลลัสเท่ากับ 0.0810 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร ในถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze ทำการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยโดยการใช้แคลลัสที่ได้จากข้อ เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลาที่ 9-24 วัน เป็นช่วงระยะ log phase เซลล์มีการเจริญเติบโตขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยพบว่าในวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุด ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.4258 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร และน้ำหนักแห้ง 0.0588 กรัมต่ออาหาร 10 มิลลิลิตร

การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการพัฒนาแคลลัสให้เกิดยอดใหม่อย่างสมบูรณ์ของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Arbrook Ecoturf และ Florigraze ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อ ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน สำหรับสายพันธุ์ Arbrook เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ สังเกตได้ว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย TDZ มีการเจริญเติบโตของแคลลัสได้ดีกว่า BA และ *m*T อาหารที่มี TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสมากที่สุดร้อยละ 100 และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสสูงที่สุดเท่ากับ 0.51 กรัม โดยพบว่าโดยส่วนมากแคลลัสนั้นมีสีน้ำตาลซึ่งมีสีเขียวเกิดขึ้นเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปเรื่อย ๆ พบว่าแคลลัสยังมีความฉ่ำน้ำมาก เกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ และไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นยอดได้ สำหรับสายพันธุ์ Ecoturf เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA นั้นส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของแคลลัสได้ดีกว่า *m*T และ TDZ ในทุกความเข้มข้นของ BA นั้นพบว่าแคลลัสมีการเจริญเติบโตร้อยละ 100 และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกัน ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้แคลลัสมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 0.619 กรัม เมื่อระยะเวลาผ่านไป 16 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น ส่งผลให้แคลลัสมีสีเขียวมากที่สุด และพบจุดสีเขียวเกิดขึ้นบนเซลล์จำนวนมาก นำแคลลัสที่มีจุดเขียวเกิดขึ้นมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ที่ความเข้มข้น 0.1 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงใน 2 สภาวะของแสงที่แตกต่างกัน ได้แก่ สภาวะมีแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน และสภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะมีแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน ส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของยอดใหม่จากแคลลัสสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 30 และมีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7 ยอดต่อแคลลัส เมื่อระยะเวลาเวลาผ่านไป 16 สัปดาห์ พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงดังกล่าวมีเกิดยอดเฉลี่ยต่อแคลลัสเพิ่มขึ้นเท่ากับ 13 ยอดต่อแคลลัส จากผลการทดลอง จึงได้ทำการเลือกอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงแรกเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์หรือ 4 เดือน จะทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 24 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อทำการกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่จากแคลลัสจำนวนมาก ซึ่งจะใช้เวลาที่น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวันตั้งแต่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยงนั่นเอง หลังจากนั้นทำการยืดความยาวของยอดด้วย GA_3 โดยพบว่าอาหารที่มี GA_3 ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีจำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 28.33 ยอดต่อแคลลัส และ 13.04 มิลลิเมตรต่อแคลลัส ตามลำดับ สำหรับถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Florigraze พบว่าเมื่อนำแคลลัสที่ได้จากใบมาทำการเพาะเลี้ยงในสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA *m*T และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 2 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่ได้จากการชักนำโดยใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze นั้นมีการเจริญเติบโตของเซลล์ที่น้อยและช้ามาก ซึ่งลักษณะและสีของเซลล์ไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาไปเป็นยอดได้ ในการทดลองจึงเลือกแคลลัสที่เกิดขึ้นร่วมกับการเกิดยอดจากข้อของถั่วลิสงเถาสายพันธุ์นี้ ในการชักนำให้เกิดเป็นยอด และเมื่อนำแคลลัสที่ได้จากข้อมาทำการเพาะเลี้ยง พบว่า อาหารที่เสริมด้วย TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น ส่งเสริมให้แคลลัสมีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นและมีสีเขียวปริมาณมาก มีจุดสีเขียวเกิดขึ้น แต่ยังมีความฉ่ำน้ำมากอยู่ ซึ่งไม่สามารถเจริญเติบโตไปเป็นยอดได้

การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของถั่วลิสงเถากลาบราต้าในธรรมชาติ สำหรับสายพันธุ์ Ecoturf โดยคัดเลือกยอดที่มีความยาวประมาณ 4-5 เซนติเมตร ซึ่งเป็นยอดที่ได้จากการชักนำผ่านแคลลัส เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ AC ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์นั้น มีการเจริญเติบโตของรากมากที่สุดร้อยละ 70 และมีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 3 รากต่อยอดนั่นเอง สำหรับสายพันธุ์ Florigraze ทำการคัดเลือกยอดที่มีอายุมากกว่า 12 สัปดาห์ ความยาวประมาณ 7-8 เซนติเมตร ซึ่งเป็นยอดที่ได้จากข้อ เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มี NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากมากที่สุดร้อยละ 50 และมีจำนวนรากมากที่สุด เท่ากับ 3.75 รากต่อยอด นำต้นกล้าของถั่วลิสงเถากลาบราต้าที่ได้จากการทดลองมาทำการออกปลูก ล้างวุ้นออกจากต้นถั่วให้สะอาด และแช่ในสารละลายที่ใส่ยาฆ่าเชื้อรา carbendazim ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร จากนั้นนำมาปลูกลงในกระถางที่ประกอบด้วยดินและเพอร์ไลท์ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำถุงพลาสติกมาครอบไว้ เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก่อนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อค่อย ๆ ทำการปรับสภาพพืช หลังจากนั้นนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง รดน้ำตามปกติ และพบว่าต้นถั่วลิสงเถากลาบราต้ายังมีความแข็งแรงและเจริญเติบโตต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองทั้งหมดเมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *A. glabrata* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Arbrook Ecoturf และ Florigraze สามารถสรุปได้ว่า ในการขยายพันธุ์ด้วยชิ้นส่วนข้อนั้น ถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Florigraze สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยลำต้นมีความแข็งแรงและสมบูรณ์ สามารถนำออกปลูกและเจริญเติบโตในสภาวะนอกหลอดทดลองได้ สำหรับการขยายพันธุ์โดยชิ้นส่วนใบนั้น พบว่าถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมาก และได้ต้นกล้าที่แข็งแรงและสมบูรณ์ พร้อมที่จะนำออกปลูกในสภาวะธรรมชาติได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 เนื่องจากการชักนำข้อให้เกิดยอดของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook และ Florigraze นั้นมีร้อยละการเกิดที่น้อย และไม่ค่อยแข็งแรง ทำให้ไม่สามารถนำยอดนั้นมาชักนำให้เกิดรากได้ จึงต้องทำการเพาะเลี้ยงตัวอย่างให้มีปริมาณมาก ๆ และใช้ระยะเวลาเพื่อที่จะได้ยอดที่สมบูรณ์มาชักนำให้เกิดรากเป็นต้นกล้าได้อย่างสมบูรณ์

5.2.2 สำหรับการศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วลิสงเถากลาบราต้าในทุกสายพันธุ์ ควรทำการขยายปริมาณแคลลัสที่ได้ตามช่วงเวลาในระยะ log phase ซึ่งจะทำให้ได้แคลลัสในปริมาณที่มากขึ้น และสามารถนำแคลลัสนั้นมาชักนำให้เกิดเป็นยอดใหม่ได้

5.2.3 ในการศึกษาการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นยอดใหม่ในถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook และ Florigraze เนื่องจากแคลลัสที่เกิดขึ้นนั้นมีความฉ่ำน้ำและไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นยอดใหม่ได้ ควรทำศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารเคมีหรือวิตามินที่สามารถในการพัฒนาแคลลัสให้เกิดเป็นยอดได้อย่างสมบูรณ์

5.2.4 ศึกษาวิธีการออกปลูกอื่น ๆ เพื่อให้ได้ต้นกล้าของถั่วลิสงเถากลาบราต้าออกปลูกในธรรมชาติมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. 2558. **ถั่วลิสงเถา ฟลอริเกรซ.** [Online]. Available : http://nutrition.dld.co.th

จิรัชญา เกตุพรหม ธันย์สิตา บุณยกาญจนารัตน์ และ พิชญ์สินี สาระพันธุ์. 2558. "อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*Arachis glabrata*)." วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เฉลิมพล แซมเพชร. 2530. **หญ้าและถั่วอาหารสัตว์เมืองร้อน.** พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ : โอ เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์.

ณัตฐิยา ชัยชนะ. 2562. "ผลของ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid ต่อการชักนำแคลลัสของข้าวซิวแดง (*Oryza sativa* L. cultivars Sew Deng) และข้าวหน่อแพร่ (*Oryza sativa* L. cultivars Nor Prae)." *วารสารวิจัยรามคำแหง (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี).* 22(1) : 30-35.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2544. **เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** (2). ขอนแก่น : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี และคณะ. 2557. "องค์ประกอบทางโภชนะและการย่อยสลายได้ของถั่วลิสงเถาในกระเพาะรูเมนด้วยเทคนิคถุงไนลอนของโคนม." หน้า 406-416. ใน **การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล.** ครั้งที่ 5. เพรชบุรี.

ยุพาภรณ์ จิโรภาสภาณุวงศ์ และวุฒิชัย ศรีช่วย. 2560. "การเปรียบเทียบปริมาณแอนโธไซยานินในแคลลัส กลีบดอก และใบอ่อน ของต้นกุหลาบหนู." *Princess of Naradhiwas University Journal*. 9(1) : 143-150.

รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและเทคนิค.** 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัตนาภรณ์ บุญเรือง และ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2554 "การศึกษาการเจริญของเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากส่วนของใบเลี้ยงของถั่วท่าพระสไตโล (*Stylosanthes guianesis* CIAT 184)." หน้า 529-535. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลีลาวดี เงินงาม. 2562. "การทนแล้งของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 และฮามาต้า โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วุฒิชัย ศรีช่วย และสมปอง เตชะโต. 2557. "การเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์กล้วยไม้เขากวางอ่อน (*Phalaenopsis cornu-cervi* (Breda) Blume & Rchb.) โดยการชักนำเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัส." *วารสารพืชสงขลานครินทร์*. 1(2) : 13-18.

ศศิธร ถิ่นนคร และคณะ. 2545. "การศึกษาถั่วลิสงเถาเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ ผลผลิตพืชอาหารสัตว์และคุณค่าทางโภชนะของถั่วลิสงเถา 11 สายพันธุ์." หน้า 112-126. ใน **รายงานผลงานวิจัยประจำปี กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.** นครราชศรีมา.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศาลักษณ์ พรรณศิริ. 2538. “การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นอ่อนจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของถั่วเหลือง.” หน้า 24. ใน **บทคัดย่องานวิจัยการใช้ฮอร์โมนพืชและสารที่เกี่ยวข้อง ครั้งที่ 3.** กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สมาคมวิทยาศาสตร์การเกษตรแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์.

สายัณห์ ทัดศรี. 2540. **พืชอาหารสัตว์เขตร้อน การผลิตและการจัดการ.** พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์รั้วเขียว.

สมัชชา นาคสมบัติ. 2543. “การขยายพันธุ์นมตำเลีย (*Hoya* ssp.) และการปรับปรุงพันธุ์โดยการปลูกถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium tumefaciens.*” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

โสภณ ชินเวโรจน์. 2562. **การเพาะต้นกล้าถั่วลิสงเถา.** [Online]. Available : http://nutrition.dld.go.th/nutrition/index.php/using-joomla/135-2015-08-06-07-47-46/387-2016-05-16-00-03-50

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. **เทคโนโลยีชีวภาพของพืช.** 2. กรุงเทพฯ : หจก.วี.เจ.พริ้นติ้ง.

อรดี สหวัชรินทร์ และ ชุติมา คุณาไทย. 2525. “การขยายพันธุ์บอนสีโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.” หน้า 123. ใน **รวมเรื่องย่อการประชุมทางวิชาการ สาขาพืช ครั้งที่ 20.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรัญญา ตันติปัญจพร. 2534. “กายวิภาคและสัณฐานวิทยาของข้าว (*Oryza sativa* L.) จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ. *ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.* 1(3) : 201-204.

Akasaka, Y. Daimon, Hiroyuki. and Mii, M. 2000. “Improved Plant Regeneration from Cultured Leaf Segments in Peanut (*Arachis hypogaea* L.) by Limited Exposure to Thidiazuron.” *Plant Science*. 156(2) : 169-175.

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.).” *Journal of Experimental Agriculture International.* 1(1) : 1-4.

Al-Joboury, M.R. 2012. “*In Vitro* Propagation of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.).” *Ibn Al-Haitham Journal for Pure and Applied Science.* 25(3) : 13-19.

Aman, V. Malik, C. P. Gupta, V. K. and Sinsinwar, Y.K. 2009. “Response of Groundnut Genotypes to Plant Growth Regulator (BAP) to Induce Direct Organogenesis.” *World Journal of Agricultural Sciences*. 5(3) : 313-317.

Aremu, A.O. Bairu, M.W. Doležal, K. Finnie, J.F. and Van-Staden, J. 2012. Topolins : A Panacea to Plant Tissue Culture Challenges.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 108(1) : 1-16.

Bairu, M.W. Stirk, W.A. Dolezal, K. and Van Staden, J. 2007). “Optimizing The Micropropagation Protocol for The Endangered *Aloe polyphylla* : Can *Meta*-topolin and Its Derivatives Serve as Replacement for Benzyladenine and Zeatin?.” *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 90(1) : 15–23.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bera, S.K. Singh, A.L. and Gedia, M.V. 2014. "Influence of Growth Regulators on Callus Induction and Plant Regeneration in *Arachis Prostrata* (L.)." *Agricultural Research communication Centre*. 37(3) : 281-286.

Cassells, A.C. 2001. "Contamination and Its Impact in Tissue Culture." *In Vitro Culture and Horticultural Breeding. Acta Horticulturae.* (560) : 353-359.

Compton, M.E. and Koch, J.M. 2001. "Influence of Plant Preservative Mixture (PPM) TM on Adventitious Organogenesis in Melon, Petunia, and Tobacco." *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant.* 37(2) : 259-261.

Des, M.P. Rebecca, L.J. Sharmila, S. and Chatterjee, S. 2012. "Study on The Effect of Mercury (II) Chloride as Disinfectant on Mixed Culture." *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 4(12) : 4975-4978.

Dolce, N.R. Faloci, M.M. and Gonzalez, A.M. 2017. "*In Vitro* Plant Regeneration and Cryopreservation of *Arachis glabrata* (Fabaceae) using Leaflet Explants." *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 54(2) : 133-144.

Dreywood, R. 1946. "Qualitative Test for Carbohydrate Material." *Analytical Edition.* 18 : 499.

Eapen, S. and George, L. 1993. "Somatic Embryogenesis in Peanut : Influence of Growth Regulators and Sugars." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 35(2) : 151-156.

El-Mahrouk, M.E. Dewir, Y.H. and Naidoo, Y. 2016. Micropropagation and Genetic Fidelity of The Regenerants of *Aglaonema* 'Valentine' using Randomly Amplified Polymorphic DNA." *HortScience.* 51(4) : 398-402.

Faizy, H.S. AL-Zubaydi, S.R. and Nair, M. 2017. "Effect of Plant Preservative Mixture PPMTM on The Shoot Regeneration of Watercress (*Nasteutium officinale*)." *Science Journal of University of Zakho.* 5(2) : 187-192.

Fajinmi, O.O. Amoo, S.O. Finnie, J.F. and Van Staden, J. 2014. "Optimization of *In Vitro* Propagation of *Coleonema album*, A Highly Utilized Medicinal and Ornamental Plant." *South African Journal of Botany*. 94 : 9-13.

French, E.C. Prine, G.M. Ocumpaugh, W.R. and Rice, R.W. 1993. "Regional Experience with Forage *Arachis* in The United States." *Hardy B (eds) Biology and Agronomy of Orage Arachis.* 167-184.

Gayathri, M. Kumar, P.S. Prabha, A.M.L. and Muralitharan, G. 2015. "*In Vitro* Regeneration of *Arachis hypogaea* L. and *Moringa oleifera* Lam. using Extracellular Phytohormones from *Aphanothece* sp. MBDU 515." *Algal Research.* 7 : 100-105.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gej, M.D. 2004. "Factors Influencing Somatic Embryogenesis Induction and Plant Regeneration with Particular Reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh." *Plant Growth Regulation.* 43 : 27-47.

Gentile, A. Gutiérrez, M.J. Martinez, J. Frattarelli, A. Nota, P. and Caboni, E. 2014. "Effect of *meta*-Topolin on Micropropagation and Adventitious Shoot Regeneration in *Prunus* rootstocks." *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 118(3) : 373–381.

George, E.F. Hall, M. A. and Klerk, G. J. D. 1993. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Basingstoke: Exegetics.

Han, B.H. and Park, B.M. 2008. "*In Vitro* Micropropagation of *Philodendron cannifolium*. *Plant Biotechnology Reports.* 35(3) : 203-208.

Hare, P.D. and Van Staden, J. 1994. "Inhibitory Effect of Thidiazuron on The Activity of Cytokinin Oxidase Isolated from Soybean Callus." *Plant and Cell Physiology*. 35(8) : 1121-1125.

Huetteman, C.A. and Preece, J.E. 1993. "Thidiazuron : A Potent Cytokinin for Woody Plant Tissue Culture." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 33: 105-119.

Jimenez, V.M. Castillo, J. Tavares, E. Guevara, E. and Montiel, M. 2006. "*In Vitro* Propagation of The Neotropical Giant Bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, Through Axillary Shoot Proliferation." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 86(3) : 389-395.

Johnson, M. Abraha, B. Kibret, M. Molla, E. and Manickam, V.S. 2005. "Regeneration from Callus Cultures of *Rhinacanthus nasutus* L." *Kurtz. Ethnomed. J. Sci. Technol.* 3(1) : 17–24.

Johnson, M. Wesely, E.G. Kavitha, M.S. and Uma, V. 2011. "Antibacterial Activity of Leaves and Inter-Nodal Callus Extracts of *Mentha arvensis* L." *Asian Pacific J. Trop. Med.* 4(3) : 196–200.

Kanyand, M. Peterson, C.M. and Prakash, C.S. 1997. "The Differentiation of Emergences into Adventitious Shoots in Peanut, *Arachis hypogaea* (L.)." *Plant Science.* 126(1) : 87-95.

Limbua, P.G. Ngugi, M.P. and Oduor, R.O. 2019. "*In Vitro* Regeneration Protocol of Kenyan Adapted Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Genotypes using Cotyledonary Node Explants." *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*. 7(1) : 1-4.

Maas, B.L. Ocampo, C.H. 1995. "Isozyme Polymorphism Provides Fingerprints for Germplasm of *Arachis glabrata* Bentham." *Genetic Resources and Crop Evolution.* 42 : 77-82.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Maina, S.M. Emongor, Q. Sharma, K.K. Gichuki, S.T. Gathaara, M. and Villiers, S.M. 2010. "Surface Sterilant Effect on The Regeneration Efficiency from Cotyledon Explants of Groundnut (*Arachis hypogea* L.) Varieties Adapted to Eastern and Southern Africa." *African Journal of Biotechnology.* 9(20) : 2866-2871.

Mansur, E. Lacorte, C. Rabello, A.C.G. Cordeiro, A.R. 1993. "*In Vitro* Regeneration of *Arachis Villosulicarpa* Hoehne from Cotyledon Segments, Leaves and Cell Suspension." *Pesquisa Agropecuaria Brasileira, Brasilia.* 28(10) : 1143-1146.

Mok, M.C. Mok, D.W.S. Armstrong, D.J. Shudo, K. Isogai, Y. and Okamoto, T. 1982. "Cytokinin Activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol5-ylurea (TDZ)." *Phytochemistry* 21 : 1509-1511.

Mroginski, E. Rey, H.Y. Gonzalez, A.M. and Mroginski, L.A. 2004. "Thidiazuron Promotes *In Vitro* Plant Regeneration of *Arachis correntina* (Leguminosae) via Organogenesis." *Journal of Plant Growth Regulation*. *23*(2) : 129-134.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. "A Revised Medium for Growth and Bioassays with Tobacco Tissue." *Physiol Plant*. 15 : 473-797.

Muthusamy, A. Vasanth, K.. Sivasankari, D. Chandrasekar, B.R. and Jayabalan, N. 2007. "Effects of Mutagens on Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Groundnut." *Biologia Plantarum*. 51(3) : 430–435.

Narasimhulu, S.B. and Reddy, G.M. 1983. "Plantlet Regeneration from Different Callus Cultures of *Arachis hypogaea* L." *Plant Science Letters.* 31(2-3) : 157-163.

Poeaim, A. Poeaim, S. Pongtongkam, P. and Arananant, J. 2015 "Callus Induction and Cell Suspension Cultures of Rhizome Peanut (*Arachis glabrata*) Cultivars: Arbrook." *Journal of Agricultural Technology*. 11(8) : 2481-2488.

Prine, G.M. Dunavin, L.S. Glennon, R. J. and Roush, R.D. 1990. "Registration of Arbrook Rhizoma Peanut." *Crop Science*. 3 : 743-744.

Rey, H.Y. Scocchi, A.M. Gonzalez, A.M. and Mroginski, L.A. 2000. "Plant Regeneration in *Arachis pintoi* (Leguminosae) Leaf Culture." *Plant Cell Reports*. 19 :856-862.

Rey, H.Y. Mroginski, L.A. 2003. "Regeneration of Plants from Apical Meristem Tips and Nodal Segments of *Arachis pintoi*." *Peanut Science*. 30(2) : 75-79.

Rouse, R.E. and Mullahey, J.J. 1997. "Perennial Peanut Ground Cover in Citrus Orchard Row Middles and Discussion of Potential Environmental Benefits." *Proceedings of the Florida State Horticultural Society.* 110 : 79–82.

Sagare, A.P. Lee, Y.L. Lin, T.C. Chen, C.C. and Tsay, H.S. 2000. "Cytokinin-Induced Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) - A Medicinal Plant." *Plant Science.* 160(1) :139-147.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sen, M.K. Hassan, M.M. Nasrin, S. Jamal, M.A.H.M. Mamun-OrRashid, A.N.M. and Dash, B.K. 2013. "*In Vitro* Sterilization Protocol for Micropropagation of *Achyranthes aspera* L. Node." *Int. Res. J. Biotechnol*. 4(5) : 89–93.

Skoog, F. and Miller, C.O. 1957. "Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissue Grown *In Vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol*. 11: 118-131.

Souza, L.M.D. Barbosa, M.R. Zárate-Salazar, J.R. Lozano-Isla, F. and Camara, T.R. 2019. Use of *meta*-Topolin, An Unconventional Cytokinin in The *In Vitro* Multiplication of *Opuntia stricta* Haw." *Biotecnología Vegetal*. 19(2) : 85-96.

Straus, J. and Lasue, C.D. 1954. "Maize Endosperm Tissue Grown *In Vitro* I. Culture Requirements." *American Journal of Botany*. 41(8) : 687-694.

Sukhawat and Poeaim 2008. "Plant Regeneration from Cell Suspension Culture of Nilegrass (*Acroceras macrum*)." *Agricultural Sci. J.* 39(3) : 556-559.

Valero-Aracama, C. Kane, M.E. Wilson, S.B. and Philman, N.L. 2009. "Substitution of Benzyladenine with *meta-Topolin* during Shoot Multiplication Increases Acclimatization of Difficult and Easy to Acclimatize Sea Oats (*Uniola paniculata* L.) Genotypes." *Plant Growth Regulation*. 60(1) : 43-49.

Venkatachalarn, P. and Jayabalan, N. 1997. "Effect of Auxins and Cytokinins on Efficient Plant Regeneration and Multiple-Shoot Formation from Cotyledons and Cotyledonary-Node Explants of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) by *In Vitro* Culture Technology." *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 67(3) : 237–247.

Vidoz, M.L. Rey, H.Y. Gonzalez, A.M. and Mroginski, L.A. 2004. "Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration through Leaf Culture in *Arachis glabrata* (Leguminosae)." *Acta Physiologiae Plantarum*. 26(1) : 59-66.

Werbrouck, S.P.O. Strnad, M. Onckelen, H.A.V. and Debergh, P.C. 1996. "Meta-topolin, an Alternative to Benzyladenine in Tissue Culture." *An International Journal for Plant Biology*. 98(2) : 291-297.

Wesely E.G., Johnson M., Kavitha M.S., and Selvan, N. 2011. "Micropropagation of *Alternanthera sessilis* (L.) using Shoot Tip and Nodal Segments." *Iranian J. Biotechnol*. 9(3) : 206–212.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ภาคผนวกที่ 1ก สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS : Murashige and Skoog (1962); Phytotech

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Ammonium Nitrate	1650
Boric Acid	6.2
Calcium Chloride, Anhydrous	332.2
Cobalt Chloride Hexahydrate	0.025
EDTA, Disodium Salt	37.26
Ferrous Sulfate, Heptahydrate	37.8
Magnesium Sulfate Anhydrous	180.7
Manganese Sulfate	16.9
Potassium Iodine	0.83
Potassium Nitrate	1900
Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous	170
Sodium Molybdate (VI), Dihydrate	0.25
Zinc Sulfate, Heptahydrate	8.6
Glycine	2.0
Myo-Inositol	100
Nicotinic Acid	0.5
Pyridoxine HCl	0.5
Thiamine HCl	0.1
Sucrose	30000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวอภิสรา ผลจัด
วัน เดือน ปีเกิด	วันพฤหัสบดีที่ 23 เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2538
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 19 แยก 1-3 ซอยอ่อนนุช 53 ถนนอ่อนนุช แขวงประเวศ เขตประเวศ จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10250
ประวัติการศึกษา	(2561) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 3.22 (สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง) (2564) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ (สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษาสำหรับหลักสูตรระดับปริญญาโท เป็นระยะเวลาไม่เกิน 2 ปี ผู้ช่วยนักวิจัย ในโครงการยกระดับเศรษฐกิจและสังคมรายตำบลแบบบูรณาการ (1 ตำบล 1 มหาวิทยาลัย) เป็นระยะเวลา 11 เดือน

ผลงานทางวิชาการ

Pholjad, A. Pongtongkam, P. Arananant, J. and Poeaim, A. 2020. *"In Vitro* Propagation from Nodal Segments of *Arachis glabrata* Cultivar Florigraze." *International Journal of Agricultural Technology*. 16(5) : 1175-1184.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้