การปรับปรุงพันธุ์ถั่วอาหารสัตว์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา

IMPROVEMENT OF PASTURE LEGUME BY TISSUE CULTURE AND GAMMA RADIATION

รัตนาภรณ์ บุญเรือง

RATTANAPORN BOONRUANG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2556

KMITL-2013-SC-M-022-046

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วอาหารสัตว์
โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา

IMPROVEMENT OF PASTURE LEGUME BY
TISSUE CULTURE AND GAMMA RADIATION

รัตนาภรณ์ บุญเรือง

RATTANAPORN BOONRUANG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2556

KMITL-2013-SC-M-022-046

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IMPROVEMENT OF PASTURE LEGUME BY TISSUE CULTURE AND GAMMA RADIATION

RATTANAPORN BOONRUANG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2013

KMITL-2013-SC-M-022-046

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2013

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การปรับปรุงพันธุ์ถั่วอาหารสัตว์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา
Improvement of Pasture Legume by Tissue Culture and Gemma Radiation

นักศึกษา นางสาวรัตนาภรณ์ บุญเรือง
รหัสประจำตัว 52651707
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.พนา	โลหะทรัพย์ทวี	
ผศ.ดร.สุพัตรา	โพธิ์เอี่ยม	
ศ.ประดิษฐ์	พงศ์ทองคำ	
ผศ.ดร.อนุรักษ์	โพธิ์เอี่ยม	

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 21 ตุลาคม พ.ศ. 2556 เวลา 09.00 - 12.00 น.
สถานที่สอบ ณ ห้อง 439 ชั้น 4 อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
วันที่ 28 เดือน ต.ค. พ.ศ. 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ที่ให้คำชี้แนะช่วยแก้ปัญหา ตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตราโพธิ์เอี่ยม อาจารย์บัณฑิตประจำสาขาวิชาชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้คำแนะนำให้คำปรึกษา และเสนอแนะแนวทางแก้ปัญหา และช่วยตรวจสอบเพิ่มความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจสอบความถูกต้อง พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องและมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความร่วมมือ และอำนวยความสะดวก ในการทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุลวงไปด้วยดี

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ตึกจุฬาภรณ์วลัยลักษณ์1 ที่คอยอำนวยความสะดวก และให้ความช่วยเหลือในส่วนของการทดลอง และขอบคุณนางสาวอินทิรา เพชรทับทิม เพื่อนและน้องที่คอยหวังดีและให้ความช่วยเหลือเรื่องต่างๆ

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำ ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทุกๆด้าน รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆ ที่ให้กำลังใจตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์

นางสาวรัตนาภรณ์ บุญเรือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงพันธุ์ถั่วอาหารสัตว์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา
นักศึกษา	นางสาวรัตนาภรณ์ บุญเรือง
รหัสประจำตัว	52651707
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2556
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

ศึกษาวิธีดำเนินการชักนำให้เกิดต้นใหม่ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วคาวาลเคด (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade) และถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) การชักนำให้เกิดแคลลัสของถั่วคาวาลเคดจากส่วนของใบเลี้ยงโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige และ Skoog, 1962) ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด 96 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักสดมากที่สุด 3.53 กรัมต่อแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสที่พัฒนามาจากใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคด และเมล็ดของถั่วฮามาต้า โดยนำแคลลัสเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่าเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคดในวันที่ 15 มีน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งสูงสุด 1.1674 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร และ 0.0220 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่าเซลล์แขวนลอยของถั่วฮามาต้ามีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมากที่สุดในวันที่ 21 หลังการเพาะเลี้ยง โดยมีน้ำหนักสด 3.0256 และน้ำหนักแห้ง 0.2713 กรัมต่ออาหาร 25 มิลลิลิตร

การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากเมล็ดบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 6-benzyladenine (BA) หรือ Thidizuron (TDZ) ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำถั่วคาวาลเคดให้เกิดยอดเฉลี่ยได้มากที่สุด 88 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 9.00 ยอดต่อเมล็ด และสามารถชักนำถั่วฮามาต้าให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 4.88 ยอดต่อเมล็ด และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 75 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การชักนำยอดจากแคลลัสอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าถั่วคาวาลเคดชักนำยอดได้มากที่สุดบนอาหารสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำถั่วคาวาลเคดให้เกิดยอดได้มากที่สุด 90 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำยอดเฉลี่ย 6.47 ยอดต่อแคลลัส และความสูงเฉลี่ย 5.09 มิลลิเมตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ส่วนถั่วฮามาต้าคือสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุดได้ 4.9 ยอดต่อแคลลัส ยอดมีความสูงเฉลี่ย 7.33 มิลลิเมตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

หลังจากนั้นนำแคลลัสที่มีต้นอ่อนเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต gibberellic acid (GA_3) ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดถั่วคาวาลเคดมีความสูงเฉลี่ย 7.15 มิลลิเมตร เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และยอดถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงเฉลี่ย 5.93 มิลลิเมตร

นำต้นอ่อนย้ายไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA หรือ NAA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ถั่วคาวาลเคดสามารถชักนำรากบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดได้ 16 รากต่อต้น และ ถั่วฮามาต้าสามารถชักนำรากบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำจำนวนรากเฉลี่ยได้ 8.36 รากต่อต้น

การชักนำการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสีแกมมา นำแคลลัสฉายรังสีแกมมาที่ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 เกรย์ พบว่าปริมาณรังสีที่ทำให้แคลลัสถั่วคาวาลเคดมีเปอร์เซ็นต์การตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD50) มีค่าเท่ากับ 53 เกรย์ ที่ระยะเวลา 12 สัปดาห์ และถั่วฮามาต้ามีเปอร์เซ็นต์การตาย 50 เปอร์เซ็นต์ 25 เกรย์ ที่ระยะเวลา 12 สัปดาห์ จากนั้นตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีเปรียบเทียบต้นควบคุม พบว่าสามารถนำเทคนิคอาร์เอพีดีมาตรวจสอบการกลายพันธุ์ของถั่วคาวาลเคดและถั่วฮามาต้าได้

คำสำคัญ : การเจริญเป็นต้นใหม่ ถั่วอาหารสัตว์ การกลายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Improvement of Pasture Legume by Tissue Culture and Gamma Radiation
Student	Rattanaporn Boonruang
Student ID	52651707
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2013
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Anurug Poeaim

ABSTRACT

This study reports a protocol for plants regeneration from cultured explants of Cavalcade (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade) and Hamata (*Stylosanthes hamata cv.* Verano). Callus were induced from cotyledons on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with different concentrations of 0.5, 1, 3 and 5 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The result showed that, the percentage of embryogenic callus induction were 96% and average fresh weight 3.53 gram per callus on MS medium supplemented with 0.5 mg/l 2,4-D for 12 weeks. Cell suspension culture of callus that developed from cotyledon of cavalcade and the seeds of hamata was study. The compact calli were transferred to liquid MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D and 30 g/l sucrose in 25 ml for 30 days. The result show that, cell suspension of cavalcade were fresh weight and dry weight of cell suspension with the best growth for 15 days of 1.1674 gram per 25 ml and 0.022 gram per 25 ml, respectively. Cell suspension of hamata were fresh weight of 3.0256 gram per 25 ml and dry weight of 0.2713 gram per 25 ml for 21 day.

Multiple shoot regeneration from mature seed on MS medium with concentrations 0.5, 1, 3 and 5 mg/l 6-benzyladenine (BA) or Thidizuron (TDZ). The highest shoots initiation were MS medium containing 1 mg/l BA for 8 weeks. Cavalcade were induced shoot 88 % and average shoots 9.00 shoots per seed. Hamata were average shoots 4.88 shoots per seed and induced shoot 75 %.

Callus were transferred to shoot regeneration medium supplemented with concentrations of 0.5, 1, 3 and 5 mg/l BA and TDZ. Callus of cavalcade was transferred onto MS regeneration medium supplemented with 3 mg/l BA and 3 mg/l TDZ. The percentage of regenerated callus pieces were 90 % and the number of shoots per callus piece was 6.47 shoots. The average highest

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

shoots were 5.09 mm for 8 weeks. Hamata of callus was transferred onto MS regeneration medium supplemented with 1 mg/l BA. The number of shoots per callus piece was 4.9 shoots per callus. The average highest shoots were 7.33 mm for 8 weeks.

The regernerated shoots were elongated on MS medium containing 1, 3 and 5 mg/l gibberellic acid (GA_3). We found that 5 mg/l GA_3 were highest multiple shoot average 7.15 mm in cavalcade and hamata were highest of shoots 5.93 mm on MS medium supplemented with 5 mg/l GA_3.

Shoot were transferred to rooting media containing MS medium supplemented with 0.5, 1, 3 and 5 mg/l IBA or NAA. We found cavalcade of the optimal rooting level was 3 mg/l of IBA, producing average 16 roots per explant. Hamata were produced average 8.36 roots per explant on MS medium supplemented with 0.5 mg/l IBA.

Mutation was induced using physical gamma rays. Callus were treated with 0, 20, 40, 60, 80 and 100 Gray of gamma ray irradiation. The result showed that, cavalcade were dose rate 53 Gray of gave 50 % survival rate of irradiated callus (LD50) for 12 weeks. Hamata were dose rate 25 Gray of gave 50 % survival rate of irradiated callus for 12 weeks. RAPD analysis was used to determine polymorphism within and among different control plant and mutation plant. These result suggested that RAPD markers were useful in detecting mutation of cavalcade and hamata.

Keywords: Regeneration, Pasture Legume, Mutation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... III

สารบัญ..... V

สารบัญตาราง..... IX

สารบัญภาพ..... XI

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความสำคัญและที่มา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์..... 3

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย..... 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ..... 4

2.1 ถั่วคาวาลเคด..... 4

2.2 ถั่วฮามาต้า..... 5

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 7

2.3.1 ส่วนต่างๆของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง..... 7

2.3.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 7

2.3.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส..... 9

2.3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย..... 9

2.3.5 ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลัส..... 10

2.3.6 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช..... 10

2.3.7 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช..... 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.8 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนต่างๆของเนื้อเยื่อพืช 14

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 15

2.5 การกลายพันธุ์..... 20

2.5.1 การกลายพันธุ์ของยีน..... 20

2.5.2 การกลายพันธุ์ของโครโมโซม..... 20

2.5.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืช..... 21

2.5.4 การชักนำให้กลายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ..... 22

2.5.5 การชักนำให้เกิดกลายพันธุ์ด้วยรังสี..... 23

2.6 การปรับปรุงพันธุ์พืชวงศ์ถั่วโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์..... 26

2.7 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลโดยเทคนิคอาร์เอพีดี..... 29

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 31

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี..... 31

3.1.1 พันธุ์ของถั่วอาหารสัตว์..... 31

3.1.2 สารเคมี..... 31

3.1.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช..... 32

3.1.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ..... 32

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง..... 33

3.2.1 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดให้เกิดยอดจำนวนมาก 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.2 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของถั่วคาวาลเคด..... 34

3.2.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย..... 35

3.2.4 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่..... 35

3.2.5 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำต้นจากแคลลัสให้มีลักษณะยืดยาว..... 36

3.2.6 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำราก..... 36

3.2.7 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของแคลลัส..... 37

3.2.8 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี..... 38

บทที่ 4 ผลทดลอง..... 40

4.1 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดให้เกิดยอดจำนวนมาก... 40

4.1.1 ถั่วคาวาลเคด..... 40

4.1.2 ถั่วฮามาต้า..... 44

4.2 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของถั่วคาวาลเคด..... 49

4.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย..... 53

4.3.1 ถั่วคาวาลเคด..... 53

4.3.2 ถั่วฮามาต้า..... 55

4.4 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่..... 57

4.4.1 ถั่วคาวาลเคด..... 57

4.4.2 ถั่วฮามาต้า..... 62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำต้นจากแคลลัสให้มีลักษณะยืดยาว..... 65

4.5.1 ถั่วคาวาลเคด..... 65

4.5.2 ถั่วฮามาต้า..... 68

4.6 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำราก..... 71

4.6.1 ถั่วคาวาลเคด..... 71

4.6.2 ถั่วฮามาต้า..... 77

4.7 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของแคลลัส..... 80

4.7.1 ถั่วคาวาลเคด..... 80

4.7.2 ถั่วฮามาต้า..... 86

4.8 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี..... 92

4.8.1 ถั่วคาวาลเคด..... 92

4.8.2 ถั่วฮามาต้า..... 93

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง..... 94

5.1 ถั่วคาวาลเคด..... 94

5.2 ถั่วฮามาต้า..... 95

เอกสารอ้างอิง..... 97

ภาคผนวก ก..... 107

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโตจากตัวทำละลายและสภาวะเก็บรักษา.....	12
3.1 แสดงชื่อและลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค อาร์เอพีดี.....	39
3.2 แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในเทคนิค PCR.....	39
4.1 ผลการชักนำเมล็ดของถั่วคาวาลเคดให้เกิดยอดจำนวนมากบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	41
4.2 ผลการชักนำเมล็ดของถั่วคาวาลเคดให้เกิดยอดจำนวนมากบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	42
4.3 ผลการชักนำเมล็ดของถั่วฮามาต้าให้เกิดยอดจำนวนมากบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	45
4.4 ผลการชักนำเมล็ดของถั่วฮามาต้าให้เกิดยอดจำนวนมากบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	46
4.5 ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	50
4.6 ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.7 ผลการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจากแคลลัสจากใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์..... 58

4.8 ผลการเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจากแคลลัสของถั่วคาวาลเคดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์..... 60

4.9 ผลการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจากแคลลัสจากเมล็ดของถั่วฮามาต้าบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์..... 63

4.10 ผลการชักนำต้นจากแคลลัสให้มีลักษณะยืดยาวของถั่วคาวาลเคด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์..... 66

4.11 ผลการชักนำต้นจากแคลลัสให้มีลักษณะยืดยาวของถั่วฮามาต้าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์..... 69

4.12 ผลการชักนำรากของถั่วคาวาลเคดเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 72

4.13 ผลการชักนำรากของถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารครึ่ง MS และ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 75

4.14 ผลการชักนำรากของถั่วฮามาต้าเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 78

4.15 ผลของจำนวนรอดชีวิตของแคลลัสของถั่วคาวาลเคด เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และค่าเฉลี่ยความสูงยอดหลังจากฉายรังสีแกมมาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ... 81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.16 ลักษณะของต้นที่คัดเลือกจำนวน 6 ต้นที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุม..... 84

4.17 ผลของจำนวนรอดชีวิตของแคลลัสของถั่วฮามาต้า เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ยและค่าเฉลี่ยความสูงยอดหลังจากฉายรังสีแกมมาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ..... 87

4.18 ลักษณะของต้นที่คัดเลือกจำนวน 6 ต้นที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุม..... 90

4.19 แสดงโคลน และจำนวนแถบที่แตกต่างจากต้นควบคุมเมื่อใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบต้นถั่วคาวาลเคดที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมาโดยใช้ไพรเมอร์ 6 ชนิด..... 92

4.20 แสดงโคลน และจำนวนแถบที่แตกต่างจากต้นควบคุมเมื่อใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบต้นถั่วฮามาต้าที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมาโดยใช้ไพรเมอร์ 6 ชนิด..... 93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 (ก) ลักษณะดอก (ข) ลำต้นของถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade.....	5
2.2 ลักษณะเมล็ดของถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade.....	5
2.3 (ก) ลักษณะดอก (ข) ลำต้นของถั่วฮามาต้า *Stylosanthes hamata* cv. Verano.....	6
2.4 ลักษณะเมล็ดของถั่วฮามาต้า *Stylosanthes hamata* cv. Verano.....	6
4.1 การเพาะเลี้ยงถั่วคาวาลเคดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ (ก) อายุ 5-7 วัน (ข) การเกิดแคลลัสจากส่วนของลำต้น (ค) การเกิดแคลลัสจากส่วนของราก (ง) การเกิดรากจากส่วนของข้อเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลามากกว่า 12 สัปดาห์.....	42
4.2 ถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น (จ) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฉ) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฌ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	43
4.3 การเพาะเลี้ยงถั่วฮามาต้าบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ข) การเกิดแคลลัสจากส่วนของราก (radicle) (ค) การเกิดต้นจากแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	47
4.4 ถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น (จ) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฉ) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฌ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.5 การชักนำแคลลัสจากส่วนของใบเลี้ยง (ก) ใบเลี้ยงถั่วคาวาลเคดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วันบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4–D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) ลักษะของแคลลัสแบบแข็ง compact callus สีเขียวปนเหลือง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ค) ลักษะของแคลลัสสีขาวใส ฉ่ำน้ำ friable callus เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์..... 51

4.6 ใบเลี้ยงถั่วคาวาลเคดอายุ 6 วันเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร..... 52

4.7 เซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคดในสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน (ก) ลักษณะของเซลล์แขวนลอยในขวดเพาะเลี้ยง (ข) ลักษณะเซลล์แขวนลอยผ่านกล้องจุลทรรศน์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 เท่า (ค) เซลล์แขวนลอยที่มีชีวิตเกิดสีเขียวเรืองแสงเมื่อย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซิเตตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 เท่า..... 54

4.8 กราฟแสดงผลของเซลล์แขวนลอยในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน (ก) น้ำหนักสด (ข) น้ำหนักแห้ง..... 54

4.9 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วฮามาต้าในสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (ก) ลักษณะเซลล์แขวนลอยในขวดเพาะเลี้ยง (ข) ลักษณะของเซลล์แขวนลอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 เท่า มีลักษณะกลม ยาว เป็นรูปท่อน อยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน (ค) เซลล์แขวนลอยภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ที่กำลังขยาย 10 เท่า เซลล์ที่มีชีวิตเกิดสีเขียวเรืองแสงเมื่อย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซิเตต..... 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.10 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วฮามาต้าในสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (ก) น้ำหนักสด (ข) น้ำหนักแห้ง..... 56

4.11 แคลลัสของถั่วคาวาลเคดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร(ก) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ข) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เริ่มการเจริญเป็นยอดอ่อน (ค) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์สามารถเกิดยอดจำนวนมากได้ตามลำดับ..... 58

4.12 แคลลัสของถั่วคาวาลเคดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น (จ) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฉ) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฌ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์..... 59

4.13 แคลลัสของถั่วคาวาลเคดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ (ก) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์..... 61

4.14 แคลลัสของถั่วฮามาต้าเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ข) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เริ่มการเจริญเป็นยอดอ่อน (ค) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์สามารถยอดจำนวนมากได้ ตามลำดับ..... 63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.15 แคลลัสของถั่วฮามาต้าเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น (จ) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฉ) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฌ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ 64

4.16 แคลลัสของถั่วคาวาลเคดที่ผ่านการชักนำยอดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารเพิ่มความสูงของยอด เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ (ก) ลักษณะยอดบนสูตรอาหารครึ่ง MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) สูตรอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ค) ลักษณะยอดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฉ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ 67

4.17 แคลลัสของถั่วฮามาต้าที่ผ่านการชักนำยอดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารเพิ่มความสูงของยอด เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ (ก) ลักษณะยอดบนสูตรอาหารครึ่ง MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) สูตรอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ค) ลักษณะยอดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฉ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ 70

4.18 ถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น (ก-ข) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค-ง) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ-ฉ) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช-ฌ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 4 สัปดาห์ 73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.19 ถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น (ก-ข) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค-ง) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ-ฉ) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช-ฌ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 74

4.20 (ก-ข) ถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค-ง) สูตรอาหารครึ่ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 76

4.21 ถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 78

4.22 ถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น (ก-ข) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค-ง) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ-ฉ) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช-ฌ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์..... 79

4.23 (ก) ลักษณะแคลลัสก่อนการฉายรังสี (ข) แคลลัสลักษณะสีเขียวและสีน้ำตาลหลังจากผ่านการฉายรังสี เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์..... 82

4.24 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของแคลลัสถั่วคาวาลเคดหลังได้รับรังสีแกมมา 0 20 40 60 80 และ100 เกรย์ ระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์..... 82

4.25 การเกิดยอดของถั่วคาวาลเคดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์..... 83

4.26 ลักษณะของต้นที่คัดเลือกจำนวน 6 ต้น..... 85

4.27 (ก) ลักษณะแคลลัสที่รอดชีวิตหลังจากผ่านการฉายรังสี (ข) ลักษณะแคลลัสที่ตายหลังจากผ่านการฉายรังสี..... 88

4.28 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของแคลลัสถั่วฮามาต้าหลังได้รับรังสีแกมมา 0 20 40 60 80 และ 100 เกรย์ ระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์..... 88

4.29 การเกิดยอดของถั่วฮามาต้าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์..... 89

4.30 ลักษณะของต้นฮามาต้าที่คัดเลือกจำนวน 6 ต้น..... 91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ประชากรส่วนใหญ่มีอาชีพเลี้ยงสัตว์และการเพาะปลูกพืช สัตว์ที่นิยมเลี้ยงกันมากและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจคือ โคเนื้อและโคนม โดยในปี 2554 กรมปศุสัตว์ได้ทำการสำรวจ พบว่ามีจำนวนโคเนื้อ 6,583,106 ตัว และโคนม 408,009 ตัว (ศูนย์สารสนเทศ, 2554) พืชอาหารสัตว์เป็นอาหารของสัตว์ที่มีราคาถูก และมีคุณค่าทางอาหารครบถ้วนเหมาะสำหรับใช้เลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้อง และสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตให้กับเกษตรกรที่เลี้ยง โคเนื้อ โคนม กระบือ แพะ และแกะได้เป็นอย่างดีกรมปศุสัตว์จึงได้ทำการพัฒนาพันธุ์พืชอาหารสัตว์และส่งเสริมให้เกษตรกรใช้หญ้าและถั่วเป็นอาหารหลักในการเลี้ยงสัตว์ให้มากขึ้น โดยเพิ่มปริมาณการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชให้เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกร พร้อมทั้งพัฒนาเทคโนโลยีด้านพืชอาหารสัตว์ และถ่ายทอดความรู้สู่เกษตรกร เช่น การปลูก การจัดการแปลงหญ้า การใช้ประโยชน์และการผลิตเมล็ดพันธุ์ เป็นต้น (กรมปศุสัตว์, 2551)

จากการศึกษาวิจัยพบว่า ถั่วฮามาต้าสามารถปลูกได้ดีในสภาพดินฟ้าอากาศทั่วๆ ไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูง ทนต่อการแทะเล็มของสัตว์ ไม่มีรายงานว่าทำให้โคกระบือท้องอืดเหมือนถั่วบางชนิด และให้ผลผลิตเมล็ดที่มีคุณภาพสูง (ชาญชัย, 2525) ในการทดสอบเปรียบเทียบพันธุ์ที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น บุญฤา (2522) พบว่า ถั่วฮามาต้าให้ผลผลิตสูงกว่าถั่วพืชอาหารสัตว์หลายๆ ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับถั่วสไตโลชนิดอื่นๆ ซึ่งคล้ายคลึงกับรายงานของ Topark-Ngarm (1979) สำหรับในด้านการผลิตเมล็ดได้มีการทดลองหาวิธีการต่างๆ เพื่อที่จะทำให้ผลผลิตของเมล็ดสูงที่สุด เช่น ช่วงหรือระยะเวลาที่เหมาะในการปล่อยแกะหรือโคแทะเล็มก่อนที่จะเก็บเมล็ด (Wilaipon และ Humphreys, 1976 ; Wilaipon และ Humphreys, 1981) หรือระยะเวลาที่ควรจะตัดต้นถั่วก่อนที่จะเก็บเกี่ยวเมล็ด (Wilaipon และคณะ, 1979)

ถั่วคาวาลเคดเป็นสายพันธุ์ในสกุลเดียวกับถั่วเซนโตรซีมา (*Centrosema* spp.) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade สามารถเจริญได้ดีในสภาพดินและอากาศโดยทั่วไปและถั่วคาวาลเคดสามารถเจริญในดินได้หลายชนิด ข้อดีของถั่วคาวาลเคดคือเมื่อถั่วแห้งใบถั่วจะไม่ร่วงหล่นง่ายเหมือนถั่วอื่นๆ จึงสามารถนำมาทำเป็นถั่วแห้งอัดฟ่อนได้ดี (ชิต และคณะ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2538) กองอาหารสัตว์ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรผลิตเมล็ดถั่วคาวาลเคด และทำแห้งเพื่อเลี้ยงสัตว์ พบว่าถั่วคาวาลเคดแห้งอายุตัดที่ 90 วันมีวัตถุแห้ง 91.96 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประกอบทางเคมีคิดเป็นวัตถุแห้งมีค่าโปรตีน 17.07 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 1.58 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใยในรูปของ neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), acid detergent lignin (ADL) และ Cellulose เท่ากับ 59.03 39.09 8.72 และ 28.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากรายงานพบว่าการใช้หญ้าแพงโกล่า (*Digitaria eriantha*) กับถั่วคาวาลเคดแห้ง 75 และ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักจะให้คุณค่าทางอาหารค่อนข้างดีกว่าการใช้อาหารเสริมที่เป็นอาหารสำเร็จรูป ซึ่งจะมีคุณค่าทางอาหารด้อยกว่า ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้หญ้าแพงโกล่าแห้งกับถั่วคาวาลเคด ซึ่งเป็นอาหารหยาบและเป็นอาหารหลักของโค เป็นสิ่งที่สำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งถ้าอาหารหยาบมีคุณภาพดีจะทำให้ช่วยลดต้นทุนในส่วนของการใช้อาหารเสริมสำเร็จรูปได้ เนื่องจากโคจะได้รับคุณค่าทางโภชนาที่พอเพียงจากอาหารหยาบทำให้ความจำเป็นในการใช้อาหารเสริมสำเร็จรูปจะน้อยลงหรืออาจไม่ต้องใช้เลย (จินดา และคณะ, 2546)

จากรายงานความก้าวหน้าของโครงการพัฒนาการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชอาหารสัตว์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ได้มีการทดสอบที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์นครราชสีมา พบว่าต้นถั่วคาวาลเคดเกิดโรคอย่างรุนแรง โดยพบได้ 3 กลุ่มอาการ คือ ลักษณะใบไหม้ มีแผลเป็นลักษณะเป็นรูและขอบแผลมีรอยไหม้ เกิดจากโรคแอนแทรคโนส ลักษณะใบหงิกผิดรูปร่าง ใบเล็กหงิกเป็นฝอย เกิดจากเชื้อไวรัสจำพวก Gemini virus อาการใบไหม้ทั้งใบ (leaf bright) เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia* ซึ่งในส่วนของโรคที่เกิดจากไวรัสนั้น ผู้เชี่ยวชาญจากประเทศญี่ปุ่นได้ทำการจำแนกเชื้อ พบว่า เป็น peanut strip virus และพบว่าถั่วคาวาลเคดมีความแปรปรวนด้านความต้านทานโรคและแมลงน้อยมาก โอกาสที่จะคัดพันธุ์จากแหล่งพันธุกรรมที่มีอยู่นั้นค่อนข้างต่ำ (จีระวัชร์, 2544 และ สมจิตร และธำรงศักดิ์, 2545) ดังนั้นในปัจจุบันเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีบทบาทอย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยอาจใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยการใช้รังสีหรือสารเคมี ซึ่งการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในพืช เนื่องจากรังสีแกมมามีคุณสมบัติเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้ามีอำนาจทะลุทะลวงสูง วิธีการฉายรังสีไม่ยุ่งยาก ไม่มีรังสีตกค้างอยู่ในพืช (สิรินุช, 2536)

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์ในถั่วคาวาลเคดและถั่วฮามาต้าด้วยวิธีการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน โดยครอบคลุมตั้งแต่การชักนำให้เกิดแคลลัส การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัส การหาค่าการตาย 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ (LD50) และการตรวจสอบต้นกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อเป็นพื้นฐานของการปรับปรุงพันธุ์ถั่วอาหารสัตว์ โดยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคด

1.2.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วคาวาลเคดและถั่วฮามาต้าให้เกิดเป็นยอดจำนวนมาก และชักนำให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์

1.2.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงถั่วคาวาลเคดและถั่วฮามาต้าให้เจริญเป็นแคลลัสและชักนำแคลลัสให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์

1.2.4 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงถั่วคาวาลเคดและถั่วฮามาต้าให้เกิดรากที่สมบูรณ์

1.2.5 ศึกษาการกลายพันธุ์โดยวิธีฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0 20 40 60 80 และ100 เกรย์ เพื่อหาปริมาณรังสีที่ทำให้แคลลัสมีอัตราการยู่รอด 50 เปอร์เซ็นต์ (LD50)

1.2.6 ตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาถั่วคาวาลเคดและถั่วฮามาต้าในการชักนำเมล็ดให้เกิดเป็นยอดจำนวนมาก การเกิดแคลลัส การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ ศึกษาการเกิดรากที่สมบูรณ์การกลายพันธุ์โดยวิธีฉายรังแกมมา แล้วพัฒนาให้เกิดต้น และการตรวจสอบต้นกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ถั่วคาวาลเคดและถั่วฮามาต้าสายพันธุ์ใหม่

1.4.2 มีฐานข้อมูลทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการฉายรังสีแกมมา เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วคาวาลเคดและถั่วฮามาต้าต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ถั่วคาวาลเคด

ถั่วคาวาลเคดเป็นถั่วในสกุลเซนโตรซีมา เป็นพืชฤดูเดียว แพร่กระจายอยู่ในแถบร้อนกึ่งแห้งแล้งที่มีช่วงฤดูแล้งยาวนานพบในทวีปอเมริกาตอนใต้และตอนกลางบางส่วน ลำต้นแถวเลื้อย ต้นที่ทอดนอนไปกับพื้นดินจะมีรากออกจากข้อ ใบมีขนาดเล็กเรียวแคบ และมีขนปกคลุม ใบมีสามใบย่อย ดอกมีสีม่วง และสีขาว (ภาพที่ 2.1 ก-ข) เมล็ดมีสีน้ำตาล ผิวมัน (ภาพที่ 2.2) ถั่วคาวาลเคดเจริญเติบโตและแพร่กระจายใน แหล่งที่มีฝนตก 1000–1500 มิลลิเมตรต่อปี และมีช่วงแล้งนาน 4–6 เดือน สามารถเจริญเติบโตได้ในดินหลายชนิดตั้งแต่ดินทรายจนกระทั่งดินเหนียว พีเอชของดินที่สามารถเจริญได้ตั้งแต่ 5.0-8.5 จากการศึกษาถั่วคาวาลเคดในออสเตรเลีย พบว่ามีการเจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิอากาศเขตมรสุม และทนต่อความแห้งแล้งได้ดี สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วเมื่อได้รับน้ำฝน เนื่องจากถั่วชนิดนี้มีการแพร่กระจายในบริเวณกว้างจึงทำให้มีความแปรผันทางลักษณะต่างๆในสายพันธุ์ค่อนข้างสูง (สายัณห์, 2540)

อาณาจักร (Kingdom) : Plantae

ส่วน (Division) : Magnoliophyta

ชั้น (Class) : Magnoliopsida

อันดับ (Order) : Fabales

วงศ์ (Family) : Fabaceae

สกุล (Genus) : *Centrosema*

สปีชีส์ (Species) : *pascuorum*

ที่มา : http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=Fabaceae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.1 (ก) ลักษณะดอก (ข) ลำต้นของถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade
ที่มา : http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Centrosema_pascuorum.htm

ภาพที่ 2.2 ลักษณะเมล็ดของถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade
ที่มา : ภาพจากผู้จัดทำ

2.2 ถั่วฮามาต้า

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ดำเนินการผลิตเมล็ดพันธุ์อย่างกว้างขวาง และใช้ในการหว่านปรับปรุง ที่ทำเลเลี้ยงสัตว์สาธารณะต่างๆในภาคอีสาน ตลอดจนจำหน่ายจ่ายแจกให้แก่เกษตรกรและผู้สนใจทั่วไป ถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) ซึ่งเป็นถั่วพื้นเมืองของประเทศเวเนซูเอลล่า ซึ่งอยู่ในแถบอเมริกาใต้ได้นำเข้ามาประเทศไทยเพื่อทดสอบครั้งแรก ที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีพ.ศ.2513 โดยได้รับเมล็ดพันธุ์ผ่านทาง Dr. H.M. Shelton และ Dr. L.R. Humphreys แห่งมหาวิทยาลัยควีนสแลนด์ ประเทศออสเตรเลีย (บุญฤา, 2533) ลักษณะทั่วไปของถั่วฮามาต้าคล้ายคลึงกับถั่วทาวสวิลสะไตโล (*S. humilis*) ลักษณะการเจริญเติบโตของลำต้นในระยะแรกๆ ลำต้นจะตั้ง (erect) และเมื่อมีอายุมากขึ้นจะมีกิ่งก้านแผ่ออกด้านข้าง (prostrate) ลำต้นมีขนาดเล็กผิวเกลี้ยง ใบเป็นแบบ pinnately trifoliate leaf ใบย่อยรูปร่างคล้ายหอก ดอกมีสีเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(สายัณห์, ไม่ระบุ พ.ศ.) (ภาพที่ 2.3 ก-ข) เมล็ดถั่วฮามาต้ามีขนาดเล็ก เปลือกมีขน สีน้ำตาลปนดำ (ภาพที่ 2.4)

อาณาจักร (Kingdom) : Plantae

ส่วน (Division) : Magnoliophyta

ชั้น (Class) : Magnoliopsida

อันดับ (Order) : Fabales

วงศ์ (Family) : Fabaceae

สกุล (Genus) : *Stylosanthes*

สปีชีส์ (Species) : *hamata*

ที่มา : http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=Fabaceae

ภาพที่ 2.3 (ก) ลักษณะดอก (ข) ลำต้นของถั่วฮามาต้า *Stylosanthes hamata* cv. Verano

ที่มา : http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Gallery/pictures/styham.htm

ภาพที่ 2.4 ลักษณะเมล็ดของถั่วฮามาต้า *Stylosanthes hamata* cv. Verano

ที่มา : ภาพจากผู้จัดทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพาะเลี้ยงได้จากทุกๆส่วนของเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ การเพาะเลี้ยงจะประสบความสำเร็จหรือไม่นั้น อาจจะต้องทดลองนำส่วนต่างๆ ของพืชเหล่านั้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งในส่วนของเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เพราะเซลล์แต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญเติบโตไม่เท่ากัน โดยส่วนมากนิยมใช้ส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

2.3.1 ส่วนต่างๆของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ได้แก่

2.3.1.1 เนื้อเยื่อบริเวณปลายยอด (shoot apex) เป็นบริเวณที่มีเซลล์มีการแบ่งตัวมากที่สุด บริเวณนี้วัดจากสุดปลายยอดลงมาไม่เกิน 5 มิลลิเมตร

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

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

2.3.1.4 เนื้อเยื่อเจริญอยู่ระหว่างปล้อง (intercalary meristem) สามารถพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยมีหน้าที่ในการเพิ่มความยาวของปล้อง

2.3.1.5 เนื้อเยื่อพืชส่วนอื่นๆ ที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้ ได้แก่

2.3.1.5.1 ส่วนของเปลือกชั้นใน (inner bark) เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อท่ออาหาร และ cortex

2.3.1.5.2 ส่วนไส้ (pith) เป็นส่วนที่อยู่บริเวณกลางสุดของลำต้นซึ่งประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

2.3.1.5.3 ใบ (leaf) ในส่วนเซลล์ของแผ่นใบที่เรียกว่า palisade parenchyma และ spongy parenchyma มีอยู่เป็นจำนวนมาก เหมาะสำหรับใช้ในการแยกโพรโทพลาสต์

2.3.1.5.4 ดอก (flower) ส่วนของดอกส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

2.3.1.5.5 ผล (fruit) เนื้อเยื่อของผลส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์พาเรงไคมา

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

2.3.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (รังสฤษฎ์, 2540)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีประโยชน์อย่างมากทั้งในด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐาน เกษตรกรรม การแพทย์ และอุตสาหกรรม ซึ่งจำแนกได้อย่างกว้างๆ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.1 การขยายพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น โดยอาศัยสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด สามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชได้เป็นทวีคูณ จากตัวอย่างการเลี้ยงพืชเพียงต้นเดียวและย้ายเนื้อเยื่อเดือนละครั้ง หากเพิ่มจำนวนได้เป็นสิบต้นแล้ว ในระยะเวลาเพียง 6 เดือน จะสามารถผลิตต้นพืชได้ถึง 1,000,000 ต้น

2.3.2.2 การผลิตพืชที่ปราศจากโรค ปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการผลิตพืช คือ การเกิดโรคพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไมโครพลาสมาที่ติดมากับเมล็ดหรือส่วนขยายพันธุ์ต่างๆ ต้นพืชที่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรคเหล่านี้ หากไม่แสดงอาการให้เห็นจะทราบได้ต่อเมื่อเกิดอาการเป็นโรคบนต้นพืชที่ได้ปลูกไปแล้ว เมื่อถึงเวลานั้นก็ยากจะแก้ไขหรือป้องกัน นอกจากจะกำจัดหรือทำลายพืชนั้นทิ้งไป การใช้สารเคมีคลุกเมล็ดหรือส่วนขยายพันธุ์ก่อนปลูก แม้จะช่วยลดปริมาณเชื้อที่อาจติดกับผิวของวัสดุปลูกได้ แต่ไม่อาจใช้ผลดีในกรณีการปนเปื้อนของเชื้อโรคที่ติดมาภายในเซลล์พืชได้ การผลิตพืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะให้ต้นพืชที่ปราศจากโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเชื้อราและแบคทีเรีย และหากมีเชื้อเหล่านี้แล้วจะแสดงการปนเปื้อนในอาหารที่ใช้เลี้ยงทันที เนื่องจากแบคทีเรีย และเชื้อราเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในอาหารที่ใช้เลี้ยง ทำให้สามารถกำจัดทิ้งได้ ส่วนในกรณีของไวรัสซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็กมากและดำรงชีวิตอยู่ในเซลล์พืช จึงมักไม่แสดงอาการปนเปื้อนให้เห็น แม้จะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็ตาม ในการปฏิบัติจะต้องคัดเลือกและตรวจสอบเนื้อเยื่อก่อนการเลี้ยงจนแน่ใจว่าปลอดภัยจากเชื้อไวรัสนั้น ชิ้นส่วนของพืชที่ปลอดภัยจากเชื้อไวรัสมากที่สุด คือ เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด (apical meristem) และเนื้อเยื่อของคัพภะ (embryonic tissue) ได้แก่ ท่อน้ำ (xylem) และท่ออาหาร (pholem) ที่ติดกับส่วนอื่นๆของต้นพืชที่เชื้อไวรัสจะสามารถเคลื่อนย้ายมาปนเปื้อนได้

2.3.2.3 การปรับปรุงพันธุ์พืช ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ทนทาน (tolerant plants) หรือสายพันธุ์ที่ต้านทาน (resistant plant) ได้จากการจัดเงื่อนไขของอาหารและสภาวะแวดล้อมของการเลี้ยง หรือชักนำการกลายพันธุ์ (induce mutation) โดยใช้รังสีหรือสารเคมี เช่นการคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็ม จากการเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดเลือกสายพันธุ์ทนดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดเลือกสายพันธุ์ทนร้อนโดยเลี้ยงในสภาพที่อุณหภูมิสูง การสร้างสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารพิษของโรค แมลง และสารเคมีกำจัดวัชพืช นอกจากนั้น ความก้าวหน้าของเทคโนโลยีการตัดต่อดีเอ็นเอ (DNA recomination) และการถ่ายยีน (transgenic plants) ที่ต้องการในพืชบางชนิด

2.3.2.4 การผลิตยาและสารเคมีจากพืช พืชบางชนิดให้สารที่มีคุณสมบัติเป็นยา หรือสารเคมีที่มีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม แต่ในกรณีเนื้อเยื่อที่นำมาสกัดสารดังกล่าวมีปริมาณที่น้อยมาก ต้องใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มจำนวนและชักนำให้มีการสังเคราะห์สารที่ต้องการในปริมาณที่มากขึ้น

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.5 การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์ พืชที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สามารถติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงในด้านเหล่านี้ได้ง่าย ชัดเจน และถูกต้องแม่นยำ ทั้งในระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และพืชทั้งต้น เช่น การศึกษาการตอบสนองของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชต่อสารเคมีป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช สารเคมีป้องกันการกำจัดวัชพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่เกิดจากการกลายพันธุ์ เป็นต้น เนื่องจากการควบคุมตัวแปรต่างๆทำได้ดีกว่าในสภาพการปลูกปกติ

2.3.2.6 การเก็บรักษาพันธุ์พืช ในปัจจุบันพืชหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์พืชที่หายากและมีคุณค่าทางประวัติศาสตร์หลายชนิดได้สูญพันธุ์ไปแล้ว หรือกำลังจะสูญพันธุ์ไปในไม่ช้า สาเหตุสำคัญอาจมาจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม หรือเกิดจากการกระทำของมนุษย์เอง นอกจากนั้นพืชบางชนิดยังยากที่จะขยายพันธุ์หรือจะเก็บรักษาพันธุ์ได้โดยวิธีปกติ ซึ่งอาจต้องใช้ระยะเวลาที่นานและไม่คุ้มค่า นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงได้คิดค้นวิธีเก็บรักษาพันธุ์พืชต่างๆไว้ในสภาพหลอดทดลอง โดยเลี้ยงไว้ในอาหารที่มีส่วนผสม ของสารบางชนิดที่มีผลต่อการชะลอการเจริญเติบโต หรือมีสารที่ทำให้เกิดสภาพขาดน้ำ (water stress) เพื่อชักนำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามากๆ เป็นการประหยัดเวลา แรงงาน ค่าใช้จ่าย และสามารถคงสภาพมีชีวิตได้ยาวนาน เนื่องจากไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้ง เช่นปกติ อีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย คือการเก็บรักษาเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชไว้ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อต้องการปลูกหรือเพิ่มปริมาณ ก็นำมาเลี้ยงในอาหารปกติของพืชนั้นๆ

2.3.3 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture) (รังสฤษฎ์, 2540)

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

2.3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (suspension culture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยนั้น อาจเริ่มต้นได้จากการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช โดยนำเอาชิ้นส่วนต่างๆของพืช ได้แก่ เนื้อเยื่อ ปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอ็มบริโอ อับเรณู รังไข่ ตาข้าง ดอก และผล มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เช่น สูตรอาหาร Murashige และ Skoog ซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินในอัตราส่วนค่อนข้างสูง โดยสารที่นิยมใช้ ได้แก่ 2,4-D NAA และ 2,4,5-T เป็นต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารสังเคราะห์จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืชไปเป็นแคลลัสซึ่งกลุ่มเซลล์จะเกาะกันอยู่อย่างหลวมๆจากนั้นนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า ซึ่งมีผลทำให้กลุ่มเซลล์ที่เกาะกันหลวมๆสามารถหลุดแยกออกจากกันมาแขวนลอยอยู่ในอาหาร ในบางกรณีอาจใช้แท่งแก้ว หรือ ช้อนตักสารเคมีช่วยกวนอย่างเบาๆ เพื่อทำให้เซลล์หลุดจากก้อนแคลลัสก็ได้ เซลล์แขวนลอยที่ดีนั้นควรประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก และมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ที่มีความสม่ำเสมอในการเจริญเติบโต

2.3.5 ปัจจัยที่มีบทบาทต่อการเลี้ยงแคลลัส (รังสฤษฎ์, 2540)

2.3.5.1 สารควบคุมการเจริญเติบโต หมายถึง สารในกลุ่มออกซิน และไซโตไคนิน ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืช โดยขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนิน เช่น ถ้าอัตราส่วนออกซินต่อไซโตไคนินมีอัตราส่วนสูง เนื้อเยื่อพืชจะพัฒนาไปเป็นราก แต่ถ้าอัตราส่วนออกซินต่อไซโตไคนินมีอัตราส่วนต่ำ เนื้อเยื่อพืชจะพัฒนาไปเป็นส่วนยอด ถ้าอัตราส่วนสมดุล เนื้อเยื่อจะพัฒนาไปเป็นรากและยอด แต่ในบางกรณีอาจขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ

2.3.5.2 ธาตุอาหารชนิดต่างๆ เช่น เคซีนไฮโดรไลเซท กลูตามีน แอลฟา-คีโตกลูตาลิก โพรลีน แอสปาราจีน อาร์จินีน และ ซิลเวอร์ไนเทรต นอกจากนี้ยังมีสารสกัดจากยีสต์ และน้ำมะพร้าวยังมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้เช่นกัน

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

2.3.5.4 ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ แสง ซึ่งโดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงแคลลัสจะต้องใช้แสงที่มีความเข้มข้นต่ำ หรือนิยมเพาะเลี้ยงในที่มืดที่ไม่ต้องการแสงเลย และอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วงประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส

2.3.5.5 สถานะของอาหารที่เลี้ยง แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งมีการเจริญเติบโตได้น้อยกว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารแข็งจะช่วยให้แคลลัสมีพื้นที่สัมผัสอาหารน้อยกว่า

2.3.6 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมต่อชนิดของพืช พันธุ์ตลอดจนชนิดและสภาพของชิ้นส่วนพืช (explants) ที่จะนำมาเลี้ยง อย่างไรก็ตามอาหารที่นิยมใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากที่สุดคืออาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้เลี้ยงกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์ที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา (differentiated) มีช่องว่างในเซลล์จำนวนมากและเซลล์ยังไม่มีการจัดรูปแบบที่แน่นอน ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงแคลลัส (callus culture) และเซลล์แขวนลอย (suspension culture) ของพืชส่วนใหญ่เกือบทุกชนิดทำได้ง่ายกว่าการเลี้ยงจากส่วนอื่นๆ แคลลัสเหล่านี้ได้จากการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium) ที่อย่างน้อยที่สุด

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบด้วยเกลือของธาตุอาหารที่ต้องการครบคือ สารประกอบอนินทรีย์ หรือสารประกอบอินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง

แม้พืชจะมีความต้องการขั้นพื้นฐานในการเจริญเติบโตไม่ซับซ้อนก็ตาม แต่การนำชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นั้น มีความต้องการธาตุอาหารและสารอาหารบางอย่างที่จำเป็นที่มีความซับซ้อนมากกว่า และมีลักษณะเป็น seldom autotrophic กล่าวคือ ต้องการทั้งธาตุอาหารหลัก (macro-element/nutrients) และธาตุอาหารรอง (micro-element/nutrients) ที่ใช้กันตามปกติในการเลี้ยงพืชในสารละลาย นอกจากนั้น ยังต้องการธาตุอาหารอื่นๆ เช่น แหล่งของธาตุคาร์บอน และวิตามินอย่างมาก ปกติแล้วเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่แยกออกมาเลี้ยงจะต้องการวิตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ ซึ่งปกติสังเคราะห์ได้เองจากส่วนหนึ่งของต้นเพื่อไปสะสมไว้ยังอีกส่วนหนึ่งของต้นพืช แล้วเคลื่อนย้ายไปยังส่วนอื่นๆเพื่อใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม อย่างไรก็ตามผลของแต่ละสารประกอบที่จำเป็นนี้ยังไม่เป็นที่ทราบชัดสมบูรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึม เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารที่ใช้มักถูกดัดแปลงไปตามความมุ่งหมาย เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อกำเนิดอวัยวะ (organogenesis) และ/หรือ การกำเนิดคัพภะ (embryogenesis) จึงทำให้ยากต่อการหาข้อสรุปพื้นฐานที่สอดคล้องไปในทางเดียวกันได้โดยง่าย อย่างไรก็ตาม โดยทั่วๆไปแล้วสามารถจำแนกสารเหล่านี้เป็นกลุ่มๆ ได้ดังนี้

2.3.6.1 ธาตุอาหารพวกอนินทรีย์

2.3.6.1.1 ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณมาก (macro element/nutrients) ได้แก่ C, H, O, N, P, K, Ca, Mg และ S

2.3.6.1.2 ธาตุอาหารที่ต้องการในปริมาณน้อย (micro-element/nutrients) ได้แก่ Fe, Mn, Cu, Zn, B, Cl และ Mo

2.3.6.2 ธาตุอาหารพวกอินทรีย์

2.3.6.2.1 วิตามิน ที่ใช้กันมากได้แก่ thiamine, nicotinic acid, pyridoxine, inositol, biotin, panthothenic acid, folic acid, choline chloride, riboflavin และ ascorbic acid

2.3.6.2.2 ฮอร์โมน และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่

2.3.6.2.2.1 สารในกลุ่มออกซิน (auxins) เช่น indole-3-acetic acid (IAA), indole butyric acid (IBA), naphthaleneacetic (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)

2.3.6.2.2.2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinins) เช่น N_6-Benzyladenine (BA), Kinetin, Zeatin และN_6-isopentenyl adenine (2iP)

2.3.6.2.2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆ เช่น gibeberellic acid (GA), paclobutrazol, abscissic acid (ABA), daminozide และ picloram

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเหล่านี้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายและเก็บรักษาไว้ในสภาพที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโตจากตัวทำละลายและสภาวะเก็บรักษา

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

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

2.3.6.2.3 สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ สารประกอบพวกน้ำตาลต่างๆ เช่น glucose sucrose fructose saccharose และ mannitol

2.3.6.2.4 กรดอะมิโน ได้แก่ glutamine asparagines adenine glycine และ casein hydrolysate

2.3.6.2.5 สารประกอบอินทรีย์อื่นๆ ส่วนใหญ่ได้จากธรรมชาติ เช่น น้ำมะพร้าว สารสกัดจากยีสต์ น้ำต้มมันฝรั่ง น้ำคั้นมะเขือเทศ กล้วยหอมบด และจากมอลท์สกัด

แม้พืชทุกชนิดโดยปกติต้องการธาตุอาหารหลักที่เหมือนกันก็จริง แต่จะต้องการในปริมาณหรือความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช มีความต้องการที่แตกต่างกันมาก ดังนั้น การเลือกอาหารเพื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชควรคำนึงถึง

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.6.2.5.1 ชนิดและสายพันธุ์ พืชต่างชนิดและสายพันธุ์ ส่วนใหญ่ต่างต้องการธาตุอาหารไม่เหมือนกัน

2.3.6.2.5.2 อายุและระยะการพัฒนา แม้เป็นพืชชนิดและสายพันธุ์เดียวกัน ถ้าอายุและระยะการพัฒนาต่างกัน ก็อาจต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน

2.3.6.2.5.3 ชนิดของชิ้นส่วนพืช พืชชนิดเดียว หรือแม้กระทั่งต้นเดียวกัน แต่ใช้ชิ้นส่วนของพืชส่วนต่างๆ เช่นใช้ส่วนยอดมาเลี้ยงจะต้องใช้สูตรอาหารสูตรหนึ่งที่แตกต่างออกไปจากสูตรที่ใช้เลี้ยงใบหรือราก

2.3.6.2.5.4 เป้าหมายของการเพาะเลี้ยง พืชชนิดเดียวกันและชิ้นส่วนเดียวกัน แต่มีเป้าหมายของการเลี้ยงต่างกัน จำเป็นต้องใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกันด้วย ตัวอย่าง ต้องการเลี้ยงให้เกิดเป็นยอดก็ใช้สูตรอาหารสูตรหนึ่ง ที่แตกต่างไปจากสูตรที่ต้องการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสหรือราก

2.3.6.2.5.5 สถานะของอาหาร ชิ้นส่วนพืชเดียวกันที่เลี้ยงในสภาพอาหารแข็ง (solid medium) อาจได้ผลแตกต่างไปจากการเลี้ยงในอาหารเหลว (liquid medium) หรืออาหารกึ่งแข็ง (semi-solid medium)

2.3.7 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช (อนุรักษ์, 2550)

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

การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เป็นการทำให้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์โดยสารเคมีจะมีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์นั้นตายได้โดยการเข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ระบบการควบคุมสารผ่านเข้าออกเสียไป พร้อมทั้งกรดอะมิโน น้ำ และแร่ธาตุต่างๆภายในก็จะสูญเสียไปด้วย สารเคมีสามารถทำปฏิกิริยากับสารในไซโตพลาสซึม จะมีผลทำให้เกิดการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ หรือสารเคมีสามารถจับกับโปรตีนในเอนไซม์ และโปรตีนเสียสภาพไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ สารเคมีที่ใช้สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อมีจำนวนมากหลายชนิด ซึ่งมีความแตกต่างกัน ดังนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะต้องใช้ดุลยพินิจในการเลือกใช้สารเคมีให้มีความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการ โดยมีแนวทางในการเลือกใช้ดังนี้

2.3.7.1 มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด และมีเปอร์เซ็นต์ความปลอดจุลินทรีย์สูง

2.3.7.2 สารเคมีสามารถออกฤทธิ์ได้รวดเร็ว

2.3.7.3 สามารถละลายหรือผสมกับน้ำได้ง่าย และคงสภาพหลังจากการละลายแล้ว ไม่ควรมีสี และกลิ่นอันไม่พึงประสงค์

2.3.7.4 ราคาไม่แพง และหาซื้อได้ง่าย

2.3.7.5 ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ และไม่เป็นอันตรายต่อชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช

2.3.8 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนของเนื้อเยื่อพืชมีดังต่อไปนี้

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

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

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

2.3.8.4 คลอร็อกซ์ (Clorox) เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้กันโดยทั่วไปตามบ้าน หรือน้ำยาซักผ้าขาวที่มีชื่อทางการค้าว่า ไฮเตอร์ โดยภายในส่วนประกอบของสารเหล่านี้จะมีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 5-15 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 5-20 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

2.3.8.5 สารละลายโบรไมด์ (bromide solution) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 2-10 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

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

2.3.8.7 สารละลายไอโอดีน (iodine solution) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

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

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

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

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.8.11 เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ความเข้มข้นที่ใช้ 70 และ95 เปอร์เซ็นต์ เวลาที่ใช้ประมาณ 1-5 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดีมาก

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

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

2.3.8.14 สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 4-50 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลาที่ใช้ 30-60 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดี

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

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

กิริยา สังข์ทองวิเศษ (2547) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่ว *Stylosanthes hamata* พันธุ์ Verano โดยการชักนำให้เกิด compact callus เพื่อใช้เป็นเนื้อเยื่อสำหรับการถ่ายยีน เริ่มจากเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบ ใบเลี้ยงและ hypocotyl บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D หรือ NAA ความเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิด compact callus มากที่สุด โดยให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 0.26 กรัมต่อชิ้นพืช และเนื้อเยื่อส่วนใบมีแนวโน้มในการชักนำให้เกิด compact callus ได้มากกว่าเนื่อเยื่อส่วนใบเลี้ยง และ hypocotyl การทดลองชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA หรือ kinetin ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 45 วัน พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 9.0 ยอดต่อชิ้นแคลลัส และสามารถชักนำให้เกิดรากได้ 40 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ขนิษฐา บุรมย์ (2547) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของไฮโพคอทิล และใบเลี้ยง (cotyledon) ของถั่วฮามาต้า (*S. hamata*) เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยงนานเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุด คือ 90 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่ได้เกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อน compact callus มีสีเขียวเมื่อนำแคลลัสที่ได้มาชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอยพบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม casein hydrolysate ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติมโต 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอยได้และสามารถชักนำเซลล์แขวนลอยให้เกิดยอดได้บนอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 96.66 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำยอดให้เกิดรากได้บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

อนุรักษ์ และคณะ (2551) การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและการเกิดเป็นต้นใหม่โดยใช้ส่วนของ ไฮโพคอทิลของถั่วดาวาลเคด โดยนำไฮโพคอทิลไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากการทดลองพบว่าไฮโพคอทิลสามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ทุกสูตรอาหาร แต่สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 57.09 ตารางมิลลิเมตร จากนั้นนำแคลลัสมาชักนำให้เกิดเป็นต้น โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า BA ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส 3.5 ยอด สามารถชักนำให้เกิดรากได้ โดยนำยอดมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า IBA ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด โดยมีการพัฒนาเป็นรากได้ 70 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนรากเฉลี่ยต่อต้นเท่ากับ 13.71 ราก และสามารถย้ายออกปลูกลงดินเป็นผลสำเร็จ

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

Dang และ Wei (2008) การเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากข้อใบเลี้ยงของถั่วแขก พบว่าจากการศึกษาส่วนของข้อใบเลี้ยงอายุ 6 วันบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ ให้เกิดยอด สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้นของ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำยอดได้ 71.9 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อนำยอดที่เกิดขึ้นย้ายมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ silver nitrate ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมที่สุดในการชักนำยอดได้ถึง 87.6 เปอร์เซ็นต์การใช้ silver nitrate จะช่วยทำให้เกิดยอดปริมาณสูงขึ้นแต่เมื่อใช้ silver nitrate มากกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะยับยั้งการเกิดยอด การชักนำรากในสูตรอาหารครึ่ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dipankar และคณะ (2006) การศึกษาถั่วลูกไก่ 3 สายพันธุ์ B115, C235 และ ICCV89314 โดยใช้ส่วนใบเลี้ยงเดี่ยวและครึ่งเอ็มบริโอบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดจำนวนมากสูงสุด 26 ยอดต่อชิ้น หลังจากเพาะเลี้ยง 20 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม สามารถยืดต้นสูงขึ้น 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยง 20-25 วัน ของการเพาะเลี้ยง

Firoz และคณะ (2011) การศึกษาระบบการเจริญเติบโตของถั่วปากอ้า (*Vicia faba* L.)โดยใช้ใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีแกนเอ็มบริโอบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 6 ไมโครโมล 2iP ความเข้มข้น 10 ไมโครโมล และ kinetin ความเข้มข้น 4 ไมโครโมล ชักนำยอด 30-50 ยอดต่อชิ้น หลังจากเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์ กระตุ้นความสูงของต้นบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2iP ความเข้มข้น 6 ไมโครโมล และ KIN ความเข้มข้น 2 ไมโครโมล ส่วนการชักนำรากบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมล สามารถเกิดรากได้หลังจากเพาะเลี้ยง 10-14 วัน ต้นสูง 5 เซนติเมตรซึ่งเหมาะสมที่สุดสำหรับการชักนำราก

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

Ian และคณะ (1987) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสของถั่ว *S. scabra* Vog จากส่วนของใบโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5-2 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

Kaviraj และคณะ (2004) การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสและการเจริญเป็นต้นใหม่จากส่วนของใบเลี้ยงของถั่วเขียวผิวมัน (*Vigna radiata* (L.) Wilezek.) สายพันธุ์ TAP – 7 และ Pusa บนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D, 2,4,5 –Trichlorophenoxyacetic acid และ NAA หรือร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.22 – 8.88 ไมโครโมล หรือ kinetin ความเข้มข้น 2.32–9.38 ไมโครโมล พบว่า NAA ความเข้มข้น 79.44 ไมโครโมล เป็นออกซินที่สามารถกระตุ้นให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสได้มากที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย abscisic acid ความเข้มข้น 1.88 ไมโครโมล ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 6.66 ไมโครโมล สามารถเกิดต้นได้ 56.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปย้ายปลูกลงดินมีอัตราการรอดชีวิต 90 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Palanivel และคณะ (2002) การชักนำแคลลัสและการเจริญเป็นต้นใหม่จากส่วนของใบเลี้ยงของถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.) สายพันธุ์ VRI-2 และ VRI-3 ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ IAA ร่วมกับ KIN หรือ BA ในสูตรอาหารที่มีเปอร์เซ็นต์การชักนำแคลลัสมากที่สุดคือสูตรอาหารที่เติม IAA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตรอาหารที่ประกอบด้วย IAA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ NAA ร่วมกับ BA หรือ KIN ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสมีลักษณะคอมแพคแคลลัสสีเขียว เมื่อย้ายแคลลัสไปชักนำต้นในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดมากที่สุด และนำไปชักนำรากด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA และ NAA สามารถชักนำรากได้ถึง 84.3 เปอร์เซ็นต์ การเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ไม่สามารถชักนำรากได้ การย้ายปลูกลงดินมีอัตราการรอดชีวิต 95 เปอร์เซ็นต์

Polisetty และคณะ (1997) การชักนำยอดโดยสารควบคุมการเจริญเติบโต Benzyladenine และการเจริญเป็นต้นใหม่จากเมล็ดของถั่วลูกไก่ (*Cicer arietinum* L.) สายพันธุ์ BG-362 BG-329 BG-267 BG-256 และ C-235 พบว่าสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA น้อยกว่า 7.5 ไมโครโมล สามารถชักนำยอด 2–3 ยอดต่อเมล็ด เมื่อเพาะเลี้ยง 30 วัน สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 75–100 ไมโครโมล สามารถชักนำยอดได้เมื่ออายุ 45–90 วัน และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดให้เกิดราก คือ BA ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 12.5 ไมโครโมล ความเข้มข้นของ BA ที่สูงมีผลยับยั้งต่อการชักนำราก

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

Saleem และคณะ (2011) การชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงของถั่วลูกไก่ (*C.arietinum* L.) สายพันธุ์ KK- 1 และ Hassan-2K บนสูตรอาหาร MS และ B5 ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต จากเปอร์เซ็นต์แคลลัสและ น้ำหนักสดแคลลัส (กรัม) หลังจากเพาะเลี้ยง 2 และ 4 สัปดาห์ ของการเพาะเลี้ยง โดยสายพันธุ์ KK-1 การเกิดแคลลัสบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 5 ไมโครโมล เกิดแคลลัส 71 และ 97 เปอร์เซ็นต์ และบนสูตรอาหาร B5 ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4 -D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม

เอกสารนี้มีการสงวนลิขสิทธิ์ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อลิตร 65 และ 96 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ ในทำนองเดียวกัน น้ำหนักสดแคลลัสบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4 -D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 5 ไมโครโมล มีน้ำหนักสดสูงสุด 0.411 และ 0.787 กรัม และบนสูตรอาหาร B5 ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักแคลลัสสูงสุด 0.401 และ 0.693 กรัม และสำหรับสายพันธุ์ Hassan - 2K ชักนำการเกิดแคลลัสบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดแคลลัส 68 และ 96 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำหนักสด 0.572 และ 0.821 กรัม หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ สำหรับสูตรอาหาร B5 ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4 -D ร่วมกับ BAP สามารถตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสได้

Shagufta และคณะ (2007) ศึกษาความสามารถในการเจริญเป็นต้นโดยตรงจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เช่น ปลายยอดและตาข้างของถั่วลูกไก่ (*Cicer arietinum*) โดยศึกษาสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้นต่างๆ สารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้นต่ำสามารถกระตุ้นการเริ่มเกิดยอดอย่างรวดเร็ว และสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้นสูงจะเริ่มเกิดยอดช้ากว่า เมื่อความเข้มข้นของ BAP สูงขึ้นจำนวนยอดต่อชิ้นจะมากขึ้น แต่ความสูงของต้นนั้นจะลดลง การตอบสนองการเกิดยอดส่วนของตาข้างนั้นดีกว่าปลายยอด ยอดที่เพาะเลี้ยงศึกษาการเกิดรากบนสูตรอาหาร MS และครึ่ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ IBA พบว่าสูตรอาหารครึ่ง MSที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล ชักนำการเกิดรากได้ดีที่สุด

Xuejun และคณะ (2011) การศึกษาการเตริญเป็นต้นใหม่จากใบเลี้ยงของ *Stylosanthes guianensis* sw. cv. 'Reyan 2' โดยอัตราสูงสุดของการชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำใบเลี้ยงเกิดแคลลัสได้ 74 เปอร์เซ็นต์ และสูตร อาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำใบเลี้ยงเกิดแคลลัสได้ 66 เปอร์เซ็นต์ สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอด คือ สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมกรัม และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากได้ 60 เปอร์เซ็นต์ คือ สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดชีวิต 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายออกปลูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การกลายพันธุ์

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

2.5.1 การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) (อรุณี, 2541)

การเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับลำดับของนิวคลีโอไทด์เพียงไม่กี่โมเลกุล เช่นการเพิ่มหรือขาดหายไปของเบสหรือการแทนที่เบสชนิดหนึ่งด้วยเบสชนิดหนึ่ง หรือทำให้ลำดับของเบสบนดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป แบ่งตามการกลายพันธุ์ของยีนได้ 2 ชนิด คือ

2.5.1.1 การกลายแบบเฟรมชิพต์ (frameshift mutation)

เกิดจากการเพิ่มหรือการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ ทำให้ลำดับเบสบน mRNA เกิดการเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้ลำดับกรดอะมิโนบนสายโพลีเปปไทด์เปลี่ยนแปลงไป ทำให้โปรตีนที่สร้างยีนนั้นไม่สามารถทำงานได้เหมือนเดิม หรือทำได้แต่ไม่มีประสิทธิภาพ หรือทำงานไม่ได้เลย

2.5.1.2 การกลายแบบเบสซับสติติวชั่น (base substitution)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการแทนที่คู่เบส เกิดได้ 2 ลักษณะคือ

2.5.1.2.1 ทรานซิชั่น (transition)

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

2.5.1.2.2 ทรานเวอร์ชัน (transversion)

การแทนที่เบสกลุ่มพิวรีน ด้วยเบสกลุ่มไพริมิดีน หรือแทนที่เบสกลุ่มไพริมิดีนด้วยเบสกลุ่มพิวรีน คือ เป็นการแทนที่เบสต่างกลุ่ม

2.5.2 การกลายพันธุ์ของโครโมโซม (chromosome mutation) (อรุณี, 2541)

การเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับยีนหลายยีน เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง หรือจำนวนโครโมโซม แบ่งการกลายของโครโมโซมเป็น 2 ชนิดคือ

2.5.2.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม

ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงเกิดจากการแตกหักของโครโมโซม แล้วมีการเชื่อมต่อกันโดยอาจจะมีชิ้นส่วนขาดหาย (deletion) การขาดหายไปนั้นทำให้ยีนจำนวนหนึ่งหายไปด้วย หรือมีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื่อมอย่างผิดปกติ เช่น มีชิ้นส่วนโครโมโซมเพิ่มขึ้นมา (duplication) การเชื่อมแบบกลับทิศทาง (inversion) หรือการเชื่อมสลับคู่ระหว่างโครโมโซมต่างคู่กัน (translocation) จะมีผลทำให้สิ่งมีชีวิตเกิดการเปลี่ยนแปลงไปได้โดยจะมีผลมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิดของยีนและจำนวนยีนที่เกี่ยวข้อง

2.5.2.2 การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม

การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.5.2.2.1 แอนิวพลอยด์ (aneuploidy) เป็นการเพิ่มขึ้นหรือหลุดหายไปของโครโมโซมทั้งแท่ง เป็นจำนวนหนึ่งหรือมากกว่า 1 โครโมโซมขึ้นไป เช่น สิ่งมีชีวิตที่เป็น ดิพลอยด์ ก็จะมีจำนวนโครโมโซมเปลี่ยนเป็น 2n+1, 2n+2, 2n-1 เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมแบบนี้อาจเกิดได้เองตามธรรมชาติหรือเกิดจากการเหนี่ยวนำ ซึ่งจะมีประโยชน์ในด้านการศึกษาทางเซลล์พันธุศาสตร์

2.5.2.2.2 ยูพลอยด์ (euploid) เป็นการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของโครโมโซมเป็นชุด พืชที่มีเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ประกอบไปด้วยจีโนมครบชุดอย่างน้อย 1 ชุด เรียกว่าพืช โมโนพลอยด์ (monoploid) รวมถึงพืชที่มีจีโนมเพิ่มเป็นผลคูณของชุดจีโนม คือ ดิพลอยด์ (diploid) ทริพลอยด์ (triploid) หรือเรียกรวมๆว่า พอลีพลอยด์ (polyploid)

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

2.5.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืช (สิรนุช, 2540)

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

2.5.3.1 การใช้ประโยชน์โดยตรง คือการนำมาขยายพันธุ์ ส่งเสริมได้ทันที เหมาะสมกับพืชที่มีการปรับปรุงพันธุ์ยังไม่ได้ระดับสูงสุด สามารถเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมได้ง่ายทำให้ได้ จีโนไทป์ใหม่ๆ ออกมาและนำไปใช้เป็นพันธุ์ใหม่ได้โดยตรง ระยะเวลาได้พันธุ์ใหม่จึงค่อนข้างสั้น

2.5.3.2 การใช้ประโยชน์ทางอ้อม พันธุ์กลายที่มีลักษณะที่น่าสนใจ แต่ยังไม่ดีพอที่จะนำมาขยายพันธุ์โดยตรง เนื่องจากยังมีลักษณะอื่นๆ ที่ไม่ต้องการอยู่ด้วย โดยถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการเข้าไปยังพืชที่ต้องการปรับปรุง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การกลายพันธุ์ที่เกิดโดยไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด เรียกว่าการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติซึ่งมีอัตราการเกิดที่ต่ำ วิธีการต่างๆ ที่นำมาชักนำให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์มากขึ้น เช่น การชักนำให้กลายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสี การชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี

2.5.4 การชักนำให้กลายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (อรุณี, 2550)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยชักนำให้เกิดแคลลัสหรือเลี้ยงในสภาพที่เป็นเซลล์แขวนลอย เมื่อกลุ่มเซลล์มีการพัฒนาไปเป็นต้นพืช พบว่า พืชที่เกิดขึ้นใหม่มีลักษณะแตกต่างกันออกไป ซึ่งไม่ปรากฏพันธุ์เดิม บางลักษณะสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ แสดงว่าได้เกิดการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมขึ้น ลักษณะความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เรียกว่า โซมาโคลนอลแวริเอชัน (somaclonal variation) สามารถคัดเลือกลักษณะที่ดีไปใช้ในการสร้างพันธุ์ใหม่ได้ การเกิดแปรผันทางพันธุกรรมในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง มีการเกิดได้มากน้อยขึ้นอยู่กับวิธีการเพาะเลี้ยง และระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงโดยผ่านแคลลัสหรือผ่านสภาพที่เป็นเซลล์แขวนลอย ทำให้ต้นพืชที่เกิดมามีการแปรผันทางพันธุกรรมสูง ยิ่งเวลาที่ใช้การเลี้ยงตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงระยะที่เป็นต้นพืชใช้เวลานาน ยิ่งมีโอกาสทำให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรมสูงขึ้น การแปรผันที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงมีแหล่งที่มา 3 แหล่งคือ

2.5.4.1 การแปรผันทางพันธุกรรมเกิดอยู่แล้วในเนื้อเยื่อที่ใช้เพาะเลี้ยง

2.5.4.2 การแปรผันทางพันธุกรรม เกิดจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง มีคุณสมบัติเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์

2.5.4.3 การแปรผันเกิดจากการตอบสนองของจีโนมพืชต่อความเครียด (stress) ต่างๆที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดในสภาพของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาพที่เป็นเซลล์แขวนลอย หรือสภาพที่เป็นแคลลัส เซลล์ทุกเซลล์มีโอกาสเกิดเป็นต้นใหม่ได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็น โททิโพเทนต์ (totopotent) หากนำเซลล์เหล่านี้มาเลี้ยงในอาหารที่ใส่สารที่ช่วยในการคัดเลือก (selective agent) เพื่อให้ได้ลักษณะที่เฉพาะเจาะจงสารดังกล่าวอาจเป็นทอกซิน (toxin) สารป้องกันกำจัดวัชพืช กรด หรือเกลือเพื่อคัดเลือกพืชที่สามารถทนเค็ม หรือสารพวกออสโมติคัม (osmoticum) บางชนิด เช่น โพลีเอทธีลีนไกลคอน (polyethylene glycol) หรือพีอีจี (PEG) น้ำตาลแมนนิทอล(mannitol) และ ซอลบิทอล (sorbitol) เป็นต้น โดยสารเหล่านี้จะทำหน้าที่ลดแรงดันออสโมซิส (osmotic potential) ของสารละลายที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ ทำให้เซลล์อยู่ในสภาพที่ขาดน้ำ เพื่อคัดเลือกพืชที่ทนแล้ง เซลล์ที่รอดชีวิตคือเซลล์ที่มีการเกิดความแปรผันทางพันธุกรรม ทำการชักนำเซลล์เหล่านี้ให้พัฒนาเป็นต้นแล้วนำพืชที่คัดเลือกได้ออกปลูกทดสอบในเรือนปลูกพืชทดลอง (green house) เพื่อคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ หากลักษณะความทนทานต่อสารที่ช่วยในการคัดเลือกยังคงอยู่ ก็จะได้พืชพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหม่ที่เป็นประโยชน์ออกมา เช่น พืชทนเค็ม ทนแล้ง ทนต่อโรค ทนต่อสารกำจัดวัชพืช โอกาสของการได้ลักษณะที่พึงประสงค์มีมากขึ้น เนื่องจากเกี่ยวข้องกับเซลล์เป็นล้านๆเซลล์ และการใช้สารที่ช่วยคัดเลือก ที่จำเพาะเจาะจงทำให้การคัดเลือกลักษณะต่างๆได้ตามประสงค์มากขึ้น (สิรนุช, 2540)

2.5.5 การชักนำให้เกิดกลายพันธุ์ด้วยรังสี (สิรินุช, 2541)

การกลายพันธุ์ในธรรมชาติมีอัตราการเกิดที่ต่ำ ในขณะที่การใช้สารเคมีหรือรังสีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์สามารถเกิดได้ในอัตราที่สูงกว่า การชักนำเพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ที่นิยมทำกันคือการชักนำด้วยรังสี

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

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

รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) คือรังสีที่มีพลังงานสูงพอที่จะทำให้เกิด คู่ไอออนในตัวกลางที่รังสีผ่านไป โดยทำให้อะตอมหรือโมเลกุล (กลุ่มของอะตอม) เกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน หรือได้อิเล็กตรอนเพิ่มขึ้นมา หากเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน ก็จะกลายเป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่มีประจุบวกหรือลบดังกล่าวว่า ไอออน ได้แก่ รังสี แอลฟา รังสีบีตา รังสีแกมมา รังสีเอกซ์ และอนุภาคนิวตรอน เป็นต้น

รังสีแกมมาเป็นรังสีที่ได้รับความนิยม เพื่อใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชมากกว่ารังสีเอกซ์ เนื่องจากมีวิธีการฉายไม่ยุ่งยาก ไม่มีรังสีตกค้างอยู่ในพืชซึ่งจะไม่เป็นอันตรายแก่ผู้ที่นำพืชไปปลูก

2.5.5.1 ผลของเซลล์พืชเมื่อได้รับรังสี

เมื่อเซลล์พืชได้รับรังสี หรืออนุภาคนิวตรอน รังสีหรืออนุภาคจะถ่ายพลังงานให้กับโมเลกุลต่างๆของเซลล์ ในกระบวนการถ่ายทอดพลังงาน ทำให้โมเลกุลที่ได้รับพลังงานแตกตัวเป็นไอออน (iron) และฟรีเลดิคอล (free radical) ต่างๆจะมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลใหม่ มีการทำปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างกัน เกิดเป็นโมเลกุลที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างไปจากเดิม (สิรนุช, 2540) รังสีทำให้อะตอมต่างๆ ภายในเซลล์เกิดการแตกตัวเป็นไอออน โดยเฉพาะการเกิด chemical radicals ที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีขึ้นภายในเซลล์ ทำให้อาจทำให้เกิดความเสียหายต่อการทำหน้าที่ต่างๆของเซลล์ เซลล์พืชที่ได้รับความเสียหายจากรังสีและเกิดการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลทางพันธุกรรมได้คือ เซลล์เนื้อเยื่อเจริญ (meristematic cells) ที่อยู่ส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่างๆของพืช มีความสามารถในการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ ซึ่งภายในเซลล์จะมีชีวโมเลกุลที่สำคัญ คือ ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic :DNA) โดยผลของรังสีจะทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป ดังนี้

2.5.5.1.1 เกิดการสลายตัวของพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ที่เชื่อมระหว่างคู่เบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ

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

2.5.5.1.3 เกิดการแตกหักที่พันธะโควาเลนท์ (covalent bond) อื่นๆของดีเอ็นเอ

2.5.5.1.4 เกิด cross linkage ระหว่างสายและภายในสายของดีเอ็นเอ

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

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

2.5.5.2 ผลที่เกิดขึ้นกับเซลล์ภายหลังการได้รับรังสี

ความผิดปกติต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ภายหลังการได้รับรังสี จะส่งผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์ เช่น อาจมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ต่างๆ กระบวนการเมแทบอลิซึม กระบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งจะส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ การเปลี่ยนแปลงจะเกิดมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับ ปริมาณรังสีที่ได้รับ ชนิดของเซลล์เป็นต้น โดยการแบ่งเซลล์นั้น อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลต่อเซลล์ได้ดังนี้

2.5.5.2.1 เซลล์ตายทันทีในขณะได้รับรังสี

2.5.5.2.2 เซลล์ที่ได้รับรังสีอาจมีการแบ่งเซลล์ได้ระยะหนึ่ง หรือไม่มีการแบ่งเซลล์เลยแต่มีชีวิตอยู่ได้ระยะหนึ่ง หลังได้รับรังสีแล้วจึงตาย

2.5.5.2.3 เซลล์มีชีวิตอยู่ต่อไปได้ แต่ไม่มีการแบ่งเซลล์ได้อีก

2.5.5.2.4 เซลล์มีชีวิตอยู่และสามารถแบ่งเซลล์ต่อไปได้ แต่การแบ่งเซลล์ในระยะแรกๆหลังได้รับรังสีแล้ว จะช้าลงบ้าง (อรุณี, 2541)

2.5.5.3 วิธีการฉายรังสี

การจะฉายรังสีแบบใดขึ้นอยู่กับวัตถุ ตัวอย่างพืช และความพร้อมของอุปกรณ์การฉายรังสี การฉายรังสีกับตัวอย่างพืชทำได้ 2 วิธีคือ

2.5.5.3.1 การฉายรังสีแบบเฉียบพลัน (Acute irradiation) คือ การให้รังสีโดยใช้อัตรารังสีและปริมาณรังสีสูงๆ และสิ้นสุดการฉายในระยะเวลาสั้นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.5.3.2 การฉายรังสีแบบเรื้อรัง (Chronic irradiation) คือ การให้รังสีโดยใช้อัตรารังสีและปริมาณรังสีต่ำๆ และใช้เวลาในการฉายรังสีเป็นระยะเวลานานๆ เช่น เป็นสัปดาห์หรือเป็นเดือน

2.5.5.4 การหาปริมาณรังสีที่เหมาะสม

เนื่องจากพืชต่างชนิดกัน จะมีความไวต่อรังสีที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการจะใช้รังสีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง จะต้องทราบปริมาณรังสีที่เหมาะสมที่จะใช้กับพืชชนิดนั้นๆเสียก่อน ปริมาณรังสีที่เหมาะสมอาจทำการศึกษาจากรายงานผลงานวิจัย หรือแนะนำโดยทบวงการพลังงานปรามาณูระหว่างประเทศ หรือนักวิจัยเองสามารถทำการทดลองเบื้องต้น เพื่อหาปริมาณรังสีที่เหมาะสมได้ เช่นทำการหาค่า LD50 (50% Lethal Dose) คือค่าที่ทำให้พืชมีอัตราการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ ค่า GR50 (50% growth reduction) คือค่าที่ทำให้อัตราการเจริญลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (อรุณี, 2530)

2.5.5.5 การเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี (สมพร, 2547)

2.5.5.5.1 เบส แอนนาลอก (Base analogues) เป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายเบส สามารถเข้าไปในโมเลกุลของดีเอ็นเอและแทนที่เบสปกติด้วยกระบวนการพอลิเมอไรเซชั่น ตัวอย่างของสารที่มีคุณสมบัติเป็นเบสแอนนาลอก เช่น 5-Bromouracil (Bu) และ 2-Aminopurine (AP) กลไกที่ทำให้เกิดการกลายของสารทั้งสองแตกต่างกันเล็กน้อย Bu จะมีโครงสร้างคล้ายไทมีน ทำให้ไปแทนที่ ไทมีนในขณะที่มีการจำลองดีเอ็นเอในรอบแรก ทำให้ Bu เกิดเทอโทเมอไรเซชั่น (tautomerization) ทำให้ Bu ในรูปคีโต (keto form) เปลี่ยนมาอยู่ในรูปของอีนอล (enol form) เป็นผลให้ Bu สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ G ได้ (ภาพที่ 2.5) ทำให้เบสคู่สมเปลี่ยนจาก AT เป็น GBu ในการถ่ายแบบดีเอ็นเอครั้งต่อมา G จะจับกลับ C ทำให้มีการเปลี่ยนเบสคู่สมจาก AT เป็น GC นอกจากนี้ Bu ยังสามารถทำให้เบสคู่สมเปลี่ยนจาก GC เป็น AT โดยที่ Bu จะถูกบรรจุในสายดีเอ็นเอขณะมีการจำลองโมเลกุล ทำให้ Bu มีโครงสร้างคล้ายไซโทซีนมากกว่าไทมีนจึงจับกับ G และ Bu จะเปลี่ยนรูปเป็นคีโต ทำให้จับกับ A ในรอบต่อมาจึงเกิดการแทนที่คู่เบสจาก GC เป็น AT สำหรับสาร AP ก่อให้เกิดการกลายโดยเข้าไปแทนที่อะดีนีนทำให้จับกับ T และ AP อาจจับกับ C

2.5.5.5.2 สารอินเทอคาเลทติ้ง (intercalating agents) เป็นสารที่สามารถสอดแทรกเข้าไปอยู่ระหว่างเบส เรียกกระบวนการนี้ว่า อินเทอคาเลชัน (intercalation) สารพวกนี้ได้แก่ สาร acridine orange และ proflavin เป็นต้น เมื่อสารแทรกเข้าไปอยู่ระหว่างเบสสองตัวในสายดีเอ็นเอทำให้เกิดการผิดพลาดในขณะที่มีการจำลองโมเลกุล กล่าวคือ อาจมีการเพิ่มเบสตัวหนึ่งในสายดีเอ็นเอใหม่หรือบางครั้งเกิดการขาดเบสไป 1 ตัว ทำให้เกิดการเปลี่ยน reading frame ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เรียกว่า เฟรมชิพท์ เพราะลำดับของเบสจะถูกอ่าน เป็น 3 เบส เมื่อเกิดการเพิ่มหรือลดของเบสจะทำให้ลำดับของกรดอะมิโนในสภาพพอลิเปปไทด์ผิดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.5.5.3 สารแอลคิเลติ้ง (Alkylating agents) เป็นสารประกอบที่สามารถเข้าไปเปลี่ยนเบสที่อยู่ในดีเอ็นเอ โดยสารพวกนี้จะเติมหมู่แอลคิล (alkyl group) ที่อะตอมของกัวนีนและไทมีนทำให้สร้างพันธะไฮโดรเจนของเบสทั้ง 2 เปลี่ยนไป มีผลทำให้เกิดการจับคู่ของเบสคู่สมผิดไป G จับกับ T เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบทรานซิชันจาก GC เป็น AT หรือ AT เป็น GC ตัวอย่างของสารพวกนี้ได้แก่ เอทิลมีเทน ซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate) เรียกย่อว่า EMS มีสูตรโมเลกุลเป็น $CH_3SO_3CH_2CH_3$ และเอทิล อีเทน ซัลโฟเนต (ethyl ethane sulfonate) เรียกย่อว่า EES มีสูตรโมเลกุลเป็น $CH_3CH_2SO_3CH_2CH_3$ EES เป็นสารที่ทำให้เบสเพียวรีนขาดหายไปจากเส้นหนึ่งของดีเอ็นเอทำให้เกิดช่องว่างในขณะที่มีการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ เบสชนิดใดชนิดหนึ่งจะเข้าไปแทนที่เมื่อสิ้นสุดการถ่ายแบบจะทำให้ GC เปลี่ยนเป็น AT TA CG หรือ GC ซึ่ง TA และ GC เป็นการเปลี่ยนแปลงแบบทรานสเวอชัน

2.5.5.5.4 สารดีอะมิเนติ้ง (Deaminating agents) เป็นสารที่ทำให้หมู่อะมิโนหลุดออกจากเบส สารพวกนี้ได้แก่ กรดไนตรัส (Nitrous acid) และ ไฮดรอกซีลามีน (hydroxylamine) กรดไนตรัสมีสูตรโมเลกุลเป็น HNO_2 จะเปลี่ยนหมู่อะมิโน ให้เป็นรูปคีโต ดังนั้น ไซโทซีน อะดีนีน และกัวนีนจะถูกเปลี่ยนเป็นยูเรซิล (U) ไฮโพแซนทีน (hypoxanthine หรือ HX) และ แซนทีน (xanthine หรือ X) ตามลำดับ เบสเหล่านี้สามารถจับคู่กับเบสอื่น กล่าวคือ UA HXC และ XC การเปลี่ยนแปลงคู่เบสจึงเป็น CG เปลี่ยนไปเป็น TA และ AT เป็น GC ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงเป็นแบบทรานซิชันซึ่งเป็นไปได้สองทิศทาง (ภาพที่ 2.10) ไฮดรอกซีลามีน มีสูตรโมเลกุลเป็น NH_2OH จะทำปฏิกิริยากับไซโทซีน โดยจะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนที่ตำแหน่งที่ 4 ของไซโทซีนได้เป็นไฮดรอกซีไซโทซีน สามารถจับคู่กับอะดีนีน ทำให้คู่เบส CG เปลี่ยน TA เป็นการเปลี่ยนแปลงแบบทรานซิชัน (ทิศทางเดียว)

2.6 การปรับปรุงพันธุ์พืชวงศ์ถั่วโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

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

ตีรณา อุทุมพฤกษ์พร (2551) ศึกษาอาหารสูตรที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้ข้อของหญ้าแพงโกล่าเกิดยอดหลายยอด คืออาหารสูตร MS ที่เติม BAP 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดหลายยอดเฉลี่ยคือ 13.05 ยอดต่อข้อ หลังจากนำยอดหญ้าแพงโกล่าไปฉายรังสีแกมมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบเฉียบพลันที่ปริมาณ 0 20 40 60 80 และ 100 เกรย์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 94.21 89.56 85.71 76.47 และ 89.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นสามารถหาค่าปริมาณรังสีที่ทำให้เกิดการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD50) ได้เท่ากับ 80.9 เกรย์ นำต้นหญ้าที่รอดชีวิตจากการฉายรังสีไปเลี้ยงบนอาหารชักนำรากเพื่อให้ได้ต้นที่แข็งแรง มีรากมาก พบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้ต้นหญ้าแพงโกล่าเกิดรากได้มากที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่ใส่ถ่านปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปกรณ์ ตั้งปอง (2552) นำต้นอ่อนเพาะเลี้ยงอนูเบียสคอนเจนซิส (*Anubias congensis* N.E. Brown) มาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 0 20 40 60 80 และ100 เกรย์ หลังจากฉายรังสี 60 วัน พบว่า เมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงขึ้น โดยมีค่า LD50เท่ากับ 32.12 เกรย์ และจำนวนยอดต่อต้น จำนวนใบต่อต้น และจำนวนรากต่อต้น ในรุ่น M1V1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับลักษณะการเปลี่ยนแปลงหลังจากฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่เกิดขึ้นในรุ่น M1V1 ที่สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่น M1V3 ได้แก่ ลักษณะขอบใบหยัก ใบแคบ ใบด่าง และต้นแคระ ส่วนการนำต้นอ่อนเพาะเลี้ยงไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันโดยการฉายครั้งเดียว และแบ่งฉาย 2 ครั้ง พบว่าที่ปริมาณรังสีรวม 15 และ 20 เกรย์ ต้นอ่อนที่ผ่านการฉายรังสีครั้งเดียวมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงเมื่อเทียบกับต้นอ่อนที่ที่ผ่านการฉายรังสีแบบแบ่งฉาย 2 ครั้ง ส่วนเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของลักษณะต่างๆ ที่พบในรุ่น M1V1 ในกลุ่มที่ฉายรังสีครั้งเดียวจะมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงสูงกว่า

ปิยนันท์ และคณะ (2554) ศึกษาชักนำให้เกิดการกลายในทานตะวันลูกผสม (*Helianthus annuus)* โดยการฉายรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้ทานตะวันลูกผสมชั่วที่ 1 พันธุ์โอเปรา โดยชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก (multiple shoot) ด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ BA และ TDZ ความเข้มข้นต่างๆ ก่อนนำไปฉายรังสีแกมมาในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดทานตะวันพันธุ์โอเปราคือสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มจำนวนยอดได้เฉลี่ย 6.67 ยอด นำยอดเหล่านี้ไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันปริมาณรังสี 0, 1, 2, 3 และ 4 Krad และได้ทดลองฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันให้กับเมล็ดที่ปริมาณรังสี 0, 12, 13 และ 14 Krad แล้วนำเมล็ดมาเพาะในสภาพปลอดเชื้อในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าเมล็ดทานตะวันพันธุ์โอเปราที่ได้รับปริมาณรังสี 13 Krad มีการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD 50) ส่วนปริมาณรังสีที่ทำให้ยอดทานตะวันตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านการฉายรังสีมาแล้ว 60 วันคือ 2.69 Krad

มณฑา (2535) ได้นำเมล็ดถั่วเหลืองมาปลูกคัดเลือกให้ต้านทานโรคราสนิมในฤดูฝนปี 2532-2536 ที่ อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่ คัดเลือกได้เพียง 1 สายพันธุ์ คือ CM60-10kr-71 เป็นสายพันธุ์ที่ได้มาจากพันธุ์เชียงใหม่ 60 ฉายรังสีแกมมา 100 เกรย์ โรคราสนิมที่ทำให้ผลผลิตถั่วเหลืองลดลงนั้นสาเหตุสำคัญคือโรคทำให้ขนาดเมล็ดเล็กลง สายพันธุ์ CM60-10kr-71 มีพื้นที่ใบที่เป็นโรคในระดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่ำ (1-6 เปอร์เซ็นต์) และผลผลิตลดลง เนื่องจากการเป็นโรค 0-17 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พันธุ์ สจ.5 และเชียงใหม่ 60 ผลผลิตลดลง 37-34 เปอร์เซ็นต์ และ 12-41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ศรัณย์ สุขวัฒน์ (2551) การศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยนำเซลล์แขวนลอยไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณ 0-100 เกรย์ พบว่าปริมาณรังสีที่ทำให้เซลล์แขวนลอยมีเปอร์เซ็นต์การตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 78.04 เกรย์ จากนั้นย้ายต้นที่พัฒนาจากเซลล์แขวนลอยที่รอดชีวิตออกปลูกเพื่อศึกษาเป็นเวลา 45 วัน พบว่าความสูงของต้น และความยาวเฉลี่ยของใบหญ้าไนล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นจากนั้นนำเทคนิคอาร์เอพีดีมาใช้ในการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุ์กรรมระหว่างต้นควบคุมกับต้นที่กลายพันธุ์ จากการทดสอบพบว่า สามารถนำเทคนิคอาร์เอพีดีมาตรวจสอบการกลายพันธุ์ของหญ้าไนล์ได้

ศุภชัย และคณะ (2534) นำเมล็ดพันธุ์ของถั่วเหลือง 8 พันธุ์ต่อสายพันธุ์ มาฉายรังสีแกมมาพันธุ์ละ 3 ระดับ เมื่อปี 2530 ผลการคัดเลือกในชั่วที่ 4-5 ในฤดูฝนปี 2533-34 ที่ อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่ โดยมีการปลูกเชื้อในสภาพไร่ คัดเลือกได้เพียง 1 สายพันธุ์ ที่ไม่พบอาการของโรคบนฝัก และมีเชื้อติดไปกับเมล็ดเพียง 6 เปอร์เซ็นต์

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

Wongpiyasatid และคณะ (2000) และ สุมนา และคณะ (2547) นำเมล็ดถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 และชัยนาท 36 ส่วนหนึ่งไปฉายรังสีแกมมาอัตรา 500 เกรย์ และอีกส่วนหนึ่งแช่ในสารเคมี EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ดำเนินการตั้งแต่ปี 2538-40 ได้ 32 สายพันธุ์ ที่ต้านทานโรคราแป้ง และใบจุด จึงนำเข้าเปรียบเทียบผลผลิตตั้งแต่ปี 2541–46 พบว่า สายพันธุ์กลายที่ให้ผลผลิตสูงและมีเสถียรภาพ ได้แก่ M 5-5, M 5-1 และ M 4-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลโดยเทคนิคอาร์เอพีดี

การกลายพันธุ์เป็นกระบวนการให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเห็นได้จากการที่ลำดับนิวคลีโอไทด์บางช่วงของดีเอ็นเอจีโนม หรือจีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA) มีความแปรผัน (variation) อาจเป็นได้ทั้งในส่วนที่เป็นยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน ส่วนที่เป็นยีนคือส่วนของดีเอ็นเอที่กำหนดการสร้างโปรตีนซึ่งจะมีผลลักษณะฟีโนไทป์ (phenotype) โดยอาจแสดงลักษณะที่แตกต่างออกมาที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หรือในส่วนที่ไม่ใช่ยีน คือส่วนของดีเอ็นเอที่ไม่กำหนดการสร้างโปรตีน ซึ่งจะไม่ปรากฏความแตกต่างทางฟีโนไทป์ของสิ่งมีชีวิตทั้งๆ ที่มีความแปรผันในระดับดีเอ็นเอ ดังนั้นการตรวจความแปรผันได้นั้นต้องตรวจสอบถึงในระดับโมเลกุล (อมรา, 2540) ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้วิธีเครื่องหมายโมเลกุลนั้นแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ Hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุล ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการจะตรวจสอบ โดยเทคนิคที่นำมาใช้คืออาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphism : RFLP) เป็นต้น ส่วน PCR based marker เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลที่พัฒนาขึ้น โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณหรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยปฏิกริยาลูกโซ่จำลองดีเอ็นเอ หรือ เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR) ตัวอย่างได้แก่ เทคนิค อาร์เอพีดี (Restriction Amplified Polymorphic : RAPD) หรือเทคนิคเอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism : AFLP) (William และคณะ, 1990)

เทคนิคอาร์เอพีดี พัฒนามาจากการทำพีซีอาร์ เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบด้วยไพรเมอร์ขนาดสั้นๆเพียงไพรเมอร์เดียว มีขนาดประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ แทนการใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ทราบลำดับเบส การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนั้นทำในสภาวะ low stringency คือ annealing ที่อุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ที่ตำแหน่งของสายดีเอ็นเอ (Welsh และ Mecleland, 1990) โดยจะเกาะกับดีเอ็นเอในตำแหน่งที่เป็นเบสคู่สมตลอดจีโนมแบบสุ่ม ไพร์เมอร์ที่เกาะในทิศทางตรงข้าม และมีระยะห่างที่เหมาะสม จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบได้ หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มแล้วสามารถแยกขนาดดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสและตรวจดูแถบดีเอ็นเอที่ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ภายใต้แสงอัตราไวโอเลต อาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการจัดและจำแนกสายพันธุ์ในเบื้องต้น ทั้งนี้เนื่องจากเทคนิคอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่ง่าย มีความสะดวกและรวดเร็วในการปฏิบัติงานและการตรวจสอบผล (Grattapaglia และ Sederoff, 1994; สุรินทร์, 2545) มีรายงานวิจัยที่ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีมาตรวจสอบการกลายพันธุ์ของพืชที่เกิดจากการชักนำด้วยรังสีหรือความแปรผันทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 พันธุ์ของถั่วอาหารสัตว์

3.1.1.1 ถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade

3.1.1.2 ถั่วฮามาต้า *Stylosanthes hamata* cv. Verano

ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ จังหวัดปทุมธานี

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอรอกซ์ สารเปียกใบ (tween-20)

3.1.2.2 อาหารผงสำเร็จสูตรอาหาร Murashige และ Skoog (1962); Phyto Technology Laboratories

3.1.2.3 ผงวุ้นเจลแลนกัม; Phyto Technology Laboratories

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

3.1.2.5 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธี CTAB

3.1.2.5.1 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

3.1.2.5.2 2X CTAB buffer

3.1.2.5.3 Chloroform : isoamyl alcohol

3.1.2.5.4 β mercaptoethanol; GE Healthcare Bio –science AB

3.1.2.5.5 10% CTAB

3.1.2.5.6 Isopropanol

3.1.2.5.7 แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์; องค์การสุรา กรมสรรพสามิต

3.1.2.5.8 RNase A ; Vivantis

3.1.2.5.9 สารละลายบัฟเฟอร์ TBE (TBE buffer)

3.1.2.5.10 น้ำปราศจากไอออน (deionize H_2O)

3.1.2.5.11 สารละลาย ethylene diamine tetraacetate (EDTA)

3.1.2.6 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคอาร์เอพีดี

3.1.2.6.1 Mix dNTPs; Vivantis

3.1.2.6.2 ไพรเมอร์ (primer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2.6.3 $MgCl_2$

3.1.2.6.4 Tris-borate-EDTA (TBE buffer)

3.1.2.6.5 เอนไซม์ *Tag* DNA polymerase

3.1.2.6.6 KCl

3.1.2.6.7 Tris-Hcl

3.1.2.7 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิส

3.1.2.7.1 อะกาโรสเจล (agarose gel)

3.1.2.7.2 สารละลายบัฟเฟอร์ TBE (TBE buffer)

3.1.2.7.3 สีย้อม (loading dye); Vivantis

3.1.2.7.4 สารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide); Vivantis

3.1.2.7.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 100 คู่เบส; Vivantis

3.1.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

3.1.3.1 สารในกลุ่มออกซิน (auxins)

3.1.3.1.1 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); Fluka

3.1.3.1.2 a-naphthaleneacetic acid (NAA); SIGMA

3.1.3.1.3 indole-3-butyric acid (IBA); SIGMA

3.1.3.2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinins)

3.1.3.2.1 N6-benzylaminopurine (BA); SIGMA

3.1.3.2.2 TDZ (Thidiazuron); Riede-de Haen

3.1.3.3 สารในกลุ่มจิบเบอเรลลิน

3.1.3.3.1 gibberellic acid (GA_3); SIGMA

3.1.4 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

3.1.4.1 บีกเกอร์ (beaker); Kartell

3.1.4.2 จานแก้ว (petri dish); ANUMBRA

3.1.4.3 ปากคีบ (forcept); AMICO Germany stainless

3.1.4.4 มีดผ่าตัด (knives); Dura

3.1.4.5 ช้อนตักสาร (spectula)

3.1.4.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.4.7 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและหยาบ (balance); AG204, Metler Toledo

3.1.4.8 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter); Eutech Instruments Pa 510, cyberscan

3.1.4.9 ตู้อบความร้อน (hot air oven); Contherm Thermotec 2000

3.1.4.10 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave); SX-500, Tomy kogyo Co.Ltd

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4.11 ไมโครปิเปตต์ (micropipette)

3.1.4.12 ทิปขนาดต่างๆ (tip)

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

3.1.4.14 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath); Heto CBN 28-30

3.1.4.15 กระดาษฟรอยด์ (aluminium foil); DIAMOND

3.1.4.16 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge); Hettich Mikro 22R

3.1.4.17 กระบอกตวง (cylinder)

3.1.4.18 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (bottle); Wellgrow Glass Industry Co.Ltd

3.1.4.19 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow); Faster BHA 48

3.1.4.20 เครื่องเขย่า (shaker); Innova 2000, New Brunswick Scientific

3.1.4.21 กระดาษกรองแบคทีเรียขนาด 0.2 ไมครอน; Whatman

3.1.4.22 อุปกรณ์การกรองแบคทีเรีย

3.1.4.23 เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)

3.1.4.24 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer); Eppendorf

3.1.4.25 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle); Eppendorf

3.1.4.26 เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (vortex mixer); Scientific Industries

3.1.4.27 ตู้เย็น 4 และ -20 องศาเซลเซียส (refrigerator)

3.1.4.28 ไมโครเวฟ (microwave oven)

3.1.4.29 โกร่งบดยา (mortar and pestle)

3.1.4.30 อุปกรณ์อื่นๆ

3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.2.1 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดให้เกิดยอดจำนวนมาก

3.2.1.1 ถั่วคาวาลเคด

คัดเลือกเมล็ดถั่วคาวาลเคดที่มีความสมบูรณ์มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวนอกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์นาน 2–3 นาที จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบ จำนวน 1-2 หยด เขย่าตลอดเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ซับเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วลงบนทิชชูปลอดเชื้อ นำเมล็ดวางบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการทดลอง โดยบันทึก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะการพัฒนาของแคลลัสและการเกิดยอดอ่อนใช้เวอร์เนียร์วัดความสูงสูงสุดของยอด จำนวนยอดและลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นและคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเจริญเป็นยอดทุกๆ 2 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ (completely randomized design) CRD ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 เมล็ด วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี HSD Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

3.2.1.2 ถั่วฮามาต้า

คัดเลือดเมล็ดถั่วฮามาต้าที่มีความสมบูรณ์มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวนอกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์นาน 2–3 นาที จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ที่เติมสารเปียกใบ จำนวน 1-2 หยด เขย่าตลอดเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ซับเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วลงบนทิชชูปลอดเชื้อนำเมล็ดวางไปบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองโดยบันทึกลักษณะการพัฒนาของแคลลัสและการเกิดยอดอ่อนใช้เวอร์เนียร์วัดความสูงสูงสุดของยอด จำนวนยอดและลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นและคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเจริญเป็นยอดทุกๆ 2 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 เมล็ด วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี HSD Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

3.2.2 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของถั่วคาวาลเคด

คัดเลือกเมล็ดถั่วคาวาลเคดที่มีความสมบูรณ์มาล้างด้วยน้ำสะอาด แช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2–3 นาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ที่เติมสารเปียกใบ (tween-20) จำนวน 1-2 หยด เขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ซับเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วลงบนทิชชู่ปลอดเชื้อ นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นต้นอ่อนบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 วัน นำส่วนของใบเลี้ยงที่สมบูรณ์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกจำนวนการเกิดแคลลัส ลักษณะของแคลลัส และชั่งน้ำหนักสดของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคลลัสในอาหารแต่ละสูตรทุกๆ 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ชิ้นใบเลี้ยง วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี HSD Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

3.2.3 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

นำแคลลัสถั่วคาวาลเคดจากการทดลองที่ 3.2.2 และถั่วฮามาต้าที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.1.2 น้ำหนักสด 0.5 กรัม มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4–D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ทำการแยกแคลลัสโดยใช้ช้อนโลหะกดให้เซลล์กระจายตัวออกจากกัน เซลล์จะหลุดออกเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยทุก 3 วันในช่วง 0-30 วัน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ในแต่ละช่วงเวลาเมื่อเพาะเลี้ยงถึงเวลาตามกำหนด นำเซลล์แขวนลอยมาหาน้ำหนักสด โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (ที่ผ่านการอบ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง) ด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ และต่อเครื่องดูดอากาศเป็นเวลา 1 นาที ชั่งน้ำหนักสด นำเซลล์มาอบที่ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักแห้งและจดบันทึก (อนุรักษ์, 2550) และศึกษาการมีชีวิตของเซลล์แขวนลอย โดยย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (FDA) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ เซลล์ที่มีชีวิตจะมีสีเขียวเรืองแสง (Dixon, 1991)

3.2.4 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่

3.2.4.1 ถั่วคาวาลเคด

นำแคลลัสของถั่วคาวาลเคดจากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงจากอาหารสูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 5 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกลักษณะการพัฒนาของแคลลัสในการเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวและการเกิดยอดอ่อนใช้เวอร์เนียร์วัดความสูงของยอด จำนวนยอดและลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นและคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเจริญเป็นยอดทุกๆ 2 สัปดาห์ วางการทดลองแบบ CRD การทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ชิ้นแคลลัส วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี HSD Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

3.2.4.2 ถั่วฮามาต้า

นำแคลลัสของถั่วฮามาต้าจากการเพาะเลี้ยงยอดจำนวนมากจากอาหารสูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.2.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 5 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกลักษณะการพัฒนาของแคลลัสในการเกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวและการเกิดยอดอ่อนใช้เวอร์เนียร์วัดความสูงของยอด จำนวนยอด และลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นและคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเจริญเป็นยอดทุกๆ 2 สัปดาห์ วางการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ชิ้นแคลลัส วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี HSD Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

3.2.5 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำต้นจากแคลลัสให้มีลักษณะยืดยาว

นำแคลลัสที่พัฒนาต้นจากการทดลองที่ 3.2.3 อายุ 12 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 0 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกลักษณะการพัฒนาของแคลลัสเกิดยอดและความสูงยอดอ่อนโดยใช้เวอร์เนียร์วัดความสูงของยอด ลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นทุกๆ 2 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ชิ้นแคลลัส วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี HSD Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

3.2.6 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำราก

3.2.6.1 ถั่วคาวาฉเคด

ย้ายต้นถั่วจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรืออาหารสังเคราะห์สูตรครึ่ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.8 เพาะเลี้ยงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกการเจริญเติบโตของราก ความยาวของรากทุกสูตรอาหาร จำนวนและลักษณะของรากที่เกิดขึ้นและคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเจริญเติบโตของรากทุกๆ 2 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD การทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี HSD Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

3.2.6.2 ถั่วฮามาต้า

ย้ายต้นถั่วจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.8 นำไปเพาะเลี้ยงในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกการเจริญเติบโตของราก ความยาวของรากทุกสูตรอาหารจำนวนและลักษณะของรากที่เกิดขึ้นและคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเจริญเติบโตของรากทุกๆ 2 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี HSD Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

3.2.7 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของแคลลัส

3.2.7.1 ถั่วคาวาลเคด

นำแคลลัสฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0 20 40 60 80 และ100 เกรย์ โดยใช้เครื่องฉายรังสีแกมมา (รุ่น Mark I มีซีเซียม 137 เป็นต้นกำเนิดรังสีของศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ ฯ) จากนั้นนำไปพัฒนาเป็นต้น โดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 5 สัปดาห์ หลังเพาะเลี้ยงบันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนแคลลัสที่อยู่รอดปริมาณรังสีแต่ละอัตรา เพื่อหาปริมาณรังสีที่ทำให้แคลลัสมีอัตราอยู่รอด 50 เปอร์เซ็นต์ (LD50) วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ชิ้น หลังจากนั้นนำมาชักนำให้เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ โดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี HSD Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

3.2.7.2 ถั่วฮามาต้า

นำแคลลัสฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0 20 40 60 80 และ 100 เกรย์ โดยใช้เครื่องฉายรังสีแกมมา (รุ่น Mark I มีซีเซียม 137 เป็นต้นกำเนิดรังสีของศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ ฯ) จากนั้นนำไปพัฒนาเป็นต้น โดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 5 สัปดาห์ หลังเพาะเลี้ยงบันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนแคลลัสที่อยู่รอดปริมาณรังสีแต่ละอัตรา เพื่อหาปริมาณรังสีที่ทำให้แคลลัสมีอัตราอยู่รอด 50 เปอร์เซ็นต์ (LD50) วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ชิ้นหลังจากนั้นนำมาชักนำให้เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ โดยเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี HSD Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

3.2.8 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

การคัดเลือกโคลนที่มีลักษณะแตกต่างไปจากต้นควบคุม สกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธี CTAB นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ 7 ชนิด คือ OPH-05 OPN09 OPN-15 OPV-02 OPV-03 OPY15 และ OPZ-04 (ตารางที่ 3.1) ทำการเตรียมสารละลายที่เป็นส่วนประกอบในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยมีความเข้มข้นสุดท้าย ได้แก่ ไพรเมอร์ความเข้มข้น 1.6 พิโคโมล จีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA) ความเข้มข้น 15 นาโนกรัม สารละลาย dNTPs ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ พีซีอาร์บัฟเฟอร์ (PCR buffer) ความเข้มข้น 1 เท่า KCl ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สารละลาย Magnesium chloride ความเข้มข้น 3.5 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ *Tag* DNA polymerase ความเข้มข้น 0.2 ยูนิต น้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized H_2O) นำสารละลายดังกล่าวผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร แล้วนำเข้าเครื่อง DNA thermal cycle เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) (ตารางที่ 3.2) ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟริซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 แสดงชื่อและลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5′-3′)
OPH05	AGTCGTCCCC
OPN09	CAGCGACTGT
OPN15	CAGCGACTGT
OPV02	AGTCACTCCC
OPV03	CTCCCTGCAA
OPY15	AGTCGCCCTT
OPZ04	AGGCTGTGCT

ตารางที่ 3.2 แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในเทคนิค PCR

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดให้เกิดยอดจำนวนมาก

4.1.1 ถั่วคาวาลเคด

จากการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วคาวาลเคดให้เกิดยอดจำนวนมาก บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5-7 วันเริ่มมีการงอกเจริญเป็นต้นอ่อน (ภาพที่ 4.1 ก) และการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตไซโทไคนินทั้งสองชนิดให้ผลที่แตกต่างกัน ในสัปดาห์ที่ 2 สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลักษณะลำต้นผอมและยืดยาว เกิดแคลลัสที่บริเวณราก (radicle) (ภาพที่ 4.1 ข-ค) ส่วนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ทุกความเข้มข้น เกิดแคลลัสที่บริเวณราก ในสัปดาห์ที่ 4 ลักษณะการเจริญมีลักษณะลำต้นอวบและต้นเตี้ยมีการบวมของลำต้นกลายเป็นแคลลัส (ภาพที่ 4.2 จ-ฌ) ซึ่ง Shagufta และคณะ (2007) รายงานว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความสูงของต้นจะลดลงเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ในทำนองเดียวกัน Basalma และคณะ (2008) รายงานว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นต่ำสามารถเกิดแคลลัสส่วนของใบเลี้ยงและไฮโปคอทิลได้

จากการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดจำนวน 5.50 ยอดต่อเมล็ด ส่วนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 3.76 เซนติเมตรต่อยอด (ตารางที่ 4.1) การเพาะเลี้ยงสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ Kinetin อย่างเดียวหรือร่วมกันเพิ่มศักยภาพการเจริญเป็นยอดของถั่วเหลืองถั่วพุ่ม ถั่วลิสง ถั่วเขียว และถั่วฝัก (Kartha และคณะ, 1981) สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 และ5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ทุกความเข้มข้น มีต้นเตี้ยไม่แตกต่างกัน เกิดแคลลัสบริเวณรากได้บางส่วน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรมียอดเฉลี่ยจำนวนมากที่สุดจำนวน 9 ยอดต่อเมล็ด ส่วนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยความสูงมากที่สุด 4.19 เซนติเมตรต่อยอด (ตารางที่ 4.2) (ภาพที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการเกิดราก พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลาสัปดาห์ที่ 10 อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เริ่มมีการเจริญของรากเกิดขึ้นบ้างเล็กน้อยจากส่วนของข้อ และสูตรอาหารที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้นสูง จะทำให้เกิดรากนั้นลดลง (ภาพที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ผลการชักนำเมล็ดของถั่วคาวาลเคดให้เกิดยอดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

BA (มิลลิกรัม/ลิตร)	TDZ (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนเมล็ด	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย/เมล็ด	ค่าเฉลี่ยความสูง (เซนติเมตร)
0.5	0	80	87	4.52 [a]	3.76 [a]
1	0	80	88	5.50 [a]	3.41 [a]
3	0	80	68	3.40 [b]	2.30 [b]
5	0	80	72	2.31 [c]	1.92 [bc]
0	0.5	80	82	1.36 [cd]	1.84 [c]
0	1	80	86	1.22 [d]	1.82 [c]
0	3	80	88	1.00 [d]	1.27 [d]
0	5	80	71	1.00 [e]	1.30 [d]

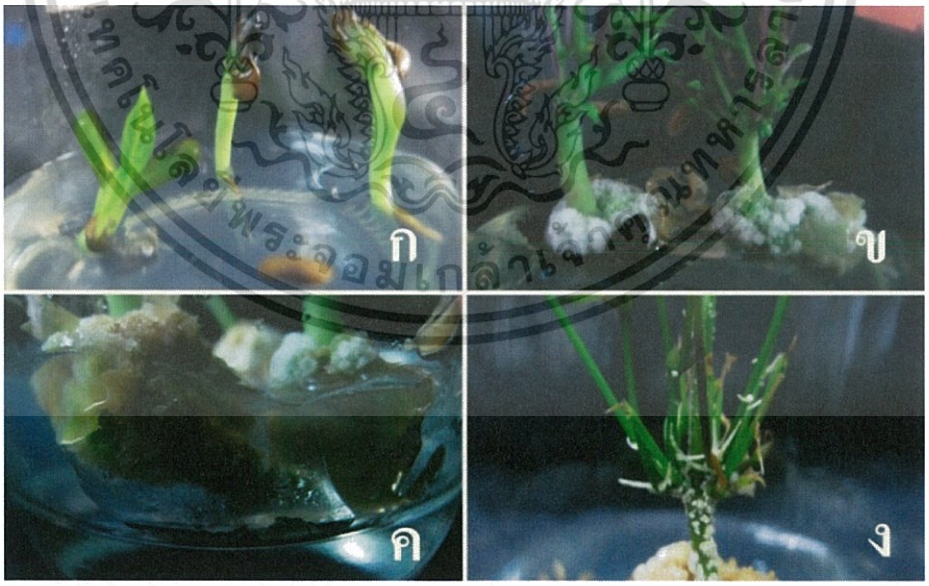
*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการชักนำเมล็ดของถั่วคาวาลเคดให้เกิดยอดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

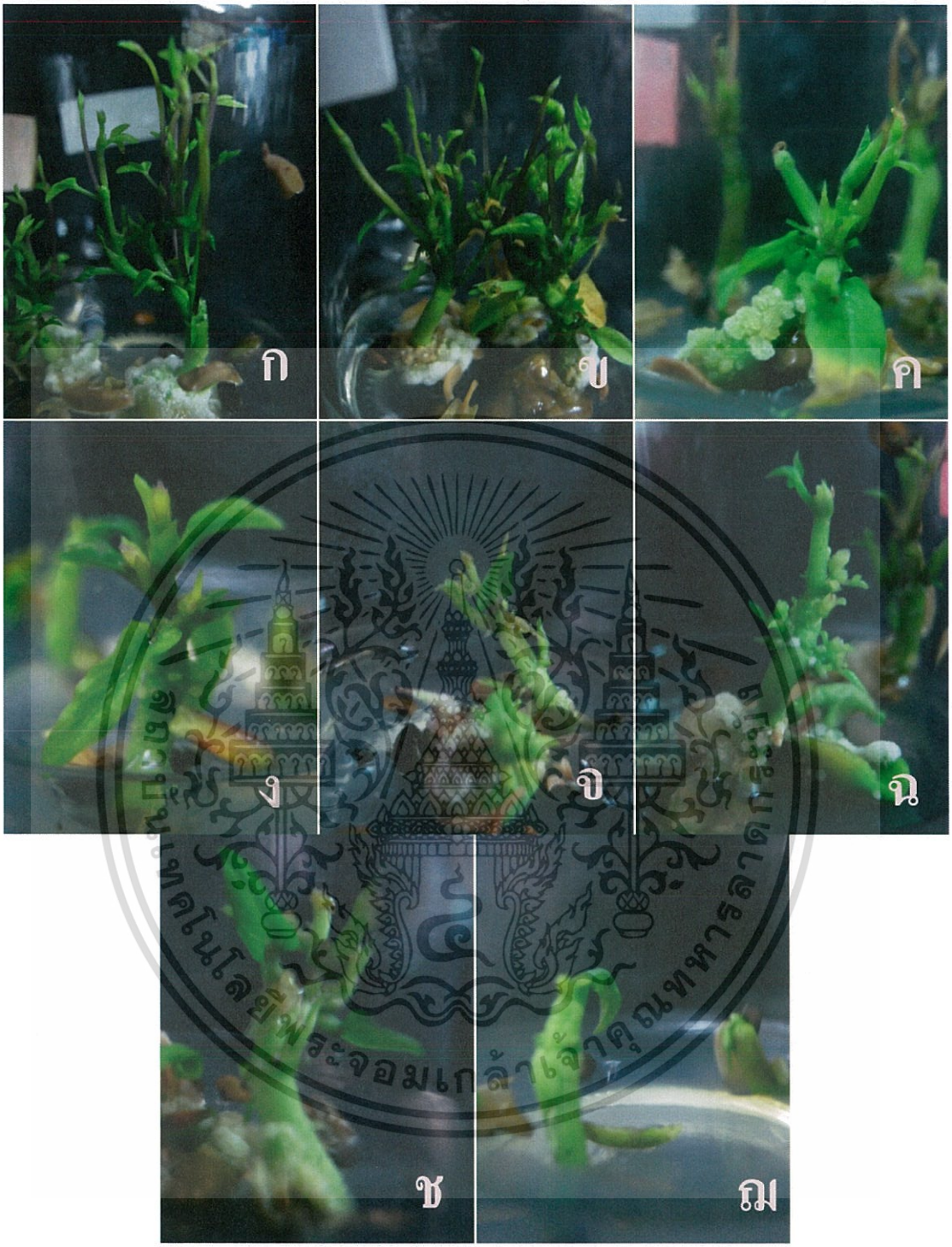
BA (มิลลิกรัม/ลิตร)	TDZ (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนเมล็ด	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย/เมล็ด	ค่าเฉลี่ยความสูง (เซนติเมตร)
0.5	0	80	87	7.63 [b]	4.19 [a]
1	0	80	88	9.00 [a]	4.04 [a]
3	0	80	68	6.52 [b]	3.14 [b]
5	0	80	72	3.71 [c]	2.06 [cd]
0	0.5	80	82	1.44 [d]	2.56 [c]
0	1	80	86	1.49 [d]	2.08 [cd]
0	3	80	88	1.20 [d]	1.44 [e]
0	5	80	71	1.14 [d]	1.72 [de]

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 4.1 การเพาะเลี้ยงถั่วคาวาลเคดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ (ก) เมื่อเพาะเลี้ยง 5-7 วัน (ข) การเกิดแคลลัสจากส่วนของลำต้น (ค) การเกิดแคลลัสจากส่วนของราก (ง) การเกิดรากจากส่วนของข้อเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลามากกว่า 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 ถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น (จ) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฉ) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฌ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ถั่วฮามาต้า

จากการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วฮามาต้าให้เกิดยอดจำนวนมาก บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยง 14 วันถั่วฮามาต้าเริ่มมีการงอกเจริญเป็นต้น (ภาพที่ 4.3 ก) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สูตรอาหารทุกสูตรต้นมีลักษณะผอมและบาง ความสูงใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันมาก สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงที่สุด 2.64 ยอดต่อเมล็ด มีค่าเฉลี่ยความสูง 4.37 เซนติเมตร และความสามารถในการเกิดยอด 80 เปอร์เซ็นต์ และสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักให้เกิดยอดเฉลี่ย 2.60 ยอดต่อเมล็ด มีค่าเฉลี่ยความสูง 3.72 เซนติเมตร และความสามารถในการเกิดยอด 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.3) (ภาพที่ 4.4) สามารถชักนำยอดได้มากที่สุดตามลำดับ ซึ่งต้นที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะผอมสูง โดยทุกสูตรอาหารเกิดแคลลัสที่ลักษณะสีเหลืองแข็ง compact callus และ friable callus เป็นจำนวนมาก ซึ่งแคลลัสเกิดขึ้นเริ่มจากเนื้อเยื่อส่วนราก (radicle) ของต้น (ภาพที่ 4.3 ข) ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดออร์แกโนเจเนซิสของถั่วฮามาต้า *Stylosanthes hamata* การงอกของเมล็ดเริ่มมีเมื่อระยะเวลา 8 วัน และเมื่อ 3 สัปดาห์ส่วนราก radicle เริ่มเกิดเป็นแคลลัส เช่นกัน (Scowcroft และ Adamson, 1976)

เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์แคลลัสที่เกิดขึ้นสามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้อย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 4.3 ค) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 4.88 ยอดต่อเมล็ด (ตารางที่ 4.3) (ภาพที่ 4.4) และแคลลัสที่เกิดขึ้นสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดได้มากที่สุด Kiran และคณะ (2010) กล่าวว่าการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสและการเจริญเป็นต้นใหม่จากเมล็ดอ่อนของถั่วลูกไก่ (*Cicer arietinum* L.) สามารถเกิดต้นได้ 36.6 เปอร์เซ็นต์ บนสูตรอาหาร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดแอบซิสิค 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ เป็นสารกลุ่มไซโตไคนินที่สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ทั้งสองชนิด Sounder และคณะ (1989) รายงานว่า BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดทวีคูณในการเพาะเลี้ยงปลายยอดในพืชตระกูลถั่วอาหารสัตว์ และTDZ เป็นสารกลุ่มไซโตไคนินที่ดีคล้ายกับไซโตไคนินตัวอื่นๆ (Mok และคณะ, 1982; Capelle และคณะ,1983; Thomas และ Katterman, 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการชักนำเมล็ดของถั่วฮามาต้าให้เกิดยอดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

BA (มิลลิกรัม/ลิตร)	TDZ (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนเมล็ด	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย/เมล็ด	ค่าเฉลี่ยความสูง (เซนติเมตร)
0.5	0	80	63	2.27 ^{ab}	3.56 ^{ab}
1	0	80	75	2.60 ^{a}	4.37 ^{a}
3	0	80	80	2.64 ^{a}	3.72 ^{ab}
5	0	80	73	2.27 ^{ab}	3.67 ^{ab}
0	0.5	80	85	2.06 ^{bc}	3.69 ^{ab}
0	1	80	67	1.59 ^{c}	2.65 ^{c}
0	3	80	90	1.89 ^{bc}	2.73 ^{c}
0	5	80	75	2.08 ^{b}	2.91 ^{bc}

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

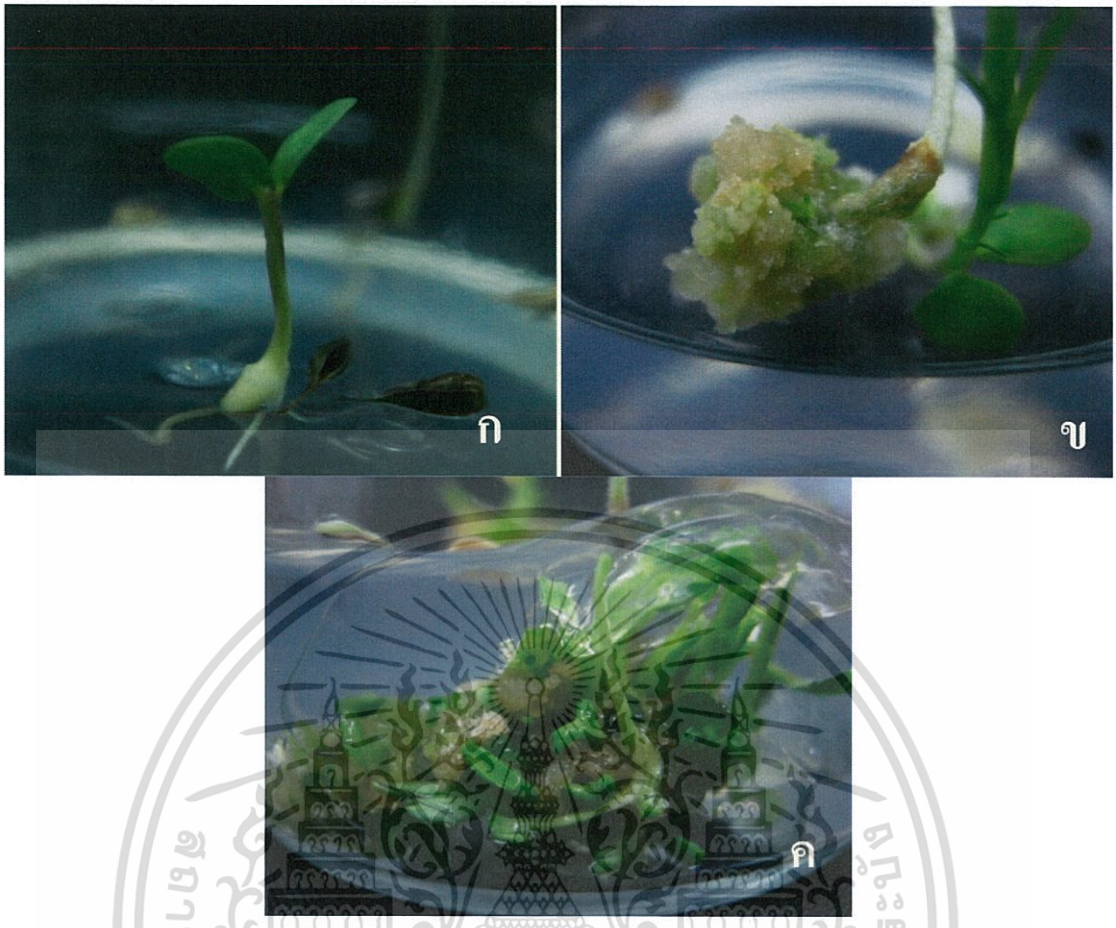
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลการชักนำเมล็ดของถั่วฮามาต้าให้เกิดยอดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

BA (มิลลิกรัม/ลิตร)	TDZ (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนเมล็ด	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย/เมล็ด	ค่าเฉลี่ยความสูง (เซนติเมตร)
0.5	0	80	63	3.90 ^{abcd}	4.44 ^{ab}
1	0	80	75	4.88 ^{a}	4.91 ^{a}
3	0	80	80	4.63 ^{ab}	5.07 ^{a}
5	0	80	73	3.80 ^{bcd}	3.81 ^{b}
0	0.5	80	85	3.53 ^{cd}	4.40 ^{ab}
0	1	80	67	4.37 ^{abc}	4.91 ^{a}
0	3	80	90	3.14 ^{d}	4.01 ^{b}
0	5	80	75	2.97 ^{d}	3.96 ^{b}

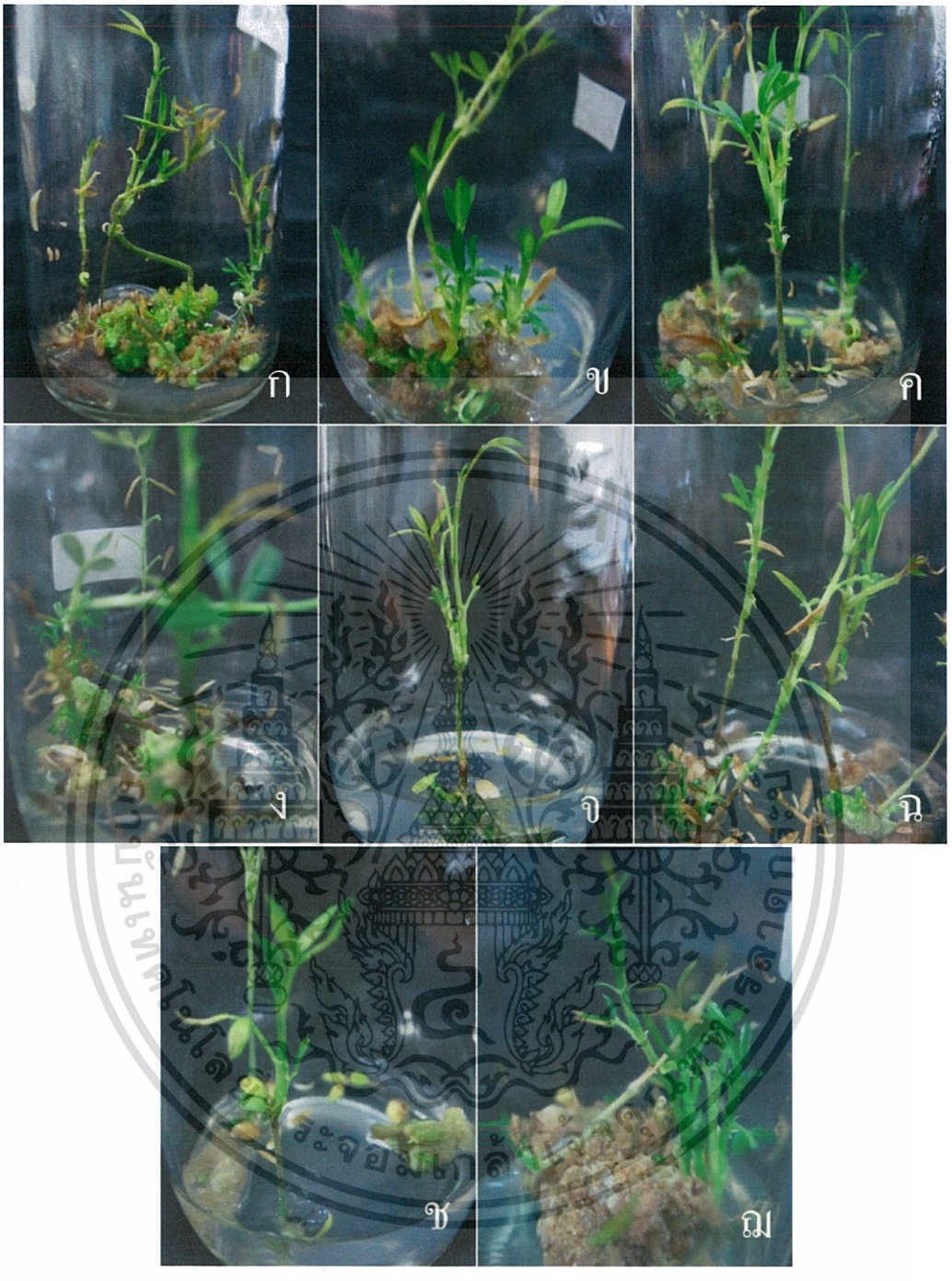
*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 การเพาะเลี้ยงถั่วฮามาต้าบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ข) การเกิดแคลลัสจากส่วนของราก (radicle) (ค) การเกิดต้นจากแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 ถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น (จ) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฉ) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฌ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของถั่วคาวาลเคด

จากการนำเมล็ดของถั่วคาวาลเคดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วัน เมล็ดสามารถเจริญเป็นต้นอ่อนและมีใบเลี้ยงคู่ เมื่อนำใบเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.5 ก) ใบเลี้ยงสามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ทุกระดับความเข้มข้น โดยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เป็นสารกลุ่มออกซินที่ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัส 2,4-D สามารถชักนำแคลลัสได้ด้วยตัวเองหรือร่วมกับไซโตไคนินได้ (Castillo และคณะ, 1998)

หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ใบเลี้ยงมีการพัฒนาเป็นแคลลัส มีลักษณะแข็ง เกาะกันเป็นกลุ่มก้อน (compact callus) กลุ่มเซลล์มีสีเขียว สีเหลือง และแคลลัสที่มีสีขาวใส ฉ่ำน้ำ (friable callus) และเป็นแคลลัสได้สมบูรณ์ทั้งชิ้นเมื่อเพาะเลี้ยงระยะเวลา 4-6 สัปดาห์ (ภาพที่ 4.5 ข-ค) ลักษณะของแคลลัสเป็น compact callus ผสม friable callus มีสีเขียว สีเหลือง เซลล์ที่ประกอบกันเป็นแคลลัสชนิดที่เป็น compact callus นี้ มักจะเป็นเซลล์ที่มีไซโตพลาสซึมเข้มข้น และมีออร์แกเนลหนาแน่น และแคลลัสชนิดนี้มักจะสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ง่าย (สุพรรณี, 2532) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สูตรอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และน้ำหนักสดมากที่สุด 2.22 กรัม และสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 96 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.5 และ ภาพที่ 4.5 ก) และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีน้ำหนักสด 3.53 กรัม ตามลำดับ และสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของอนุรักษ์ (2551) ได้ศึกษาการเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสที่พัฒนามาจากไฮโพคอทิลของถั่วคาวาลเคด โดยเพาะเลี้ยงส่วนไฮโพคอทิลบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ทุกสูตรอาหาร แต่สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือที่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 57.09 ตารางมิลลิเมตร และการชักนำใบเลี้ยงให้เกิดแคลลัสของถั่วลูกไก่ (*Cicer arietinum* L.) บนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เกิดแคลลัสได้ 53 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสมีลักษณะเป็น compact callus สีเขียวอ่อน มีน้ำหนักสด 0.537 กรัม (Saleem, 2011) แต่ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะของแคลลัสเป็น friable callus มีสีขาวใส ฉ่ำน้ำ เพียงอย่างเดียว และเกิดการตายของชิ้นใบเลี้ยงเป็นสีน้ำตาล มีน้ำหนักสด 1.21 และ1.20 กรัม ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 88 และ 73 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีน้ำหนักสด 2.00 และ 2.09 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5 และ 4.6) (ภาพที่ 4.6 ค-ง) อย่างไรก็ตาม 2,4-D ยังเป็นออกซินที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฤทธิ์รุนแรง ถ้าใช้ในความเข้มข้นสูงอาจก่อให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมของเซลล์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (somaclonal variation) ได้ (สุพรรณี, 2532)

งานวิจัยจำนวนมากรายงานว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เป็นสารกลุ่มออกซินที่ดีในการชักนำแคลลัสทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ (Evans และคณะ, 1984; Ho และ Vasil, 1983; Jaiswal และ Naryan, 1985; Chee, 1990; Mamun และคณะ, 1996) Gosal และ Bajai (1979) ได้รายงานว่าการนำชิ้นส่วนของใบเลี้ยงของถั่วลูกไก่ (*Cicer arietinum*) ถั่วแดง (*Lens esculenta*) ถั่วแดง (*Phaseolus aureus*) ถั่วเขียวผิวดำ (*P. mungo*) และถั่วลันเตา (*Pisum sativum*) เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ชักนำแคลลัสจากสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D สามารถชักนำแคลลัสได้ดีและสามารถนำไปชักนำให้เกิดต้นได้

ตารางที่ 4.5 ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

2,4-D (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนของใบเลี้ยง	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	น้ำหนักสดของแคลลัส (กรัม)
0.5	60	96	2.22[a]
1	60	93	1.36[b]
3	60	88	1.21[b]
5	60	73	1.20[b]

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

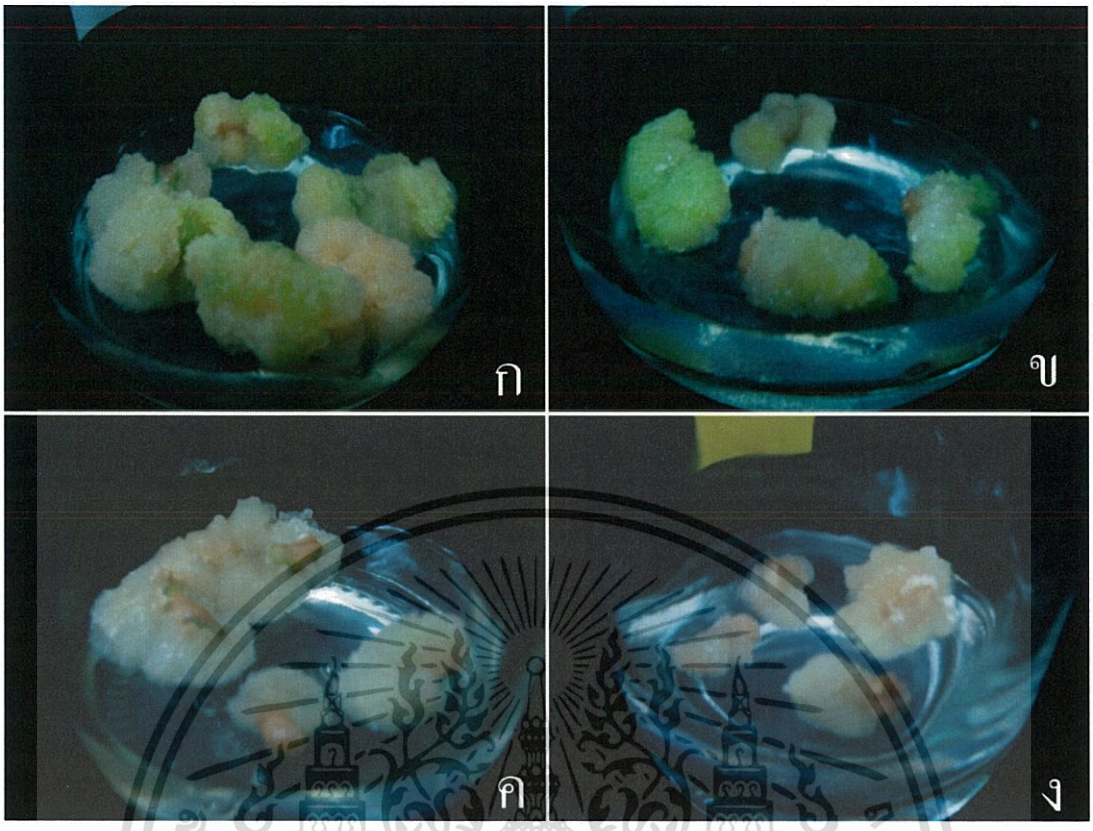
ตารางที่ 4.6 ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

2,4-D (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนของใบเลี้ยง	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	น้ำหนักสดของแคลลัส (กรัม)
0.5	60	96	3.53 [a]
1	60	93	2.41 [ab]
3	60	88	2.00 [b]
5	60	73	2.09 [b]

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ภาพที่ 4.5 การชักนำแคลลัสจากส่วนของใบเลี้ยง (ก) ใบเลี้ยงถั่วคาวาลเคดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 วันบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4–D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) ลักษะของแคลลัสแบบแข็ง compact callus สีเขียวปนเหลือง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ค) ลักษะของแคลลัสสีขาวใส ฉ่ำน้ำ friable callus เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ใบเลี้ยงถั่วคาวาลเคดอายุ 6 วันเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

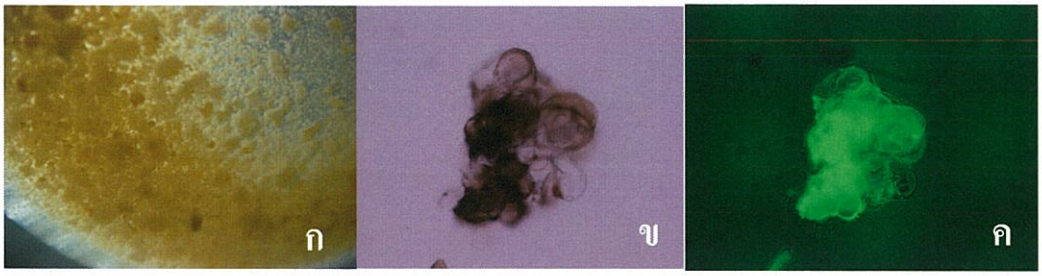
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

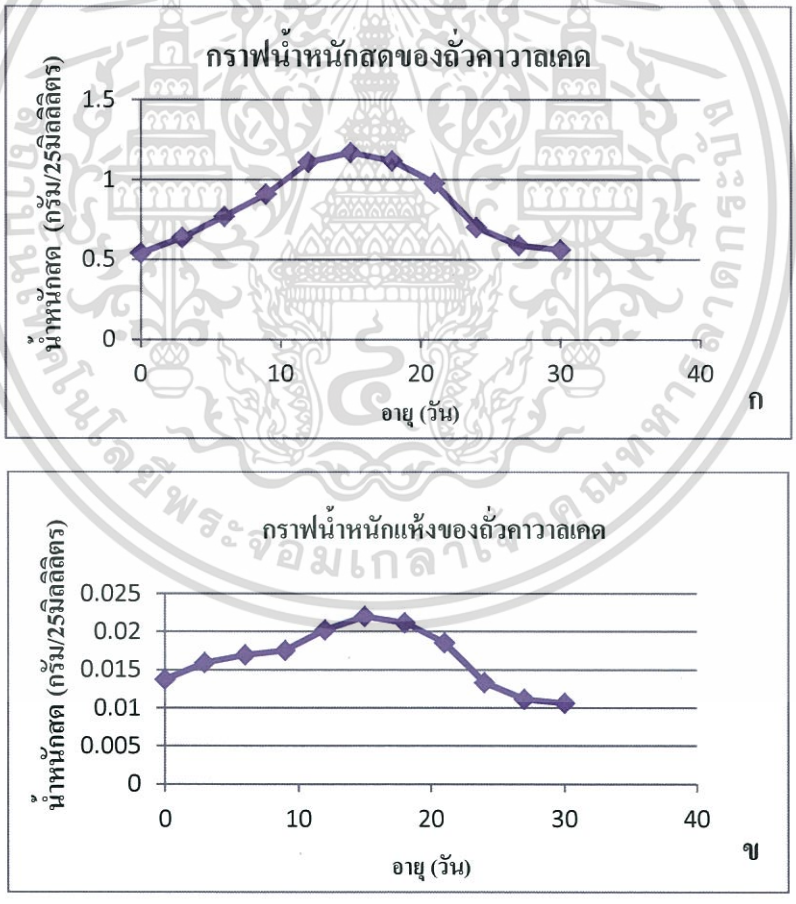
4.3.1 ถั่วคาวาลเคด

นำแคลลัสจากส่วนของใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคดจากการทดลอง 4.2.1 ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร พบว่าลักษณะของเซลล์แขวนลอยมีสีเหลืองอ่อนกระจายอยู่ภายในอาหารเหลว และเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ (ภาพที่ 4.7 ก) เซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 3-12 วัน ซึ่งเป็นระยะ log phase จากนั้นจะเข้าสู่ stationary phase ในช่วง 12-21 วัน และ death phase ในช่วง 21-30 วัน ในวันที่ 15 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงสุด 1.1674 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร และ 0.0220 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหาร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.8 ก-ข) อนุรักษ์ (2550) กล่าวว่าเซลล์ที่อยู่ในระยะ log phase เป็นเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเหมาะจะนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ เช่น เปลี่ยนอาหารใหม่ หรือนำไปชักนำให้พัฒนาเกิดเป็นต้น เมื่อศึกษาเซลล์แขวนลอยที่อายุ 30 วัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ brightfield microscope จะเห็นเซลล์แขวนลอยมี รูปร่างกลม กลมรี และเป็นท่อนยาวอยู่ปะปนกัน ลักษณะสีใส และสีดำเนื่องจากการทึบแสงของเซลล์แขวนลอยที่รวมกลุ่มซ้อนทับกัน (ภาพที่ 4.7 ข) เซลล์แขวนลอยที่เห็นไม่สามารถบอกได้ชัดเจนว่ามีชีวิตหรือไม่ จึงตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซิเตต พบว่าจำนวนเซลล์แขวนลอยที่มีชีวิตยังสามารถพบได้อยู่ทั่วไปในอาหารเป็นจำนวนมาก และมีเซลล์แขวนลอยที่ตายแล้วอยู่ปะปนในอาหาร เนื่องจากเซลล์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์เอสเตอร์เรส (esterase) อยู่ภายในเซลล์ สีจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์เอสเตอร์เรสภายในเซลล์แขวนลอย เมื่อกระทบกับแสงสีน้ำเงินจากกล้อง florescence microscope (อารีย์, 2541) (ภาพที่ 4.7 ค) จากการศึกษาการมีชีวิตของ Rotman และ Papermaster (1966) กล่าวว่าเซลล์ที่ถูกย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต จะเกิดกิจกรรม fluorochromatic ขึ้นภายในเซลล์ เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ความยาวคลื่นแสง 440-480 นาโนเมตร จะมีสีเขียวเรืองแสงกับเซลล์ที่มีชีวิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 เซลล์แขวนลอยของถั่วคาวาลเคดในสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาเวลา 30 วัน (ก) ลักษณะของเซลล์แขวนลอยในขวดเพาะเลี้ยง (ข) ลักษณะเซลล์แขวนลอยผ่านกล้องจุลทรรศน์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 เท่า (ค) เซลล์แขวนลอยที่มีชีวิตเกิดสีเขียวเรืองแสงเมื่อย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซิเตตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 เท่า



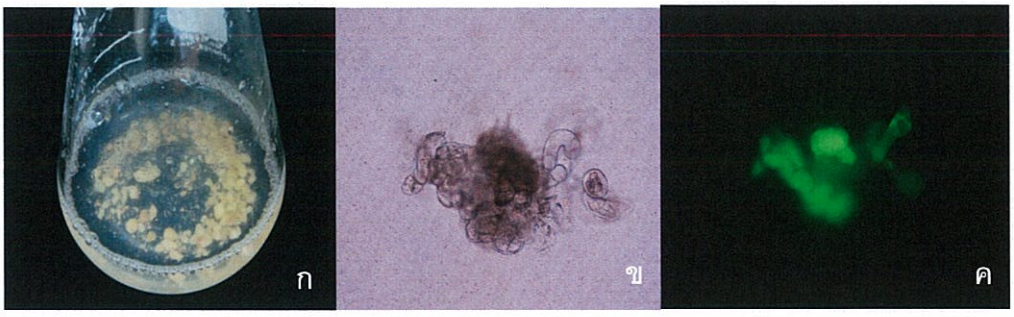
ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงผลของเซลล์แขวนลอยในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน (ก) น้ำหนักสด (ข) น้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

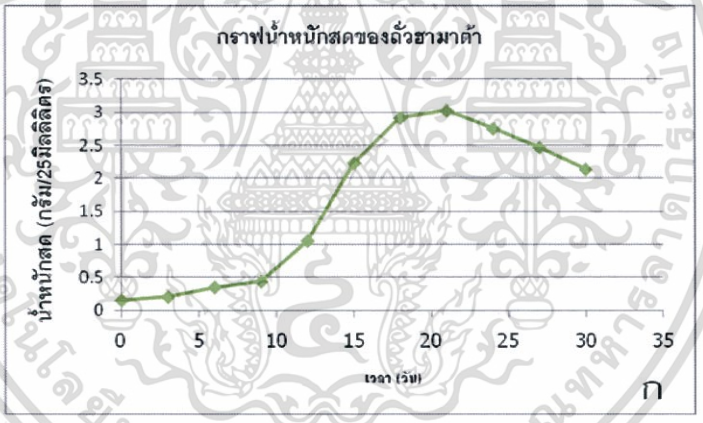
4.3.2 ถั่วฮามาต้า

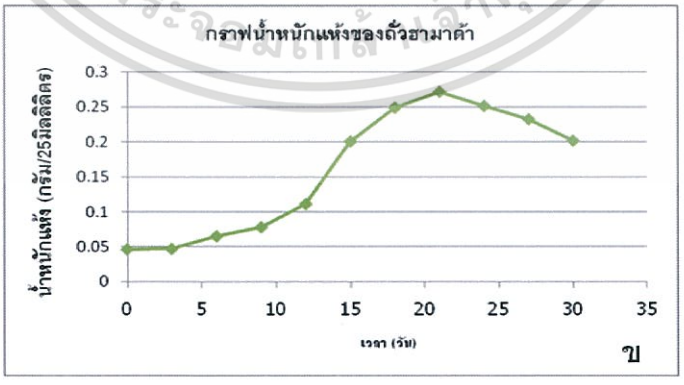
จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร พบว่าลักษณะของเซลล์แขวนลอยจะมีการกระจายตัวในอาหารเหลวเป็นกลุ่มขนาดเล็กใหญ่ปะปนกัน โดยลักษณะเซลล์แขวนลอยจะมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 4.9 ก) ค่าน้ำหนักสดและค่าน้ำหนักแห้งในวันที่ 21 มีค่าสูงสุดคือ 3.0256 และ 0.2713 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.10) จากการทดลองพบว่าเซลล์แขวนลอยมีการเจริญอย่างต่อเนื่อง ในช่วง 9-18 วัน เซลล์แขวนลอยที่อยู่ในระยะ lag phase จะอยู่ในช่วง 0-6 วัน ส่วนระยะ log phase อยู่ในช่วง 9-18 วัน จากนั้นจะเข้าสู่ระยะ stationary ในวันที่ 18-21 และระยะ death phase ในวันที่ 24-30 หลังการเลี้ยง (ภาพที่ 4.10) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และคณะ (2001) ที่ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยในต้นอ้อ (*Phragmites communis Trinius*) ในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีระยะ lag phase จะอยู่ในช่วง 0-4 วัน ส่วนระยะ log phase อยู่ในช่วง 6-16 วัน และเข้าสู่ระยะ death phase ในหลังจากวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง จากการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์แขวนลอย โดยนำเซลล์แขวนลอยอายุ 30 วัน ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ brightfield microscope เซลล์แขวนลอยจะมีลักษณะใส และดำ อยู่กันเป็นกลุ่มก้อน และกระจายอยู่ทั่วไปในอาหาร (ภาพที่ 4.9 ข) ซึ่งไม่สามารถยืนยันการมีชีวิตของเซลล์ได้ จากการศึกษาการมีชีวิตของ (ภาพที่ 4.9 ค) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Steward และคณะ (1999) ที่ทำการศึกษาความมีชีวิตของเซลล์จากเอนไซม์เอสเตอเรสภายในเซลล์ พบว่าในถั่วอัลฟาฟ่า (*Medicago sativa* L.) มีกิจกรรมของเอนไซม์เอสเตอเรสภายในไซโตพลาสซึมที่จะสามารถย่อยสีฟลูออเรสซีนไดอะซิเตต ทำให้เกิดสีเขียวเรืองแสง และจากการศึกษาของ Thomas และคณะ (1997) ได้ศึกษาการมีชีวิตในรากและเมล็ดพืช เมื่อย้อมสีด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต ส่วนที่มีชีวิตจะสามารถติดสีเขียวเรืองแสงได้เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วฮามาต้าในสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (ก) ลักษณะเซลล์แขวนลอยในขวดเพาะเลี้ยง (ข) ลักษณะของเซลล์แขวนลอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 เท่า มีลักษณะกลม ยาว เป็นรูปท่อน อยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน (ค) เซลล์แขวนลอยภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ที่กำลังขยาย 10 เท่า เซลล์ที่มีชีวิตเกิดสีเขียวเรืองแสงเมื่อย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซิเตต





ภาพที่ 4.10 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วฮามาต้าในสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (ก) น้ำหนักสด (ข) น้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่

4.4.1 ถั่วดาวาลเดด

จากการนำแคลลัสที่ได้จากการทดลอง 4.2 ให้พัฒนาเป็นต้นบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตไซโทไคนินทั้งสองชนิดแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นได้บนอาหารทุกสูตร โดยแคลลัสเริ่มมีการพัฒนาเกิดเป็นยอดจำนวนมากได้ (ภาพที่ 4.11 ก-ค) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 3.25 ยอดต่อแคลลัส ยอดมีความสูงเฉลี่ยมากที่สุดได้ 3.11 มิลลิเมตรต่อยอด (ภาพที่ 4.12 ค และ ตารางที่ 4.7) ซึ่งสอดคล้องกับการชักนำแคลลัสให้เกิดยอดของถั่วลิสงสายพันธุ์ VRI-2 และ VRI-3 บนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดยอดได้มากที่สุด 63.2 เปอร์เซ็นต์ และ 57.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Palanivel และคณะ, 2002) และ Xuejun Yuan (2011) ได้ศึกษาระบบการเจริญเป็นต้นของถั่ว *Stylosanthes guianensis* cv 'Reyan 2' จากส่วนของใบเลี้ยง โดยชักนำยอดจากแคลลัสบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดยอดได้ 66 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 2.2 และ 2.35 ยอดต่อแคลลัส ยอดมีความสูงเฉลี่ยมากที่สุดได้ 2.75 และ 2.93 มิลลิเมตรต่อยอด ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) ลักษณะของยอดมีสีเขียวและยอดหนากว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต BA โดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นต่ำกระตุ้นการเกิดยอดได้ดีที่สุด (ภาพที่ 4.12) ซึ่งสอดคล้องกับการใช้สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดยอดของต้นถั่วแขกสายพันธุ์ pusa-33 ค่าเฉลี่ย 13 ยอดต่อเมล็ดและสูง 3.16 มิลลิเมตร (Dorendro และคณะ, 2002) และในถั่วเขียวผิวดำเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดยอดเฉลี่ย 10.6 ยอดต่อชิ้น (Dilip และคณะ, 1998)

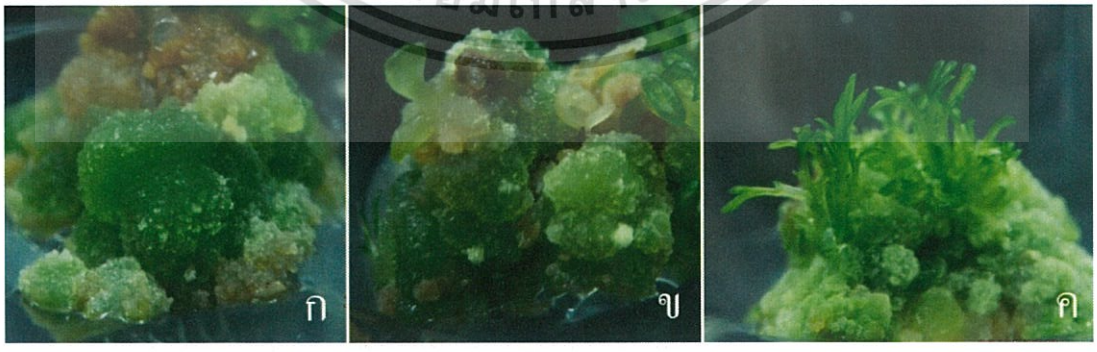
ส่วนลักษณะการเจริญเติบโต พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA นอกจากสามารถชักนำยอดยังกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของแคลลัสได้มากกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.7ผลการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจากแคลลัสจากใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา8สัปดาห์

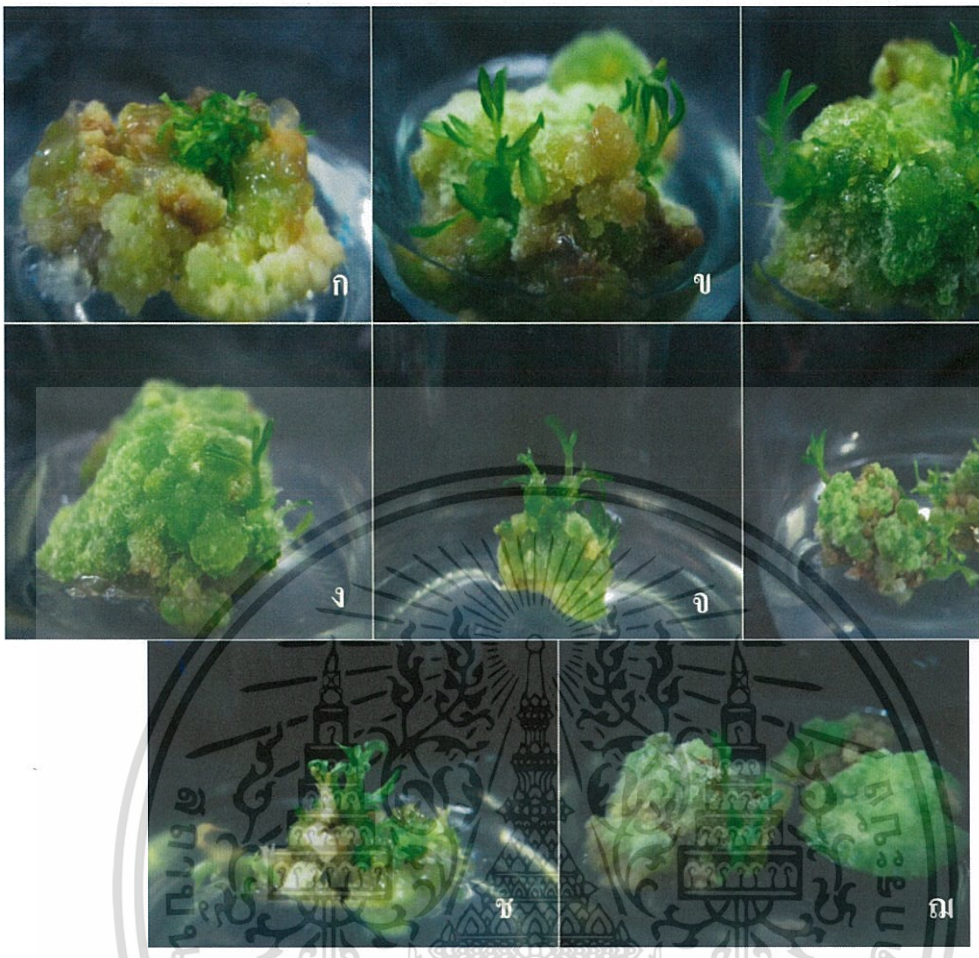
BA (มิลลิกรัม/ลิตร)	TDZ (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนชิ้นแคลลัส	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส	ค่าเฉลี่ยความสูง (มิลลิเมตร)
0.5	0	60	58	1.81[b]	2.87
1	0	60	63	1.92[b]	3.07
3	0	60	80	3.25[a]	3.11
5	0	60	75	2.15[b]	2.87
0	0.5	60	48	2.2[ab]	2.75
0	1	60	58	2.35[ab]	2.93
0	3	60	63	1.9[b]	2.98
0	5	60	53	1.48[b]	2.91

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ0.05



ภาพที่ 4.11แคลลัสของถั่วคาวาลเคดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร(ก) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา4สัปดาห์ (ข) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา6 สัปดาห์เริ่มการเจริญเป็นยอดอ่อน(ค) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา12 สัปดาห์สามารถเกิดยอดจำนวนมากได้ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.12แคลลัสของถั่วคาวาลเคดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก)0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร(ข)1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค)3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น (จ) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร(ฉ)1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช)3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฌ)5 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

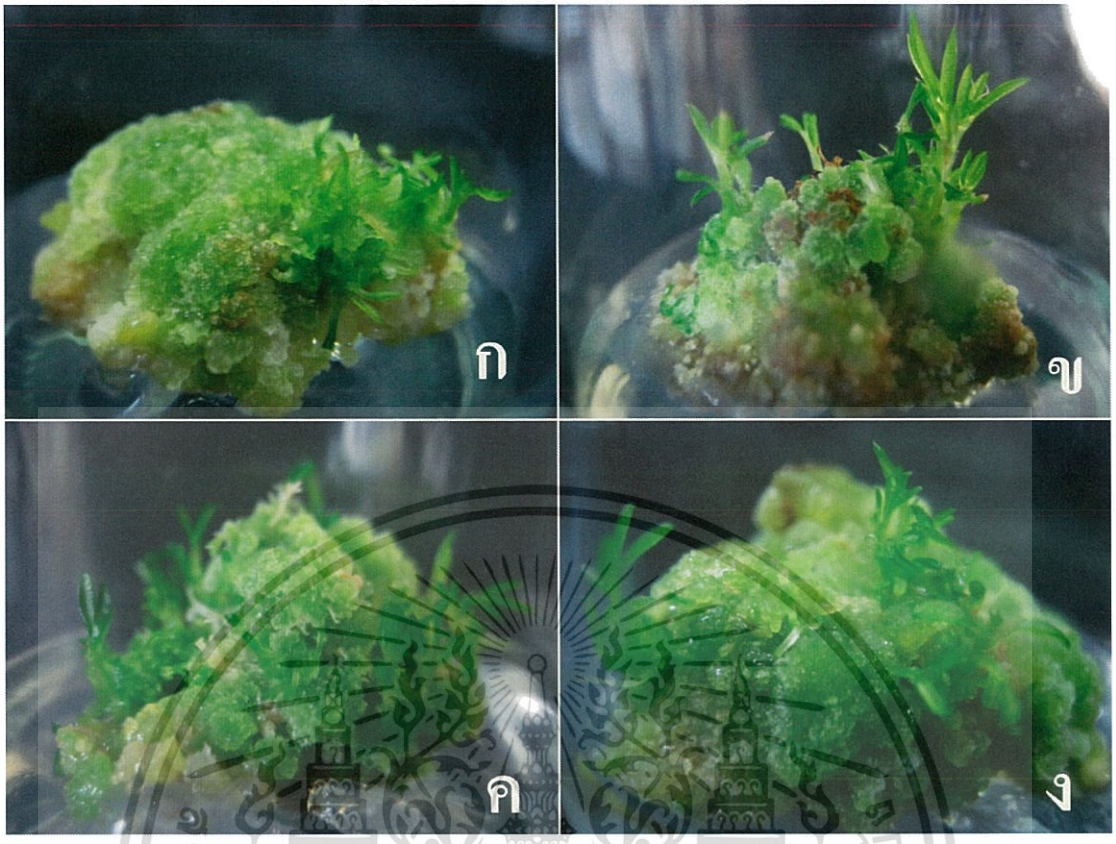
จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัสของถั่วคาวาลเคดเพื่อให้เกิดยอดจำนวนมาก ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการเพิ่มสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำยอดให้เพิ่มมากขึ้นกว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ เพียงอย่างเดียว โดยพบว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดเฉลี่ยได้มากที่สุด 6.47 ยอด และความสูงเฉลี่ย 5.09 มิลลิเมตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.8) (ภาพที่ 4.13 ค)

ตารางที่ 4.8 ผลการเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจากแคลลัสของถั่วคาวาลเคดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

BA (มิลลิกรัม/ลิตร)	TDZ (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนชิ้นแคลลัส	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส	ค่าเฉลี่ยความสูง (มิลลิเมตร)
3	0	60	80	3.25 ^{b}	3.11 ^{b}
3	0.5	60	85	3.75 ^{a}	3.38 ^{b}
3	1	60	87	5.67 ^{a}	4.25 ^{ab}
3	3	60	90	6.47 ^{a}	5.09 ^{a}
3	5	60	89	4.38 ^{a}	4.18 ^{ab}

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.13 แคลลัสของถั่วดาวาลเดดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ (ก) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ถั่วฮามาต้า

จากการนำแคลลัสถั่วอามาต้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดจากการทดลอง 4.1.2 เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าลักษณะการเจริญเติบโตของยอดจากแคลลัสสองสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสมีการขยายตัวและมีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 4.14 ก) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์แคลลัสสีเหลืองอ่อนมีการพัฒนาเกิดเป็นเซลล์สีเขียว หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ แคลลัสเริ่มมีการพัฒนายอดเกิดขึ้น (ภาพที่ 4.14 ข) เมื่อเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดที่ได้จะมีการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อน ลักษณะต้นที่ได้จะมีลำต้นสูง ส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ ทุกความเข้มข้นต้นที่ได้มีลักษณะลำต้นเตี้ย หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ แคลลัสสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดบนอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ลักษณะต้นที่ได้จะมีลำต้นสูง บริเวณปลายยอดและใบจะมีสีเขียว (ภาพที่ 4.14 ค)

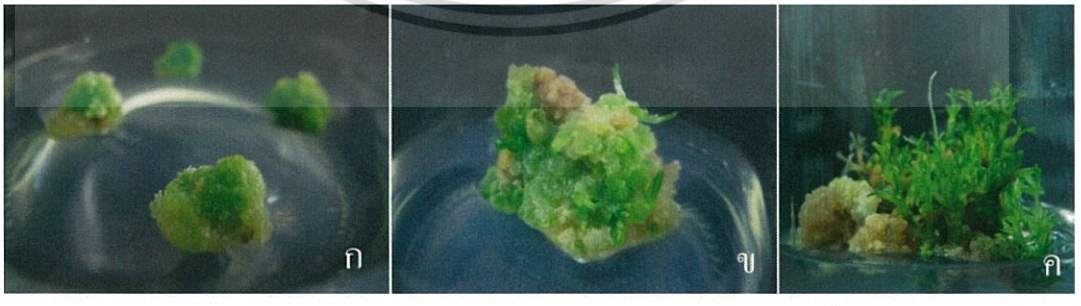
แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ทุกสูตรอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 7.33 ยอดต่อแคลลัส ยอดมีความสูงเฉลี่ยมากที่สุดได้ 4.9 มิลลิเมตรต่อยอด (ภาพที่ 4.15 ข และ ตารางที่ 4.9) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Meijer (1982) พบว่าสามารถชักนำ แคลลัสของใบถั่ว *Stylosanthes humilis* ให้มีการพัฒนาเป็นยอดได้บนอาหารสูตร MS ที่สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 78 เปอร์เซ็นต์ และขนิษฐา (2547) สามารถชักนำเซลล์แขวนลอยของถั่วฮามาต้ากลายเป็นยอดได้บนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 96.66 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ผลการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจากแคลลัสจากเมล็ดของถั่วฮามาต้าบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

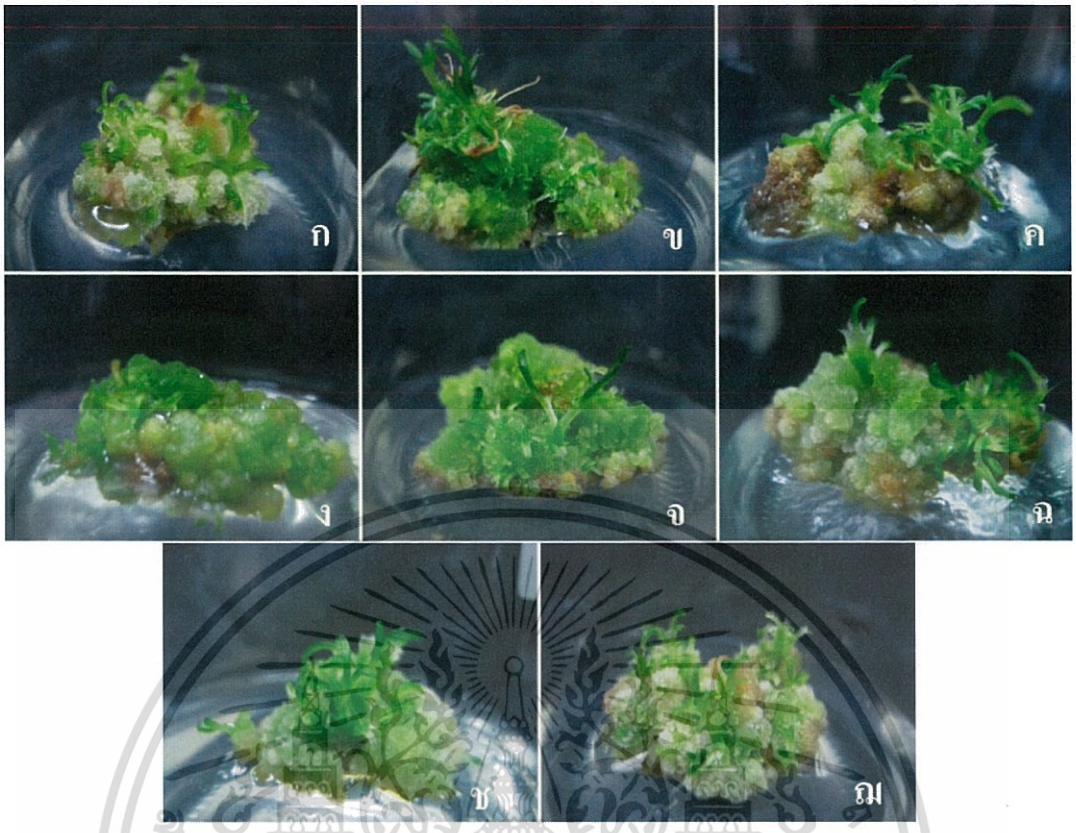
BA (มิลลิกรัม/ลิตร)	TDZ (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนชิ้นแคลลัส	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส	ค่าเฉลี่ยความสูง (มิลลิเมตร)
0.5	0	60	89	5.28^{bc}	4.8^{a}
1	0	60	100	7.33^{a}	4.9^{a}
3	0	60	100	6.98^{ab}	4.25^{b}
5	0	60	100	4.29^{cd}	4.31^{b}
0	0.5	60	60	2.28^{e}	4.2^{bc}
0	1	60	43	3.00^{de}	3.95^{bc}
0	3	60	63	3.37^{de}	3.89^{bc}
0	5	60	65	3.52^{de}	3.77^{c}

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 4.14 แคลลัสของถั่วฮามาต้าเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ข) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เริ่มการเจริญเป็นยอดอ่อน (ค) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์สามารถยอดจำนวนมากได้ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.15 แคลลัสของถั่วฮามาต้าเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น (ก) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น (จ) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฉ) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฌ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำต้นจากแคลลัสให้มีลักษณะยืดยาว

4.5.1 ถั่วคาวาลเดด

เมื่อนำแคลลัสที่พัฒนายอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรครึ่ง MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 0 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายอดมีความสูงเพิ่มขึ้นน้อยที่สุดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูง 3.89 มิลลิเมตร ส่วนอาหารสังเคราะห์สูตรครึ่ง MS และ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต มีความสูง 4.49 และ 4.61 มิลลิเมตร ตามลำดับ และยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูง 6.75 และ 7.42 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10) ลักษณะยอดที่เกิดขึ้นจะผอม และมีการเจริญของแคลลัสน้อยกว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรอื่นๆ (ภาพที่ 4.16) ซึ่งสอดคล้องกับการใช้สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อลิตรกระตุ้นการเพิ่มความสูงของต้นถั่วแขกได้มากขึ้น 46 เปอร์เซ็นต์ (Shamsudeen และคณะ, 2006) ในทำนองเดียวกัน Kailash และคณะ (2009) สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 0.2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลผิดปกติต่อการงอกและต้นอ่อนที่เกิดขึ้น

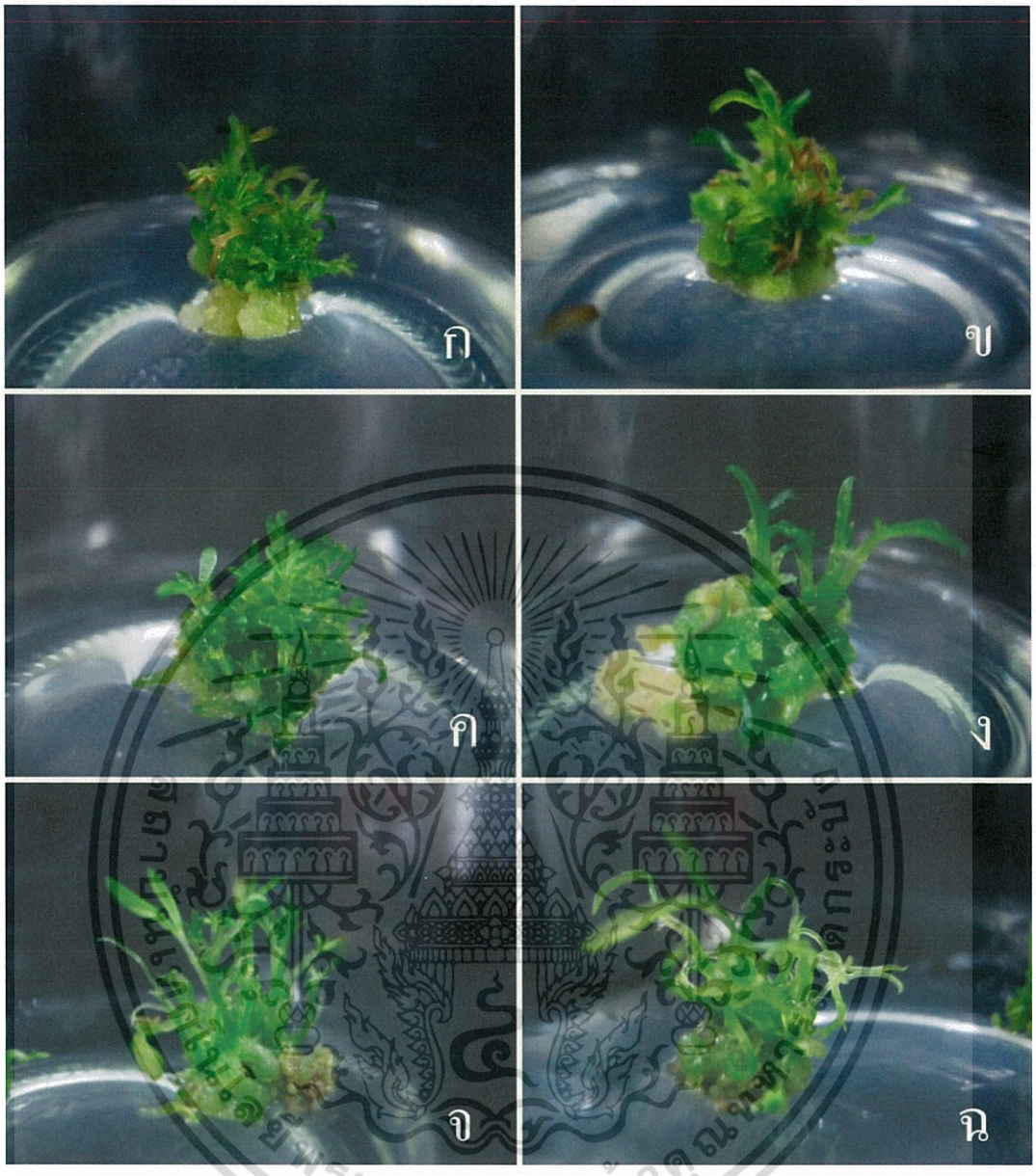
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ผลการชักนำต้นจากแคลลัสให้มีลักษณะยืดยาวของถั่วคาวาลเคด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนแคลลัสที่เพาะเลี้ยง	ค่าเฉลี่ยความยาวยอด (มิลลิเมตร)
BA+TDZ	3	30	3.90 [c]
½ MS medium	0	30	4.59 [bc]
No Hormone	0	30	4.13 [c]
GA_3	1	30	4.07 [c]
	3	30	6.42 [ab]
	5	30	7.15 [a]

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.16 แคลลัสของถั่วคาวาลเคดที่ผ่านการชักนำยอดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารเพิ่มความสูงของยอด เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ (ก) ลักษณะยอดบนสูตรอาหารครึ่ง MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) สูตรอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ค) ลักษณะยอดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฉ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.2 ถั่วฮามาต้า

เมื่อนำแคลลัสที่พัฒนายอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรครึ่ง MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 0 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรครึ่ง MS และ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต มีความสูง 4.49 และ 4.61 มิลลิเมตร ตามลำดับ และมีความสูงน้อยที่สุดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูง 3.89 มิลลิเมตร ยอดที่เกิดขึ้นมีความสูง ลักษณะลำต้นหนา ใบมีความกว้างกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่นๆ (ตารางที่ 4.11) (ภาพที่ 4.17)

จากการทดลองยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูง 4.44 6.75 และ 7.42 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11) ศิวพงศ์ (2546) กล่าวว่าฮอร์โมน GA_3 เป็นจิบเบอเรลลินนำมาใช้เพื่อกระตุ้นให้ปล้องยืดยาวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือตา แต่ในทางตรงกันข้าม GA_3 จะระงับการเกิดรากและการงอกของยอดด้านข้าง ลักษณะยอดที่เกิดขึ้นจะผอมสูง จำนวนการเกิดยอดน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่นๆ และบริเวณโคนต้นการเกิดแคลลัสปริมาณเล็กน้อย (ภาพที่ 4.17) ซึ่งสอดคล้องกับ Jing และคณะ (2006) หลังจากชักนำยอดจากแคลลัสได้ย้ายไปเพาะเลี้ยงถั่วพุ่มบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยยอดค่อย ๆ เพิ่มขึ้นและส่งเสริมการยืดตัวของยอด ในทำนองเดียวกัน

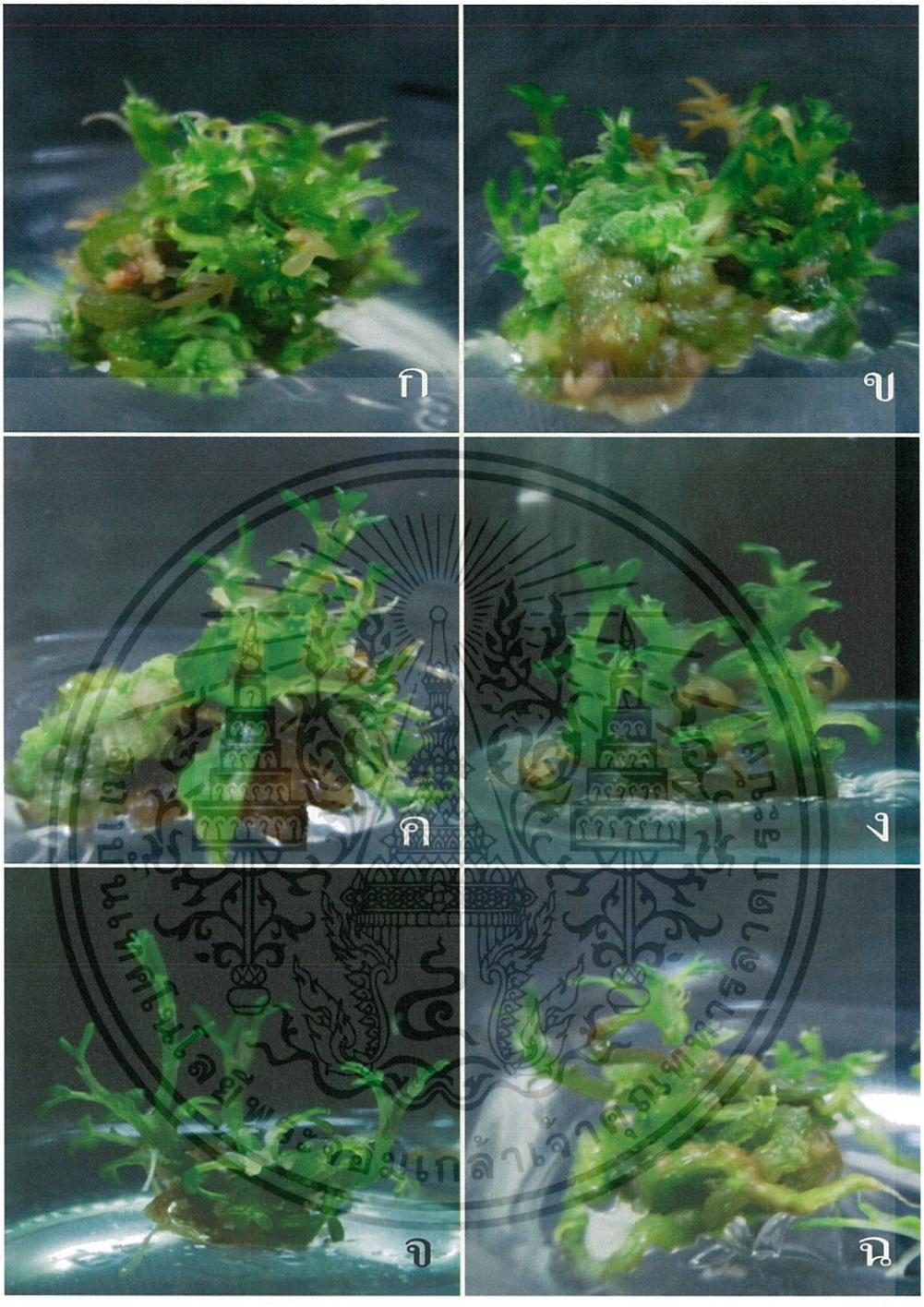
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 ผลการชักนำต้นจากแคลลัสให้มีลักษณะยืดยาวของถั่วฮามาต้าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนที่เพาะเลี้ยง	ความยาวยอด (มิลลิเมตร)
BA	1	30	2.78 [c]
½ MS medium	0	30	4.23 [abc]
No Hormone	0	30	4.20 [bc]
GA_3	1	30	4.44 [abc]
	3	30	4.90 [ab]
	5	30	5.93 [a]

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.17 แคลลัสของถั่วฮามาต้าที่ผ่านการชักนำยอดเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารเพิ่มความสูงของยอด เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ (ก) ลักษณะยอดบนสูตรอาหารครึ่ง MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) สูตรอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ค) ลักษณะยอดบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ฉ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำราก

4.6.1 ถั่วคาวาลเคด

จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสูตรอาหารอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA และ NAA ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดรากได้ทุกสูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ชักนำรากที่มีลักษณะยาวสีขาว (ภาพที่ 4.18) สามารถชักนำจำนวนรากเฉลี่ยได้ 16.00 รากต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ย 12.48 มิลลิเมตรได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA สามารถชักนำรากที่มีลักษณะใหญ่และหนาสีขาวปนน้ำตาล สามารถชักนำจำนวนรากเฉลี่ยได้มากที่สุด 13.43 รากต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ย 9.41 มิลลิเมตรที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.19)ซึ่งจำนวนรากและความยาวน้อยกว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต IBA (ตารางที่ 4.12) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Saini และ Jaiwal (2002) โดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต IBA นั้นดีกว่าเพราะเกิดจำนวนมากของรากและบางยาว เมื่อเทียบกับลักษณะรากหนาและแคระแกรนของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ IAA ในต้นถั่วดำ *Vigna mungo*

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

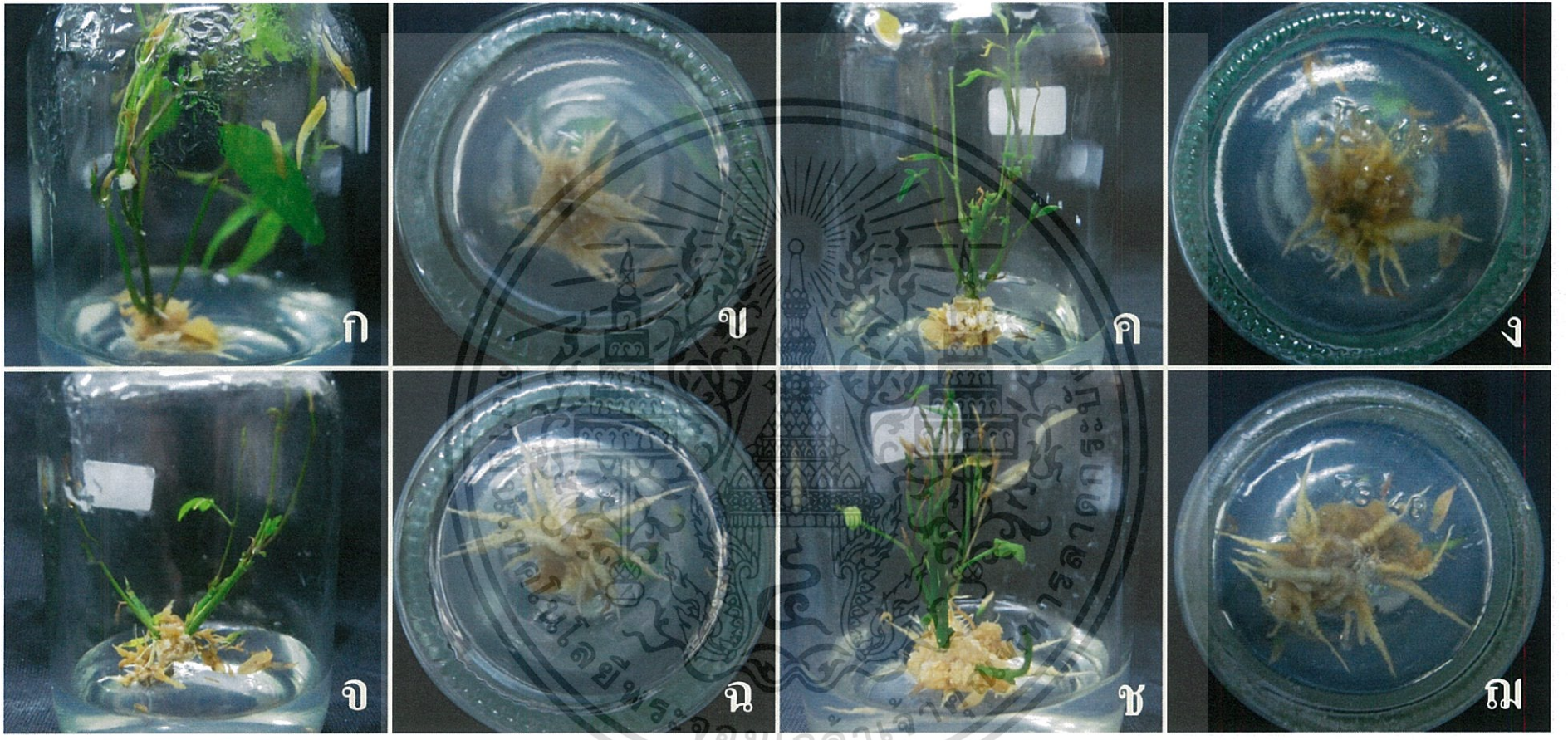
ตารางที่ 4.12 ผลการชักนำรากของถั่วคาวาลเคดเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต		จำนวนต้นที่เพาะเลี้ยง	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	ค่าเฉลี่ยความยาวราก/ต้น (มิลลิเมตร)	ค่าเฉลี่ยจำนวนราก/ต้น
IBA (มิลลิกรัม/ลิตร)	NAA (มิลลิกรัม/ลิตร)				
0.5	0	30	56	8.76^{cd}	2.73^{d}
1	0	30	83	10.14^{b}	4.97^{d}
3	0	30	90	12.48^{a}	16.00^{a}
5	0	30	73	9.55^{bc}	6.47^{d}
0	0.5	30	53	5.27^{e}	6.80^{cd}
0	1	30	63	5.33^{e}	7.17^{cd}
0	3	30	83	7.84^{d}	11.07^{bc}
0	5	30	93	9.41^{bc}	13.43^{ab}

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.18 ถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น (ก-ข) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค-ง) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ-ฉ) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช-ฌ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 4.19 ถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น (ก-ข) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค-ง) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ-ฉ) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช-ฌ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

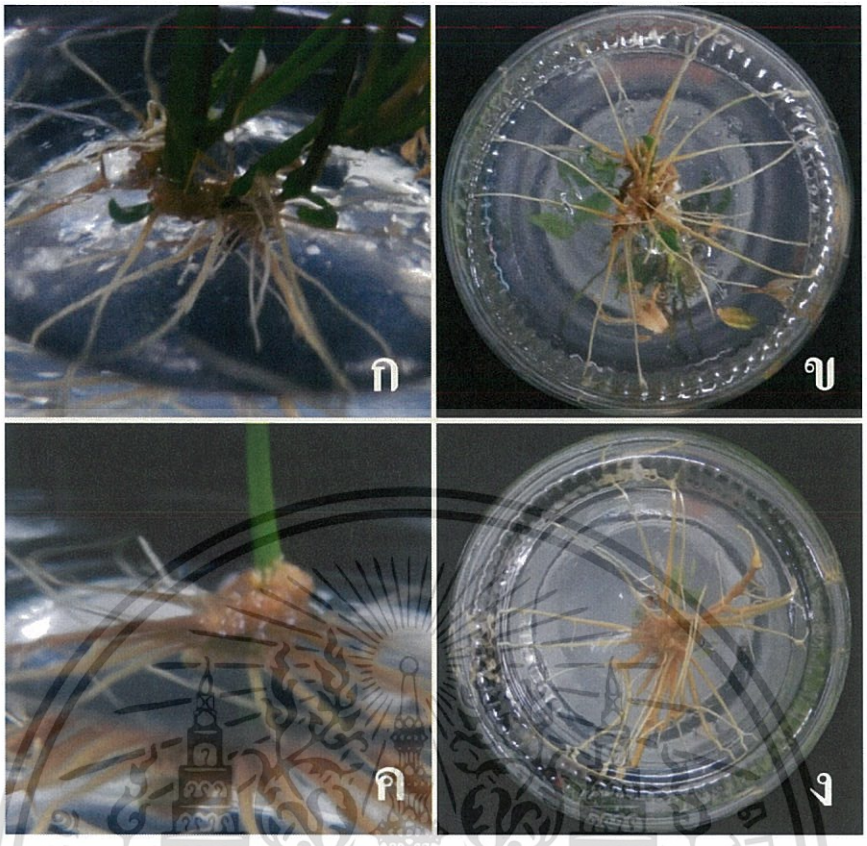
เมื่อทำการทดลองอาหารสังเคราะห์สูตร MS และครึ่ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดได้ 16 รากต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ย 12.48 มิลลิเมตร และสูตรอาหารครึ่ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดได้ 11.17 รากต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ย 11.32 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.13) (ภาพที่ 4.20) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Heinz และ Mee (1969) รายงานว่า การลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง (half-strength) หรือการตัดใบออกบางส่วนสามารถกระตุ้นการเกิดรากได้ดีในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่นข้าว

ตารางที่ 4.13 ผลการชักนำรากของถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารครึ่ง MS และ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	IBA (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนต้นที่เพาะเลี้ยง	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	ค่าเฉลี่ยความยาวราก/ต้น (มิลลิเมตร)	จำนวนราก/ต้น
½ MS	3	30	85	11.32[a]	11.17[ab]
MS	3	30	90	12.48[a]	16[a]

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.20 (ก-ข) ถั่วคาวาลเคดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค-ง) สูตรอาหารครึ่ง MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.2 ถั่วฮามาต้า

จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สูตรอาหารอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ และบริเวณรอบต้นมีการเกิดแคลลัส (ภาพที่ 4.21) เนื่องจากออกซินมีแนวโน้มรุนแรงต่อการกระตุ้นให้เกิดแคลลัส นิยมใช้ที่ความเข้มข้น 0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร (บุญยืน , 2544) ส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 และ 1 สามารถชักนำรากที่มีลักษณะยาวสีขาวปนน้ำตาล สามารถชักนำจำนวนรากเฉลี่ยได้ 8.36 รากต่อต้น ความยาวรากเฉลี่ย 3.43 มิลลิเมตร และเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 96 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.22) (ตารางที่ 4.14) ซึ่งสอดคล้องกับ Iram และ Saad (2012) การเพาะเลี้ยงมะขาม (*Cassia angustifolia* Vahl) บนสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA, IBA และ NAA สารควบคุมการเจริญเติบโตออกซินทั้งสามชนิด IBA มีประสิทธิภาพมากที่สุดของการสร้างจำนวนรากและความยาวรากได้ประสบความสำเร็จในระดับความเข้มข้น IBA ความเข้มข้น 0.406 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจาก 6 สัปดาห์ของการเพาะเลี้ยง และในทำนองเดียวกัน Dhabhai และคณะ (2010) กล่าวว่า IBA ถือเป็นออกซินที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในชักนำให้เกิดรากยาว เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการชักนำการเกิดรากได้ 85 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 1-2 สัปดาห์ และการเกิดรากของต้นถั่วเขียวบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 35 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

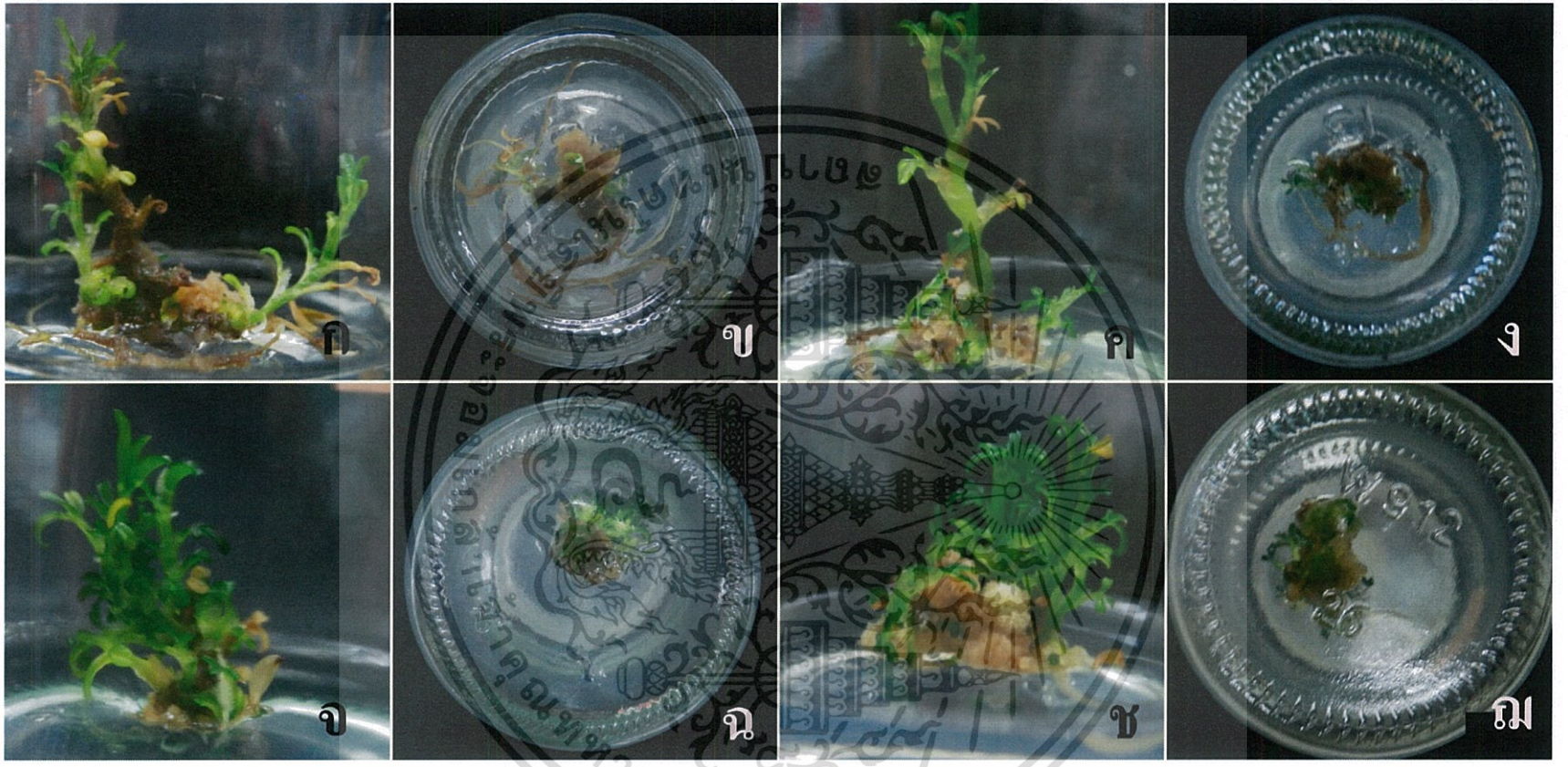
ตารางที่ 4.14 ผลการชักนำรากของถั่วฮามาต้าเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

IBA (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนต้นที่เพาะเลี้ยง	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	ค่าเฉลี่ยความยาวรากต่อต้น (มิลลิเมตร)	ค่าเฉลี่ยจำนวนรากต่อต้น
0.5	30	96	8.36 [a]	3.43 [a]
1	30	70	6.24 [b]	2.22 [b]
3	30	0	0 [c]	0 [c]
5	30	0	0 [c]	0 [c]

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ภาพที่ 4.21 (ก-ข) ถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.22 ถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น (ก-ข) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค-ง) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (จ-ฉ) 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช-ฌ) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.7 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของแคลลัส

4.7.1 ถั่วคาวาลเคด

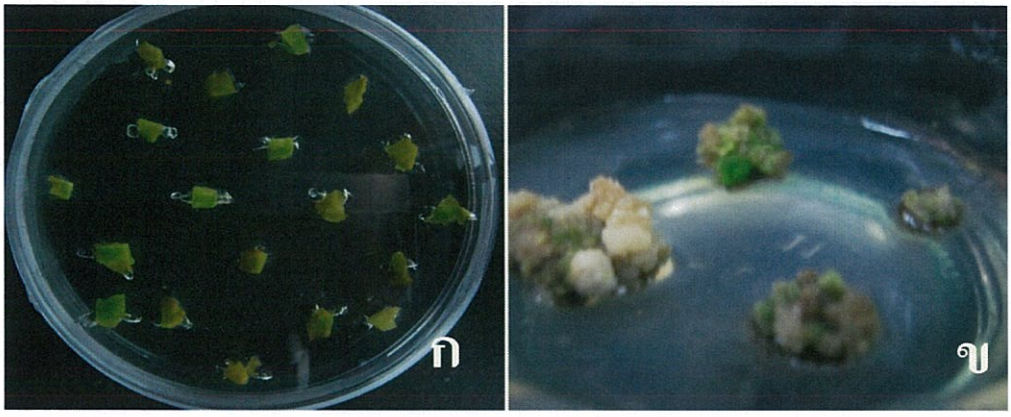
จากการนำแคลลัสฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0 20 40 60 80 และ 100 เกรย์ แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่ได้รับปริมาณรังสี 83 63 และ 53 เกรย์ มีการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD50) ตามลำดับ (ภาพที่ 4.24) เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสจะลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.15) ซึ่งสอดคล้องกับ ศรัณย์ (2553) ได้ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์หญ้าไนล์ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา โดยเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสจะลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น จากการทดลองแคลลัสที่ไม่สามารถอยู่รอดได้ จะเปลี่ยนเป็นสีดำและตายในที่สุด (ภาพที่ 4.23) ค่า LD50 ที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับผลของการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันและโครนิกต่อเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงอนูเบียสคอนเจนซิส (*Anubias congensis*) มีค่า LD50 ปริมาณรังสีที่ 30-40 เกรย์ และ GR50 ประมาณ 16-28 เกรย์ (ปกรณ์, 2552) และหญ้าชนิดอื่นเช่น แคลลัสของหญ้าเนเปียร์แคระ (*Pennisetum purpureum* Cr. Mott) มีค่า LD50 เท่ากับ 10.6 เกรย์ (จันทกานต์, 2544) หรือในแคลลัสของหญ้าอะตราตั้ม (*Paspalum atratum*) มีค่า LD50 เท่ากับ 22.13 เกรย์ (ธนภักษ์, 2545) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากปริมาณรังสีที่มีผลทำให้พืชมีอัตราการตายเป็นจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ขนาดของนิวเคลียส จำนวนและขนาดของโครโมโซม ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดต่อเซลล์ เป็นต้น (sparrow และคณะ 1963) โดยแคลลัสที่ได้รับรังสีปริมาณ 100 เกรย์ จะสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ต่ำที่สุดเท่ากับ 34 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอดทั้งหมดนั้นจะน้อยลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับ Gaul (1977) ที่พบว่าแคลลัสที่ได้รับรังสีในปริมาณที่สูง เซลล์จะหยุดการเจริญเติบโต จากการทดลองแคลลัสที่ได้รับรังสีปริมาณ 6 กิโลแรด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ จะสามารถพัฒนาเกิดยอดได้จำนวนมากที่สุด 8.02 ยอดต่อแคลลัส ยอดที่พัฒนามาจากแคลลัสที่รอดชีวิตจากการฉายรังสีแกมมานี้ สามารถพบความแปรปรวนในลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ต้นเตี้ยแคระแกร็น (ภาพที่ 4.25) และเมื่อย้ายต้นอ่อนที่รอดชีวิตที่พัฒนาจากแคลลัสปริมาณรังสีแกมมา 20 40 60 80 และ100 เกรย์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และยอดที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ที่ฉายรังสีแกมปริมาณ 20 และ 40 เกรย์ สามารถเกิดราก แต่ยอดที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ปริมาณรังสี 80 และ 100 เกรย์ ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

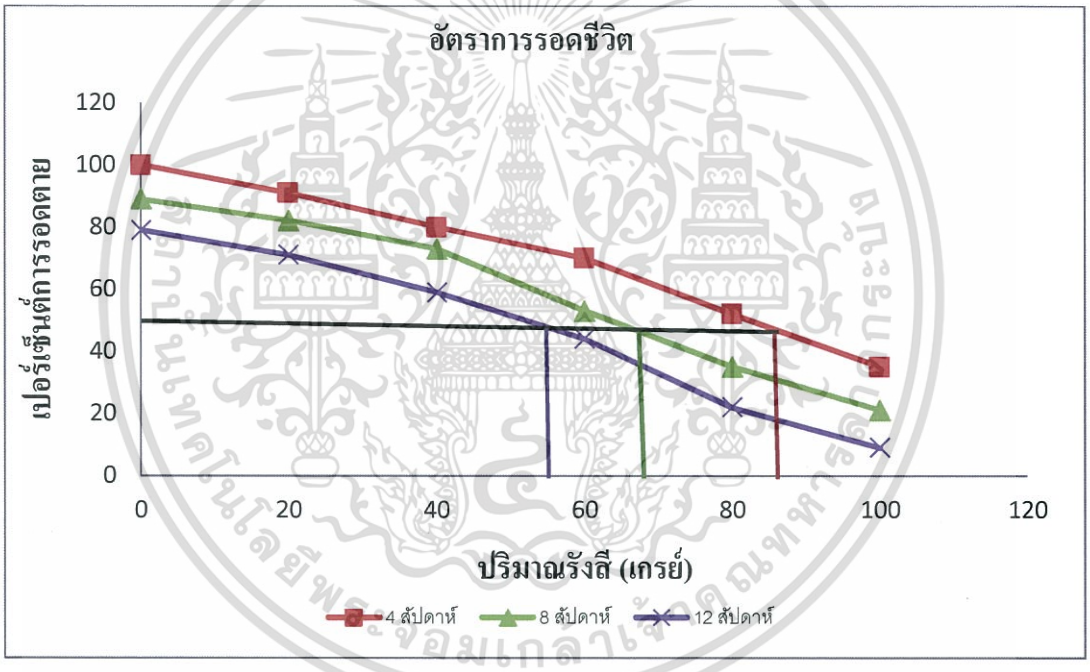
ตารางที่ 4.15 ผลของจำนวนรอดชีวิตของแคลลัสของถั่วคาวาลเคด เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และค่าเฉลี่ยความสูงยอดหลังจากฉายรังสีแกมมาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของรังสี (เกรย์)	จำนวนรอดชีวิต		เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด		จำนวนยอดเฉลี่ย/แคลลัส		ค่าเฉลี่ยความสูงยอด (มิลลิเมตร)	
	0 สัปดาห์	12 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์
0	120	95	90	90	6.35 [a]	7.61 [a]	4.54 [a]	5.13 [a]
20	120	86	80	90	3.11 [b]	7.77 [a]	4.24 [ab]	5.21 [a]
40	120	71	74	80	1.60 [bc]	7.91 [a]	3.80 [ab]	5.09 [a]
60	120	53	59	65	2.06 [b]	8.02 [a]	3.23 [bc]	5.07 [a]
80	120	27	30	49	0.56 [cd]	6.02 [ab]	2.72 [c]	4.86 [ab]
100	120	11	10	34	0.4 [d]	5.07 [b]	2.33 [c]	4.67 [b]

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

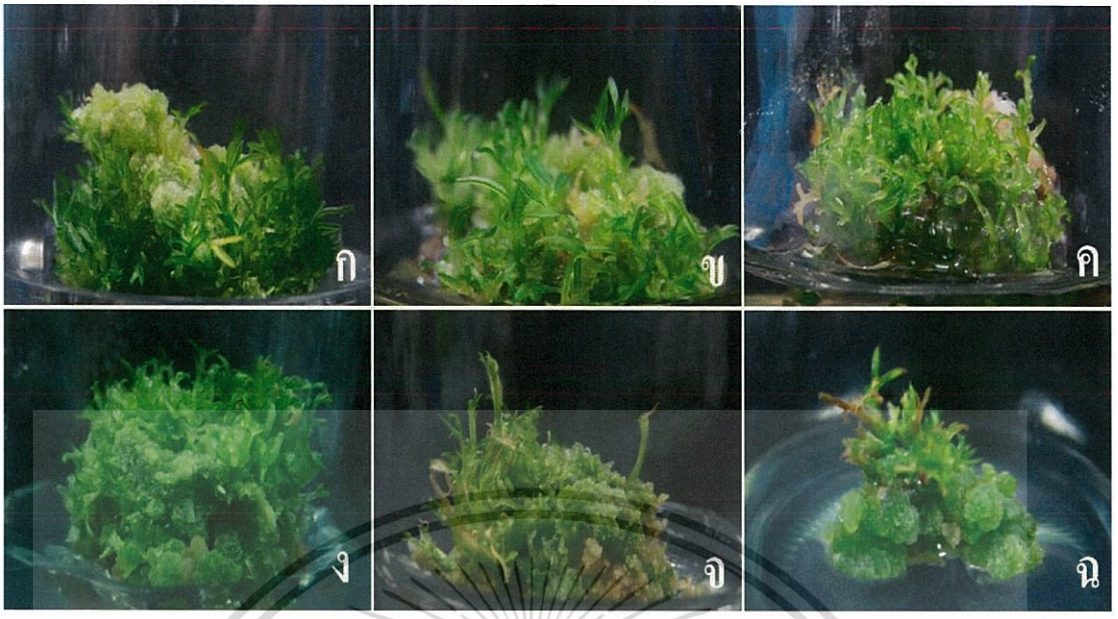


ภาพที่ 4.23 (ก) ขนาดและลักษณะแคลลัสถั่วคาวาลเคดก่อนการฉายรังสี (ข) แคลลัสถั่วคาวาลเคดหลังจากผ่านการฉายรังสีลักษณะสีเขียวและสีน้ำตาล เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์



ภาพที่ 4.24 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของแคลลัสถั่วคาวาลเคดหลังได้รับรังสีแกมมา 0 20 40 60 80 และ100 เกรย์ ระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.25 การเกิดยอดของถั่วคาวาลเคดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

(ก) ลักษณะยอดถั่วคาวาลเคดที่ไม่ผ่านการฉายรังสี (ต้นควบคุม)

(ข) ลักษณะยอดถั่วคาวาลเคดที่ผ่านการฉายรังสี 20 เกรย์

(ค) ลักษณะยอดถั่วคาวาลเคดที่ผ่านการฉายรังสี 40 เกรย์

(ง) ลักษณะยอดถั่วคาวาลเคดที่ผ่านการฉายรังสี 60 เกรย์

(จ) ลักษณะยอดถั่วคาวาลเคดที่ผ่านการฉายรังสี 80 เกรย์

(ฉ) ลักษณะยอดถั่วคาวาลเคดที่ผ่านการฉายรังสี 100 เกรย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

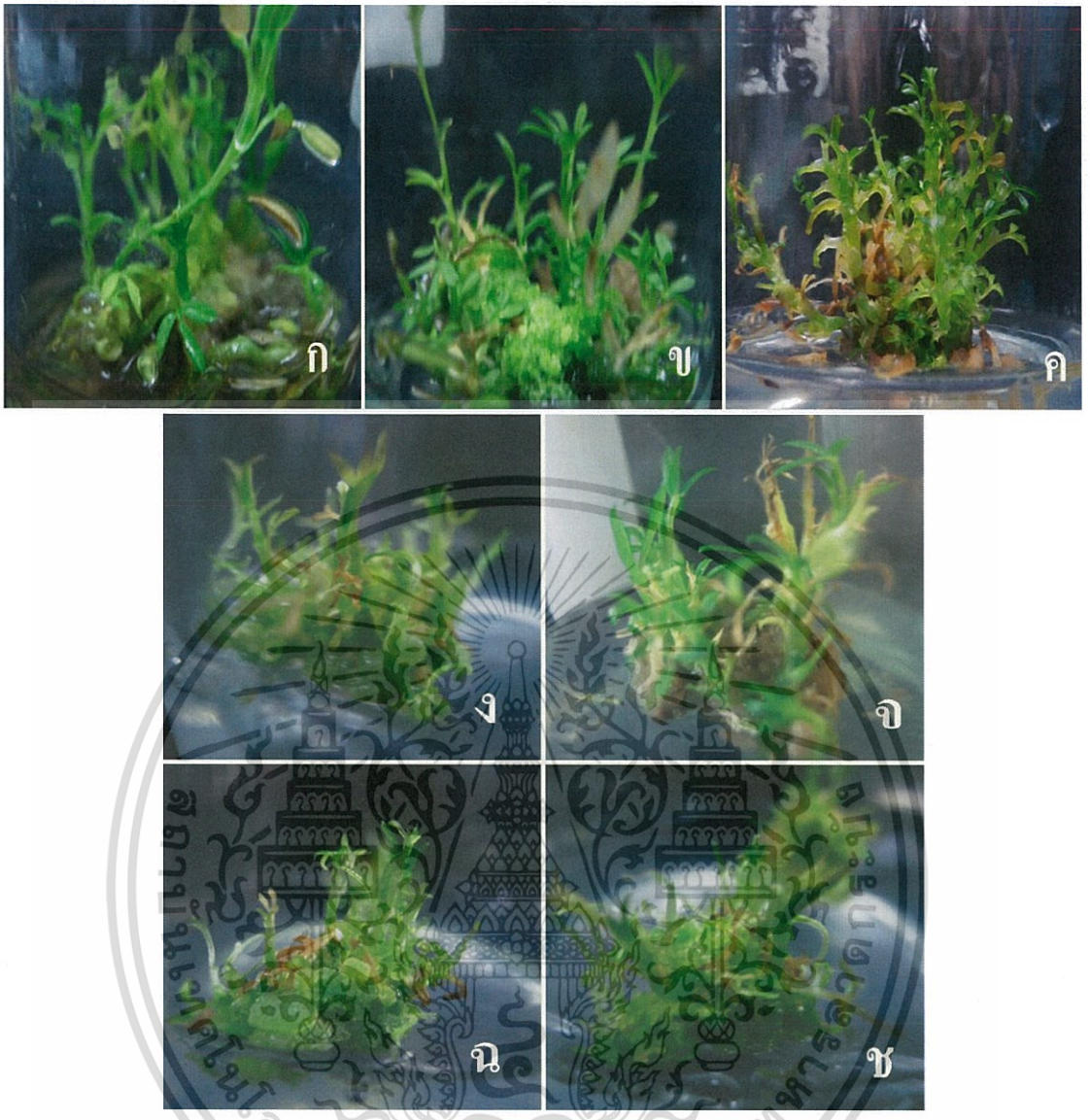
จากการคัดเลือกลักษณะความแปรปรวนทางสัณฐานวิทยาของต้นที่พัฒนาจากแคลลัสของถั่วฮามาต้าที่ได้รับรังสีที่ปริมาณต่างๆ โดยได้ทำการคัดเลือกมาทั้งหมด 6 โคลน จากลักษณะของความสูงต้น จำนวนยอด ลักษณะที่แตกต่างจากต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการฉายรังสีแกมมา ได้แก่โคลนที่ C0220 C0405 C0605 C0612 C0805 C1002 และต้นควบคุม (control) หรือต้นที่ไม่ได้รับการฉายรังสี (ตารางที่ 4.16)

ตารางที่ 4.16 ลักษณะของต้นที่คัดเลือกจำนวน 6 ต้นที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุม

ตัวอย่างที่	โคลน	จำนวนยอด	ค่าเฉลี่ยความสูงของต้น (ซม.)
1	ต้นควบคุม	10	6.77
2	C0220	13	6.56
3	C0405	15	5.98
4	C0605	13	5.31
5	C0612	10	5.43
6	C0805	9	5.05
7	C1002	10	4.89

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.26 ลักษณะของต้นคาวาลเคดที่คัดเลือกจำนวน 6 ต้น

(ก) ลักษณะถั่วคาวาลเคดที่ไม่ผ่านการฉายรังสี (ต้นควบคุม)

(ข) ลักษณะถั่วคาวาลเคดต้นโคลนที่ C0220

(ค) ลักษณะถั่วคาวาลเคดต้นโคลนที่ C0405

(ง) ลักษณะถั่วคาวาลเคดต้นโคลนที่ C0605

(จ) ลักษณะถั่วคาวาลเคดต้นโคลนที่ C0612

(ฉ) ลักษณะถั่วคาวาลเคดต้นโคลนที่ C0805

(ช) ลักษณะถั่วคาวาลเคดต้นโคลนที่ C1002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7.2 ถั่วฮามาต้า

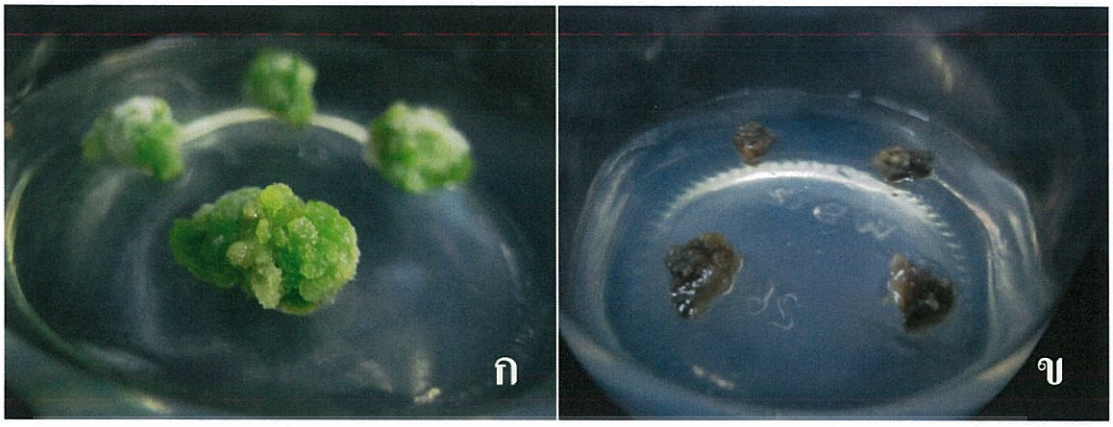
หลังจากนำแคลลัสถั่วฮามาต้าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0 20 40 60 80 และ100 เกรย์ ทำการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปริมาณรังสีที่ทำให้แคลลัสรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ (LD50) ที่ 59 เกรย์ และหลังจาก 8 และ 12 สัปดาห์ ปริมาณรังสีที่ทำให้แคลลัสรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ที่ 48 และ 25 เกรย์ (ภาพที่ 4.28) เมื่อพิจารณาลักษณะของแคลลัส พบว่าแคลลัสที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาที่ความเข้มข้นสูงแคลลัสมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ถ้ารุนแรงก็ตายในที่สุด (ภาพที่ 4.27) จากการทดลอง เมื่อปริมาณของรังสีเพิ่มขึ้น ความสูงของลำต้นจะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับ อุไร (2542) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำให้เกิดการกลายในต้นอเมซอนด้วยรังสีแกมมา โดยศึกษาอิทธิพลของรังสีแกมมาต่อการตายของต้นอเมซอน 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 4 เดือน ได้ค่า LD50 ประมาณ 550 แรด และ รังสีแกมมามีผลทำให้ต้นอ่อนอเมซอน (*Echinodosus cordifolius* L. Griseb) ที่ได้รับการฉายรังสีทุกปริมาณเจริญเติบโตช้ากว่าต้นอ่อนที่ไม่ได้รับการฉายรังสีแกมมาทุกปริมาณ จากการทดลองต้นที่พัฒนาจากแคลลัสที่ฉายรังสีแกมมา 80 และ 100 เกรย์ ซึ่งเป็นไปได้ว่า มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น โดยเป็นการกลายพันธุ์จากลักษณะต้นสูงเป็นลักษณะต้นเตี้ย โดยแคลลัสที่ได้รับรังสีปริมาณ 60 เกรย์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ จะสามารถพัฒนาเกิดยอดได้จำนวนมากที่สุด 7.71 ยอดต่อแคลลัส การฉายรังสีแกมมามีผลทำให้ความสูงลดลงเมื่อเปรียบเทียบแคลลัสที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสี (control) กล่าวคือ ยอดจากแคลลัสที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณ 20 และ 40 เกรย์ มีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 4.96 และ 4.81 มิลลิเมตรตามลำดับ ส่วนยอดจากแคลลัสที่ไม่ได้ฉายรังสีมีความสูงเท่ากับ 5 มิลลิเมตร เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าความสูงเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.18) ทั้งนี้เนื่องจากรังสียับยั้งการสร้างออกซิน มีผลต่อระบบการสังเคราะห์เอนไซม์เป็นองค์ประกอบสำคัญของกระบวนการสังเคราะห์ออกซิน ทำให้เซลล์ไม่สามารถสร้างออกซินได้หรือสร้างได้แต่ไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้เพื่อการเจริญเติบโต พืชจึงเจริญเติบโตช้า (Cooke, 1955) ส่วนลักษณะใบบางบิดเป็นเกลียว มีข้อสั้น ในทำนองเดียวกับ ชุตินทร (2532) ได้ศึกษาการชักนำเบญจมาศให้กลายพันธุ์โดยการฉายรังสีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำเบญจมาศที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อมาอาบรังสีที่อัตรา 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 กิโลแรด พบว่าปริมาณรังสีที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์คือ 1 กิโลแรด ปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตลดลง และก่อให้เกิดลักษณะผิดปกติ เช่น ข้อถี่สั้น อาจเนื่องจากรังสีไปทำลายจุดเนิดใบอย่างรุนแรงจนเซลล์บางชั้น หรือบางเซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อได้ (นงลักษณ์, 2541) หรือเกิดจากความไม่สมดุลของฮอร์โมนในเซลล์พืช (Wi และคณะ, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

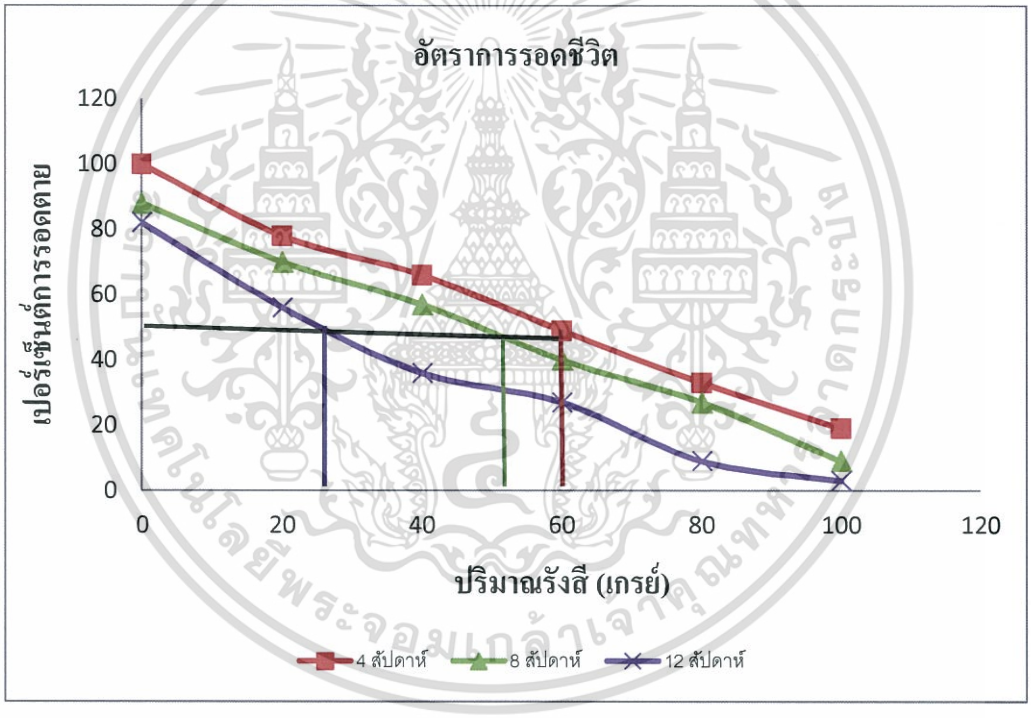
ตารางที่ 4.17 ผลของจำนวนรอดชีวิตของแคลลัสของถั่วฮามาต้า เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และค่าเฉลี่ยความสูงยอดหลังจากฉายรังสีแกมมาที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของรังสี (เกรย์)	จำนวนรอดชีวิต		เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด		จำนวนยอดเฉลี่ย/แคลลัส		ค่าเฉลี่ยความสูงยอด (มิลลิเมตร)	
	0 สัปดาห์	12 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์
0	120	99	90	94	6.85 [a]	7.45 [ab]	4.66	5.00 [a]
20	120	68	90	95	5.95 [a]	8.59 [ab]	4.64	4.96 [a]
40	120	44	81	87	2.97 [b]	8.88 [a]	4.11	4.81 [a]
60	120	33	52	81	1.85 [b]	7.71 [ab]	3.13	4.80 [a]
80	120	11	33	75	1.78 [b]	6.67 [ab]	3.01	4.22 [b]
100	120	4	22	75	1.4 [b]	6.26 [b]	2.21	3.96 [b]

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

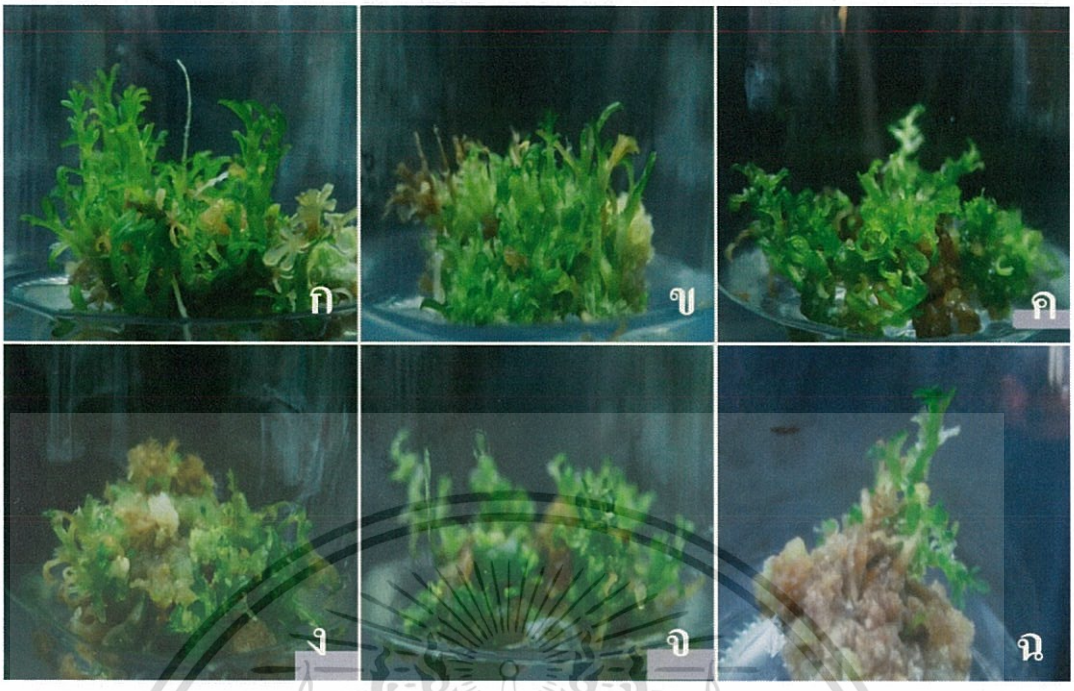


ภาพที่ 4.27 (ก) ลักษณะแคลลัสที่รอดชีวิตหลังจากผ่านการฉายรังสี (ข) ลักษณะแคลลัสที่ตายหลังจากผ่านการฉายรังสี



ภาพที่ 4.28 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของแคลลัสถั่วฮามาต้าหลังได้รับรังสีแกมมา 0 20 40 60 80 และ100 เกรย์ ระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.29 การเกิดยอดของถั่วฮามาต้าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

(ก) ลักษณะยอดถั่วฮามาต้าที่ไม่ผ่านการฉายรังสี (ต้นควบคุม)

(ข) ลักษณะยอดถั่วฮามาต้าที่ผ่านการฉายรังสี 20 เกรย์

(ค) ลักษณะยอดถั่วฮามาต้าที่ผ่านการฉายรังสี 40 เกรย์

(ง) ลักษณะยอดถั่วฮามาต้าที่ผ่านการฉายรังสี 60 เกรย์

(จ) ลักษณะยอดถั่วฮามาต้าที่ผ่านการฉายรังสี 80 เกรย์

(ฉ) ลักษณะยอดถั่วฮามาต้าที่ผ่านการฉายรังสี 100 เกรย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

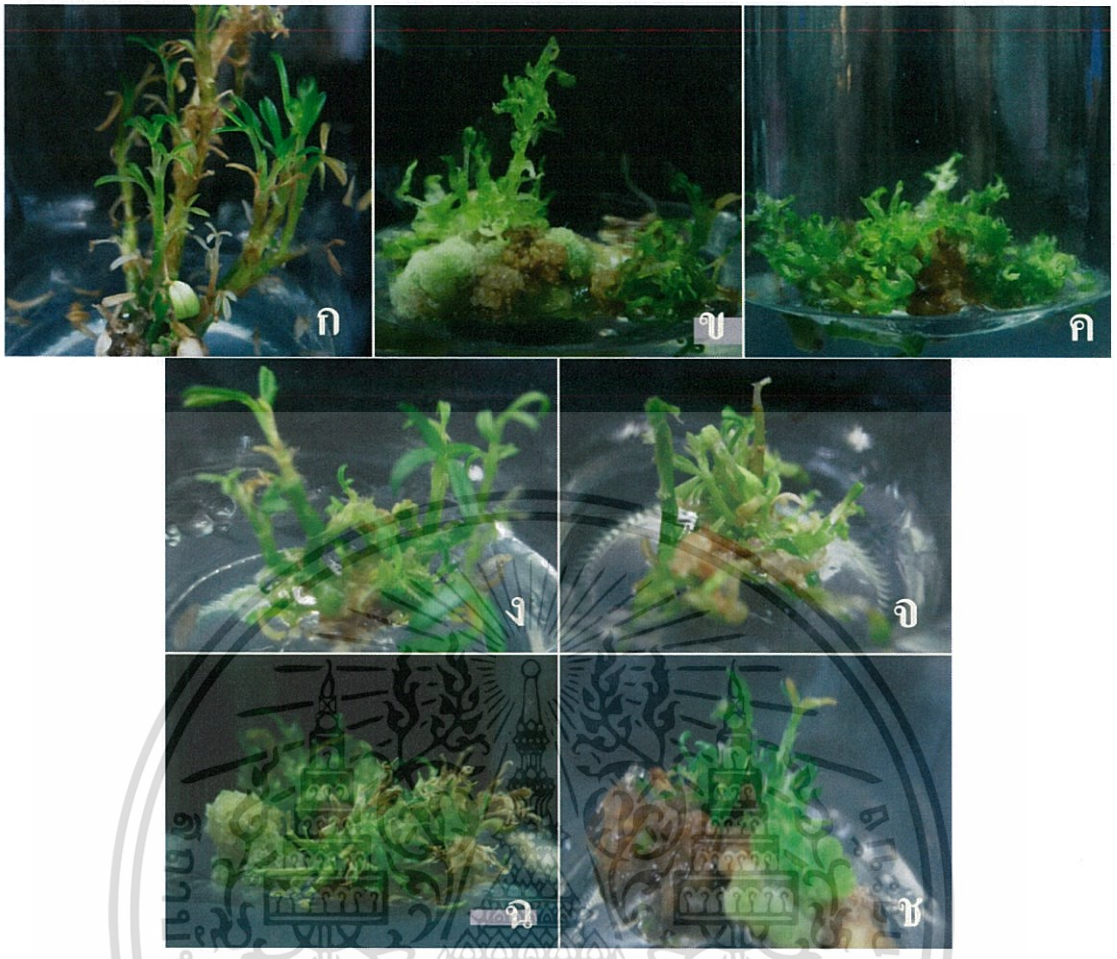
จากการคัดเลือกลักษณะความแปรปรวนทางสัณฐานวิทยาของต้นที่พัฒนาจากแคลลัสของถั่วฮามาต้าที่ได้รับรังสีที่ปริมาณต่างๆ โดยได้ทำการคัดเลือกมาทั้งหมด 6 โคลน จากลักษณะของความสูงต้น จำนวนยอด ลักษณะที่แตกต่างจากต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการฉายรังสีแกมมา ได้แก่โคลนที่ H0219 H0403 H0406 H0603 H0810 H1003 และต้นควบคุม (control) หรือต้นที่ไม่ได้รับการฉายรังสี (ตารางที่ 4.18) (ภาพที่ 4.30)

ตารางที่ 4.18 ลักษณะของต้นที่คัดเลือกจำนวน 6 ต้นที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุม

ตัวอย่างที่	โคลน	จำนวนยอด	ความสูงของต้น (ซม.)
1	ต้นควบคุม	6	6.21
2	H0219	9	4.48
3	H0403	11	4.20
4	H0406	9	5.80
5	H0603	7	5.22
6	H0810	15	4.46
7	H1003	5	3.55

*หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี HSD Turkey'Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.30 ลักษณะของต้นฮามาต้าที่คัดเลือกจำนวน 6 ต้น

(ก) ลักษณะยอดถั่วฮามาต้าที่ไม่ผ่านการฉายรังสี (ต้นควบคุม)

(ข) ลักษณะถั่วฮามาต้าต้น โคลนที่ H0219

(ค) ลักษณะถั่วฮามาต้าต้น โคลนที่ H0403

(ง) ลักษณะถั่วฮามาต้าต้น โคลนที่ H0406

(จ) ลักษณะถั่วฮามาต้าต้น โคลนที่ H0603

(ฉ) ลักษณะถั่วฮามาต้าต้น โคลนที่ H0810

(ช) ลักษณะถั่วฮามาต้าต้น โคลนที่ H1003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 การตรวจสอบต้นกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

4.8.1 ถั่วคาวาเคด

จากการคัดเลือกโคลนต้นถั่วคาวาเคดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ฉายรังสีหรือต้นควบคุม (control) จำนวน 6 ต้น ได้แก่ โคลน C0220 C0405 C0605 C0612 C0805 และ C1002 โดยตัวอักษร C หมายถึง ถั่วคาวาลเคด ตัวเลข 2 ตัวแรกหมายถึงปริมาณรังสีแกมมา เช่น 02 คือ 20 เกรย์ ตัวเลข 2 ตัวสุดท้ายหมายถึงต้น เมื่อนำโคลนที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุม และต้นควบคุมมาสกัดดีเอ็นเอ และตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยการศึกษาจากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างไปจากต้นควบคุม ด้วยไพรเมอร์จำนวน 7 ชนิด พบว่ามีจำนวนไพรเมอร์ 6 ชนิด คือ OPH05 OPV02 OPV03 OPN09 OPN15 และ OPZ 04 ที่ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างไปจากต้นควบคุม โดยไพรเมอร์ OPN 09 สามารถแยกความแตกต่างได้ดีที่สุดในทุกโคลน และโคลนที่สามารถแยกความแตกต่างจากต้นควบคุมมากที่สุดคือโคลน C0805 โดยให้จำนวนแถบที่แตกต่างจากต้นควบคุมจำนวน 14 แถบ คิดเป็นค่าเฉลี่ยต่อไพรเมอร์เท่ากับ 2.33 ดังตารางที่ 4.19

ตารางที่ 4.19 แสดงโคลน และจำนวนแถบที่แตกต่างจากต้นควบคุมเมื่อใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบต้นถั่วคาวาลเคดที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมาโดยใช้ไพรเมอร์ 6 ชนิด

ไพรเมอร์	โคลนที่/จำนวนแถบที่แตกต่างจากต้นควบคุม					
	C0220	C0405	C0605	C0612	C0805	C1002
OPH05	1	1	0	1	1	1
OPV02	1	0	2	0	1	0
OPV03	0	0	1	0	1	0
OPN09	1	1	2	4	4	1
OPN15	1	1	0	2	5	3
OPZ04	2	2	2	1	2	1
จำนวนที่แตกต่างทั้งหมด	6	5	7	8	14	5
ค่าเฉลี่ยต่อไพรเมอร์	1	0.83	1.17	1.33	2.33	0.83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8.2 ถั่วฮามาต้า

จากการคัดเลือกโคลนต้นถั่วฮามาต้าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ฉายรังสีหรือต้นควบคุม (control) จำนวน 6 ต้น ได้แก่ โคลน H0219 H0403 H0406 H0603 H0810 และ H1003 โดยตัวอักษร H หมายถึง ถั่วฮามาต้า ตัวเลข 2 ตัวแรกหมายถึงปริมาณรังสีแกมมา เช่น 02 คือ 20 เกรย์ ตัวเลข 2 ตัวสุดท้ายหมายถึงต้น เมื่อนำโคลนที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุม และต้นควบคุมมาสกัดดีเอ็นเอ และตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยการศึกษาจากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างไปจากต้นควบคุม ด้วยไพรเมอร์จำนวน 7 ชนิด พบว่ามีจำนวนไพรเมอร์ 6 ชนิด คือ OPH05 OPV02 OPV03 OPN15 OPY15 และ OPZ 04 ที่ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างไปจากต้นควบคุม โดยไพรเมอร์ OPY15 สามารถแยกความแตกต่างได้ดีที่สุดในทุกโคลน และโคลนที่แสดงความแตกต่างจากต้นควบคุมมากที่สุดคือโคลน H0403 โดยให้จำนวนแถบที่แตกต่างจากต้นควบคุมจำนวน 20 แถบ คิดเป็นค่าเฉลี่ยต่อไพรเมอร์เท่ากับ 3.33 ดังตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.20 แสดงโคลน และจำนวนแถบที่แตกต่างจากต้นควบคุมเมื่อใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบต้นถั่วฮามาต้าที่ผ่านและไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมาโดยใช้ไพรเมอร์ 6 ชนิด

ไพรเมอร์	โคลนที่/จำนวนแถบที่แตกต่างจากต้นควบคุม					
	H0219	H0403	H0406	H0603	H0810	H1003
OPH05	3	3	0	2	2	2
OPV02	0	2	0	1	1	1
OPV03	2	2	2	2	2	2
OPN15	2	4	4	0	3	0
OPY15	5	6	4	5	5	5
OPZ04	3	3	3	3	4	1
จำนวนที่แตกต่างทั้งหมด	15	20	13	13	17	11
ค่าเฉลี่ยต่อไพรเมอร์	2.5	3.33	2.17	2.17	2.83	1.83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 ถั่วคาวาลเคด

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

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

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

แคลลัสที่พัฒนาจากส่วนของใบเลี้ยงสามารถชักนำให้เป็นต้นบนอาหารสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด 90 เปอร์เซ็นต์สามารถชักนำยอดเฉลี่ยได้มากที่สุด 6.47 ยอดต่อแคลลัส และความสูงเฉลี่ย 5.09 มิลลิเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อนำแคลลัสที่พัฒนายอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น5มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงเฉลี่ย7.15มิลลิเมตรเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

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

จากกการฉายรังสีแคลลัสที่ปริมาณต่างๆ ปริมาณรังสีที่ทำให้ถั่วคาวาลเคดตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD50) คือ53 เกรย์ ที่ระยะเวลา 12 สัปดาห์แคลลัสได้รับรังสีปริมาณ20และ40เกรย์มีเปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความมีชีวิตรอดร้อยละ 92และ81ตามลำดับแคลลัสได้รับรังสีปริมาณ 60 เกรย์สร้างยอดเฉลี่ยมากที่สุดคือ8.02ยอดต่อแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์พบลักษณะผิดปกติคือยอดเจริญเติบโตช้าแตกกอเป็นกระจุก

การตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค RAPD พบว่าไพรเมอร์จำนวน6ชนิด คือ OPH05OPV02 OPV03 OPN09 OPN15 และ OPZ04สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาและไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมาได้

5.2 ถั่วฮามาต้า

จากการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงถั่วฮามาต้าให้เกิดยอดจำนวนมาก พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักให้เกิดยอดเฉลี่ย 2.60ยอดต่อเมล็ด และความสามารถในการเกิดยอด 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 4.88 ยอดต่อเมล็ด

เมื่อนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร พบว่าเซลล์แขวนลอยมีค่าน้ำหนักสดและค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดในวันที่ 21 คือ 3.0256และ 0.2713 กรัมต่ออาหาร 25 มิลลิลิตรตามลำดับเซลล์แขวนลอยที่อยู่ในระยะ lag phase อยู่ในช่วง 0-6 วัน ระยะ log phase ในช่วง 9-18 วัน

จากการนำชิ้นส่วนของแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุดได้ 7.33ยอดต่อแคลลัส ยอดมีความสูงเฉลี่ย 4.9มิลลิเมตรและจากการทดลองยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูง 4.44 4.90และ 5.93มิลลิเมตร ตามลำดับ

ส่วนการชักนำรากจากสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 สามารถชักนำรากที่มีลักษณะยาวสีขาวปนน้ำตาล สามารถชักนำจำนวนรากเฉลี่ยได้ 8.36 รากต่อต้นความยาวรากเฉลี่ย 3.43 มิลลิเมตรและเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 96 เปอร์เซ็นต์

จากกการฉายรังสีแคลลัสที่ปริมาณต่างๆ ปริมาณรังสีที่ทำให้ถั่วฮามาต้าตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD50) คือ25เกรย์ ที่ระยะเวลา 12 สัปดาห์ แคลลัสที่ได้รับรังสีปริมาณ20และ40เกรย์มีเปอร์เซ็นต์ความมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีวิตรอดร้อยละ 94และ 80 ตามลำดับแคลลัสที่ได้รับรังสีปริมาณ40เกรย์สร้างยอดเฉลี่ยคือ8.88ยอดต่อแคลลัส

การตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค RAPD พบว่าไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิด คือ OPH05OPV02 OPV03 OPN15 OPY15 และ OPZ04 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาและไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมาได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2551. **รายงานประจำปี 2551**. [Online].Available :http://www.dld.go.th, 13 มกราคม 2551

กิริยา สังข์ทองวิเศษ. 2547.**ระบบการถ่ายยีนที่เหมาะสมสำหรับถั่ว *Stylosantheshamata*พันธุ์ Verano**.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.

ขนิษฐา บุรมย์. 2547. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วฮามาต้าและหญ้ารูซี่**.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.

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

จันทกานต์อรณนันท์. 2544. **การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าเนเปียร์แคระโดยรังสีแกมมากับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จินดา สนิทวงศ์ฯ ประพฤทธิ์ จงใจภักดีและพิมพาพร พลเสน.2546. คุณค่าทางโภชนะของถั่วค า วาลเคดและระดับการเสริมถั่วคาวาลเคดในโคเนื้อ. **รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2546 อาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์**. หน้า 264 – 276.

ชาญชัย มณีดุลย์. 2525. ถั่วฮามาต้า. **เอกสารเผยแพร่ กองอาหารสัตว์**. ฉบับโรเนียว 9 หน้า.

ชาตรี สิทธิกุล วิชาสอาดสุด และสุพรรณ ปัญญาฟู. 2537. การใช้สารEthyl Methanesulfonate กั บ ถั่วเหลืองเพื่อชักนำให้ต้านทานโรค. **เอกสารรายงานการประชุมทางวิชาการการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอาหารและการเกษตรโดยนิวเคลียร์II**. การปรับปรุงพันธุ์พืช. วันที่ 25-27 พ.ค. 2537. กรุงเทพฯ

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

ชุตินทรบูรณะกนิษฐ. 2532. **การชักนาให้เบญจมาศกลายพันธุ์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสี**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ตีรณา อุทุมพฤกษ์พร. 2551. **การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าแพงโกล่าโดยรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

บุญฤา วิไลพล. 2522. การปรับตัวและอนาคตของถั่วเวอราโนสไตโลในภาคอีสาน. **แก่นเกษตร** 7(2): 77-82.

บุญฤา วิไลพร. 2533. **พืชอาหารสัตว์สำหรับภาคอีสาน.** ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 81-82.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2544. **เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ปิยนันท์ พวงจันทร์. 2554. **การชักนำให้เกิดการกลายในทานตะวันลูกผสม (*Helianthus annuus* L.) โดยการฉายรังสีแกมมาร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปกรณ์ ตั้งปอง, 2552. **ผลของการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันและโครนิกต่อเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงอนูเบียสคอนเจนซิส.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2546. **พันธุศาสตร์.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

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

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

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

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศูนย์สารสนเทศ. 2554. เกษตรกรต่อปศุสัตว์ในประเทศไทย. **ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลโคเนื้อ ปี 2545 – 2554 ระหว่างกรมปศุสัตว์ และสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร.** กรมปศุสัตว์. [Online]. Available : http://www.dld.go.th

ศูนย์สารสนเทศ. 2554. เกษตรกรต่อปศุสัตว์ในประเทศไทย. **ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลโคนม ปี 2545 – 2554 ระหว่างกรมปศุสัตว์ และสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร.** กรมปศุสัตว์. [Online].Available :http://www.dld.go.th

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

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

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

สายัณห์ ทัดศรี. ไม่ระบุ พ.ศ.. **พืชอาหารสัตว์และหลักการทำทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์.** พิมพ์ครั้งที่ 3. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สายัณห์ ทัดศรี. 2540. **พืชอาหารสัตว์เขตร้อนการผลิตและการจัดการ.** ภาควิชาพืชไร่นาคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2536. **การกลายพันธุ์ของพืช.** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2540. **การกลายพันธุ์ของพืช.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

สุพรรณี แก่นสาร. 2532. **ผลของรังสีแกมมาต่อการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนในข้าว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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

อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม วิชุดา พิริยพงศ์ ศุภลักษณ์ มั่นไทย ศรัณย์ สุขวัฒน์ และ จันทกานต์ อรณนันท์. 2551. **การเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสที่พัฒนามาจากไฮโพคอทิลของถั่วคาวาลเคด**. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 5. 8-9 ธันวาคม. หน้า 1139-1145.

อุไร เรืองฉรงค์. 2542. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนาให้เกิดการกลายในต้นอเมซอนโดยใช้รังสีแกมมา**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2530. **วิธีปรับปรุงพันธุ์โดยการกลายพันธุ์**. เอกสารคำสอน. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2541. **หลักการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยรังสีในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด.ในการปรับปรุงพันธุ์พืช**โดยใช้เทคนิคการกลายพันธุ์. เอกสารคำสอน. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 97 – 111.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาณัติ วัฒนสิทธิ์ สุมนา งามผ่องใส วันชัย ถนอมทรัพย์ และสุวิมล ถนอมทรัพย์. 2543. ถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 72. การประชุมทางวิชาการถั่วเขียวแห่งชาติครั้งที่ 8. ณ ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม. หน้า 53-62.

อมรา คัมภิรานนท์. 2540. **พันธุศาสตร์ของเซลล์**. มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์. กรุงเทพฯ.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Heinz, D.J. and Mee, G.W.P. 1969. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. **Crop Science.** 9: 346-348.

Ho, W. and Vasil, I. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) the morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. **Protoplasm.** 118: 169-180.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Iram, S., Saad, B.J., Muneera, R., Al, O. and Anis, M. 2012. Stimulation of *in vitro* organogenesis from epicotyl explants and successive micropropagation round in *Cassia angustifolia* Vahl.: an important source of sennosides. **Agroforestry Systems.** 87(3): 583-590.

Islam, M.A., Hassan, Z., Nisbah, I. and Chaudhary, M.F. 2005. Effect of different plant growth regulators for the economical production of *in vitro* root cultures of *Cicer arietinum* L. Int. **Journal Agriculture Biolology.** 7(4): 621-626.

Jaiswal, V.S. and Naryan, P. 1985. Regeneration of plantlets from the callus of stem segment of adult plants of *Fucus religosi* L. **Plant Cell Report.** 4: 256-258.

Jing, Q.M., Mohsin, A.Z., John, T.A. and Ilimar, A. 2006. In vitro regeneration of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Blackeye cowpea via shoot organogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 87: 121–125.

Kailash, C.M., Singh, M.S., Rathore and Shekhawat, N.S. 2009. Somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration in moth bean (*Vigna aconitifolia* (Jacq.) Marechal): a recalcitrant grain legume. **Plant Biotechnology.** 3: 205–211.

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Scowcroft, W.R. and Adamson, J.A. 1976. Organogenesis from callus cultures of the legume, *Stylosanthes hamata*. **Plant Science Letters**. 7:39-42.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

Sounder, R.V., Telavathi, D.H. and Nijalingappa, B.H.M. 1989. Shoot tip culture in *Dolichos biflorus* L. **Current Science**. 58: 1385–1388.

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

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

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

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

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

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

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

Wilaipon, B. and Humphreys L.R. 1976. Grazing and moving effect on the seed production of *Stylosanthes hamata* cv. Verano. **Tropical Grassland**. 10: 107-112.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wilaipon, B., Gigir, S.A. and Humphreys, L.R. 1979. Apex, lamina, and shoot removal effects on seed production and growth of *Stylosanthes hamata* cv. Verano. **Australia Journal Agriculture Science**. 30: 253-306.

Wilaipon, B. and Humphreys, L.R. 1981. Influence of grazing on the seed production of *Stylosanthes hamata* cv. Verano. **Thai Journal Agriculture Science**. 14: 69-81.

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

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

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

[Online].Available:http://www.tropicakforages.info/key/Forages/Media/HTMl/Centrosema_pascuorum.htm

[Online].Available:http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=Fabaceae

[Online].Available:http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Gallery/pictures/styham.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก-1 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Murashige and Skoog (1962)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้แต่ง

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวรัตนาภรณ์ บุญเรือง
วัน เดือน ปีเกิด	วันอาทิตย์ที่ 16 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2529
ที่อยู่	79/122 ซอยสวนสยาม ถนนสวนสยาม เขตคันนายาว แขวงคันนายาว กทม. รหัสไปรษณีย์ 10230
	โทร. 084-217-0572
ประวัติการศึกษา	2550 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้