การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นถั่วกลาบราต้า (*Arachis glabrata*)

STUDY ON OPTIMUM FACTORS FOR GROWTH OF *Arachis glabrata*

ณัฐดนัย บุญสัมฤทธิ์
พงศธรณ์ เหมจุไร

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON OPTIMUM FACTORS FOR GROWTH OF *Arachis glabrata*

NATDANAI BOONSUMLIT
PONGSATHON HEMCHURAI

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นถั่วกลาบราต้า (*Arachis glabrata*)

Study on Optimum Factors for Growth of *Arachis glabrata*

ชื่อนักศึกษา นายณัฐดนัย บุญสัมฤทธิ์ รหัสนักศึกษา 57050683

นายพงศธรณ์ เหมจุไร รหัสนักศึกษา 57050729

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการ	
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นถั่วกลาบราต้า (*Arachis glabrata*)
ชื่อนักศึกษา	นายณัฐดนัย บุญสัมฤทธิ์ รหัสนักศึกษา 57050683
	นายพงศธรณ์ เหมจุไร รหัสนักศึกษา 57050729
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงถั่วลิสงกลาบราต้า (*Arachis glabrata*) ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Arbrook Ecoturf และ Floriglaze ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ความเข้มข้นของไฟตาเจล 2.6 และ 5.2 กรัมต่อลิตร ที่มีค่าความเป็นกรด 4.8 และ 5.8 ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 6 สัปดาห์พบว่า สำหรับชิ้นส่วนข้อของสายพันธุ์ Arbrook ที่ TDZ ความเข้มข้น 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดที่ 5.8 สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดใหม่ได้มากที่สุด สำหรับชิ้นส่วนข้อของสายพันธุ์ Ecoturf ที่ TDZ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดที่ 4.8 สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดใหม่ได้มากที่สุด และมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด และจากการศึกการชักนำแคลลัสของสายพันธุ์ Ecoturf ให้เกิดยอดพบว่า ที่ BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดที่ 4.8 สามารถชักนำให้แคลลัสเกิดการพัฒนาไปเป็นอวัยวะสูงที่สุด และเกิดยอดใหม่ได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น การอ้างอิงถึงเอกสารนี้ต้องมีการอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ : ถั่วกลาบราต้า การชักนำให้เกิดยอด การพัฒนาไปเป็นอวัยวะ

Title	Study on Optimum Factors for Growth of *Arachis glabrata*		
Students	Mr. Natdanai	Boonsumlit	Student ID 57050683
	Mr. Pongsathon	Hemchurai	Student ID 57050729
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2017		
Advisor	Asst. Prof. Dr. Anurug Poeaim		

Abstract

This research on the tissue culture of *Arachis glabrata* cv. Arbrook, Ecoturf and Floriglaze on MS medium supplemented with 2.6 and 5.2 g/L of phytagel and regulated pH at 4.8 and 5.8 combined with 0, 0.5, 1, 3 and 5 mg/L of TDZ for 6 weeks. For node, Arbrook using 1 and 3 mg/L TDZ with phytagel 2.6g/L pH 5.8 and Ecoturf using TDZ at 5 mg/L with phytagel 5.2 g/L pH at 4.8 gave the highest percentage of shoot induction and highest average length. For callus of Ecoturf using BAP at 0.5 mg/L with phytagel 5.2 g/L pH at 4.8 could induce the highest number of organogenesis and gave the highest shoot induction

Keyword: *Arachis glabrata*, Shoot induction, Organogenesis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ โดยวัตถุประสงค์ของผู้จัดทำคือศึกษาปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อการเจริญของถั่วกลาบราต้าซึ่งจะไม่สามารถสำเร็จได้หากขาดความช่วยเหลือจากผู้มีอุปการะคุณ หลายๆท่าน

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการโครงงานพิเศษ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการโครงงานพิเศษ ที่คอยให้คำปรึกษา และแนะนำสิ่งต่างๆที่เป็นประโยชน์อย่างมากเกี่ยวกับการทำงาน อีกทั้งยังชี้แนะข้อบกพร่อง ที่เกิดขึ้น ตลอดจนให้แนวทางในการแก้ไขปัญหาในการทำงานวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างดี ผู้จัดทำขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน และถ่ายทอดความรู้ที่ได้นำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาชีววิทยาที่เอื้ออำนวยความสะดวกในการใช้สารเคมีต่างๆสำหรับการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆนักศึกษาปริญญาโทภาควิชาชีววิทยาที่ดูแล เกื้อหนุน และชี้แนะแนวทางรวมถึงเพื่อนที่ได้ให้คำปรึกษา และช่วยเป็นกำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา บุคคลอันเป็นที่เคารพรัก ตลอดจนบุคคลที่ผู้จัดทำไม่ได้กล่าวถึงมา ณ ที่นี้ด้วยที่ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และการสนับสนุนจนการทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ณัฐดนัย บุญสัมฤทธิ์
พงศธรณ์ เหมจุไร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
คำย่อ/สัญลักษณ์	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ถั่วลิสงเถา	3
2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของถั่วลิสงเถากลาบราต้า	3
2.1.3 ประโยชน์ของถั่วลิสงเถากลาบราต้า	4
2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	4
2.2.1 ความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	4
2.2.2 อาหารสังเคราะห์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	4
2.2.3 ประเภทของอาหารสังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	5
2.2.4 ส่วนประกอบของอาหาร	5
2.3 การเพาะเลี้ยงและการพัฒนาของแคลลัส	8
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	12
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	12
3.1.1 พืชตระกูลถั่วที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆ	12
3.1.2 ภาชนะเครื่องแก้ว	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการเตรียมอาหาร 12
3.1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อและย้ายเนื้อเยื่อ 12
3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ 13
3.1.6 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 13
3.1.7 อุปกรณ์ 13
3.2 วิธีการทดลองและการวิเคราะห์ผล 13
3.2.1 การเตรียมอาหาร 13
3.2.2 การเตรียมชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช 14
3.2.2.1 การคัดเลือกชิ้นส่วนพืช 14
3.2.2.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อ 14
3.2.2.3 การเตรียมแคลลัส 14
3.2.3 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และค่าความเป็นกรดในอาหารต่อการชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อของถั่วกลาบราต้า 14
3.2.4 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และค่าความเป็นกรดในอาหารต่อการชักนำยอดจากแคลลัสของถั่วกลาบราต้า 15
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 16
4.1 ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และค่าความเป็นกรดในอาหารต่อการชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อของถั่วกลาบราต้า 16
4.2 ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และค่าความเป็นกรดในอาหารต่อการชักนำยอดจากแคลลัสของถั่วกลาบราต้า 24
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 30
5.1 สรุปผลการวิจัย 30
5.2 ข้อเสนอแนะ 30
เอกสารอ้างอิง 31
ภาคผนวก 34
ภาคผนวก ก 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

รูปที่		หน้า
4.1	ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และค่าความเป็นกรดในอาหาร ต่อการชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อของถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook ในสัปดาห์ที่ 2	17
4.2	ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และค่าความเป็นกรดในอาหาร ต่อการชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อของถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook ในสัปดาห์ที่ 4	18
4.3	ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และค่าความเป็นกรดในอาหาร ต่อการชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อของถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf ในสัปดาห์ที่ 2	21
4.4	ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และค่าความเป็นกรดในอาหาร ต่อการชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อของถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf ในสัปดาห์ที่ 4	22
4.5	ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และค่าความเป็นกรดในอาหาร ต่อการชักนำยอดจากแคลลัสของถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf ในสัปดาห์ที่ 2	26
4.6	ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และค่าความเป็นกรดในอาหาร ต่อการชักนำยอดจากแคลลัสของถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf ในสัปดาห์ที่ 4	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4.1	กราฟแสดงร้อยละจำนวนข้อที่เกิดยอดใหม่ของต้นถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	19
4.2	รูปแสดงผลการชักนำชิ้นส่วนข้อของต้นถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook ให้เกิดยอดในสัปดาห์ที่ 2 และสัปดาห์ที่ 4	20
4.3	กราฟแสดงร้อยละจำนวนข้อที่เกิดยอดใหม่ของต้นถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	23
4.4	รูปแสดงผลการชักนำชิ้นส่วนข้อของต้นถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf ให้เกิดยอดในสัปดาห์ที่ 2 และสัปดาห์ที่ 4	24
4.5	กราฟแสดงร้อยละจำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียวเข้มของต้นถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	28
4.6	รูปแสดงผลการชักนำแคลลัสของต้นถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf ที่เกิดจุดสีเขียวเข้ม	29
4.7	รูปแสดงผลการชักนำแคลลัสของต้นถั่วกลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ที่เกิดยอด	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
MS	อาหารสังเคราะห์สำเร็จสูตร Murashige and Skoog, 1962
BAP	6-Benzylaminopurine
TDZ	Thidiazuron
PPM	plant preservative culture media active ingredients
antibiotics	antibiotic antimycotic solution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ถั่วกลาบราต้า มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Arachis glabrata* ชื่อสามัญว่า rhizoma peanut ถิ่นกำเนิดมาจากประเทศอเมริกาใต้ ถั่วกลาบราต้าได้ถูกพิสูจน์แล้วว่าเป็นพืชอาหารสัตว์ที่มีโปรตีนสูง และสามารถทนอยู่ภายใต้สภาวะที่หลากหลาย ถึงแม้ว่าถั่วกลาบราต้าจะออกดอกสีเหลืองสดถึงสีส้มอยู่บ่อยครั้งแต่พบว่าส่วนใหญ่ไม่มีการผลิตเมล็ด การแพร่พันธุ์ที่สำคัญของถั่วกลาบราต้าคือเหง้า หรือลำต้นใต้ดินซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย และยังช่วยให้ดินมีการระบายน้ำที่ดีขึ้น (M. J. และคณะ, 2011)

ปัจจุบันประเทศไทยนับได้ว่าเป็นประเทศที่มีการทำเกษตรกรรมมากที่สุดแห่งหนึ่งในโลก มีการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรจนเป็นรายได้หลักของประเทศ ซึ่งผลผลิตที่มีการส่งออกจำนวนมากก็คืออาหารแปรรูปจำพวกเนื้อสัตว์ ซึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการส่งออกคือการผลิตผลผลิตในปริมาณที่มากและต่อเนื่องต่อความต้องการของผู้บริโภค โดยต้องการใช้วัตถุดิบในการผลิตที่มีคุณภาพสูงและมีต้นทุนที่ต่ำ ซึ่งปัญหาในการเลี้ยงสัตว์เพื่อส่งออกผลผลิตคือการใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพและราคาต้นทุนค่อนข้างสูง

พืชอาหารสัตว์ เป็นอาหารหลักที่สำคัญสำหรับการเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้องซึ่ง ปัจจุบันเกษตรกรสนใจเลี้ยงสัตว์มากขึ้น จำนวนโคเนื้อและโคนมเพิ่มขึ้นทุกปี ขนาดของโคเนื้อและโคนมก็โตขึ้นเนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์ตามหลักวิชาการ ซึ่งพืชอาหารสัตว์ที่มีตามธรรมชาติไม่เพียงพอต่อความต้องการ ดังนั้นในการเลี้ยงโคเนื้อ โคนม กระบือ หรือสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่นให้มีการเจริญเติบโตและมีผลผลิตเป็นปกตินั้น จำเป็นต้องปลูกพืชอาหารสัตว์โดยเลือกปลูกพืชอาหารสัตว์ที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ มีการเจริญเติบโตดี มีผลผลิตที่สูง ซึ่งถั่วอาหารสัตว์นั้นมีโปรตีนสูง จึงเป็นแหล่งอาหารที่มีความอุดมสมบูรณ์ตอบสนองต่อความต้องการของสัตว์ได้เป็นอย่างดี (เชาวลิต และธำรงศักดิ์, 2539)

ถั่วกลาบราต้า (*Arachis glabrata*) เป็นถั่วอาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่เหมาะสมและเพียงพอต่อความต้องการของสัตว์ อีกทั้งยังเป็นถั่วสายพันธุ์ใหม่ที่นำมาปลูกในประเทศ โดยพบปัญหาของการขยายพันธุ์ที่ไม่ประสบความสำเร็จตามธรรมชาติเนื่องจากปัญหาของการไม่ติดเมล็ดหรือติดน้อยจึงไม่สามารถขยายพันธุ์ให้เพียงพอต่อความต้องการได้ อีกทั้งยังไม่มีรายงานการวิจัยของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วกลาบราต้ามากนัก ด้วยเหตุนี้เองผู้จัดทำจึงได้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วกลาบราต้าเพื่อขยายพันธุ์ให้ได้เพียงพอต่อความต้องการ อีกทั้งยังสามารถเจริญได้ในระยะเวลาอันสั้นซึ่งจะเป็นผลดีต่อเกษตรกรไทยครอบคลุมไปถึงสภาวะทางเศรษฐกิจถ้าสามารถต่อยอดได้ในวงกว้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของถั่วกลาบราต้า 3 สายพันธุ์ได้แก่ Arbrook Ecoturf และ Florigraze

1.2.2 ศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf

1.2.3 ศึกษาความเข้มข้นไฟตาเจลและความเป็นกรดของอาหาร ที่ส่งผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของถั่วกลาบราต้า 3 สายพันธุ์ได้แก่ Arbrook Ecoturf และ Florigraze

1.2.4 ศึกษาความเข้มข้นไฟตาเจลและความเป็นกรดของอาหาร ที่ส่งผลต่อการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ศึกษาปัจจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์ถั่วกลาบราต้าจากชิ้นส่วนข้อทั้ง 3 สายพันธุ์ และแคลลัสของถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อโดยศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญ ,ความเข้มข้นไฟตาเจล และความเป็นกรดของอาหาร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบความเข้มข้นไฟตาเจล และความเป็นกรดที่เหมาะสมต่อการเจริญของถั่วลิสงกลาบราต้า

1.4.2 ทราบความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของถั่วสายพันธุ์ Arbrook Ecoturf และ Florigraze

1.4.3 ทราบความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสของถั่วสายพันธุ์ Ecoturf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ถั่วลิสงเถา (สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์, 2016)

2.1.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Fabales

Family: Fabaceae

Genus: *Arachis*

Species: *Glabrata*

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของถั่วลิสงเถากลาบราต้า

ถั่วกลาบราต้าเป็นพืชที่มีอายุหลายปี (perennial) ชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Arachis glabrata* จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae มีรากเป็นแบบไหลหรือเหง้า (rhizomes) ซึ่งสานกันหนาแน่นอยู่บริเวณใต้ผิวดินลึกประมาณ 5-7 เซนติเมตร เหง้ามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร เมื่อเจริญเต็มที่จะมีสีน้ำตาลส้มหรือสีเปลือกไม้ ลักษณะต้นเตี้ย มีลำต้นใต้ดินเรียกว่า “เหง้า” (rhizomes) ลำต้นเหนือพื้นดินมีลักษณะตั้งตรง แตกออกจากเหง้า เมื่อต้นโตจะนอนและชูยอดสูงขึ้น ไม่มีแขนง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นประมาณ 2-3 มิลลิเมตร สูงประมาณ 15-45 เซนติเมตร เป็นพืชที่ทนอากาศหนาวเย็นได้ดี ตอบสนองต่อการให้น้ำดี เจริญได้ดีในดินที่มี pH ต่ำ ใบเป็นใบประกอบที่มี 4 ใบย่อย (fetrafoliolate) ลักษณะใบคล้ายใบหอก ไม่มีขน หรือมีขนขนาดเล็ก โดย 2 ใบ คู่บนมีความกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร ยาวประมาณ 3-3.5 เซนติเมตร ที่ส่วนปลายของหูใบมีรยางค์แข็งยาว ใบอ่อนมีสีเขียวอ่อน ใบแก่มีสีเขียวอมเทา ดอกมีลักษณะค่อนข้างกลม เป็นดอกเดี่ยว แบบสมมาตรด้านข้าง มีสีส้มอมเหลือง ความกว้างดอกประมาณ 15-25 มิลลิเมตร กลีบดอก 5 กลีบ กลีบเลี้ยง 5 กลีบเชื่อมติดกันเป็นหลอด มีเกสรตัวผู้ 9 อัน โดย ส่วนก้านเกสรตัวผู้เชื่อมติดกันตลอดความยาว เกสรตัวเมียมีรังไข่ยาวแบนตั้งตรง หรืออาจจะโค้งเล็กน้อย ก้านดอกยาว 10 เซนติเมตร ไม่ติดเมล็ด หรือติดเมล็ดน้อยมาก ลักษณะเมล็ดเป็นทรงกลมรี มีเปลือกหุ้ม ด้านนอกมีสีน้ำตาลอมเทา ขนาดของเมล็ดยาวประมาณ 10 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของเมล็ด 5-6 มิลลิเมตรมีความทนทานต่อการแทะเล็มของสัตว์ได้ดี ทนต่อสภาพอากาศแล้ง ปรับตัวได้ดีในดินกรด (pH<7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ประโยชน์ของถั่วลิสงเถากลาบราต้า

ประโยชน์ของถั่วลิสงเถากลาบราต้า มีหลากหลาย อาทิใช้เป็นอาหารหยาบของสัตว์คุณภาพดีในรูปถั่วสดโดยตัดให้กิน หรือปล่อยแทะเล็ม และในรูปถั่วแห้งสำหรับเลี้ยงโคนม โคเนื้อ กระบือ แพะ แกะ ม้า และกระต่าย ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในการผสมอาหารสำหรับสุกร และสัตว์ปีก การใช้ทำแปลงหญ้าผสมถั่ว สามารถปลูกร่วมกับหญ้าได้หลายชนิด อาทิหญ้าแพงโกลา หญ้ารูซี อีกทั้งยังปลูกเพื่อป้องกันการพังทลายของดิน และปลูกเป็นไม้ประดับได้อีกด้วย

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (อนุรักษ์, 2550)

2.2.1 ความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) คือ การนำเอาอวัยวะของพืช เช่น ยอด ราก ใบ และส่วนต่างๆของดอก ผล ลำต้น โปรโตพลาสต์เซลล์ หรือเนื้อเยื่อ มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและปลอดเชื้อ ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เห็นได้ชัดเจนและนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน คือ การผลิตพืชพันธุ์ดีเป็นจำนวนมากเพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม เพราะสามารถประหยัดเวลา แรงงาน และงบประมาณเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการขยายพันธุ์แบบเดิมที่เคยปฏิบัติมา

2.2.2 อาหารสังเคราะห์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

หนึ่งในปัจจัยที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่สำคัญ ได้แก่ อาหารสังเคราะห์ที่เตรียมขึ้นเพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งต้องมีความเหมาะสมสามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์และเนื้อเยื่อพืชได้ อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นกับความเหมาะสมต่อชนิดของพืชพันธุ์ ตลอดจนชนิดและสภาพชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามอาหารที่นิยมใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากที่สุด คือ อาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้ได้ดีในการเลี้ยงกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์ที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา มีช่องว่างในเซลล์จำนวนมาก และเซลล์ยังไม่มีการจัดรูปร่างที่แน่นอน ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอย ของพืชส่วนใหญ่เกือบทุกชนิดทำได้ง่ายกว่าการเพาะเลี้ยงจากส่วนอื่นๆ แคลลัสเหล่านี้ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารกึ่งแข็งที่ ประกอบด้วยเกลือของธาตุอาหารที่ต้องการ คือสารประกอบอนินทรีย์ และสารประกอบอินทรีย์ ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง แม้พืชทั้งต้นจะมีความต้องการขั้นพื้นฐานในการเจริญเติบโตไม่ซับซ้อนมากนักก็ตาม แต่การนำชิ้นส่วนของพืชมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นั้นความต้องการธาตุอาหารและสารบางอย่างที่จำเป็นมีความซับซ้อนมากกว่า คือ ต้องการทั้งธาตุอาหารหลัก(macroelements/nutrients) และธาตุอาหารรอง (micro-elements/nutrients) ที่ใช้ตามปกติในการเพาะเลี้ยงพืชในสารละลาย นอกจากนั้นยังต้องการธาตุอาหารอื่นๆ เช่น แหล่งของธาตุคาร์บอน และวิตามินอย่างมาก ปกติแล้วเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่แยกมาเลี้ยงจะต้องการวิตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) ต่างๆ ซึ่งปกติสังเคราะห์ได้เอง เพื่อไปสะสมไว้ยังอีกส่วนหนึ่ง แล้วเคลื่อนย้ายไปยังส่วนอื่นๆ เพื่อใช้ในกระบวนการเมตาโบลิซึม อย่างไรก็ตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของแต่ละสารประกอบที่จำเป็นนี้ยังไม่เป็นที่ทราบชัดสมบูรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของสารที่ได้จากกระบวนการเมตาโบลิซึม (secondary metabolites) เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารที่ใช้มักถูกดัดแปลงไปตามจุดมุ่งหมาย เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อกำเนิดอวัยวะ (organogenesis) และ/หรือ การกำเนิดคัพภะ (embyogenesis) จึงทำให้ยากต่อการหาข้อสรุปพื้นฐานที่สอดคล้องไปในทางเดียวกัน

2.2.3 ประเภทของอาหารสังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.อาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium) เทคนิคที่ใช้ในยุคแรกๆ นั้น ใช้วุ้น (agar) เพื่อปรับสารละลายอาหารให้มีสภาพเป็นของแข็งมากขึ้น โดยนึ่งในหม้อนึ่งความดันเพื่อหลอมละลายอาหารแล้วเทใส่ภาชนะและทิ้งให้แข็งตัวอยู่ในสภาพอาหารกึ่งแข็งแต่มักพบว่าคุณสมบัติต่างๆ ของสารประกอบเคมีในอาหารอาจไม่ได้รับสูงสุดเท่ากับอาหารเหลว (liquid medium) รายงา**นระบุ**ว่าการเจริญเติบโตของถั่ว Pea abies จะดีที่สุดในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร การใช้วุ้นปริมาณมากเกินไปอาจไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อได้ ดังนั้นความเข้มข้นไฟตาเจลที่พอเหมาะสำหรับอาหารแต่ละชนิดจะต้องมีการทดสอบเสียก่อน อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่ใช้กันแพร่หลายและได้ผลดีเพื่อวัตถุประสงค์ส่วนใหญ่ คือ 0.8 % สารสังเคราะห์พวกเจลาติน และเจลซิลิกาได้เคยมีการใช้ และในปัจจุบันมี การพัฒนาสารประกอบพวกอะคิลาไมด์เจล เช่นเดียวกับสตาร์ทโคพอลิเมอร์มีการแนะนำมาใช้แทนวุ้น สารเหล่านี้มีข้อดีที่ไม่จำเป็นต้องต้มให้เดือดเพื่อช่วยให้ละลายน้ำได้ แต่ยังมีปัญหาในเรื่องการปรับค่า pH ในขณะที่สารพวกผงถ่าน (charcoal) ถูกเติมในอาหารหลายสูตร เพื่อช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตเนื่องจากสามารถดูดซับสารพิษพวก toxic metabolites ที่เกิดจากเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงได้ดี

2. อาหารเหลว (liquid medium) อาหารเหลวเป็นที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางเนื่องจากเนื้อเยื่อจะจม หรือแขวนลอยอยู่บนกระดาษกรองที่จุ่มในอาหารเหลวตลอดเวลาในทางปฏิบัติอาจจะใช้ฉนวนใบแก้วช่วยพยุงเนื้อเยื่อที่เลี้ยงได้เช่นกัน เช่นเดียวกับการใช้ fabric support (100% polyester) ที่อิ่มตัวด้วยอาหารเหลว ซึ่งจะช่วยในการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานเกิดได้ดีขึ้น เนื้อเยื่อที่จมอยู่ในอาหารเหลวอาจถูกเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที (rpm) เพื่อช่วยในการให้อากาศ

2.2.4 ส่วนประกอบของอาหาร

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะประกอบด้วยองค์ประกอบต่างๆ ที่พืชต้องการอย่างครบถ้วน จึงขอกล่าวส่วนประกอบของอาหารดังต่อไปนี้

1. น้ำ (water) ประมาณ 95 % ของอาหารเป็นน้ำ ในการทำงานวิจัยควรใช้น้ำกลั่นจากเครื่องกลั่นแก้วเครื่องกลั่นควรได้รับการทำความสะอาดอย่างสม่ำเสมอ และควรบรรจุน้ำกลั่นในขวดพลาสติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วุ้น (agar) เนื้อเยื่อส่วนมากจะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตรที่มีวุ้น ซึ่งหน้าที่ช่วยพยุงเนื้อเยื่อให้ตั้งอยู่ได้บนอาหาร ในกรณีที่เลี้ยงในอาหารเหลวจะวางบนเครื่องเขย่า หรือเลี้ยงบนสะพานกระดาษกรอง (filter paper bridge) เพื่อให้เนื้อเยื่อได้รับอากาศเพียงพอ วุ้นเป็นส่วนประกอบที่แพงที่สุดในอาหาร ผลิตจากสาหร่ายทะเลทำให้อาหารแข็งสังเคราะห์สูตรตัววุ้นเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) มีโมเลกุลใหญ่ การใช้วุ้นในปริมาณที่ต่ำ (0.5%) จะทำให้อาหารไม่แข็งตัวไหลไปมาได้ โดยเฉพาะเมื่อมี pH ต่ำจึงไม่สามารถพยุงเนื้อเยื่อพืชไว้ได้ แต่ถ้าใช้วุ้นในปริมาณที่สูง (1.0%) จะทำให้อาหารแข็งสังเคราะห์สูตรมากจนไม่สามารถให้น้ำเพียงพอ และยังทำให้พืชดูดอาหารไปใช้ได้ยาก

3. แหล่งธาตุคาร์บอน (carbon sources) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารทุกสูตร เป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นมากต่อการเจริญเติบโต เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชยังไม่มีการสังเคราะห์แสงในสภาพหลอดแก้ว หรือมีการสังเคราะห์แสงในอัตราที่ต่ำเพราะได้รับแสงน้อย และมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์จำกัดน้ำตาลที่นิยมใช้คือ ซูโครส (sucrose) ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่พืชสังเคราะห์ได้เอง และมีความจำเป็นอย่างมากต่อเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิด โดยปกติมักใช้ในปริมาณ 1-5 % การเพิ่มปริมาณน้ำตาลมากขึ้นอีกจะลดการเจริญเติบโตลง น้ำตาลอาจเปลี่ยนรูปได้เมื่อถูกนึ่งฆ่าเชื้อ นอกจากนี้น้ำตาล พอลิแซ็กคาไรด์อาจเปลี่ยนเป็น โมโนแซ็กคาไรด์ เมื่อเกิดการแยกสลายด้วยน้ำ (hydrolysis)

4. เกลืออนินทรีย์ (inorganic salt) ธาตุอาหารมีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อรองลงมาจากน้ำตาล แร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชทั่วๆไป ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) ซัลเฟอร์ (S) แมกนีเซียม (Mg) เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) สังกะสี (Zn) โบรอน (B) ทองแดง (Cu) โคบอลต์ (Co) และโมลิบดีนัม (Mo) บางสูตรเติมไอโอดีน (I) ด้วย ซึ่งพบว่าให้ผลดีสำหรับการเจริญของรากและแคลลัส ชนิดและปริมาณของเกลือที่มีแร่ธาตุเหล่านี้ มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อและเซลล์พืชมาก เช่น ธาตุไนโตรเจน (N) โดยทั่วไป มักให้อย่างน้อย 25-60 มิลลิโมลาร์ ในรูปเกลือไนเทรต แต่ก็พบว่าการใช้เกลือแอมโมเนียม 2-20 มิลลิโมลาร์ด้วย ก็จะให้ผลดียิ่งขึ้นสำหรับการเลี้ยงแคลลัสของยาสูบ และการเพาะเมล็ดกล้วยไม้บางชนิด นอกจากนั้นเกลือแอมโมเนียมยังมีส่วนช่วยรักษาสมดุลของค่า pH หรือระดับความเป็นกรดด่างของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วย เช่นเดียวกับการใช้สารอินทรีย์ แต่บางครั้งพบว่าเกลือแอมโมเนียมอาจมีผลยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อพืชบางชนิดได้ ส่วนธาตุเหล็กมักเตรียมให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ดี โดยรวมกับไดโซเดียมอีดีทีเอเก็บในที่ที่ไม่ถูกแสง ทั้งนี้เพื่อให้เหล็กอยู่ในรูปที่พืชใช้ได้นาน และทำให้พืชไม่มีภาวะขาดธาตุเหล็ก

5. วิตามิน (Vitamins) ช่วยให้การทำงานของเอนไซม์ต่างๆเป็นไปได้อย่างดี ปกติพืชสามารถสังเคราะห์วิตามินได้เอง แต่ในหลอดทดลองอาจสร้างได้ไม่เพียงพอจึงต้องเติมให้เสมอๆ คือ ไทอามีน (Thiamine) 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้การให้วิตามินเสริมจำพวกนิโคทินิกแอซิด (Nicotinic acid), ไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine hydrochloride) ไมโออินอซิทอล

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น

(myoinositol) โฟลิกแอซิด (folic acid) และแคลเซียมดีเพนโททิเนต (Ca D-pentothenate) เสริมด้วยยังช่วยกระตุ้นการเจริญของเนื้อเยื่อพืชบางชนิดอีกด้วย

6. ความเป็นกรดและด่างของอาหาร (pH of nutrient medium) pH ที่เหมาะสมของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอยู่ในช่วง 5.0-6.5 ถ้าต่ำมากเกินไป (<4.5) หรือสูงมากเกินไป (>7.6) จะทำให้พืชหยุดการเจริญเติบโต การเลือกกระตุ้นของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงนั้นจะขึ้นอยู่กับ pH ด้วยควรหลีกเลี่ยง pH ที่มีค่าสูงหรือต่ำเกินไปเพราะจะไปขัดขวางคุณประโยชน์ของธาตุอาหาร

7. สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) ทำหน้าที่กระตุ้นและมีส่วนร่วมในกระบวนการต่างๆที่นำไปสู่การการเจริญเติบโตตลอดจน การเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์เนื้อเยื่อและสารทุติยภูมิ เป็นผลมาจากฮอร์โมนเหล่านี้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ออกซินและไซโทไคนินมีความสำคัญที่สุด พืชบางชนิดสร้างสารเหล่านี้อยู่แล้ว แต่ควรเพิ่มเข้าไปในอาหารเพื่อช่วยให้การเจริญดีขึ้น บางครั้งอาจต้องใช้จิบเบอเรลลิน หรือเอทิลีน

- ออกซิน(auxin) เช่น IAA (indole acetic acid) IBA (indole butyric acid) NAA (naphthalene acetic acid) 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) ใช้ในช่วง 0.01-10 มิลลิกรัมต่อลิตร ออกซินช่วยเพิ่มขนาดของเซลล์ มักใช้ร่วมกับไซโทไคนินเพื่อช่วยในการแบ่งเซลล์ การสร้างราก แต่การเจริญของรากจะถูกยับยั้งถ้ามีออกซินในปริมาณที่สูงเกินไป

- ไซโทไคนิน (cytokinin) ไซโทไคนินที่สังเคราะห์ได้ในธรรมชาติ คือ ซีอะทิน (zeatin) ใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโต ไซโทไคนินที่ใช้กันมากคือ ไคเนทิน (kinetin) 2iP (N6-isopentenyl adenine) และBA (benzyl aminopurine) มีหน้าที่ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ โดยเฉพาะถ้าใช้ร่วมกับออกซิน ในความเข้มข้นสูงจะช่วยในการสร้างราก ส่งเสริมการสร้างยอด โดยลดผลจากการที่ตายอดข่มตาข้าง มีบทบาทในการเปลี่ยนสภาพเซลล์เป็นอวัยวะได้และชักนำให้เกิดเป็นต้นไซโทไคนินทน ความร้อนได้ดีจึงมักเติมในอาหารก่อนฆ่าเชื้อ บทบาทของออกซิน และไซโทไคนินในพืชทั้งต้นและในสภาพหลอดแก้วอาจจะเหมือนกันหรือไม่เหมือนกันก็ได้

- จิบเบอเรลลิน (gibberellin) ฮอร์โมนพืชกลุ่มนี้มี 60 กว่าชนิด จิบเบอเรลลินไม่ค่อยใช้กันมากนักในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แต่ GA_3 เป็นชนิดที่ใช้มากที่สุด มีบทบาทในการชักนำให้ปล้องยาวขึ้นหลังจากการสร้างยอด ช่วยให้เนื้อเยื่อเจริญมีการเจริญเติบโตและช่วยในการงอกของเมล็ด

- แอบไซซิกแอซิค (abscisic acid; ABA) เอบีเอส่งเสริมการเจริญของแคลลัส และการเกิด เป็นต้นใหม่ เอบีเอมีบทบาทเกี่ยวกับ การสังเคราะห์ไซโทไคนินและเป็นตัวต่อต้านการทำงานของจิบเบอเรลลิน

- เอทิลีน (ethylene) อวัยวะพืช แคลลัส หรือเซลล์ในสภาพหลอดแก้วมีการผลิตเอทิลีน จึงไม่ควรปิดหลอดแก้วแน่นเกินไปเพื่อไม่ให้เกิดการสะสมของแก๊สนี้ ผลของเอทิลีนมีทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่งเสริม และยับยั้งการเจริญเติบโต การเลี้ยงเนื้อเยื่อในที่มีแสง จะมีการสะสมเอทิลีนมากกว่าในที่มืด ถ้ามีมากเกินไปจะทำให้เกิดการฉ่ำน้ำของพืชได้ แก๊สนี้ยังเป็นสาเหตุของการแก่ของเนื้อเยื่อพืช

8. สารอินทรีย์ (organic salt) สารอินทรีย์จากผักหรือผลไม้ที่สำคัญมากคือ น้ำมะพร้าว น้ำส้ม น้ำมะเขือเทศ สารสกัดจากยีสต์ น้ำแอปเปิล กล้วยบด สารเหล่านี้ไม่ควรใช้ในงานวิจัยเนื่องจากไม่ทราบส่วนประกอบแน่นอน (undefined medium)

9. กรดอะมิโน (amino acid) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่พืชใช้ในการสร้างอวัยวะ ได้แก่ Glutamine, asparagine, adenine, glycine, casein เป็นต้น

10. ผงถ่าน (activated charcoal) มักใช้ในความเข้มข้น 0.2-3.0% ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ผงถ่านมีความสามารถในการดูดซับสารบางตัวออกจากอาหารได้ เนื่องจากผงถ่านมีช่องว่างที่ละเอียดมาก มีพื้นที่ผิวในช่องว่างสูง จึงใช้ผงถ่านในการดูดซับสารพิษเช่น สารประกอบฟีนอล (phenol) เอทิลีน ทำให้ปริมาณสารดังกล่าวในอาหารลดลงเช่น การดูดซับฮอร์โมนหรือสารประกอบฟีนอลซึ่งเป็นพิษกับเซลล์ นอกจากนี้อาจใช้ผงถ่านในระยะที่เกิดรากเพื่อลดแสงบริเวณราก และทำให้รากเจริญเติบโตได้ดี ผงถ่านจึงสำคัญต่อการสร้างเป็นต้นใหม่ สารที่มีคุณสมบัติเหมือนกันกับผงถ่านคือ PVP (polyvinyl pyrolidone) ก็สามารถดูดซับสารฟีนอลได้ หรือการเติม diethyl-dithiocarbonate (DIECA) จะช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชั่น

2.3 การเพาะเลี้ยงและการพัฒนาของแคลลัส (รังสฤษฎ์, 2540)

แคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์ที่อยู่รวมกันที่ยังไม่มีการพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะชนิดต่างๆ ประกอบด้วยเซลล์พาเรนไคมา (parenchyma cell) มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอลที่มีขนาดใหญ่ หรือมีจำนวนมาก มีสีเขียวเนื่องจากคลอโรฟิลล์ สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ หรือสีม่วงจากแอนโทไซยานิน ปริมาณและชนิดของรงควัตถุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหาร และปัจจัยสภาพแวดล้อมจากการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือแสง ส่วนใหญ่ได้จากการเพาะเลี้ยงปล้องหรือเนื่อเยื่อสะสมอาหารจากพืช และจากเนื้อเยื่อตรงกลางลำต้นพืช สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสให้ได้มากขึ้นเรื่อยๆ โดยการตัดแบ่งทุกๆ 2-4 สัปดาห์ แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนออกซินและไซโตไคนินต่างกัน และยังสามารถบังคับให้แคลลัสสร้างต้น สร้างราก หรือสร้างต้นที่มีรากได้ แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันหนาแน่นเรียกว่า compact callus แต่ถ้าเกาะกันหลวมๆ คล้ายฟองน้ำเรียกว่า friable callus การเจริญของแคลลัสจากส่วนต่างๆ ของพืชสามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ การชักนำ (induction) การแบ่งเซลล์ (cell division) และการเปลี่ยนแปลง (differentiation) เริ่มแรกของการชักนำให้เกิดแคลลัสจะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ซึ่งระยะเวลานานเท่าใดขึ้นอยู่กับสภาพทางสรีรวิทยาของเซลล์พืช และสภาพการเพาะเลี้ยง จากนั้นเซลล์พืชจะกลับไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญ และมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต่อไป ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัสจะเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนระหว่างเซลล์พืชที่ใช้ในการชักนำ สภาพการเพาะเลี้ยง และองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การพัฒนาไปเป็นอวัยวะ (organogenesis) โดยปกติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักได้จากแคลลัส ซึ่งจะมีการสร้างอวัยวะขึ้นมาเช่น ราก ใบ ลำต้น หรือดอกเรียกว่า การเกิดออร์แกโนเจนเนซิส การเกิดยอดและรากค่อนข้างง่ายกว่าอวัยวะส่วนอื่น เนื่องจากชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงเกิดการเปลี่ยนแปลงกลับไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญใหม่ มีไซโทพลาสซึมเข้มข้น นิวเคลียสใหญ่ และในชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงมีจุดกำเนิดของยอด และรากอยู่แล้ว เซลล์เริ่มต้นอาจเจริญมาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว โดยเซลล์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น ราก ยอด ใบ หรือเจริญมากจากเซลล์กลุ่มข้างเคียง โดยที่เซลล์เหล่านี้มีกระบวนการเกิดอวัยวะไม่พร้อมกันทำให้บางครั้งไม่สามารถคาดเดาได้ การชักนำโดยทั่วไปพบว่าเกิดรากได้ง่ายกว่ายอด การเกิดรากมาจากอาหารที่มีออกซินสูง และไซโทไคนิน ต้องการปริมาณออกซินที่สูงกว่าการใช้ชักนำให้เกิดราก แต่ไม่แน่นอนเสมอไปขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโทไคนิน การเกิดยอดจากแคลลัสนั้นมาจากอาหารที่มีออกซินต่ำและไซโทไคนินสูง BA เป็นไซโทไคนินที่ให้ผลดีที่สุดตัวหนึ่งในการชักนำให้เกิดยอด การชักนำให้เกิดยอดยังมีปัจจัยอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง และเป็นการยากที่จะศึกษาปัจจัยที่ส่งผลเกี่ยวกับออร์แกโนเจเนซิส เพราะสิ่งที่มากระตุ้นอาจเป็นองค์ประกอบของอาหาร สารประกอบภายในที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยง และสารที่ได้จากชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่นำมาเลี้ยง

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ian และคณะ (1987) ได้ทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงต้นถั่วฮามาต้า (*Stylosasanthes hamata*) โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 - 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญ BA ที่ความเข้มข้น 1.0 - 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสสามารถเจริญได้ในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ที่ไม่มี Kinetin การชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่โดยการเติม Kinetin ลงในอาหาร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

Angelon และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส และการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของต้นถั่วสายพันธุ์ *Centrosema brasilianum, C. arenarium, C. macrocarpum, C. pubescens* เจริญ NAA ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมนี้ มีเพียงแคลลัสของต้นถั่ว *C. brasilinum* ที่สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้

Maria และ Alberto (2000) ได้ทำการศึกษาการเจริญในหลอดทดลองของต้นถั่วลิสงกลาบราต้า (*Arachis hypogea* L.) โดยการใช้ชิ้นส่วนพืชที่แตกต่างกัน คือ ใบเลี้ยงที่มีเอ็มบริโอ ใบเลี้ยงที่มีไม่มีเอมบริโอล ลำต้น และข้อ พบว่าการชักนำให้เกิดแคลลัสสูงสุดในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ชิ้นส่วนข้อของพืช

ขนิษฐา (2004) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) และใบเลี้ยง (cotyledon) ของถั่วฮามาต้า (*Stylosathes hamate*) เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรที่เพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์ มีร้อยละการเกิดแคลลัส 90 ลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่เกาะกันเป็นก้อนสีเขียว เมื่อนำแคลลัสที่ได้มาชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอยพบว่า อาหาร MS ที่เติม casein hydrolysate 1 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอยได้ และนำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาชักนำให้เกิดยอดได้บนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีร้อยละการเกิดยอดมากที่สุด คือ 96.66 เมื่อเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำยอดให้เกิดรากได้ในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ IBA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Anuradha และคณะ (2006) ได้ทำการเพาะเลี้ยงถั่วลิสงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ที่ความเข้มข้น 3 4 และ5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0.1 และ0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญ BA ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด มี ร้อยละการเกิดเป็นต้นใหม่และค่าเฉลี่ยการเกิดยอดสูงสุด

Radhakrishnan และคณะ (2009) ได้ศึกษาการชักนำยอดและรากด้วยสารควบคุมการเจริญ TDZ ในถั่วเหลือง (*Glycine max*. L) โดยใช้ชิ้นส่วนพืชส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง ใบเลี้ยง และข้อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS และ B5 ที่เติมสารควบคุมการเจริญ TDZ ที่ความเข้มข้น 0.9 – 5.4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร B5 ที่เติมสารควบคุมการเจริญ TDZ สามารถชักนำให้เกิดรากได้ทุกความเข้มข้น ร้อยละการเกิดราก 93.5 ที่ความเข้มข้น 3.6 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในสูตรอาหาร MS ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ TDZ ที่ความเข้มข้น 4.5 มิลลิกรัม สามารถเกิดยอดได้ร้อยละ 26.4 และอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร B5 ที่เติมสารควบคุมการเจริญ TDZ ที่ความเข้มข้น 3.6 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดยอดได้ร้อยละ 93.5

Alam และคณะ (2010) ได้ศึกษาการพัฒนาของแคลลัส และการเกิดเป็นต้นใหม่ของถั่วลิสง (*Arachis hypogea* L.) โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชชนิดต่างๆในหลอดทดลองพบว่า การเกิดเป็นต้นใหม่จากชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ใบเลี้ยง ลำต้นเหนือใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยง เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ 2,4-D, BA และ NAA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่าชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงให้ผลที่ดีกว่าลำต้นเหนือใบเลี้ยง ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันมีผลต่อการชักนำแคลลัสพบว่า ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด และเมื่อเลี้ยงแคลลัสบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าบริเวณตรงกลางของแคลลัสจะเกาะกันแน่น มีสีเขียว และส่วนด้านข้างเกาะกันหลวมๆ หลังจากย้ายแคลลัสไปยังอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆพบว่า แคลลัสมีการเจริญได้ดี และเมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารจะทำให้แคลลัสเกิดหน่อยอดเล็กๆพบว่า อาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนของยอดสูงสุด จากการศึกษาการเจริญสำหรับการชักนำแคลลัสพบว่า 2,4-D ได้ผลดีที่สุด โดยการเปลี่ยนอาหารไปยังสูตรเดิมทุกๆ 1 เดือน

Al-Joboury (2011) ได้ทำการศึกษาการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองของต้นถั่วลิสง (*Arachis hypogea* L.) โดยใช้ชิ้นส่วนพืชส่วนข้อเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ร่วมกับ Kin หรือ GA_3 ที่แตกต่างกันพบว่า การตอบสนองการเกิดยอดสูงสุดที่อาหาร MS ที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kin ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และการชักนำให้เกิดรากจากยอดอ่อนในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ IBA และ IAA ที่แตกต่างกัน พบว่าการตอบสนองการเกิดรากและจำนวนรากสูงสุดในอาหาร MS ที่เติม IBA ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร

Collado และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาการเจริญในหลอดทดลองของต้นถั่ว (*Phaseolus vulgaris)* ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่มีการเจริญแบบออร์กาโนเจเนซิส โดยใช้ชิ้นส่วนพืชส่วนต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดอายุ 3 วัน นำมาชักนำให้เกิดแคลลัส และชักนำให้เกิดยอดในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ TDZ และBA ที่แตกต่างกันพบว่า ในอาหารที่ชักนำแคลลัส ที่เติมสารควบคุมการเจริญ TDZ ที่ความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักให้เกิดแคลลัสสูงสุด การเกิดยอดเฉลี่ยอยู่ที่ 3 ยอดต่อแคลลัส ในอาหารที่เติม BA ที่มีความเข้มข้น 2.25 หรือ 4.50 มิลลิกรัมต่อลิตร

พิมพ์ชนก และคณะ (2017) ได้ทำการศึกษาผลของรังสีและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*Arachis glabrata)* ทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่า สายพันธุ์ Ecoturf สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดและแคลลัสในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ TDZ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำข้อให้เกิดแคลลัสได้สูงสุด สำหรับพันธุ์ Florigraze สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอด และแคลลัสร่วมกันในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และสายพันธุ์ Arbrook สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดและแคลลัสร่วมกัน ในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ TDZ ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดแคลลัสได้ ในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

Dolce และคณะ (2017) ได้ทำการศึกษาการเจริญในหลอดทดลอง และการเก็บรักษาโดยการแช่แข็งของต้นถั่วลิสงเถา (*Arachis glabrata)* จากชิ้นส่วนพืชพืชส่วนใบพบว่า ชิ้นส่วนใบสามารถชักนำให้เกิดตายอดได้ร้อยละ 58 ในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ TDZ ที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร พืชทั้งหมดมีการเจริญผ่านออร์กาโนเจนเนซิส โดยการย้ายตายอดไปเพาะเลี้ยงในอาหาร MS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 พืชตระกูลถั่วที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆได้แก่

- ถั่วลิสงเถาสายพันธุ์ Arbook
- ถั่วลิสงเถาสายพันธุ์ Ecoturf
- ถั่วลิสงเถาสายพันธุ์ Floriglaze

3.1.2 ภาชนะเครื่องแก้ว

- ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Bottle) และฝาพลาสติกทนความร้อน
- จานแก้ว (Petri dish)

3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการเตรียมอาหาร

- กระบองตวง (cylinder)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและหยาบ (Balance); AG204 Metler Toledo
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)
- ช้อนตักสารเคมี (spatula)
- เตาไมโครเวฟ (microwave)
- ถ้วยกระดาษชั่งสาร (paper cup)
- บีกเกอร์พลาสติก (plastic beaker)
- ไมโครปิเปต (micropipette) และทิปขนาดต่างๆ (micropipette tips)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave); SX-500, Tomy Kogyo Co.Ltd

3.1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อและย้ายเนื้อเยื่อ

- กรรไกร (scissors)
- กระดาษทิชชู่ (tissue paper)
- เครื่องเขย่า (shaker)
- ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด (knives and scalpel)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Bunsen burner)
- ตู้ปลอดเชื้อ (lamina air flow cabinet)
- ปากคีบ (forceps)
- พาราฟิล์ม (parafilm)
- ไฟแช็ค (lighter)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- เครื่องปรับอากาศ (air condition)
- เครื่องวัดอุณหภูมิ (thermometer)
- ชั้นวางเนื้อเยื่อพร้อมระบบให้แสงสว่าง (shelves)

3.1.6 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (distilled water)
- น้ำตาลทราย (sucrose)
- ไฟทาเจล (phytagel)
- เมอร์คิวริกคลอไรด์ (mercuric (II) chloride)
- สารควบคุมการเจริญเติบโต BA (6-Benzylaminopurine)
- สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ (Thidiazuron)
- สารลดแรงตึงผิว (tween-20)
- สารละลายกรดไฮดรอคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล (hydrochloric acid, 1N HCl)
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 นอร์มอล และ 1 นอร์มอล (sodium-hydroxide,0.5 N and 1 N NaOH)
- แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
- อาหารสังเคราะห์สำเร็จสูตร Murashige and Skoog , 1962
- antibiotic antimycotic solution (SIGMA Inc.)
- PPM (plant preservative mixture, PCT Inc.)

3.1.7 อุปกรณ์

- กล้องถ่ายรูป (camera)
- เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ (water distriller)
- เครื่องวัดเวอร์เนียคาลิปเปอร์ (Vernier calipers)
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

3.2 วิธีการทดลองและการวิเคราะห์ผล

3.2.1 การเตรียมอาหาร

เตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 2.6 และ5.2 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ หรือ BA ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1 3 และ5 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.8 และ5.8 จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การเตรียมชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช

3.2.2.1 การคัดเลือกชิ้นส่วนพืช

เนื้อเยื่อพืชที่ใช้เพาะเลี้ยงในโครงงานพิเศษนี้คือชิ้นส่วนข้อจากต้นแม่ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ Arbook, Ecoturf และ Floriglaze โดยจะคัดเลือกชิ้นส่วนจากต้นที่มีความสมบูรณ์ ใบสีเขียว ไม่เป็นโรค และข้อมีลักษณะที่ไม่อ่อนหรือแข็งมากเกินไป

3.2.2.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อ

นำชิ้นส่วนข้อของถั่วกลาบราต้า 3 สายพันธุ์ได้แก่ Arbrook Ecoturf และ Florigraze มาทำความสะอาดเพื่อชะล้างสิ่งสกปรกออกแล้วนำไปเขย่าแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่1ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 80 มิลลิลิตร ร่วมกับ PPM และ antibiotics ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ร่วมกับเมอร์คิวริกคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (w/v) เติม tween-20 จำนวน 2-3 หยด เขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 80 มิลลิลิตร ร่วมกับ PPM และ antibiotics ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร และtween-20 จำนวน 2-3 หยด เขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการล้างสารฟอกฆ่าเชื้อโดยย้ายชิ้นส่วนพืชลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 80 มิลลิลิตร และเขย่าเป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นผึ่งชิ้นส่วนพืชให้แห้งในเพลทที่สะอาดภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

3.2.2.3 การเตรียมแคลลัส

แคลลัสที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นแคลลัสที่พัฒนามากจากชิ้นส่วนพืชสายพันธุ์ Ecoturf ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง นำมาปรับสภาพในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

3.2.3 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และค่าที่ความเป็นกรดในอาหารต่อการชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อของถั่วกลาบราต้า

นำชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงกลาบราต้าทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดให้ได้ขนาดประมาณ 1 ซม. แล้วนำมาวางบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติมโต TDZ ที่ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 และ 5.2 กรัมต่อลิตรที่มีค่าความเป็นกรด 4.8 และ 5.8 ทำการเพาะเลี้ยงความเข้มข้นละ 20 ชิ้น โดยจะวางขวดละ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 ชิ้น เพาะเลี้ยงในที่มีแสง 16 ชม. และปราศจากแสง 8 ชม.ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เก็บผลทุกๆ 1 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 6 สัปดาห์ บันทึกผลที่เกิดขึ้นทั้งจำนวนยอด และความยาวยอดที่เกิดขึ้นเพื่อคำนวณหาอัตราการเกิดยอด จากสูตร

$$\text{อัตราการเกิดยอด} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดยอด}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{ความยาวยอด} = \frac{\text{ความยาวยอดทั้งหมด}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดยอดทั้งหมด}} \times 100$$

3.2.4 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และค่าที่ความเป็นกรดในอาหารต่อการชักนำยอดจากแคลลัสของถั่วกลาบราต้า

นำแคลลัสของถั่วลิสงกลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมาวางบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติมโต BA ที่ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 และ5.2 กรัมต่อลิตร ที่มีค่าความเป็นกรด 4.8 และ5.8 ทำการเพาะเลี้ยงความเข้มข้นละ 20 ชิ้น โดยจะวางขวดละ 2 ชิ้นเพาะเลี้ยงไว้ในที่มีแสง 16 ชั่วโมง และปราศจากแสง 8 ชม. ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เก็บผลทุกๆ 1 สัปดาห์เปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์ บันทึกผลที่เกิดขึ้นทั้งจุดสีเขียวเข้มที่เกิดบนก้อนแคลลัส และจำนวนยอดมาคำนวณร้อยละการเกิดยอดได้จากสูตร

$$\text{อัตราการพัฒนาไปเป็นยอด} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนแคลลัสที่เกิดจุดเขียวเข้ม}}{\text{จำนวนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{อัตราการเกิดยอด} = \frac{\text{จำนวนยอดที่เกิดจากแคลลัส}}{\text{จำนวนแคลลัสทั้งหมด}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และที่ค่าความเป็นกรดในอาหารต่อการชักนำยอดจากชิ้นส่วนข้อของถั่วกลาบราต้า

จากการนำชิ้นส่วนข้อของถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Arbook, Ecoturf และ Floriglaze มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟตาเจล 2.6 และ 5.2 กรัมต่อลิตร ที่ค่าที่ความเป็นกรดในอาหาร 4.8 และ 5.8 เพื่อชักนำให้เกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์พบว่า ในสัปดาห์ที่ 2 สายพันธุ์ Arbrook ในอาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดในอาหาร 5.8 สามารถชักนำ ให้เกิดยอดสูงสุดจำนวน 4 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 20 (รูปที่ 4.2ก) และที่ TDZ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดในอาหาร 5.8 สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวน 2 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 10 โดยมีความยาวยอดสูงสุดเฉลี่ย 9 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.2ค) ดังตารางที่ 4.1 สายพันธุ์ Ecoturf ในอาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วย TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดในอาหาร 5.8 สามารถ ชักนำให้เกิดยอดสูงสุดจำนวน 4 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 20 โดยยอดมีความยาวเฉลี่ยสูงสุด 2.5 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.4ก) ดังตารางที่ 4.3 และสายพันธุ์ Florigraze ไม่พบการชักนำให้เกิดยอดใหม่

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์พบว่า สายพันธุ์ Arbrook ในอาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วย TDZ 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดในอาหาร 5.8 สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุดจำนวน 4 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 20 (รูปที่ 4.2ข) และที่ TDZ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดในอาหาร 5.8 และความเข้มข้นไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวน 2 ชิ้นคิดเป็นร้อยละ 10 มีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 13 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.2ง) ดังตารางที่ 4.2 สายพันธุ์ Ecoturf ในอาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วย TDZ 0.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรดในอาหาร 4.8 สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุดจำนวน 4 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 20 และที่ TDZ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรความเข้มข้นไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดในอาหาร 4.8 มีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด 7.3 มิลลิเมตร (รูปที่ 4.4ค,ง) ดังตารางที่ 4.4 และสายพันธุ์ Florigraze ยังไม่พบการชักนำให้เกิดยอดใหม่แต่พบการเกิดแคลลัสได้

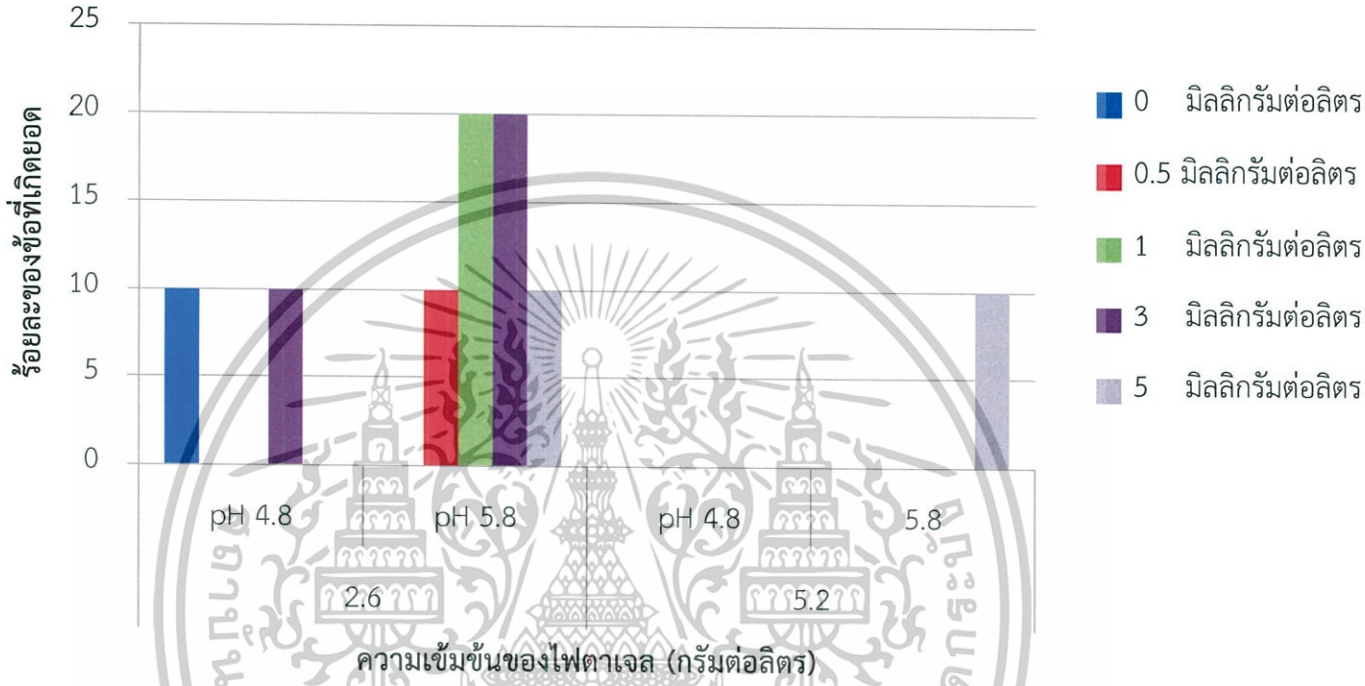
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 4.1 ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และค่าความเป็นกรดในอาหารต่อการชักนำยอดจากข้อของถั่วกลาบราต้าจำนวน 20 ซ้ำ ของสายพันธุ์ Arbrook ในสัปดาห์ที่ 2

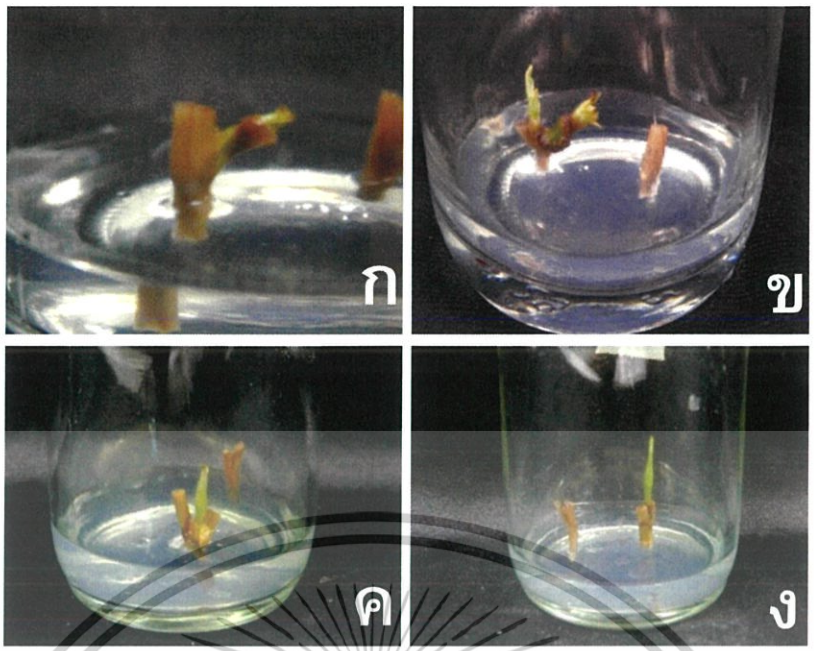
ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร						ไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร					
	pH 4.8			pH 5.8			pH 4.8			pH 5.8		
	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	ความยาวของยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	ความยาวของยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	ความยาวของยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	ความยาวของยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)
0	2 (10)	1.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	0	0	0	2 (10)	4.5	4 (20)	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	4 (20)	1.5	2 (10)	0	0	0	0	0	0
3	2 (10)	1.5	1 (5)	4 (20)	1.55	2 (10)	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	2 (10)	2.4	0	0	0	0	2 (10)	9	0

ตาราง 4.2 ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และค่าความเป็นกรดในอาหารต่อการชักนำยอดจากข้อของถั่วกลาบราต้าจำนวน 20 ซ้ำ ของสายพันธุ์ Arbrook ในสัปดาห์ที่ 6

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร						ไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร					
	pH 4.8			pH 5.8			pH 4.8			pH 5.8		
	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	ความยาวของยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	ความยาวของยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	ความยาวของยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	ความยาวของยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)
0	2 (10)	1.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	0	0	0	2 (10)	5.2	4 (20)	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	4 (20)	4.7	4 (20)	0	0	0	0	0	0
3	2 (10)	4.6	2 (10)	4 (20)	5.9	6 (30)	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	2 (10)	6.3	0	0	0	0	2 (10)	13	0



รูปที่ 4.1 แสดงร้อยละของจำนวนข้อที่เกิดยอดใหม่ในสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และความเป็นกรดในอาหารที่ค่าต่างๆ ของต้นถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook บนอาหารแข็งสูตร MS เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์



รูปที่ 4.2 แสดงผลการชักนำชิ้นส่วนข้อของต้นถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Arbrook ให้เกิดยอดในสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดในอาหาร 5.8 ที่ให้จำนวนการเกิดยอดสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 และสัปดาห์ที่ 6 (ก-ข) และ ในสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรความเข้มข้นไฟตาเจล5.2 ที่ความเป็นกรดในอาหาร 5.8 ที่ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดสัปดาห์ที่ 2 และสัปดาห์ที่6(ค-ง)

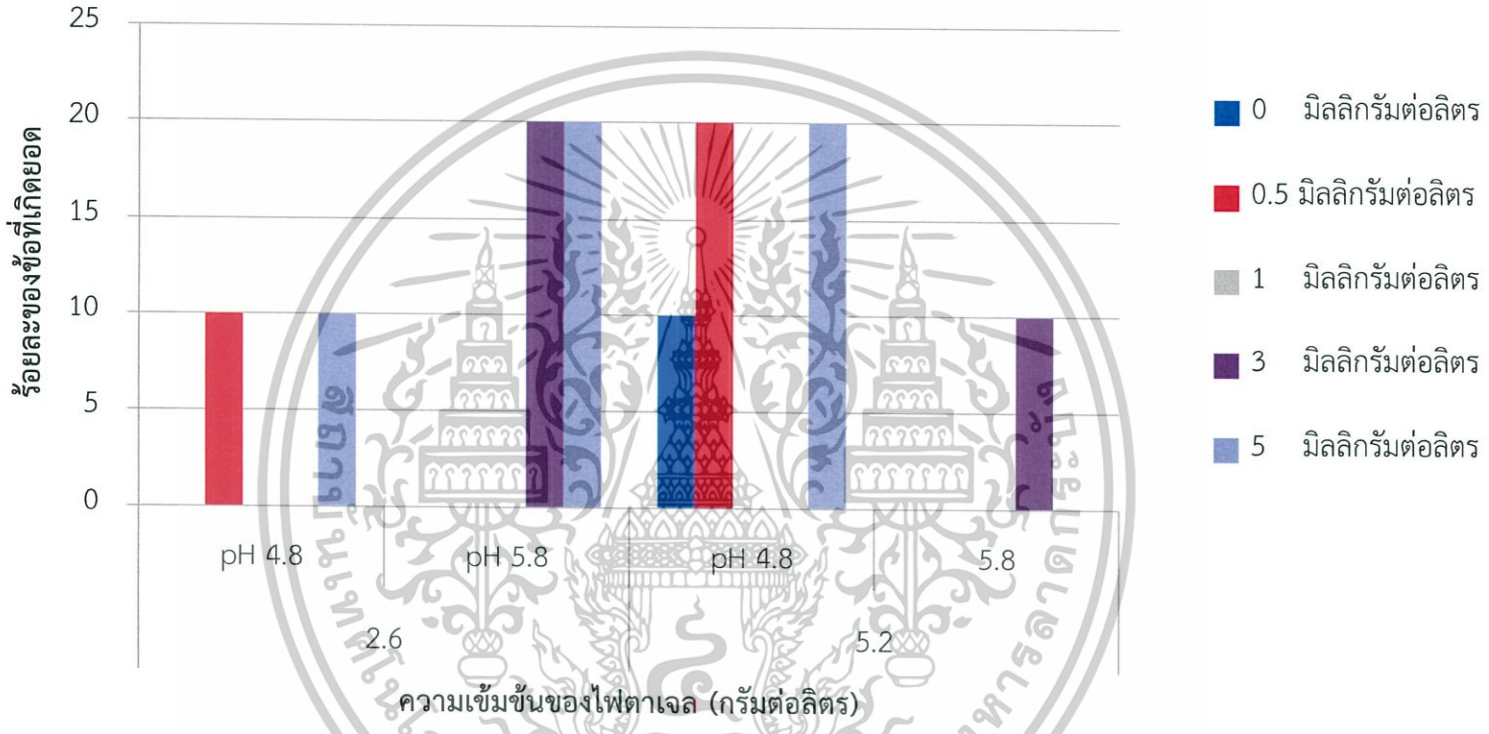
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 4.3 ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และค่าความเป็นกรดในอาหารต่อการชักนำยอดจากข้อของถั่วกลาบราต้าจำนวน 20 ซ้ำ ของสายพันธุ์ Ecoturf ในสัปดาห์ที่ 2

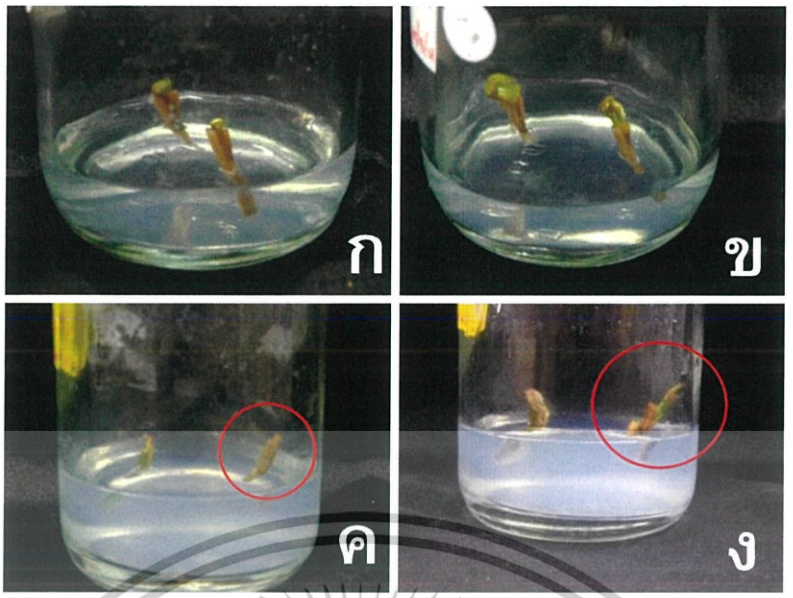
ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร						ไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร					
	pH 4.8			pH 5.8			pH 4.8			pH 5.8		
	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	ความยาวของยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	ความยาวของยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	ความยาวของยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	ความยาวของยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (5)	0	0	0
0.5	2 (10)	1.6	1 (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (10)
1	0	0	3 (15)	0	0	2 (10)	0	0	0	0	0	0
3	0	0	2 (10)	4 (20)	2.5	3 (15)	0	0	2 (10)	0	0	1 (5)
5	0	0	2 (10)	2 (10)	1.6	1 (5)	0	0	0	0	0	1 (5)

ตาราง 4.4 ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และค่าความเป็นกรดในอาหารต่อการชักนำยอดจากข้อของถั่วกลาบราต้าจำนวน 20 ซ้ำ ของสายพันธุ์ Ecoturf ในสัปดาห์ที่ 6

ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร						ไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร					
	pH 4.8			pH 5.8			pH 4.8			pH 5.8		
	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	ความยาวของยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	ความยาวของยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	ความยาวของยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	ความยาวของยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)
0	0	0	0	0	0	0	2 (10)	4.2	4 (20)	0	0	0
0.5	2 (10)	3.2	4 (20)	0	0	0	4 (20)	3.1	0	0	0	4 (20)
1	0	0	8 (40)	0	0	4 (20)	0	0	0	0	0	0
3	0	0	6 (30)	4 (20)	4.9	6 (30)	0	0	4 (20)	2 (10)	1.6	2 (10)
5	2 (10)	6.4	6 (30)	2 (10)	5.1	2 (10)	4 (20)	7.3	2 (10)	0	0	4 (20)



รูปที่ 4.3 แสดงร้อยละจำนวนข้อที่เกิดยอดใหม่ในสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และความเป็นกรดในอาหาร ที่ค่าต่างๆของต้นถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารแข็งสูตร MS เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์



รูปที่ 4.4 แสดงผลการชักนำชิ้นส่วนข้อของต้นถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf ให้เกิดยอดในสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรความเข้มข้นไฟตาเจล 2.6 ที่ความเป็นกรดในอาหาร 5.8 ที่ให้จำนวนการเกิดยอดสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 (ก) และสัปดาห์ที่ 6 (ข) และที่ TDZ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 5.2 ที่ความเป็นกรดในอาหาร 4.8 ที่ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 (ค) และสัปดาห์ที่ 6 (ง)

4.2 ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และที่ค่าความเป็นกรดในอาหารต่อการชักนำยอดจากแคลลัสของถั่วกราบลาต้าสายพันธุ์ Ecoturf

จากการนำแคลลัสของถั่วกราบลาต้าสายพันธุ์ Ecoturf มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตรและไฟตาเจล 2.6 และ 5.2 กรัมต่อลิตร และที่ความเป็นกรดในอาหาร 4.8 และ 5.8 เพื่อชักนำให้เกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์พบว่า ในสัปดาห์ที่ 2 ในอาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดในอาหาร 4.8 สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดจุดเขียวเข้มจำนวน 9 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 45 อาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วย BAP 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดในอาหาร 5.8 สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดจุดเขียวเข้มจำนวน 11 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 55 อาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วย BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดในอาหาร 4.8 สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดจุดเขียวเข้มจำนวน 16 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 80 และสามารถชักนำแคลลัสให้เกิดยอดจำนวน 2 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 10 อาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วย BAP 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดในอาหาร 5.8 สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดจุดเขียวเข้มจำนวน 6 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 30 ดังตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์พบว่า ในอาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วย BAP 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดในอาหาร 4.8 (รูปที่ 4.7ก,ง) สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดจุดเขียวเข้มจำนวน 13 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 65 อาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วย BAP 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดในอาหาร 5.8 (รูปที่ 4.7ข,จ) สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดจุดเขียวเข้มจำนวน 15 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 75 อาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วย BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดในอาหาร 4.8 (รูปที่ 4.7ค,ฉ) สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดจุดเขียวเข้มจำนวน 19 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 95 อาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วย BAP 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดในอาหาร 5.8 (รูปที่ 4.7ฆ,ช) สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดจุดเขียวเข้มจำนวน 17 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 85 อาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วย BAP 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความข้นข้นไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดในอาหาร 4.8 และ 5.8 สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดยอดใหม่จำนวน 1 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 5 ในอาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วย BAP 0.5 (รูปที่ 4.8ก,ค) 3 (รูปที่ 4.8ข,ง) และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดในอาหาร 4.8 สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดยอดจำนวน 5(25%) 3 (15%) และ 1 (5%) ชิ้น ตามลำดับ ในอาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วย BAP 3 และ5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดในอาหาร 5.8 สามารถชักนำให้แคลลัสเกิดยอดจำนวน 1 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 5 ดังตารางที่ 4.6

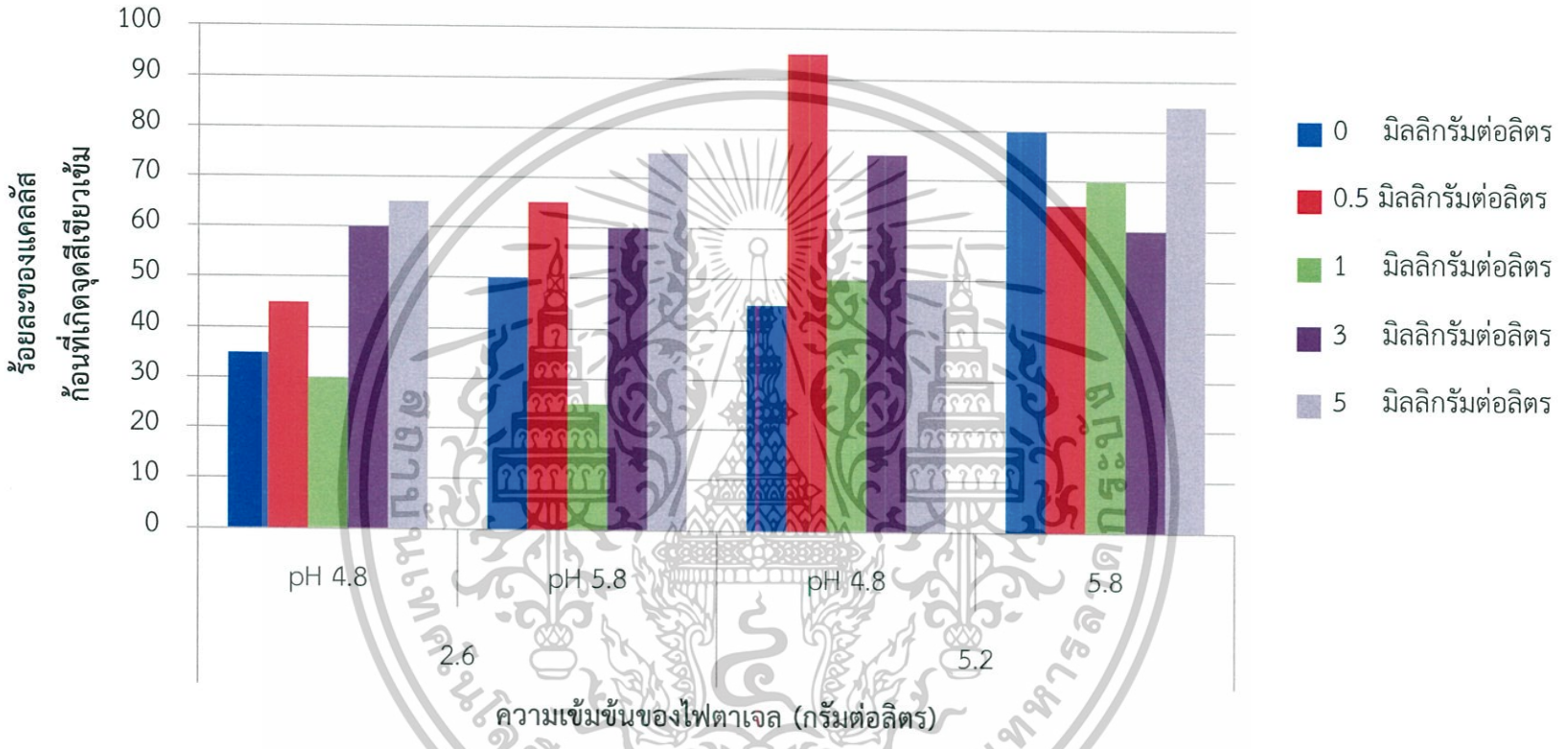
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 4.5 ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และที่ค่าความเป็นกรดในอาหารต่อการชักนำยอดจากแคลลัสของถั่วกลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf สัปดาห์ที่ 2

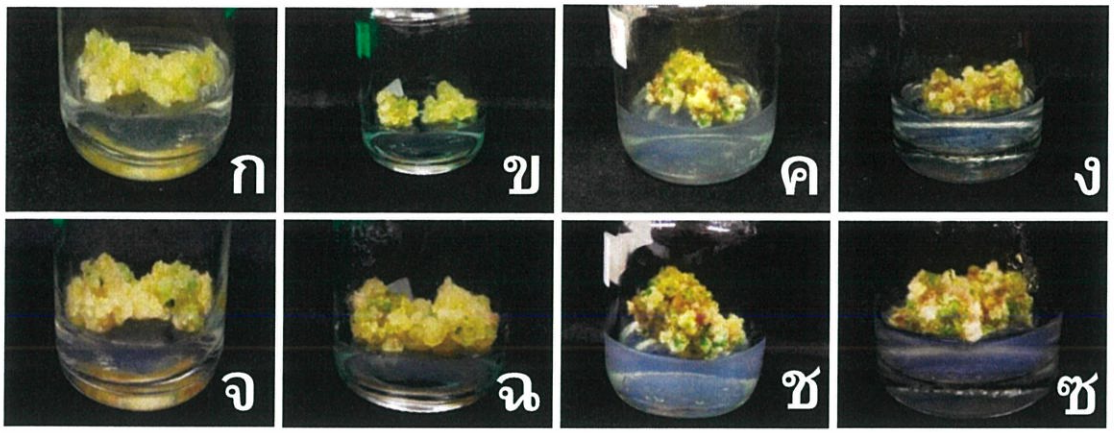
ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร				ไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร			
	pH 4.8		pH 5.8		pH 4.8		pH 5.8	
	จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียวเข้ม (ร้อยละ)	จำนวนแคลลัสที่เกิดยอด (ร้อยละ)	จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียวเข้ม (ร้อยละ)	จำนวนแคลลัสที่เกิดยอด (ร้อยละ)	จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียวเข้ม (ร้อยละ)	จำนวนแคลลัสที่เกิดยอด (ร้อยละ)	จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียวเข้ม (ร้อยละ)	จำนวนแคลลัสที่เกิดยอด (ร้อยละ)
0	5 (25)	0	8 (40)	0	8 (40)	0	4 (20)	0
0.5	7 (35)	0	6 (30)	0	16 (80)	2 (10)	5 (25)	0
1	6 (30)	0	2 (10)	0	7 (35)	0	4 (20)	0
3	9 (45)	0	11 (55)	0	14 (70)	0	5 (25)	0
5	4 (20)	0	10 (50)	0	8 (40)	0	6 (30)	0

ตาราง 4.6 ผลการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นไฟตาเจล และที่ค่าความเป็นกรดในอาหารต่อการชักนำยอดจากแคลลัสของถั่วกลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf สัปดาห์ที่ 4

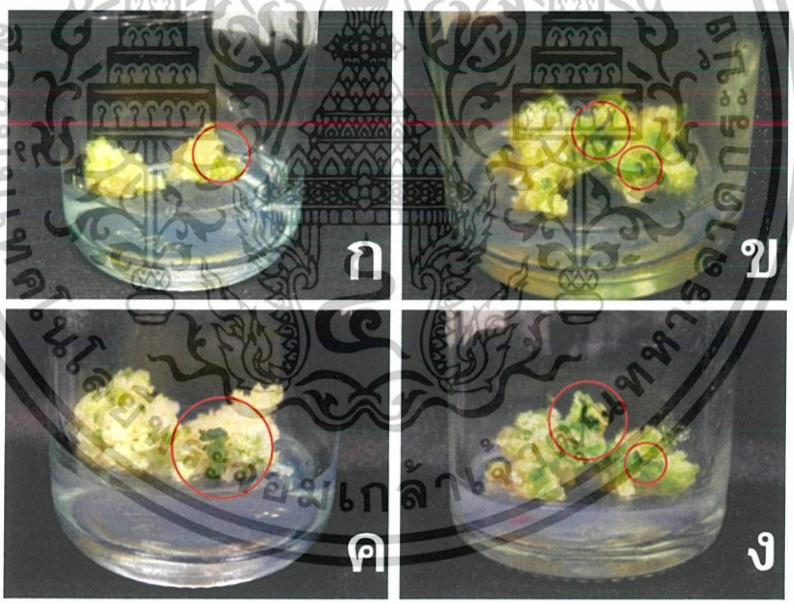
ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร				ไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร			
	pH 4.8		pH 5.8		pH 4.8		pH 5.8	
	จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียวเข้ม (ร้อยละ)	จำนวนแคลลัสที่เกิดยอด (ร้อยละ)	จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียวเข้ม (ร้อยละ)	จำนวนแคลลัสที่เกิดยอด (ร้อยละ)	จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียวเข้ม (ร้อยละ)	จำนวนแคลลัสที่เกิดยอด (ร้อยละ)	จำนวนแคลลัสที่เกิดจุดเขียวเข้ม (ร้อยละ)	จำนวนแคลลัสที่เกิดยอด (ร้อยละ)
0	7 (35)	0	10 (50)	0	9 (45)	0	16 (80)	0
0.5	9 (45)	1 (5)	13 (65)	0	19 (95)	5 (25)	13 (65)	0
1	6 (30)	0	5 (25)	1 (5)	10 (50)	0	14 (70)	0
3	12 (60)	0	12 (60)	0	15 (75)	3 (15)	12 (60)	1 (5)
5	13 (65)	0	15 (75)	0	10 (50)	1 (5)	17 (85)	1 (5)



รูปที่ 4.5 แสดงร้อยละจำนวนแคลลัสของต้นถั่วกลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารแข็งสูตร MS สูตรต่างๆที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP 0 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์



รูปที่ 4.7 แสดงผลการชักนำแคลลัสของต้นถั่วกลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ให้เกิดยอดในสารควบคุม การเจริญเติบโตที่เกิดจุดสีเขียวเข้ม BAP 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดในอาหาร 4.8 และ 5.8 ตามลำดับใน สัปดาห์ที่ 2 (ก-ข) สัปดาห์ที่ 4 (ค-ง) ที่ BAP 0.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ที่ความเป็นกรดในอาหาร 4.8 และ 5.8 สัปดาห์ที่ 2 (จ-ฉ) สัปดาห์ที่ 6 (ช-ซ)



รูปที่ 4.8 แสดงผลการชักนำแคลลัสของต้นถั่วกลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ให้เกิดยอดในสารควบคุมการเจริญ BAP 0.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นไฟตาเจล 5.2 กรัมต่อลิตร ที่มีค่าความเป็นกรด 4.8 สัปดาห์ที่ 2 (ก-ข) และสัปดาห์ที่ 6 (ค-ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองศึกษาความเข้มข้นของวุ้น ความเป็นกรดในอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญของถั่วกลาบราต้า (*Arachis glabrata)* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เป็นเวลา 6 สัปดาห์พบว่า สายพันธุ์ Arbrook มีการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดได้ดีที่สุดในอาหารสังเคราะห์ TDZ ที่ 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นวุ้น 2.6 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดในอาหาร 5.8 ได้จำนวน 4 ข้อ คิดเป็นร้อยละ 20 และในอาหารสังเคราะห์ TDZ ที่ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นวุ้น 5.2 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดในอาหาร 5.8 ให้ความยาวยอดเฉลี่ยนสูงสุด 13 มิลลิเมตร สายพันธุ์ Ecoturf มีการชักนำให้ชิ้นส่วนข้อเกิดยอดได้ดีที่สุดในอาหารสังเคราะห์ TDZ ที่ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นวุ้น 5.2 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดใน 4.8 ได้จำนวน 6 ข้อ คิดเป็นร้อยละ 30 และมีความยาวเฉลี่ยสูงสุด 6.6 มิลลิเมตร และสายพันธุ์ Florigraze ยังไม่สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดได้

จากการทดลองศึกษาความเข้มข้นของวุ้น ความเป็นกรดในอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญแคลลัสของถั่วกลาบราต้า (*Arachis glabrata)* สายพันธุ์ Ecoturf ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เป็นเวลา 6 สัปดาห์พบว่า มีการชักนำชิ้นส่วนแคลลัสให้เกิดจุดสีเขียวเข้มได้ดีที่สุดในอาหารสังเคราะห์ BAP ที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นวุ้น 5.2 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดในอาหาร 4.8 ได้จำนวน 19 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 95 และยังสามารถชักนำแคลลัสให้เกิดยอดได้จำนวน 5 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 25

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองศึกษาถึงความเข้มข้นของวุ้น ความเป็นกรดในอาหาร และผลของสารควบคุมการเจริญที่เหมาะต่อการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอด พบว่าชิ้นส่วนของข้อที่นำมาเพาะเลี้ยงจะต้องมีลักษณะที่สมบูรณ์ สีเขียวสด ไม่แข็งหรือไม่อ่อนจนเกิน ซึ่งส่งผลสำคัญต่อการเกิดเป็นต้นใหม่ของถั่วกลาบราต้า และการชักนำแคลลัสสามารถชักนำให้เกิดยอดได้แต่ยอดที่ได้ยังไม่แข็งแรงที่จะทำให้เจริญเป็นต้นใหม่ได้ ในอนาคตควรมีการศึกษาถึงสารควบคุมการเจริญที่สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดยอดใหม่ เพื่อที่จะสามารถศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ของถั่วกลาบราต้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ขนิษฐา บุรมย์. 2547. “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วฮามาต้าและหญ้ารูซี่.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

เชาวลิต พานิชอัตรา และธำรงศักดิ์ พลบำรุง. 2539. **ถั่วอาหารสัตว์และการผลิตเมล็ด.** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://agebook.lib.ku.ac.th/ebooks/item.php?id=20130-141.

วันที่สืบค้น 23 มีนาคม 2561.

จิรัชญา เกตุพรหม, ธันย์สิต บุณยกาญจนรัตน์ และพิชญ์สินี สาระพันธุ์. 2558. “**อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า** (*Arachis glabata*).” วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พิมพ์ชนก ทองสาด, ภิรมน อรัญญา และมนัญชยา วงศ์อินทร์. 2559. “**ผลของรังสีแลละสารควบคุม การเจริญเติบโตต่อถั่วกลาบราต้า** (*Arachis glabrata*) **โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.**” วิทยานิพนธ์ปริญญาตรีคณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2540. “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักเทคนิค.” กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รัตนภรณ์ บุญเรือง, อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำและจันทกานต์ อรณนันท์. 2554. “**การยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วคาวาเคด** *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade.” *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* ฉบับที่ 42(2)(พิเศษ) : 185-188.

สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์. 2559. **ถั่วลิสงเถา ฟรอริเกซ.** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://secretary.dld.go.th/index.php/informationdld-/article-dld/1308-1-2559.

วันที่สืบค้น 13 กุมภาพันธ์ 2561.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลีลาพรรษ์ บุญเรือง, ศศวรรณ ขจรพันธุ์ และศุภกร โพธิจันทร์. 2556. **"ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเป็นต้นใหม่ของถั่วลิสงเถากลาบราต้า** (*Arachis glabrata*)." วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศศิธร ถิ่นนคร, กานดา นาคมณี, ฉายแสง ไผ่แก้ว และสมจิตร อินทรมณี. 2544. **"การศึกษาถั่วลิสงเถา เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ (4) การปลูกถั่วลิสงเถาสายพันธุ์อมาริลโลร่วมกับหญ้าเขตร้อน 3 ขนิด."** รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2544. กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 1-16.

ศศิธร ถิ่นนคร, กานดา นาคมณี, ฉายแสง ไผ่แก้ว. 2548. **"การศึกษาถั่วลิสงเถาเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ (9) ผลผลิตและคุณภาพของถั่วลิสงเถาและหญ้าสกุล Brachiaria สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อปลูกร่วมกัน."** รายงานการผลงานวิจัยประจำปี 2548. กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 48-59.

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. **ปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 2 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ : โครงการตำรา.

Alam, A. K. and Khaleque, M. A. 2010. "*In vitro* Response of Different Explants on Callus Development and Plant Regeneration in Groundnut (*Arachis hypogaea L.*)." *International Jounal of Experimental Agriculture*. vol. 1. 1-4.

Al-Joboury, Kh. R. 2011. "*In vitro* Propagation of Groundnut (*Arachis hypogaea L.*)." 25(3). 1-19.

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

Anuradha, T. S. Jami, S. K. Datla, R. S. and Kirti, P. B. 2006. "Genetic Transformation of Peanut (*Arachis hypogaea L.*) Using Cotyledonary Node as Explant and a Promoterless Gus:nptll Fusion Gene Based Vector." *Journal of Biosci.* 31(2) : 236–245.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Collado, R. Veitia, N. Bermudez-CaraBalloso, I. Garcia, L. R. Torres, D. Romero, C. Rodriguez Lorenzo, J. L. and Angenon, G. 2013. "Efficient *in vitro* Plant Regeneration *via* Indirect Organogenesis for Different Common Bean Cutivars." *Scientia Horticulturae* 153 : 109-116.

Dolce, N. R. Faloci, M. M. and Gonzalez, A. M. 2017. "Cryopreservation of *Arachis glabrata* (Fabaceae) using leaflet explants." *In Vitro Cellular & Development- Plant*. 2(54) : 134-144.

Maria, F. C. and Alberto, D. R. J. 2000. "Protocol for Regeneration *in vitro* of *Arachis hypogaea* L." *Electronic Journal of Biotechnology*. 2(3) : 1-7.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures." *Physiology Plant*. 15(3) : 473-497.

Radhakrishnan, R. Ramachandran and Ranjitha Kumari, B. D. 2009. "Rooting and Shooting: Dual Function of Thidiazuron *in vitro* Regeneration of Soybean (*Glycine max*. L)." *Acta Physiologiae Plantarum*. 31(6) : 1213-1217.

Williams, M. J. Newma, Y. C. and Blount, A. 2017. **Rhizoma Perennial Peanut.** University of Florida Report SS-AGR-349.
[Online]. Available : http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/AG/AG35800.pdf
Date April 7,2018.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตาราง สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS (Murashige and Skoog, 1962)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
$MnSO_4.4H_2O$	6.2
$ZnSO_4.5H_2O$	22.3
H_3BO_3	6.2
KI	0.33
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.H_2O$	0.025
$FeSO_4.5H_2O$	27.85
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.25
Nicotic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Glycine	2.0
Myo-inosital	100
Agar	8,000
Sucrose	30,000
pH 5.7	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้