อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า (Arachis glabrata)

EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATOR ON TISSUE CULTURE OF Arachis glabrata

จิรัชญา เกตุพรหม
ธันย์สิตา บุณยกาญจนารัตน์
พิชญ์สินี สาระพันธุ์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*Arachis glabrata*)

EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATOR ON TISSUE CULTURE OF *Arachis glabrata*

จิรัชญา เกตุพรหม
ธันย์สิตา บุณยกาญจนารัตน์
พิชญ์สินี สาระพันธุ์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....149026
วัน,เดือน,ปี.....27 ส.ค. 2560

b.12879191
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATOR ON TISSUE CULTURE OF *Arachis glabrata*

JIRATCHAYA KETPROM
THANSITA BHUNYAKARNJANARAT
PITSINEE SARAPHAN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

หัวข้อโครงงานพิเศษ	อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*Arachis glabrata*) Effect of Plant Growth Regulator on Tissue Culture of *Arachis glabrata*	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวจิรัชญา เกตุพรหม	รหัสนักศึกษา 55051067
	นางสาวธันย์สิตา บุณยกาญจนารัตน์	รหัสนักศึกษา 55051104
	นางสาวพิชญ์สินี สาระพันธุ์	รหัสนักศึกษา 55051138
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
ปีการศึกษา	2558	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.วิมลมาศ บุญมี	

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม กรรมการ และอาจารย์ที่ปรึกษา	
ดร.วิมลมาศ บุญมี กรรมการ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*Arachis glabrata*)

ชื่อนักศึกษา นางสาวจิรัชญา เกตุพรหม รหัสนักศึกษา 55051067
นางสาวธันย์สิตา บุณยกาญจนารัตน์ รหัสนักศึกษา 55051104
นางสาวพิชญ์สินี สาระพันธุ์ รหัสนักศึกษา 55051138

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2558

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.วิมลมาศ บุญมี

บทคัดย่อ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบและข้อของถั่วลิสงเถาสกุลกลาบราต้า (*Arachis glabrata*) โดยการนำชิ้นส่วนใบของสายพันธุ์ Ecoturf และ Florigraze มาชักนำให้เกิดแคลลัส ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสายพันธุ์ Ecoturf ในแต่ละความเข้มข้น สามารถชักนำชิ้นส่วนใบให้เกิดแคลลัสได้จำนวนที่ใกล้เคียงกัน และมีขนาดที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนสายพันธุ์ Florigraze ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 91.67 และในการนำชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถาสายพันธุ์ Ecoturf มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA Kn หรือ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เจริญเป็นยอดและแคลลัสร่วมกันได้มากที่สุดในสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เมื่อเทียบกับ BA และ Kn ต่อมาศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่เหมาะสม โดยศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 1 2 3 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.75 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดและแคลลัสร่วมกันได้สูงสุด คิดเป็นร้อยละ 40 ซึ่งที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ต้นที่สมบูรณ์กว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงเหมาะกับการนำไปชักนำให้เกิดรากต่อไป

คำสำคัญ : การชักนำให้เกิดแคลลัส การชักนำให้เกิดยอด ถั่วลิสงเถากลาบราต้า พืชตระกูลถั่ว

Title	Effect of Plant Growth Regulator on Tissue Culture of *Arachis glabrata*		
Students	Miss Jiratchaya	Ketprom	Student ID 55051067
	Miss Thansita	Bhunyakarnjanarat	Student ID 55051104
	Miss Pitsinee	Saraphan	Student ID 55051138
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2015		
Advisor	Asst. Prof. Dr. Anurug Poeaim		
Co-advisor	Dr. Wimonmat Boonmee		

ABSTRACT

Studied on tissue culture of *Arachis glabrata* from leaf and node. The callus induction from leaf of Arachis glabrata cv. Ecoturf and Florigraze. MS medium supplemented with 6 concentrations (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 and 3 mg/L) of 2,4-D was for callus induction from leaflet explant. Percent callus induction of Ecoturf was not different among concentration of 2,4-D. For Florigraze, using 0.25 mg/L of 2,4-D gave the highest percentage of callus induction as 91.67%. The callus induction and shoot induction from node of Arachis glabrata cv. Ecoturf was culture on MS medium supplemented with 4 concentrations (0.5, 1, 3 and 5 mg/L) of Kn BA or TDZ. The results found that the highest percentage of shoot and callus induction was on TDZ. For the best concentration of TDZ for callus and shoot induction from node was culture on MS medium supplemented with TDZ in 8 concentrations (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 5 and 7 mg/L) for 8 weeks .The results shown that both of 0.75 and 3 mg/L of TDZ gave the highest percentage of shoot and callus induction as 40%. The induced shoots by using 3 mg/L of TDZ were suitable for root induction more than 0.75 mg/L.

Keywords : *Arachis glabrata*, callus induction, legume, shoot induction

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ผู้จัดทำต้องขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ ดร.วิมลมาศ บุญมี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้กรุณาให้ความรู้ คอยแนะนำให้คำปรึกษา และคอยช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษจนสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการที่ได้สละเวลา และแนะนำให้คำปรึกษา รวมถึงช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคุณศักดา ประจักษ์บุญเจษฎา ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์จังหวัดเพชรบุรี และ คุณจันทกานต์ อรณนันท์ ผู้เชี่ยวชาญด้านวิเคราะห์อาหารสัตว์ สำหรับตัวอย่างพืชที่นำมาใช้ในการศึกษา

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ ประจำภาควิชาชีววิทยา ตึกจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 ที่เอื้ออำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับการทดลองในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งสำหรับพ่อแม่ บุคคลอันเป็นที่รักและเคารพทุกท่านที่คอยเป็นกำลังใจตลอดมา ขอบคุณพี่นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา ที่เป็นทั้งผู้ให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางที่เหมาะสม และช่วยเป็นกำลังใจเสมอมา รวมถึงเพื่อนที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และแก้ไขปัญหาต่างๆ จนจบโครงงานพิเศษ คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อบุคคลที่สนใจไม่มากก็น้อย หากมีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ ที่นี้

จิรัชญา เกตุพรหม
ธันย์สิตา บุณยกาญจนารัตน์
พิชญ์สินี สาระพันธุ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ความสำคัญของถั่วอาหารสัตว์ 3
2.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*Arachis glabrata*) 4
2.2.1 อนุกรมวิธานของถั่วลิสงเถากลาบราต้า 4
2.2.2 ถิ่นกำเนิดของถั่วลิสงเถากลาบราต้า 4
2.2.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของถั่วลิสงเถากลาบราต้า 5
2.2.4 สภาพนิเวศวิทยาของถั่วลิสงเถากลาบราต้า 6
2.2.5 ประโยชน์ในการเลี้ยงสัตว์ 7
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 11
3.1 วัสดุและอุปกรณ์ 11
3.1.1 พืชและการเก็บตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา 11
3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ 11
3.1.3 สารเคมี 12
3.2 วิธีการทดลอง 12
3.2.1 การคัดเลือกชิ้นเนื้อเยื่อพืช 12
3.2.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นเนื้อเยื่อพืช 12
3.2.3 การชักนำชิ้นส่วนใบให้เกิดแคลลัส 13

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.2.4 การชักนำยอดและแคลลัสจากชิ้นส่วนข้อ 13
3.2.5 วิธีการบันทึกผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง 14
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 15
4.1 ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากใบ 15
4.2 ผลการศึกษาการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดและแคลลัส 21
4.2.1 ผลการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำข้อให้เกิดยอดและแคลลัส 21
4.2.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำข้อให้เกิดยอดและแคลลัส 28
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 33
5.1 สรุปผลการวิจัย 33
5.2 ข้อเสนอแนะ 34
เอกสารอ้างอิง 35
ภาคผนวก 36
ภาคผนวก ก 38
ภาคผนวก ข 39

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 ผลการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf ในสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ที่ 4 และ 8 สัปดาห์.....17

4.2 ผลการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Florigraze ในสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ที่ 4 และ 8 สัปดาห์.....18

4.3 ผลการชักนำข้อให้เกิดยอดและแคลลัสของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์.....22

4.4 ผลการชักนำข้อให้เกิดยอดและแคลลัสของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....23

4.5 ผลการทดลองการศึกษาอิทธิพลของชิ้นส่วนข้อที่มีผลต่อการชักนำข้อให้เกิดยอดและแคลลัสของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 1 2 3 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ 4 และ 8 สัปดาห์.....29

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะของถั่วลิสงเถากลาบราต้า	4
2.2	ส่วนเหง้าและลำต้นของต้นถั่วลิสงเถากลาบราต้า	5
2.3	ลักษณะใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf Florigraze และ Arbrook	5
2.4	ลักษณะดอกของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf	6
4.1	ผลร้อยละของการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf หลังทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์	19
4.2	ผลร้อยละของการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Florigraze หลังทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์	19
4.3	ผลการชักนำการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf และ Florigraze ในสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร	20
4.4	ร้อยละจำนวนแคลลัสและยอดในสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	24
4.5	ร้อยละจำนวนแคลลัสและยอดในสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์	25
4.6	ผลการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ในสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn (ก-ค) BA (ง-ฉ) และ TDZ (ช-ฌ) ที่เวลา 0 4 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ	26
4.7	ผลการชักนำการเกิดยอดและแคลลัสร่วมกันจากชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถา-กลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ในสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn (ก-ค) BA (ง-ฉ) และ TDZ (ช-ฌ) ที่เวลา 0 4 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ	27
4.8	ร้อยละจำนวนแคลลัสและยอดในสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารแข็งสูตร MS เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	30

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.9	ร้อยละจำนวนแคลลัสและยอดในสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารแข็งสูตร MS เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์	31
4.10	ผลการชักนำการเกิดยอดและแคลลัสร่วมกันจากชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถา-กลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ในสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก, ค) และความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข, ง) ที่เวลา 4 และ 8 สัปดาห์	32

คำย่อ/สัญลักษณ์

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
BA	N6-Benzyladenine
Kn	Kinetin
MS	Murashige and Skoog (1962) Basal medium
PPM	Plant preservative mixture
TDZ	Thaidiazuron

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

ประเทศไทยเป็นพื้นที่ที่มีสภาพภูมิอากาศเป็นแบบร้อนจัด และบางพื้นที่มีสภาพพื้นที่เป็นแบบดินดาน และดินเหนียวปนทราย ในช่วงฤดูแล้งจะจับตัวกันเป็นดินแข็ง มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ และขาดความอุดมสมบูรณ์ จึงส่งผลต่อการปลูกพืชที่ให้ผลผลิตต่ำ ทั้งยังส่งผลต่อเกษตรกรที่มีการปลูกพืชอาหารเพื่อนำไปเลี้ยงปศุสัตว์เป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดปัญหาการขาดแคลนพืชอาหารสัตว์เกิดขึ้น เมื่อเกิดภาวะขาดแคลนอาหารผลที่ตามมา คือ ราคาของพืชอาหารสัตว์ทั้งในรูปแบบสด และแห้งมีแนวโน้มสูงขึ้น ส่งผลต่อต้นทุนการผลิตปศุสัตว์ที่สูงขึ้นตามไปด้วย (มนัสนันท์ และคณะ, 2013) เพื่อเป็นการช่วยแก้ไขปัญหา และลดภาระต้นทุนต่อเกษตรกรในการปลูกหญ้าหรือถั่วอาหารสัตว์ชนิดต่างๆ โดยถั่วเขตร้อนที่ใช้ปลูกเป็นอาหารสัตว์จะมีเพียงไม่กี่ชนิด ในประเทศไทยนิยมปลูกถั่วในสกุล *Stylosanthes* เช่น ถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata*) รองลงมาได้แก่ สกุล *Centrosema* เช่น ถั่วคาวาลเคต (*Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade) และมีการแนะนำให้เกษตรกรปลูกเพื่อใช้เลี้ยงสัตว์เป็นส่วนใหญ่ (ลีลาพรรษ์ และคณะ, 2556) ส่วนถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*Arachis glabrata*) เป็นพืชอาหารสัตว์เขตร้อนที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ เป็นพืชที่ทนแล้ง เจริญเติบโตได้ดีในดินเกือบทุกชนิด ใช้ปลูกตามแนวขอบถนนเพื่ออนุรักษ์ดิน (ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ชัยนาท, 2015) สามารถปลูกร่วมกับหญ้าได้หลายชนิด และยังทนทานต่อร่มเงาได้ (กานดา และคณะ, 2547) มนัสนันท์ และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาถึงองค์ประกอบทางโภชนาการและการย่อยสลายได้ในกระเพาะรูเมนของโคนมของถั่วลิสงเถาสายพันธุ์ Florigraze Arbrook และ Ecotarf พบว่าถั่วลิสงเถาพันธุ์ Arbrook และ พันธุ์ Florigraze มีปริมาณโปรตีน และเฮมิเซลลูโลสสูง ตามลำดับ โดยมีปริมาณ crude protein สูงถึงร้อยละ 17 และมีค่าการย่อยได้ของวัตถุแห้ง และค่าการย่อยได้ของเยื่อใยสูง จึงเหมาะสำหรับนำไปปลูกเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ แต่ก็ยังไม่ค่อยแพร่หลายมากนักเนื่องจากถั่วลิสงเถากลาบราต้าติดเมล็ดได้น้อย จึงต้องใช้ส่วนของเหง้าที่อยู่ใต้ดินไปทำการเพาะกล้าเพื่อขยายพันธุ์ (ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ชัยนาท, 2015) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลานาน และไม่เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกรต่อการนำไปเป็นอาหารเพื่อเลี้ยงสัตว์

ด้วยคุณสมบัติของถั่วลิสงเถาที่มีประโยชน์ และสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารสัตว์ได้ ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาถึงปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ และข้อของถั่วลิสงเถา-กลาบราต้าพันธุ์ Florigraze และ Ecotarf ในสภาวะปลอดเชื้อ เพื่อการขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว และเพื่อให้องค์ความรู้ที่ได้ไปพัฒนาต่อยอดงานวิจัยอันจะนำไปสู่การส่งเสริมให้เกษตรกรได้นำถั่วลิสงเถา-กลาบราต้าไปเป็นอาหารสัตว์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ และข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*Arachis glabrata*) ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

2. เพื่อศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ทำให้เกิดยอดและแคลลัส

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์ จากการใช้ชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*A. glabrata*) สายพันธุ์ Ecoturf และ Florigraze และชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*A. glabrata*) สายพันธุ์ Ecoturf ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ โดยศึกษาการเกิดยอด และการเกิดแคลลัสของถั่วลิสงเถากลาบราต้า

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงวิธีการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบและข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*A. glabrata*) ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

2. ทราบถึงสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดและแคลลัส

3. ทราบถึงระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดและแคลลัส

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของถั่วอาหารสัตว์ (เชาวลิต และคณะ, 2539)

พืชอาหารสัตว์ เป็นอาหารที่สำคัญสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง ได้แก่ โคเนื้อ โคนม กระบือ แพะ และแกะ เป็นต้น พืชอาหารสัตว์ที่สำคัญมี 2 ชนิด คือ หญ้าอาหารสัตว์ และถั่วอาหารสัตว์ ปัจจุบันเกษตรกรได้รับการส่งเสริมให้ปลูกทั้งหญ้าอาหารสัตว์ และถั่วอาหารสัตว์ร่วมกันเรียกว่าแปลงหญ้าผสมถั่ว เนื่องจากหญ้าโดยทั่วไปให้ผลผลิตสูง เป็นแหล่งพลังงานและสัตว์ชอบกิน ส่วนถั่วอาหารสัตว์นั้นมีโปรตีนสูง

พืชตระกูลถั่ว เป็นอาหารหยาบหลักที่สำคัญเท่าๆ กับหญ้าอาหารสัตว์ เกษตรกรควรปลูกถั่วผสมหญ้า เพื่อทำให้แปลงหญ้าเลี้ยงสัตว์มีคุณค่าทางอาหารสูง เนื่องจากถั่วมีสารโปรตีนสูงกว่าหญ้า นอกจากนั้น รากของพืชตระกูลถั่วสามารถสะสมธาตุไนโตรเจนจากอากาศ หญ้าที่ปลูกผสมกับถั่วสามารถใช้ธาตุไนโตรเจนจากถั่วได้ ทำให้ผลผลิตหญ้าสูงขึ้น

ลักษณะของถั่วอาหารสัตว์ ถั่วอาหารสัตว์ที่ได้มีทดลองปลูก ขยายพันธุ์ และกระจายพันธุ์ให้เกษตรกรปลูกได้ผลดีมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีข้อดีข้อเสีย และเหมาะกับสภาพดิน ฟ้า อากาศ และการนำไปใช้ประโยชน์แตกต่างกัน สามารถแบ่งถั่วอาหารสัตว์เป็น 3 กลุ่มตามลักษณะทรงต้น และการเจริญเติบโต คือ

1. ถั่วลำต้นเถาเลื้อย พันธุ์ที่นิยมปลูก ได้แก่ ถั่วเซนโตร ถั่วเซอราโตร ซึ่งมีเถาเลื้อยพันเมื่อปลูกรวมกับหญ้า เลื้อยพันต้นหญ้า ทำให้โค กระบือ กินหญ้า และถั่วพร้อมๆกัน

2. ถั่วลำต้นเป็นทรงพุ่ม พันธุ์ที่นิยมปลูก ได้แก่ เวอราโนสไตโลหรือถั่วฮามาต้า แกรมสไตโล ซึ่งมีทรงพุ่มเตี้ย ต้นโตเต็มที่สูงเพียง 50-60 เซนติเมตร แตกกิ่งก้านและมีใบขนาดเล็กจำนวนมาก เจริญเติบโตได้ในดินหลายชนิด และมักทนความแห้งแล้งหรือทนการเหยียบย่ำได้ดี

3. ไม้ยืนต้น พืชตระกูลถั่วบางชนิดเป็นไม้ยืนต้น เช่น กระถิน แคบ้าน แคฝรั่ง ไมยราบ มะแฮะ มักมีใบสีเขียวตลอดปี สามารถเลี้ยงสัตว์ได้ ปัจจุบันสนใจปลูกมากขึ้นเนื่องจากทนความแห้งแล้ง และเลี้ยงสัตว์ในฤดูขาดแคลน

2.2 ถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*Arachis glabrata*)

2.2.1 อนุกรมวิธานของถั่วลิสงเถากลาบราต้า

อนุกรมวิธานของถั่วลิสงเถากลาบราต้า (รูปที่ 2.1) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Arachis glabrata* Benth. ชื่อสามัญ ถั่วลิสงเถา, rhizoma peanut, rhizoma perennial peanut, perennial forage peanut ดังนี้

Kingdom: Plantae
Family : Leguminosae (Fabaceae)
Subfamily : Papilionoideae (Faboideae)
Tribe : Dalbergieae
Genus : Arachis
Species : Arachis glabrata

(ที่มา : http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Arachis_glabrata.html)

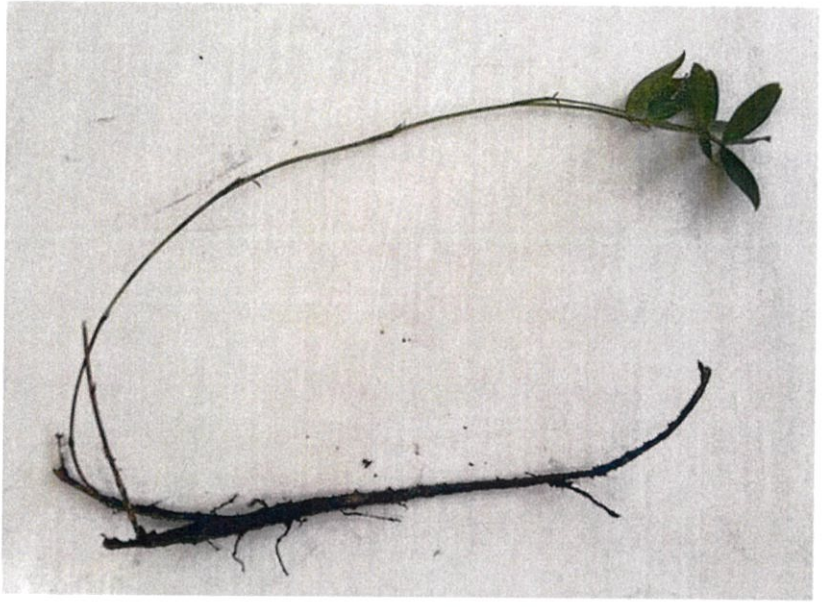
รูปที่ 2.1 ลักษณะของถั่วลิสงเถากลาบราต้า
(ที่มา : ภาพจากผู้จัดทำ)

2.2.2 ถิ่นกำเนิดของถั่วลิสงเถากลาบราต้า

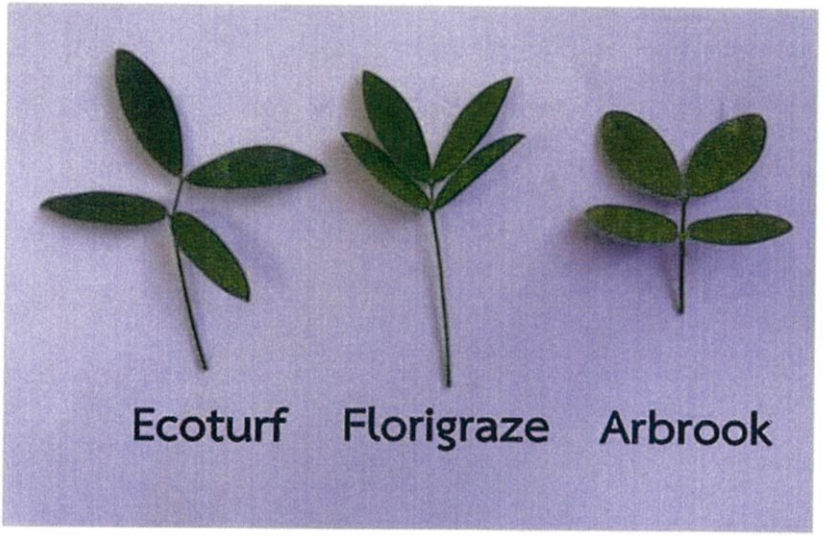
เป็นพืชอาหารสัตว์เขตร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ เป็นพืชพื้นเมืองของประเทศบราซิล อาเจนตินา และปารากวัย สามารถทำเป็นถั่วแห้ง ถั่วหมัก และเหมาะแก่การนำไปเป็นอาหารไว้สำหรับเลี้ยงสัตว์ โดยสามารถปลูกไว้คลุมดินแล้วปล่อยให้สัตว์ลงแทะเล็มได้ (โสภณ, 2557)

2.2.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของถั่วลิสงเถากลาบราต้า

ถั่วลิสงเถากลาบราต้า เป็นพืชอายุหลายปีมีลักษณะต้นเตี้ย มีลำต้นใต้ดินเรียกว่า "เหง้า" (rhizomes) (รูปที่ 2.2) อยู่หนาแน่นบริเวณผิวดินลึก 5-7 เซนติเมตร ลำต้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร (ใหญ่สุด 10 มิลลิเมตร) เหง้าเมื่อโตเต็มที่มีสีน้ำตาลส้ม ลำต้นเหนือพื้นดินมีลักษณะตั้งตรงถึงกึ่งนอน ไม่มีแขนง ก้านมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร ยาว 5-35 เซนติเมตร แตกออกมาจากตอหรือเหง้า ลักษณะใบเป็นแบบรวมกลุ่มกัน 4 ใบ (tetrafoliolate) (รูปที่ 2.3) ไม่มีขนถึงมีขนเล็กน้อย ขนาดกว้าง 2 เซนติเมตร ยาว 4 เซนติเมตร ก้านดอกยาว 10 เซนติเมตร ดอกค่อนข้างกลมกว้าง 15-25 มิลลิเมตร มีสีเหลืองถึงส้มอ่อน (รูปที่ 2.4) ไม่ค่อยติดเมล็ด (โสภณ, 2557)



รูปที่ 2.2 ส่วนเหง้า และลำต้นของต้นถั่วลิสงเถากลาบราต้า
(**ที่มา** : ภาพจากผู้จัดทำ)



รูปที่ 2.3 ลักษณะใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf Florigraze และ Arbrook
(**ที่มา** : ภาพจากผู้จัดทำ)

รูปที่ 2.4 ลักษณะดอกของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf
(ที่มา : ภาพจากผู้จัดทำ)

ถั่วลิสงเถากลาบราต้าเจริญเติบโตได้ดีบนดินที่มีการระบายน้ำได้ดี ทั้งดินทราย และดินเหนียว ชอบดินเป็นกรดได้ถึง pH 4.5 แต่ก็ทนต่อดินที่เป็นกลางถึงด่างได้เล็กน้อยที่ pH 8.5 เจริญได้ดีทั้งบนดินที่ความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง พบว่าถั่วลิสงเถากลาบราต้าต้องการธาตุฟอสฟอรัสน้อยกว่าถั่วพินตอย ถั่วลิสงเถากลาบราต้านั้นต้องการปริมาณน้ำฝนอยู่ในช่วง 1,000–2,000 มิลลิเมตร/ปี สามารถทนต่อสภาพแห้งแล้งได้ ในช่วงที่แห้งแล้งมากๆ ลำต้นเหนือผิวดินจะตายไป แต่ลำต้นใต้ดินยังมีชีวิตอยู่ และถั่วสามารถเจริญเติบโตขึ้นมาใหม่เมื่อได้รับภูมิอากาศที่ร้อนและชื้น ถั่วลิสงเถาทนต่อน้ำท่วมระยะสั้นๆ ได้ ถั่วเจริญเติบโตได้ดีเมื่ออุณหภูมิรายเดือนเฉลี่ยสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส แต่ชะงักการเจริญเติบโตเมื่อเข้าสู่ช่วงฤดูหนาว โดยทั่วๆ ไปสามารถเจริญในพื้นที่ร่มเงาปานกลาง และพบว่าออกดอกอยู่ในช่วงวันสั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้นถั่วผ่านพ้นช่วงแล้ง แต่ติดเมล็ดได้น้อย โดยติดเมล็ดในช่วงแรกๆ ของการปลูกหรือเมื่อมีการพรวนดินเท่านั้น (โสภณ, 2557)

2.2.4 สภาพนิเวศวิทยาของถั่วลิสงเถากลาบราต้า

- ดินที่ต้องการ ถั่วลิสงเถากลาบราต้าเจริญเติบโตดีบนดินที่มีการระบายน้ำได้ดี ทั้งดินทราย และดินเหนียว ชอบดินเป็นกรดที่ 4.5 แต่ทนต่อดินที่เป็นกลางถึงด่างได้ที่ 8.5 เจริญได้ดีทั้งบนดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง แต่อาจจะพบต้นหญ้าขึ้นแซมได้ภายหลังปลูก พบว่าถั่วลิสงเถากลาบราต้าต้องการธาตุฟอสฟอรัสน้อยกว่าถั่วพินตอย
- ความชื้น ถั่วลิสงเถากลาบราต้าต้องการปริมาณน้ำฝนอยู่ในช่วง 1,000–2,000 มิลลิเมตรต่อปี สามารถทนต่อสภาพแห้งแล้งได้ ในช่วงที่แห้งแล้งมากๆ ลำต้นเหนือผิวดินจะตายไป แต่ลำต้นใต้ดินยังมีชีวิตอยู่ และถั่วสามารถเจริญเติบโตขึ้นมาใหม่เมื่อได้รับภูมิอากาศที่ร้อน และชื้น ถั่วทนต่อน้ำท่วมระยะสั้นๆ ได้
- อุณหภูมิ ถั่วลิสงเถากลาบราต้าเจริญเติบโตได้ดีเมื่ออุณหภูมิรายเดือนเฉลี่ยสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส แต่ชะงักการเจริญเติบโตเมื่อเข้าสู่ช่วงฤดูหนาว

- แสง สายพันธุ์ที่ทนร่มเงา ได้แก่ CPI 12121 และสายพันธุ์ที่ไม่ทนร่มเงา ได้แก่ CPI 29986 โดยทั่วไปสามารถเจริญในพื้นที่ร่มเงาปานกลาง แต่ยังทนร่มเงาได้น้อยกว่า ถั่วลิสงเถาพินตอย

- พัฒนาการสืบพันธุ์ พบว่าออกดอกอยู่ในช่วงวันสั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อต้นถั่วผ่านพ้นช่วงแล้ง แต่ติดเมล็ดได้น้อย โดยติดเมล็ดในช่วงแรกๆ ของการปลูกหรือเมื่อมีการพรวนดินเท่านั้น

การตัด ต้นถั่วลิสงเถากลาบราต้าทนต่อการแทะเล็มได้ดี และในพื้นที่ที่สามารถให้น้ำได้ตลอดทั้งปีสามารถตัดต้นทำถั่วแห้งได้ปีละ 6 ครั้ง โดยมีรอบการตัดระหว่าง 45-60 วัน เว้นแต่ช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม เพราะถั่วนั้นชะงักการเจริญเติบโต

- ไฟ กรณีที่มีไฟไหม้ต้นถั่วบริเวณเหนือผิวดินจะตายไป แต่หลังจากนั้นต้นถั่วสามารถเจริญเติบโตจากลำต้นใต้ดินขึ้นมาคลุมพื้นที่ได้อย่างรวดเร็ว (โสภณ, 2557)

2.2.5 ประโยชน์ในการเลี้ยงสัตว์

ต้นถั่วลิสงเถากลาบราต้าให้คุณค่าทางอาหาร ผันแปรตามสภาพแวดล้อมหรือชนิดพันธุ์ โดยคุณค่าจะลดลงตามอายุของต้นถั่ว กรณีตัดต้นถั่วปีละ 2 ครั้ง คุณค่าโปรตีน (CP) เท่ากับ 10-18 เปอร์เซ็นต์ และ IVOMD เท่ากับ 45-68 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลวิเคราะห์ของกรมปศุสัตว์พบว่ามีโปรตีน (crude Protein) เท่ากับ 16.23 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียม (calcium) เท่ากับ 2.18 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัส (phosphorus) เท่ากับ 0.29 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสำหรับใช้เลี้ยงโคนม โคเนื้อ ม้า แพะ แกะ สุกร กระต่าย และนกกระจอกเทศ ทั้งที่ทำเป็นถั่วแห้ง ถั่วหมัก และปล่อยสัตว์ลงแทะเล็ม ถั่วลิสงเถา-กลาบราต้าแห้งเหมือนกับถั่วอัลฟัลฟ่าแห้ง นอกจากนี้ถั่วกลาบราต้าป่นยังมีสารสี xanthophylls สำหรับเพิ่มสีไข่แดง (ไก่ไข่) เหมือนกับ ข้าวโพด และถั่วอัลฟัลฟ่าด้วย (โสภณ, 2557)

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Bajaj. et al. (1981) ได้ศึกษาการชักนำ androgenesis ในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของถั่วลิสง *Arachis hypogaea* และถั่วลิสง *A. villosa* พบว่าแคลลัสมีสีขาวไปจนถึงเหลือง และสามารถเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลภายใน 5-6 สัปดาห์ นอกจากนี้ พบว่าแคลลัสบางส่วนโดยเฉพาะด้านล่างที่สัมผัสอาหารมีสีเขียว ซึ่งเป็นสัญญาณที่ดีสำหรับการเปลี่ยนโครงสร้างจากแคลลัสไปเป็นอวัยวะ อย่างไรก็ตาม พบว่าพัฒนาการของแคลลัสที่เกิดขึ้นนั้นไม่เหมือนกันเสมอไป บางครั้งแคลลัสที่ได้อาจพัฒนาไปได้ระยะหนึ่งแล้วหยุดชะงัก ไม่มีการพัฒนาต่อไปอีกและตายในที่สุด

Narasimhulu. et al. (1987) ศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสระยะต่างๆ ของ *A. hypogaea* L. พบว่า แคลลัสมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสภาพของเนื้อเยื่อ 6 ระยะ โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชของ *A. hypogaea* L. บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D IAA NAA และ KIN ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.5 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตผสมระหว่าง 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KIN ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีประสิทธิภาพในการชักนำแคลลัสมากที่สุด และการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เจริญมาจากหลายชิ้นส่วนของพืช คือ ลำต้นเหนือใบเลี้ยง ลำต้นใต้ใบเลี้ยง ใบ และใบเลี้ยง พบว่า ชักนำแคลลัสให้เกิดยอดจากอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KIN ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเกิดยอดแล้วจึงย้ายไปยังอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1

มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้รากมีการพัฒนา นอกจากพืชมีการเจริญเป็นต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสแล้วยังเกิดยอดโดยตรงได้จากชิ้นส่วนเพาะเลี้ยง ลำต้นเหนือใบเลี้ยง ลำต้นใต้ใบเลี้ยง และใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KIN ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

Chengalrayan. et al. (1994) ศึกษาการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสจากต้นอ่อนที่สมบูรณ์ที่เกิดจากใบอ่อนของถั่วลิสง (*A. hypogaea* L.) กลุ่มก้อนของใบอ่อนที่เจริญเติบโตไม่เต็มที่ของถั่วลิสง (*A. hypogaea* L.) เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร โซมาติกเอ็มบริโอพัฒนาจากกลุ่มก้อน จากการย้ายลงอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โครงสร้างของต้นอ่อนมีความแตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง ต้นอ่อนเริ่มเจริญเติบโต เมื่อย้ายลงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ปลายยอดเริ่มยืดยาวออก 25 เปอร์เซ็นต์ จากการย้ายลงอาหารที่มี BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kn ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พืชที่เจริญเติบโตในหลอดทดลอง โดยขั้นตอนนี้จะอยู่รอด เจริญ และพัฒนาเต็มที่ในทรายและดินผสม

Kanyard. et al. (1997) ศึกษาอัตราที่สูงขึ้นของ TDZ (thidiazuron) ที่มีผลส่งเสริมการงอกใหม่ของถั่วลิสง (*A. hypogaea*) ในหลอดทดลอง ซึ่งจากการศึกษา พบว่า ชิ้นส่วนยอดหลายชิ้นของถั่วลิสง Valenciatype (*A. hypogaea* L.) ถูกชักนำจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ชิ้นส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดได้มาจากต้นอ่อนไซโกติกเมล็ดแก่ที่งอกบนอาหารแข็งสูตร MS และต้นกล้าที่เกิด (ผ่านมาแล้ว 8 วัน) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเข้มข้น TDZ สูงขึ้น ชิ้นส่วนของ hypocotyl และใบเลี้ยงที่ผลิตยอดในจำนวนมากกว่าชิ้นอื่นๆ (20 ยอดต่อชิ้นส่วนของ hypocotyl) ที่ทุกๆ ความเข้มข้นของ TDZ และ 15 ยอดต่อชิ้นส่วนของใบเลี้ยง ปลายราก nonually บนอาหารแข็ง MS ที่ประกอบด้วยผงถ่าน ซึ่งการพัฒนาของพืชที่ได้รับสารอาหารครบถ้วนจะมีความอุดมสมบูรณ์เมื่อปลูกในดิน

ขนิษฐา (2542) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของ hypocotyls และใบเลี้ยง (cotyledon) ของถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata*) เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่า อาหารสูตรแข็ง MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงนานเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุดคือ 90 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่ได้เกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อน (compact callus) มีสีเขียว เมื่อนำแคลลัสที่ได้มาทำให้เกิดเซลล์แขวนลอย (suspension cell) พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม casein hydrolysate ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอยได้ และสามารถักนำให้เกิดยอดได้บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 96.66 เปอร์เซ็นต์

Rey. et al. (2000) ศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่ของถั่วอาหารสัตว์ *A. pintoi* โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ การเจริญเป็นต้นใหม่จะต้องผ่านกระบวนการพัฒนาอวัยวะ และกระบวนการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกาย พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบลงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA

หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA KIN หรือ 2iP รวมกันอย่างเหมาะสมจึงจะเกิดแคลลัส และจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงสามารถเจริญเป็นพืชต้นใหม่ผ่านทางกระบวนการพัฒนาอวัยวะ หลังจากนั้นชักนำให้เกิดปลายยอดโดยการย้ายแคลลัสลงบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสร้างปลายยอดใหม่บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม PIC ร่วมกับ KIN ZEA BA หรือ 2iP มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดแคลลัสที่สร้างมาจากใบ หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนแคลลัสย้ายลงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายมีความแตกต่างกัน และต้นพืชมีการพัฒนามากขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี AC ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามด้วยเพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของต้นพืชตามลำดับ

Maria. et al. (2004) ได้ทำการศึกษาถึงการเกิดเป็นต้นใหม่ของถั่วลิสงเถา (*A. glabrata*) 2 สายพันธุ์คือ *A. glabrata* A6138 และ *A. glabrata* AF385 โดยผ่านกระบวนการ somatic embryogenesis โดยการนำชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถามาเพาะเลี้ยงลงในอาหารสูตร Murashige and Skoog (ประกอบด้วยวิตามิน น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ และฮอร์โมน 3 ชนิดที่มีความเข้มข้นต่างกันคือ PIC ความเข้มข้น 2-15 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D ความเข้มข้น 2-15 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.01-0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 90 วัน หลังจากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่มีการเติม picloram ลงไปเพียงอย่างเดียวหรือมี picloram ผสมอยู่กับ BAP โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *A. glabrata* A6138 สามารถชักนำให้เกิด somatic embryos ได้มากที่สุดในอาหารที่มี picloram ความเข้มข้น 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ในทางตรงกันข้าม *A. glabrata* AF385 ให้ผลที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในอาหารที่มี piclorum ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ BAP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

Alam. et al. (2010) ศึกษาการตอบสนองต่อการพัฒนาของแคลลัส และการเกิดเป็นต้นใหม่ของถั่วลิสง *A. hypogaea* L. โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชชนิดต่างๆ ในหลอดทดลอง พบว่าการเกิดเป็นต้นใหม่ของถั่วลิสง *A. hypogaea* L. จากชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ใบเลี้ยง ลำต้นเหนือใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยง โดยศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของถั่วลิสง BARI 5 และ BARI 6 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D BAP และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งผลของการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงแสดงสมรรถภาพดีกว่าลำต้นเหนือใบเลี้ยง และใบเลี้ยง เมื่อศึกษาปริมาณความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการชักนำแคลลัส พบว่า ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสได้ดี และเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า บริเวณตรงกลางของแคลลัสจะเกาะกันแน่นมีสีเขียวสว่าง ส่วนด้านข้างเกาะกันหลวมๆ หลังจากย้ายแคลลัสไปยังอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้นต่างๆ สังเกตได้ว่าแคลลัสเจริญเติบโตได้ดี และเมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารจะทำให้แคลลัสเกิดหน่อยอด (shoot bud) เล็กๆ โดยพบว่า อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนของการเปลี่ยนสภาพหน่อยอดสูงสุด จากการศึกษาปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเติบโตสำหรับชักนำแคลลัส พบว่า 2,4-D ได้ผลดีที่สุด และ BAP

เหมาะสมที่สุดสำหรับการสร้างอวัยวะเมื่อเปรียบเทียบกับ NAA และการรักษาสภาพของแคลลัสโดยการเปลี่ยนถ่ายอาหารไปยังอาหารสูตรเดิมซ้ำทุกๆ 28-30 วัน จะสังเกตได้ว่าขั้นตอนนี้จะเป็นขั้นตอนก่อนการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อไปเป็นยอดและรากต่อไป

Hasancebi. et al. (2010) ศึกษาการขยายพันธุ์ และการเพาะเลี้ยงรากของ *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae) ในท้องถิ่นตุรกี พบว่า สามารถชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง และแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างมากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

จิรวัฒน์ และคณะ (2554) ได้ทำการศึกษาถึงอิทธิพลของอาหารที่มีต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ในถั่วลิสง (*A. hypogaea* L.) โดยการศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ของถั่วลิสงอาหารที่ใช้ประกอบด้วยสูตรอาหาร N_6, MS ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MS ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาล 5.5 กรัมต่อลิตร, วุ้น 8 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ให้ได้ 5.8 และศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแคลลัสสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแคลลัส โดยครั้งที่ 1 ประกอบด้วยสูตรอาหาร MS ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Malt extract 2 กรัมต่อลิตร และ MS ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ครั้งที่ 2 ประกอบด้วยสูตรอาหาร MS ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ MS ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร, วุ้น 8 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ให้ได้ 5.8 ผลจากการทดลองพบว่าอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงได้แก่สูตร N_6 แคลลัสที่ได้จะมีลักษณะสีขาวไปจนถึงสีครีม และมีลักษณะเนื้อเยื่อเกาะกันหลวมๆ ไปจนถึงเกาะกันแน่นเป็นก้อน เมื่อนำแคลลัสไปเลี้ยงขยาย แคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kinetin ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และผลจากการทดลองยังสังเกตพบแคลลัสที่มีสีเขียว

Iqbal. et al. (2011) ศึกษาการขยายพันธุ์ถั่วลิสง (*A. hypogaea*) ในหลอดทดลองผ่านกระบวนการเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายโดยตรง จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของถั่วลิสง (*A. hypogaea*) บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมวิตามิน B5 วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส และออกซิน (2,4-D, NAA) พบว่า มีการชักนำแคลลัสจากเอ็มบริโอสูงสุดที่ 87 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกิดการเปลี่ยนรูปร่างของแคลลัสเป็น friable callus ที่มีสีขาวคล้ายครีม

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 พืชและการเก็บตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

เก็บตัวอย่างชิ้นส่วนใบ และข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*Arachis glabrata*) จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ Ecoturf (*Arachis glabrata* cv. Ecoturf) และสายพันธุ์ Florigraze (*Arachis glabrata* cv. Florigraze) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ต้นพันธุ์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์เพชรบุรี อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และฝาพลาสติกทนความร้อน
- จานแก้ว (Petri dish)
- ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)
- กระบอกตวง (Cylinder)
- บีกเกอร์พลาสติก (Plastic beaker)
- ช้อนตักสาร (Spatula)
- ถ้วยชั่งสาร (Cup)
- ทิป (Tip)
- ไมโครปิเปตต์ (Micropipettes)
- ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด (Scalpel handle and Scalpel blade)
- กรรไกรผ่าตัด (Scissors)
- ปากคีบ (Forcept)
- ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test tube rack)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)
- ไฟแช็ค (Lighter)
- กระดาษทิชชู (Tissue paper)
- ถุงมือยาง (Rubber gloves)
- พาราฟิล์ม (Parafilm)
- กระดาษฟอยล์ (Aluminium foil)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด (Balance)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
- เตาไมโครเวฟ (Microwave oven)
- เครื่องเขย่าไฟฟ้า (Rotary shaker)
- ตู้เย็น (Refrigerator)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)

- อุปกรณ์ถ่ายภาพ (Camera)

3.1.3 สารเคมี

- สารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 และ 95
- เมอคิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$)
- สารลดแรงตึงผิว (Tween-20)
- พีพีเอ็ม (Plant Preservative Mixture Solution, PCT Inc.)
- Antibiotic antimycotic solution (SIGMA Inc.)
- เซฟโฟแซน (Cefozan, NidaPharma Inc.)
- น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (sterilized distilled water)
- อาหารสังเคราะห์สำเร็จสูตรอาหาร MS (Murashige and skoog, 1962)
- ผงวุ้นไฟทาเจล (phyto technology laboratory Inc.)
- น้ำตาลทราย (sucrose)
- 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
- N6-Benzyladenine (BA)
- Thaidiazuron (TDZ)
- Kinetin (Kn)
- สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล (hydrochloric acid, 1 N HCl)
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล และ 3 นอร์มอล (sodium hydroxide, 0.1 N and 3.0 N NaoH)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การคัดเลือกชิ้นเนื้อเยื่อพืช

คัดเลือกชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf และคัดเลือกชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf และ Florigraze เพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยทำการคัดเลือกชิ้นส่วนข้อ และใบที่มีความสมบูรณ์ไม่เป็นโรค และไม่มีรอยแมลงกัด

3.2.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นเนื้อเยื่อพืช

3.2.2.1 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบ

นำชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า 2 สายพันธุ์ ได้แก่ Ecoturf และ Florigraze มาล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน เพื่อชะล้างคราบดินและฝุ่นละอองออก แล้วนำไปแช่แอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วร่วมกับพีพีเอ็ม ที่ความเข้มข้น 80 ไมโครลิตรต่อน้ำ 80 มิลลิลิตร Antibiotic antimycotic solution ที่ความเข้มข้น 80 ไมโครลิตรต่อน้ำ 80 มิลลิลิตร เซฟโฟแซน ที่ความเข้มข้น 80 ไมโครลิตรต่อน้ำ 80 มิลลิลิตร และสารเมอคิวริกคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 แล้วเติมสาร tween-20 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิว จำนวน 2-3 หยดฟอกฆ่าเชื้อในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 8 ออนซ์ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วร่วมกับพีพีเอ็ม ที่ความเข้มข้น 80 ไมโครลิตรต่อน้ำ 80 มิลลิลิตร Antibiotic antimycotic solution ที่ความเข้มข้น 80 ไมโครลิตรต่อน้ำ 80 มิลลิลิตร และเซฟโฟแซน ที่ความเข้มข้น 80 ไมโครลิตรต่อน้ำ 80 มิลลิลิตร ฟอกฆ่าเชื้อในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ขนาด 8 ออนซ์ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาทำการล้างสารฟอกฆ่าเชื้อออกโดยย้ายชิ้นส่วนพืชลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทำการเขย่าเป็นเวลา 10 นาที โดยล้างซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อให้ชิ้นส่วนพืชไม่มีสารฟอกฆ่าเชื้อตกค้างอยู่

3.2.2.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อ

นำชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf มาทำการฟอกฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบในข้อ 3.2.2.1 ซึ่งแตกต่างกันที่การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ไม่เติมสารเซฟโฟแซน ทำการเขย่าเป็นเวลา 15 นาที และในการฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ไม่เติมสารเซฟโฟ-แซน จากนั้นทำการฟอกฆ่าเช่นเดียวกับการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบในข้อ 3.2.2.1

3.2.3 การชักนำชิ้นส่วนใบให้เกิดแคลลัส

นำชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาตัดแต่งชิ้นส่วนให้มีขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร จากนั้นนำชิ้นส่วนใบที่ตัดแต่งแล้ววางลงบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยง 12 ชิ้นต่อความเข้มข้น เพาะเลี้ยงในที่มืด ณ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส พร้อมบันทึกผลลักษณะสีและขนาดของแคลลัสที่เกิดขึ้น ที่ 4 และ 8 สัปดาห์

3.2.4 การชักนำยอดและแคลลัสจากชิ้นส่วนข้อ

3.2.4.1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำยอดและแคลลัสจากชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า

นำชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้าที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วนำมาตัดแต่งให้มีความยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร จากนั้นนำมาวางลงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สารควบคุมการเจริญเติบโต Kn ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยง 1 ชิ้นต่อขวด เพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และให้แสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส พร้อมบันทึกผลลักษณะการเจริญเติบโต การเกิดของยอดและแคลลัส ที่ 4 และ 8 สัปดาห์

3.2.4.2 การศึกษาระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำยอดและแคลลัสจากชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า

การชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดและแคลลัสเพื่อประสิทธิภาพสูงสุด โดยเลือกชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และยอดได้ในปริมาณสูงสุด นำมาทำการทดลองต่อ ทำการตัดชิ้นส่วนข้อจากต้นพันธุ์แล้วนำมาผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ จากนั้นนำมาตัดแต่งชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ ให้มีความยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร นำชิ้นส่วนที่ตัดแต่งแล้ววางลงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ให้ปริมาณผลสูงสุดจากข้อ 3.2.4.1 ความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 1 2 3 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และไฟทาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยง 1 ชิ้นต่อขวด เพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และให้แสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส พร้อมบันทึกผลลักษณะการเจริญเติบโต การเกิดของยอด และแคลลัส ที่ 4 และ 8 สัปดาห์

3.2.5 วิธีการบันทึกผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.2.5.1 การสังเกตลักษณะภายนอก

บันทึกผลการทดลองโดยทำการสังเกตลักษณะการเจริญเติบโตที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในอาหารแต่ละสูตร รวมถึงสี ขนาดของแคลลัส และความสูงของยอด

3.2.5.2 การวัดขนาดแคลลัสที่เกิดขึ้น

ขนาดแคลลัส = กว้าง x ยาว x สูง

3.2.5.3 การคำนวณร้อยละการเกิดยอด

นับจำนวนชิ้นส่วนที่เกิดยอด และจำนวนชิ้นส่วนทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองมาคำนวณร้อยละการเกิดยอด ดังนี้

$$\text{ร้อยละการเกิดยอด} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดยอด}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง}} \times 100$$

3.2.5.4 การคำนวณร้อยละการเกิดแคลลัส

นับจำนวนชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส และจำนวนชิ้นส่วนทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองมาคำนวณร้อยละการเกิดแคลลัส ดังนี้

$$\text{ร้อยละการเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง}} \times 100$$

3.2.5.5 การคำนวณร้อยละการเกิดยอดและแคลลัสร่วมกัน

นับจำนวนชิ้นส่วนที่เกิดยอดและแคลลัสร่วมกัน และจำนวนชิ้นส่วนทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองมาคำนวณร้อยละการเกิดยอดและแคลลัสร่วมกัน ดังนี้

$$\text{ร้อยละการเกิดยอดและแคลลัสร่วมกัน} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดยอดและแคลลัส}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง}} \times 100$$

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากใบ

จากการนำชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf และ Florigraze มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำชิ้นส่วนใบให้เกิดเป็นแคลลัส เมื่อทำการเพาะเลี้ยงถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบให้เกิดเป็นแคลลัสได้สูงสุด โดยมีจำนวนชิ้นใบที่เกิดแคลลัสมีจำนวนเท่ากับ 11 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 91.67 ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 0.75 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบได้จำนวน 10 9 และ 8 ชิ้น ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบได้จำนวนเท่ากัน คือ 7 ชิ้น และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบให้เกิดเป็นแคลลัสได้สูงสุด โดยมีจำนวนชิ้นใบที่เกิดแคลลัสมีจำนวนเท่ากับ 12 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 100 และมีค่าเฉลี่ยขนาดแคลลัสเท่ากับ 348.29 และ 539.45 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ตามลำดับ รองลงมาคือที่ระดับความเข้มข้น 0.75 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบได้จำนวนเท่ากันคือ 11 ชิ้น และที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบได้จำนวน 10 และ 9 ชิ้น ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 และลักษณะของการเกิดแคลลัสหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าลักษณะของใบมีสีเขียว เกิดแคลลัสที่เกาะกันแบบหลวมๆ (friable callus) มีลักษณะฉ่ำน้ำ แคลลัสมีสีขาวไปจนถึงเขียวอ่อน และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าลักษณะของใบเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีน้ำตาลไหม้ แห้ง และแคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเปลี่ยนไปจากสีขาวไปเป็นสีน้ำตาลอ่อน ดังรูปที่ 4.3 ซึ่งจะเห็นว่าจำนวนชิ้นใบที่เกิดเป็นแคลลัสจากทุกระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D มีจำนวนการเกิดแคลลัสที่ใกล้เคียงกัน และมีขนาดที่ไม่แตกต่างกันมากนัก อีกทั้งยังให้ขนาดแคลลัสเฉลี่ยในแต่ละระดับความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกันอีกด้วย ดังแสดงในตารางที่ 4.1 อาจเป็นผลมาจากจำนวนชิ้นใบที่ใช้ในการทดลองนั้นมีจำนวนซ้ำน้อยเกินไป จึงทำให้เห็นความแตกต่างของการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบได้น้อย

สำหรับสายพันธุ์ Florigraze เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนใบให้เกิดเป็นแคลลัสได้สูงสูด โดยมีจำนวนเท่ากับ 10 ชิ้น คิดเป็นร้อยละการเกิดแคลลัสเท่ากับ 83.33 มีการเจริญเติบโตของแคลลัสเพียงเล็กน้อยบริเวณขอบใบ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนใบให้เกิดเป็นแคลลัสได้สูงสูด โดยมีจำนวนเท่ากับ 11 ชิ้น

คิดเป็นร้อยละการเกิดแคลลัสเท่ากับ 91.67 แต่แคลลัสที่เกิดมีขนาดเล็กเกินกว่าจะสามารถวัดขนาดได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2 โดยที่เวลา 4 สัปดาห์ ลักษณะของใบเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีน้ำตาล เกิดแคลลัสขนาดเล็กมากที่บริเวณขอบใบ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น ลักษณะแคลลัสมีสีน้ำตาลอ่อนไปจนถึงสีน้ำตาลเข้ม และมีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ Ecoturf ดังรูปที่ 4.3 ซึ่งลักษณะแคลลัสที่เกิดในทั้ง 2 สายพันธุ์มีลักษณะเกาะกันอย่างหลวมๆ (friable callus) ซึ่งยังไม่มีคุณสมบัติที่จะพัฒนาไปเป็นยอดได้ จึงยังไม่มีการศึกษาต่อถึงการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบให้เกิดเป็นยอดได้

ตารางที่ 4.1 ผลการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ในสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ที่ 4 และ 8สัปดาห์

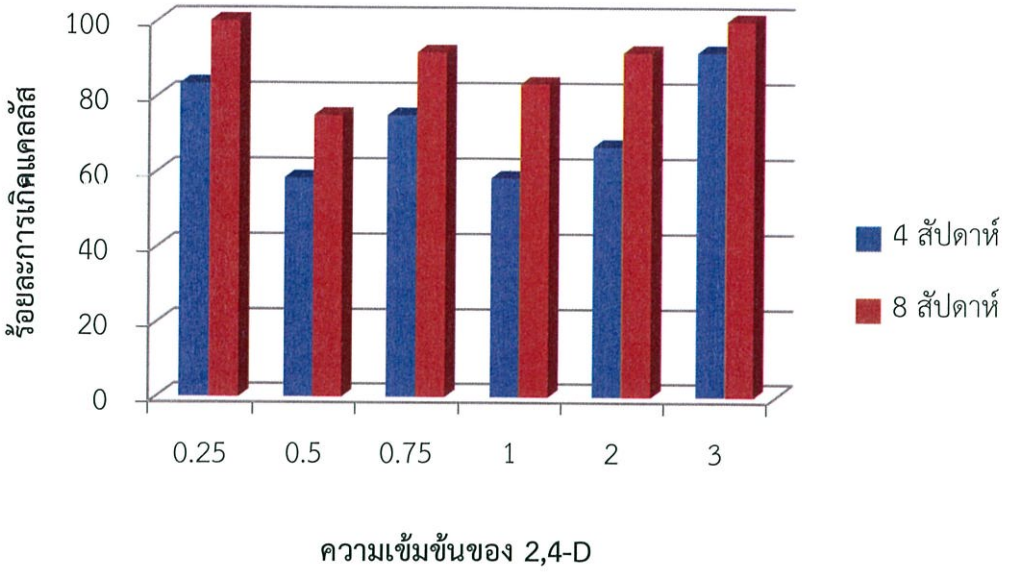
ความเข้มข้น 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนชิ้นใบทั้งหมด (ชิ้น)	ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ			
		สัปดาห์ที่ 4		สัปดาห์ที่ 8	
		จำนวนชิ้นใบที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	ค่าเฉลี่ยขนาดแคลลัส (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)	จำนวนชิ้นใบที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	ค่าเฉลี่ยขนาดแคลลัส (ลูกบาศก์มิลลิเมตร)
0.25	12	10 (83.33)	112.32	12 (100)	348.29
0.5	12	7 (58.33)	153.46	9 (75)	579.74
0.75	12	9 (75)	386.65	11 (91.67)	884.67
1	12	7 (58.33)	108.58	10 (83.33)	422.94
2	12	8 (66.67)	389.33	11 (91.67)	757.97
3	12	11 (91.67)	253.09	12 (100)	539.45

149026

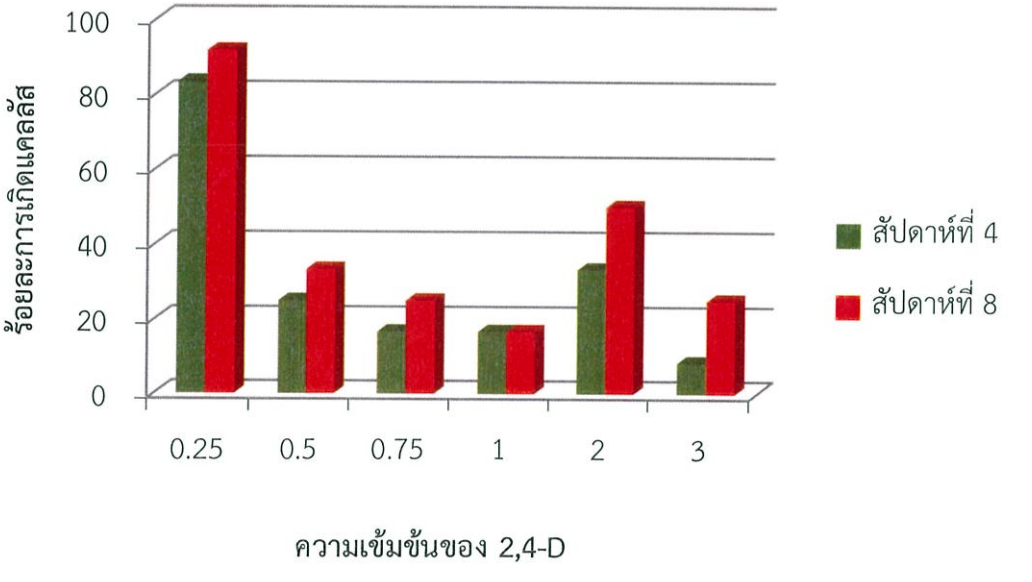
ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ผลการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Florigraze ในสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ที่ 4 และ 8 สัปดาห์

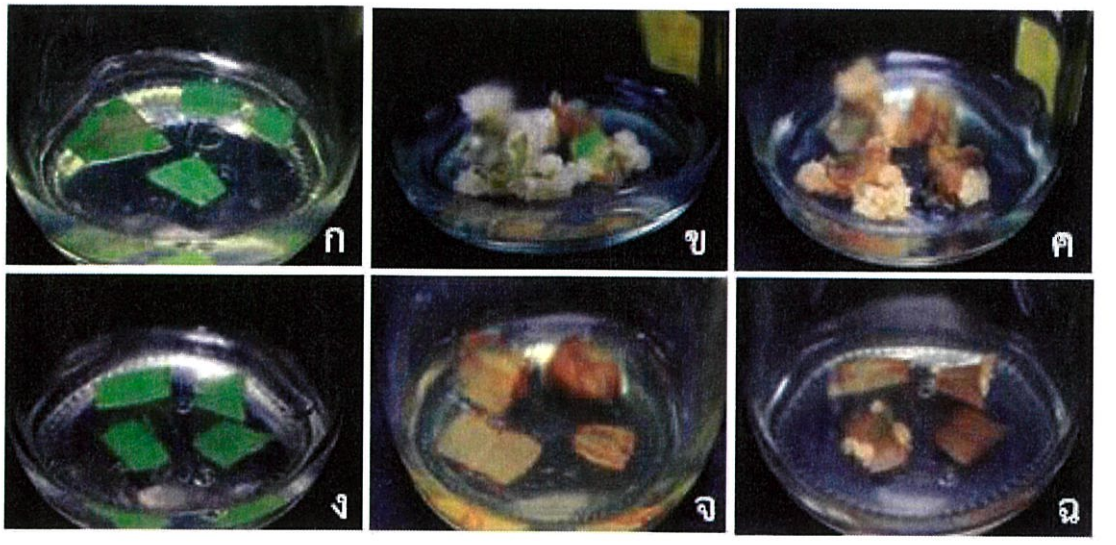
ความเข้มข้น 2,4-D (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนชิ้นใบทั้งหมด (ชิ้น)	ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ	
		สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 8
		จำนวนชิ้นใบที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	จำนวนชิ้นใบที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)
0.25	12	10 (83.33)	11 (91.67)
0.5	12	3 (25.00)	4 (33.33)
0.75	12	2 (16.67)	3 (25.00)
1	12	2 (16.67)	2 (16.67)
2	12	4 (33.33)	6 (50.00)
3	12	1 (8.33)	3 (25.00)



รูปที่ 4.1 ผลร้อยละของการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf หลังทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์



รูปที่ 4.2 ผลร้อยละของการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Florigraze หลังทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์



รูปที่ 4.3 ผลการชักนำการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf และ Florigraze ในสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ก) ชิ้นส่วนใบของสายพันธุ์ Ecoturf ที่ 0 สัปดาห์

(ข) ชิ้นส่วนใบของสายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์

(ค) ชิ้นส่วนใบของสายพันธุ์ Ecoturf เมื่อทำการเพาะเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์

(ง) ชิ้นส่วนใบของสายพันธุ์ Florigraze ที่ 0 สัปดาห์

(จ) ชิ้นส่วนใบของสายพันธุ์ Florigraze เมื่อทำการเพาะเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์

(ฉ) ชิ้นส่วนใบของสายพันธุ์ Florigraze เมื่อทำการเพาะเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์

4.2 ผลการศึกษาการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดและแคลลัส

4.2.1 ผลการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำข้อให้เกิดยอดและแคลลัส

จากการนำชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สารควบคุมการเจริญเติบโต Kn ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดและแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในทุกๆ ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA Kn หรือ TDZ มีจำนวนชิ้นส่วนข้อที่ถูกชักนำให้เกิดแคลลัสเพียงอย่างเดียว และยอดเพียงอย่างเดียวได้จำนวนที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.4 ส่วนการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดเป็นยอดและแคลลัสร่วมกัน พบว่ามีเพียงสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ในระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดและแคลลัสร่วมกันได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.4 และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนข้อที่ถูกชักนำให้เกิดยอดเพียงอย่างเดียวมีจำนวนเพิ่มขึ้น แต่ในทุกๆ ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA Kn และ TDZ ยังคงมีจำนวนชิ้นส่วนข้อที่ถูกชักนำให้เกิดแคลลัสเพียงอย่างเดียว และยอดเพียงอย่างเดียวได้จำนวนที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.5 แต่ในการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดเป็นยอดและแคลลัสร่วมกัน พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ในระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดและแคลลัสร่วมกันได้สูงกว่า เมื่อเทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ Kn โดยลักษณะการเจริญของข้อเมื่อทำการเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนข้อที่ถูกชักนำให้เกิดแคลลัสได้เพียงอย่างเดียว จะให้แคลลัสที่มีลักษณะฉ่ำน้ำ และมีสีเขียวเกิดขึ้นบริเวณตาข้าง และส่วนของลำต้น ดังรูปที่ 4.6 ส่วนชิ้นส่วนข้อที่ถูกชักนำให้เกิดยอดเพียงอย่างเดียว ลักษณะยอดที่เกิดขึ้นมีสีเขียว แตกใบอ่อน แต่มีขนาดเล็ก และเจริญเติบโตช้าลงในระยะเวลา 4 สัปดาห์ และชิ้นส่วนข้อที่ชักนำให้เกิดยอดและแคลลัสร่วมกันนั้น ในระยะแรกของการเจริญ ยอดจะเจริญขึ้นมาก่อน ที่เวลา 4 สัปดาห์ เมื่อยอดสูงได้ระดับหนึ่ง จะเกิดแคลลัสขึ้นที่บริเวณรอบๆ โคนของต้นใหม่ ดังรูปที่ 4.7 แคลลัสที่เกิดขึ้นรอบๆ ต้นใหม่นั้น มีลักษณะเกาะตัวกันแน่น มีสีเขียวอ่อน มีแนวโน้มที่จะพัฒนาไปเป็น multiple shoot ได้

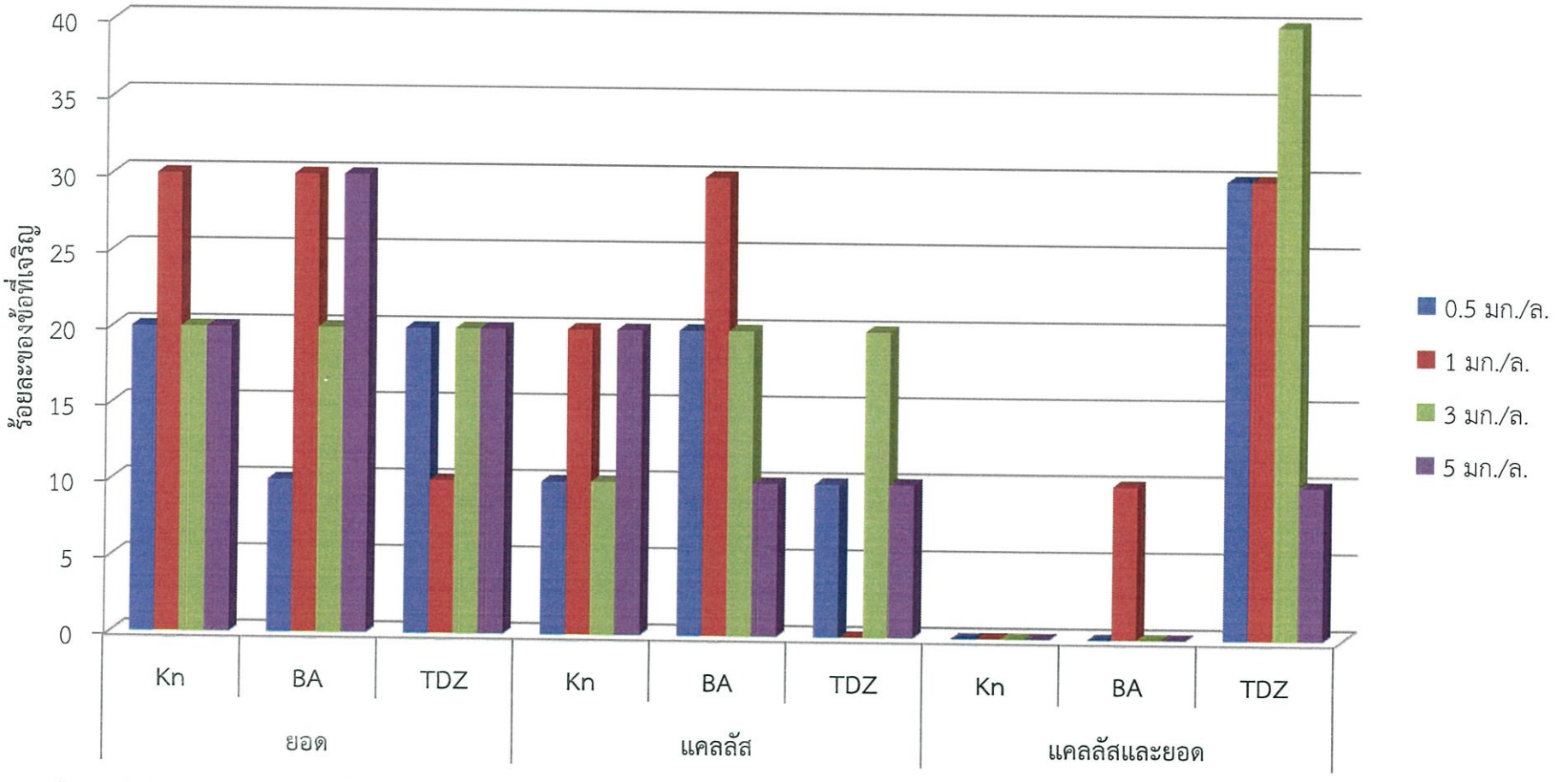
สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เจริญเป็นยอดและแคลลัสร่วมกันได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ Kn แต่เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักชิ้นส่วนข้อให้เจริญเป็นยอดและแคลลัสร่วมกันได้ใกล้เคียงกัน จึงนำไปศึกษาต่อถึงระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่เหมาะสมต่อไป

ตารางที่ 4.3 ผลการชักนำข้อให้เกิดยอดและแคลลัสของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

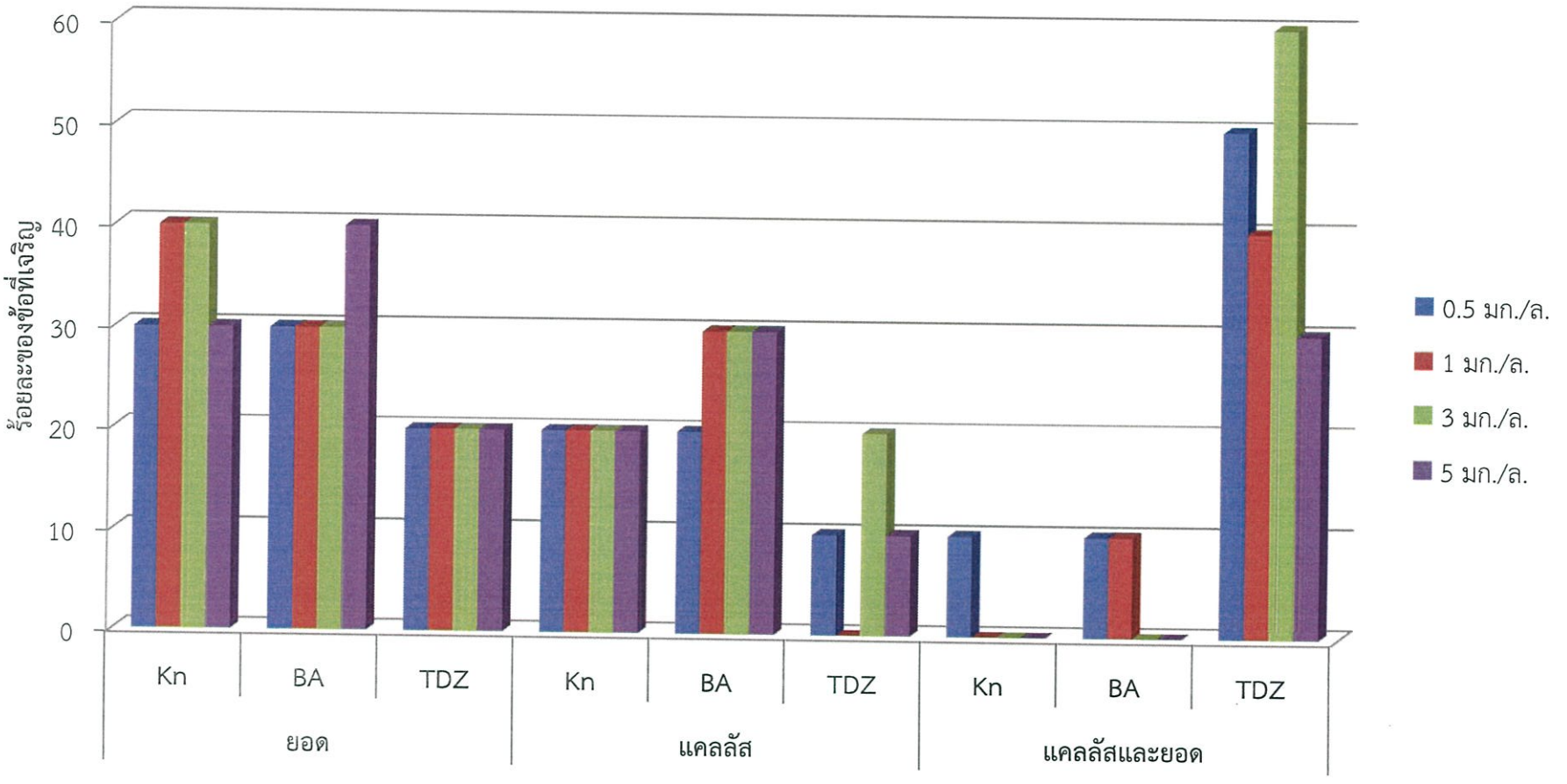
ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)			จำนวนข้อที่ใช้เพาะเลี้ยง	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	จำนวนข้อที่เกิดยอดและแคลลัสร่วมกัน (ร้อยละ)
Kn	BA	TDZ				
0.5	-	-	10	2 (20)	1 (10)	0 (0)
1	-	-	10	3 (30)	2 (20)	0 (0)
3	-	-	10	2 (20)	1 (10)	0 (0)
5	-	-	10	2 (20)	2 (20)	0 (0)
-	0.5	-	10	1 (10)	2 (20)	0 (0)
-	1	-	10	3 (30)	3 (30)	1 (10)
-	3	-	10	2 (20)	2 (20)	0 (0)
-	5	-	10	3 (30)	1 (10)	0 (0)
-	-	0.5	10	2 (20)	1 (10)	3 (30)
-	-	1	10	1 (10)	0 (0)	3 (30)
-	-	3	10	2 (20)	2 (20)	4 (40)
-	-	5	10	2 (20)	1 (10)	1 (10)

ตารางที่ 4.4 ผลการชักนำข้อให้เกิดยอดและแคลลัสของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

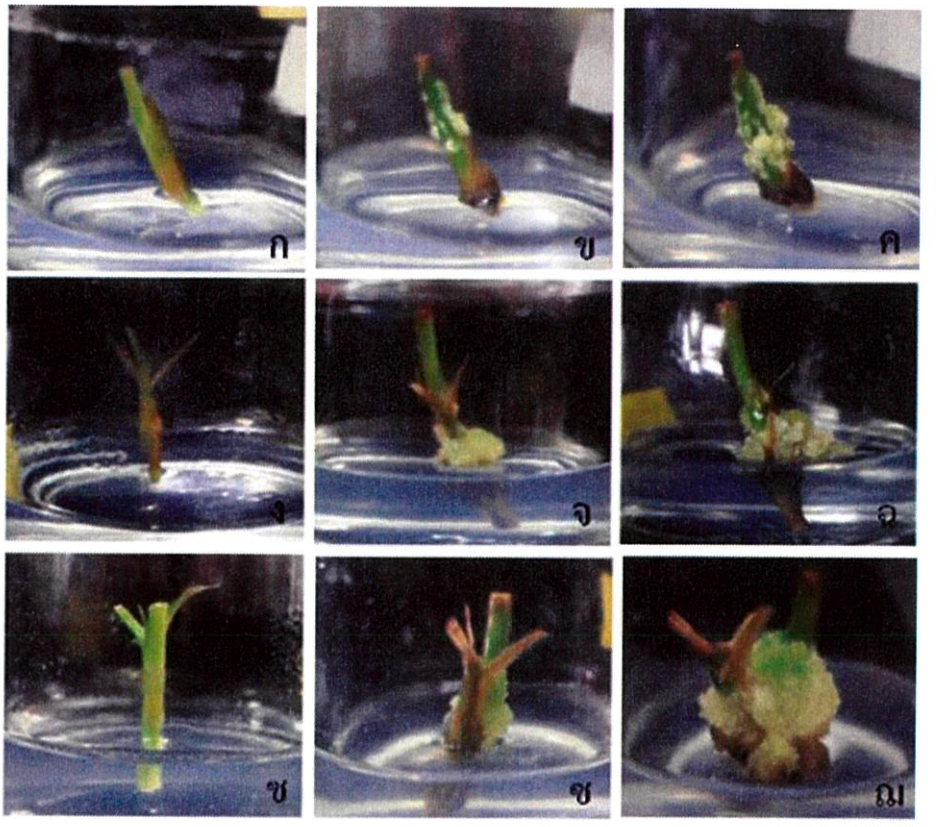
ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)			จำนวนข้อที่ใช้เพาะเลี้ยง	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	จำนวนข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	จำนวนข้อที่เกิดยอดและแคลลัสร่วมกัน (ร้อยละ)
Kn	BA	TDZ				
0.5	-	-	10	3 (30)	2 (20)	1 (10)
1	-	-	10	4 (40)	2 (20)	0 (0)
3	-	-	10	4 (40)	2 (20)	0 (0)
5	-	-	10	3 (30)	2 (20)	0 (0)
-	0.5	-	10	3 (30)	2 (20)	1 (10)
-	1	-	10	3 (30)	3 (30)	1 (10)
-	3	-	10	3 (30)	3 (30)	0 (0)
-	5	-	10	4 (40)	3 (30)	0 (0)
-	-	0.5	10	2 (20)	1 (10)	5 (50)
-	-	1	10	2 (20)	0 (0)	4 (40)
-	-	3	10	2 (20)	2 (20)	6 (60)
-	-	5	10	2 (20)	1 (10)	3 (30)



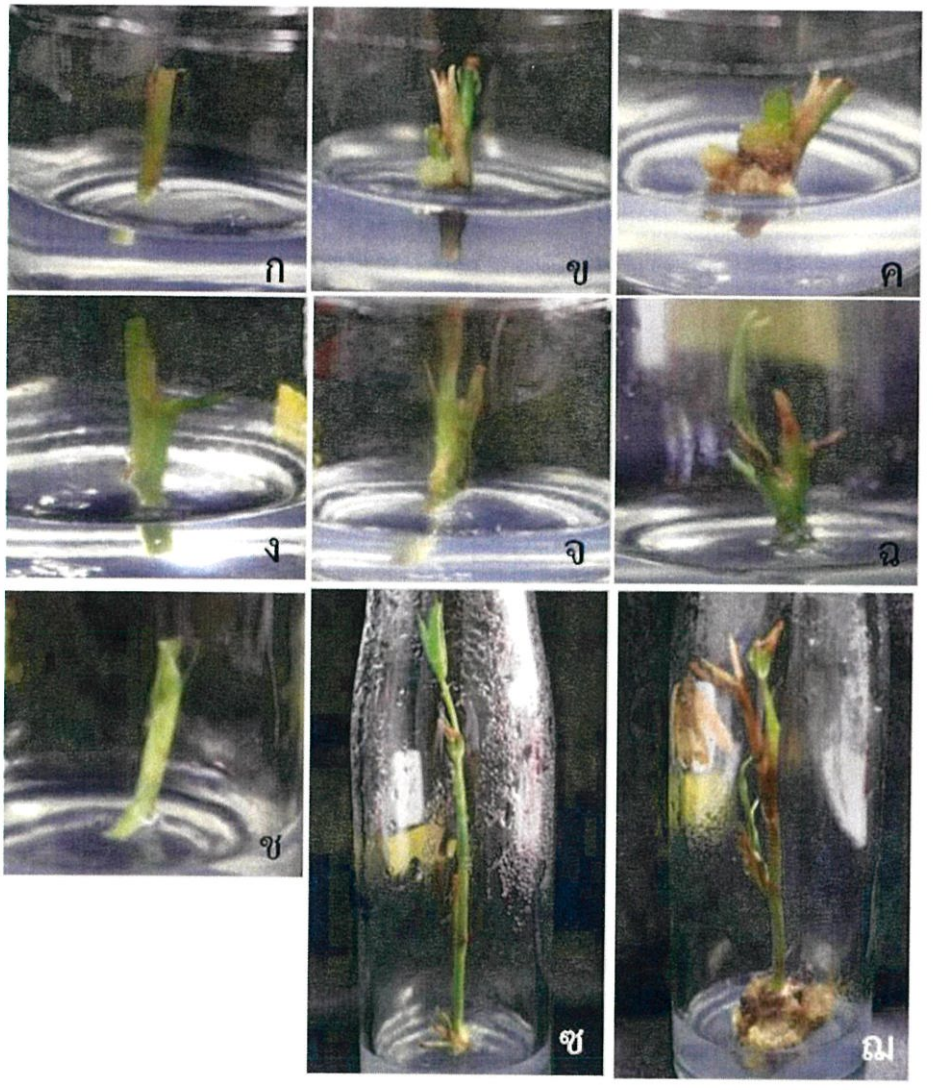
รูปที่ 4.4 ร้อยละจำนวนแคลลัสและยอดในสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.5 ร้อยละจำนวนแคลลัสและยอดในสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์



รูปที่ 4.6 ผลการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ในสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn (ก-ค) BA (ง-ฉ) และ TDZ (ช-ฌ) ที่เวลา 0 4 และ 8 สัปดาห์ตามลำดับ



รูปที่ 4.7 ผลการชักนำการเกิดยอดและแคลลัสร่วมกันจากชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสาย-พันธุ์ Ecoturf ในสารควบคุมการเจริญเติบโต Kn (ก-ค) BA (ง-ฉ) และ TDZ (ช-ฌ) ที่เวลา 0 4 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ

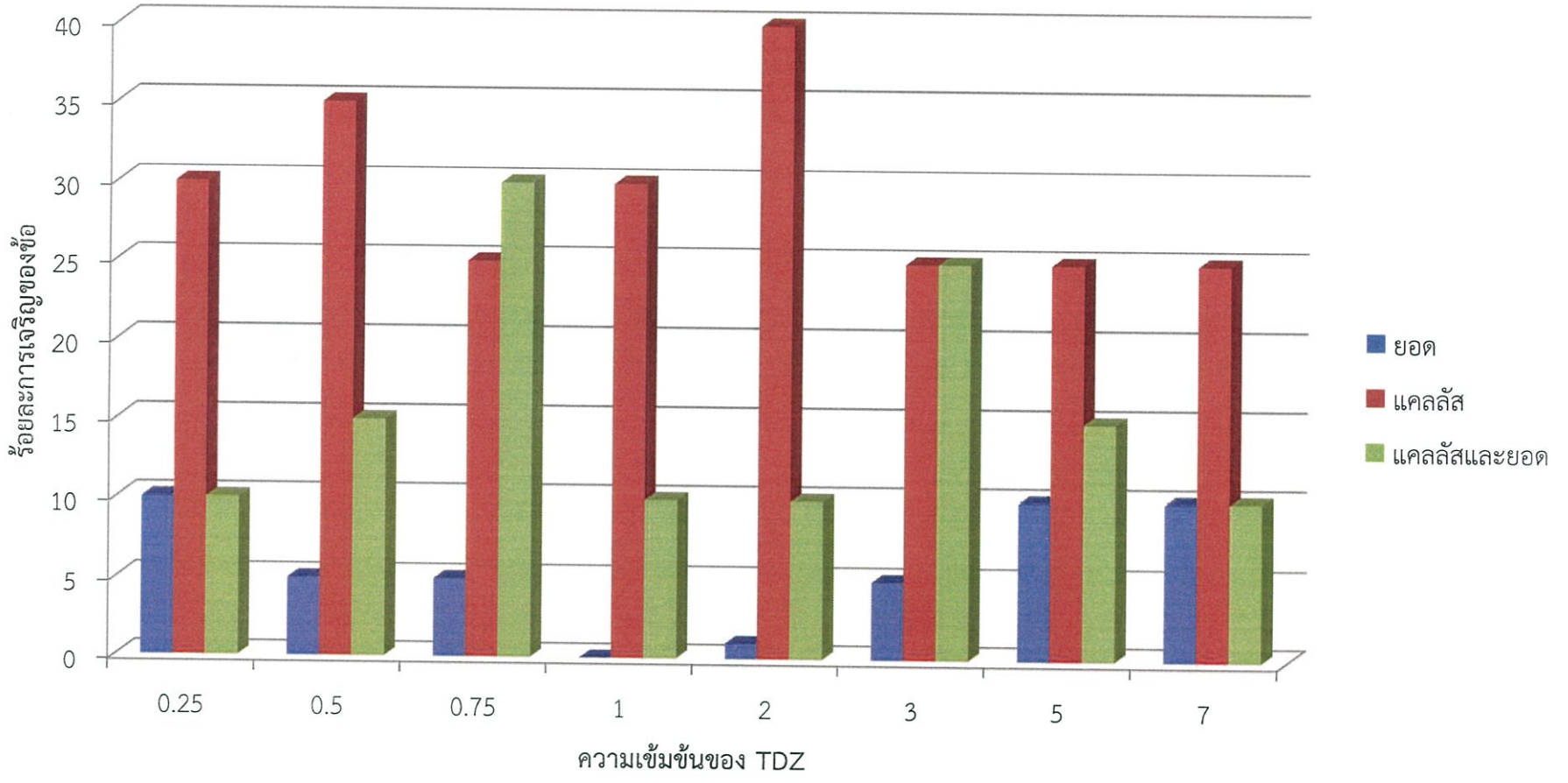
4.2.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำข้อให้เกิดยอดและแคลลัส

จากการนำชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 1 2 3 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดและแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดเพียงอย่างเดียวได้สูงสุด โดยมีจำนวนเท่ากับ 3 ยอด คิดเป็นร้อยละ 15 ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดแคลลัสเพียงอย่างเดียวได้สูงสุด มีจำนวนเท่ากับ 8 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 40 และที่ระดับความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดเป็นยอดและแคลลัสร่วมกันได้สูงสุด มีจำนวนเท่ากับ 6 คิดเป็นร้อยละ 30 ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.8 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดเป็นยอดเพียงอย่างเดียวได้สูงสุด โดยมีจำนวนเท่ากับ 5 ยอด คิดเป็นร้อยละ 25 ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดเป็นแคลลัสเพียงอย่างเดียวได้สูงสุด มีจำนวนเท่ากับ 11 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 55 และที่ระดับความเข้มข้น 0.75 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดเป็นยอดและแคลลัสร่วมกันได้สูงสุด มีจำนวนเท่ากับ 8 คิดเป็นร้อยละ 40 ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.9

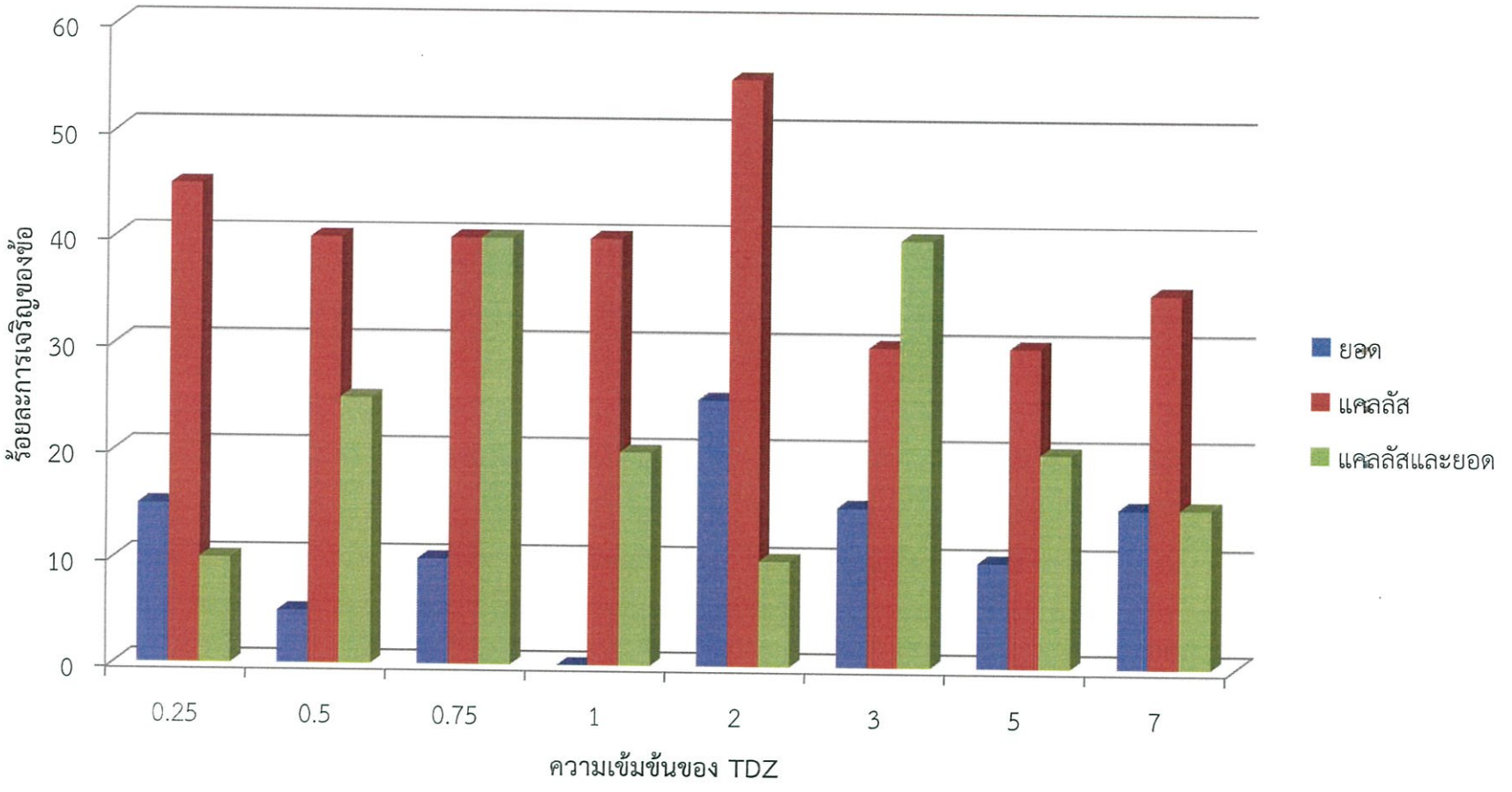
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ พบว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.75 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนข้อมีการเจริญของยอดเกิดขึ้นมาจากตาข้าง สามารถสังเกตเห็นแคลลัสเกิดขึ้นเล็กน้อยบริเวณเหนืออาหารรอบๆ ตาของข้อที่ทำการเพาะเลี้ยง ดังรูป 4.10 (ก, ข) ในการเกิดยอดนั้นสามารถเกิดได้ทั้งยอดและแคลลัสตรงบริเวณส่วนโคนของชิ้นส่วนข้อ ซึ่งอาจเกิดแยกกันหรืออาจเกิดลักษณะที่กล่าวมาร่วมกันได้ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร การเจริญของยอดมีความยาวเพิ่มขึ้น แต่ลักษณะของยอดที่ได้ไม่มีใบอ่อนเกิดมาอย่างสมบูรณ์ และแคลลัสที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้น มีจุดกำเนิดยอดสีเขียวเกิดขึ้นบนชิ้นแคลลัส ซึ่งมีแนวโน้มที่จะพัฒนาไปเป็น multiple shoot ได้มากกว่าแคลลัสที่ได้จากการชักนำชิ้นส่วนใบ ดังรูปที่ 4.10 (ค) จึงเหมาะกับการนำไปศึกษาต่อถึงการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นยอดต่อไปได้ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร การเจริญของยอดมีความยาวเพิ่มขึ้นจากในสัปดาห์ที่ 4 ลักษณะของยอดที่ได้มีใบอ่อนเกิดขึ้นหลายใบเป็นยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์กว่ายอดที่ได้จากระดับความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่แคลลัสมีขนาดเล็กมาก ไม่ค่อยเจริญ ดังรูปที่ 4.10 (ง) ซึ่งลักษณะของยอดที่เกิดมีความสูงพอที่จะพัฒนาไปเป็นต้นที่มีความสมบูรณ์ พร้อมที่จะนำไปชักนำให้เกิดรากได้ต่อไป

ตารางที่ 4.5 ผลการทดลองการศึกษาอิทธิพลของชนิดชิ้นส่วนข้อที่มีผลต่อการชักนำข้อให้เกิดยอดและแคลลัสของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 1 2 3 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ 4 และ 8 สัปดาห์

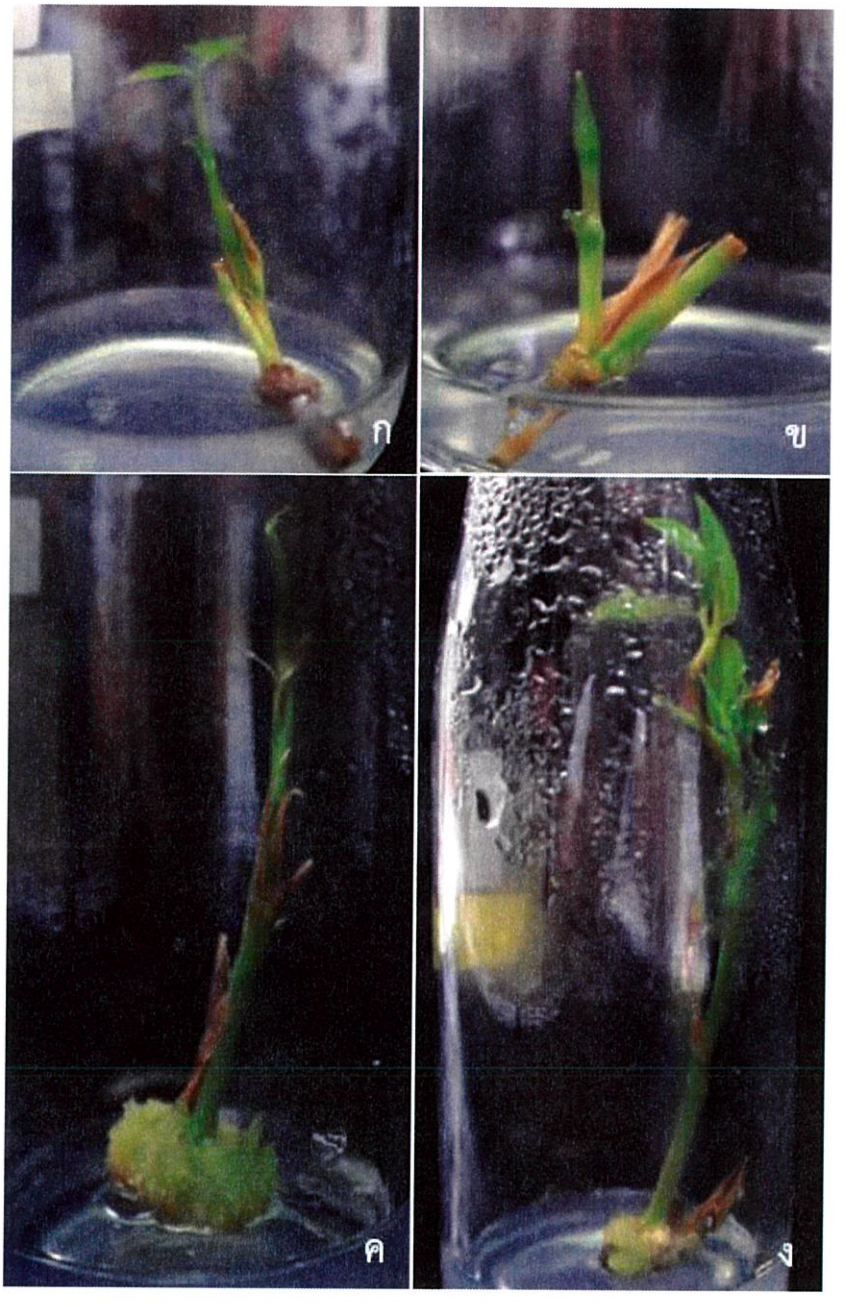
ความเข้มข้น TDZ (มก./ล.)	จำนวนข้อที่ใช้เพาะเลี้ยง	ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ (สัปดาห์)					
		4 สัปดาห์			8 สัปดาห์		
		จำนวนชิ้นข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	จำนวนชิ้นข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	จำนวนชิ้นข้อที่เกิดแคลลัสและยอด (ร้อยละ)	จำนวนชิ้นข้อที่เกิดยอด (ร้อยละ)	จำนวนชิ้นข้อที่เกิดแคลลัส (ร้อยละ)	จำนวนชิ้นข้อที่เกิดแคลลัสและยอด (ร้อยละ)
0.25	20	2 (10)	6 (30)	2 (10)	3 (15)	9 (45)	2 (10)
0.5	20	1 (5)	7 (35)	3 (15)	1 (5)	8 (40)	5 (25)
0.75	20	1 (5)	5 (25)	6 (30)	2 (10)	8 (40)	8 (40)
1	20	0 (0)	6 (30)	2 (10)	0 (0)	8 (40)	4 (20)
2	20	3 (15)	8 (40)	2 (10)	5 (25)	11 (55)	2 (10)
3	20	1 (5)	5 (25)	5 (25)	3 (15)	6 (30)	8 (40)
5	20	2 (10)	5 (25)	3 (15)	2 (10)	6 (30)	4 (20)
7	20	2 (10)	5 (25)	2 (10)	3 (15)	7 (35)	3 (15)



รูปที่ 4.8 ร้อยละจำนวนแคลลัสและยอดในสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารแข็งสูตร MS เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.9 ร้อยละจำนวนแคลลัสและยอดในสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันของถั่วลิสงเถากลาบราต้าสายพันธุ์ Ecoturf บนอาหารแข็งสูตร MS เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์



รูปที่ 4.10 ผลการชักนำการเกิดยอดและแคลลัสร่วมกันจากชิ้นส่วนข้อของถั่วลิสงเถากลาบราต้า สายพันธุ์ Ecoturf ในสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก, ค) และความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข, ง) ที่เวลา 4 และ 8 สัปดาห์

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของต้นถั่วลิสงเถากลาบราต้า (*Arachis glabrata*) เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากใบที่ประกอบด้วยสายพันธุ์ Ecoturf และ Florigraze พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์ ในสายพันธุ์ Ecoturf สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนใบให้เกิดเป็นแคลลัสได้ในจำนวนที่ใกล้เคียงกัน และมีขนาดที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนสายพันธุ์ Florigraze สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนใบให้เกิดเป็นแคลลัสได้สูงสุด คิดเป็นร้อยละ 91.67 แคลลัสที่เกิดมีขนาดเล็กกว่าเมื่อเทียบกับแคลลัสที่เกิดจากการชักนำของสายพันธุ์ Ecoturf

จากการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันคือ BA Kn และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าในทุกระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันคือ BA Kn และ TDZ สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดแคลลัสเพียงอย่างเดียว และข้อเพียงอย่างเดียวได้จำนวนที่ใกล้เคียงกัน แต่ในการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดเป็นยอดและแคลลัสร่วมกัน พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ในระดับความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดและแคลลัสร่วมกันได้สูงกว่า เมื่อเทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ Kn โดยการเจริญของยอดมีความยาวเพิ่มขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และแคลลัสที่เกิดมีแนวโน้มที่สามารถพัฒนาไปเป็น multiple shoot ได้ หลังจากนั้นจึงได้ทำการศึกษาต่อถึงระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 0.5 0.75 1 2 3 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.75 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนข้อให้เกิดยอดและแคลลัสร่วมกันได้สูงสุด โดยจำนวนการเกิดยอดและแคลลัสร่วมกันมีจำนวนเท่ากับ 8 ยอด คิดเป็นร้อยละ 40 จากการสังเกตลักษณะของยอดและแคลลัสที่เกิดในระดับความเข้มข้น 0.75 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความสูงของยอดที่ใกล้เคียงกัน แต่แตกต่างกันที่ลักษณะการเจริญคือ ที่ระดับความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร การเจริญของยอดไม่มีช่อใบเกิดขึ้น และมีแคลลัสขนาดใหญ่เกิดขึ้นบริเวณโคนของยอด มีลักษณะเกาะกันแน่น (compact callus) มีจุดสีเขียวเกิดขึ้นบริเวณทั่วแคลลัส ซึ่งมีแนวโน้มที่จะพัฒนาไปเป็น multiple shoot ได้ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร การเจริญของยอดมีช่อใบเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และต้นมีความแข็งแรง ซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปชักนำให้เกิดรากได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ ควรทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ เนื่องจากหลังทำการเพาะเลี้ยงผ่านไป 4 สัปดาห์แล้ว ลักษณะของแคลลัสเริ่มมีการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองอ่อนไปเป็นสีน้ำตาล แสดงว่าแคลลัสขาดสารอาหาร ซึ่งอาจส่งผลให้แคลลัสตายได้ในที่สุด และควรมีการศึกษาต่อในการชักนำแคลลัสให้เกิดยอด เนื่องจากในการทดลองนี้ยังไม่สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นยอดได้ ส่วนการชักนำชิ้นส่วนข้อให้เจริญเป็นต้นใหม่นั้น ในการทดลองนี้ยังไม่สามารถทำให้เกิดเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ เนื่องจากในการทดลองสามารถทำให้เกิดยอดได้เพียงเท่านั้น แต่ยังไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ดังนั้นในอนาคตควรมีการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สามารถชักนำให้เกิดราก เพื่อให้เกิดเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์มากขึ้น ก็จะสามารถขยายพันธุ์ถั่วลิสงเถากลาบราต้าเพื่อเป็นต้นพันธุ์ให้กับเกษตรกรได้ในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กานดา นาคมณี, ศศิธร ถิ่นนคร, ฉายแสง ไผ่แก้ว และอำนาจ ปัญญาปรุ. 2547. **ลักษณะการออกดอก ผลผลิตและคุณภาพเมล็ดพันธุ์ของถั่วลิสงเถา 11 สายพันธุ์**. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2547, กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 185 196.

ขนิษฐา บุรมย์. 2547. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วฮามาต้าและหญ้ารูซี่**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. กรุงเทพมหานคร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. คณะวิทยาศาสตร์.

จิรวัฒน์ สนิทชน และวิบูล เป็นสุข. 2554. **อิทธิพลของอาหารที่มีต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ในถั่วลิสง**. *แก่นเกษตร, ปีที่ 39*, ฉบับพิเศษ 3, 53-59.

เชาวลิต พานิชอัตรา และ ธำรงศักดิ์ พลบำรุง. 2539. **ถั่วอาหารสัตว์และการผลิตเมล็ดพันธุ์**. กองอาหารสัตว์. กรมปศุสัตว์. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 23.

ปวิณ ภิรมย์, อรวรา ดำนิล, ปณิดา ศิลารัตน์ และพัชรา พงศ์มานะวุฒิ. 2010. **การเพาะเลี้ยเนื้อเยื่อ**. [Online]. Available : http://www.thaigoodview.com/library/contest2553/type2/science04/24/pages/index5cfa.html

พัชรา ลิมปนะเวช. 2550. **อาหารสังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. [Online]. Available : http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=31&chap=5&page=t31- 5-infodetail03.html

มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี, อนันท์ เชาว์เครือ, วรางคณา กิจพิพิธ, อณัญญา ปานทอง และศักดา ประจักษ์บุญเจษฎา. 2545. **องค์ประกอบทางโภชนะและการย่อยสลายได้ของถั่วลิสงเถาในกระเพาะรูเมนด้วยเทคนิคถุงไนลอนของโคนม**. วารสารวิชาการและวิจัย มทร. พระนคร ฉบับพิเศษ. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลครั้งที่ 5-6. 407-416.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2545. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. หลักการและเทคนิค, พิมพ์ครั้งที่ 3, ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 219 หน้า.

ลีลาพรรษ์ ย้อยสวัสดิ์, ศศวรรณ ขจรพันธ์, และศุภกร โพธิจันทร์. 2556. **ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเป็นต้นใหม่ของถั่วลิสงเถากลาบราต้า Arachis glabrata)**. กรุงเทพฯ.ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ชัยนาท. 2015. **ถั่วลิสงเถากลาบราต้า**. [Online]. Available : http://nccn-cnt.dld.go.th/cnt_new/index.php/about/68-2015-10-10-07-25-40/139-2015-11-18-08-51-33

โสภณ ชินเวโรจน์. 2014. **การเพาะต้นกล้าถั่วลิสงเถา**. [Online]. Available : http://nccn-cnt.dld.go.th/th/images/stories/pictures/forage/arachis/KM-Arachis.pdf

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

โสภณ ชินเวโรจน์. 2558. **ถั่วกลาบราต้า**. [Online]. Available : http://nccncnt.dld.go.th/th-/index.php?option=com_content&view=article&id=412:2014-06-23-13-06-19&catid=110:2014-06-14-07-51-35&Itemid 55. 26 ธันวาคม 2558

อภิชาติ วรรณวิจิตร. 2547. **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. [Online]. Available : http://kan-chanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=28&chap=5&page=t28-5-infodetail05.html

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

Bajaj Y.P.S., Ram A.K., Labana K.S. and Singh H.. "Regeneration of genetically variable plants from the anther-derived callus of *Arachis hypogaea* and *Arachis villosa*". Plant Sci. letters 23 : 35-39.

Chengalrayan K., Sathaye S.S. and Hazra S. 1994. "Somatic embryogenesis from mature embryo derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.)". Plant Cell Rep. 13, 578-581.

HASANÇEBİ S., TURGUT K.N., ÇAKIR Ö., ARI Ş. 2010. "Micropropagation and root culture of Turkish endemic *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae)". Turk J Bot. 35. pp. 203-210.

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

Kanyard M., Dessai A.P. and Prakash C.S.. 1997. "Thidiazuron promotes high frequency regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plants in *vitro*". Plant. Cell Rep.14, 1-5.

María Laura Vidoz, Hebe Yolanda Rey, Ana María Gonzalez1 and Luis Amado Mroginski. 2004. "Somatic embryogenesis and plant regeneration through leaf culture in *Arachis glabrata* (Leguminosae)". Acta Physiologiae Plantarum. Vol.26 No.1. 59-66.

Narasimhulu S.B. and Reddy G.M. 1983. "Plantlet regeneration from different callus cultures of *Arachis hypogaea* L.". Plant Science Letters. Vol.31. Issues 2-3. pp. 157-163.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตาราง สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS (Murashige and Skoog, 1962)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัม/ลิตร)
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$CaCl_2.2H2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
$MnSO_4.4H_2O$	6.2
$ZnSO_4.5H_2O$	22.3
H_3BO_3	6.2
KI	0.33
$Na_2.MoO_4.2H_2O$	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
Nicotic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Glycine	2.0
Myo-inosital	100
Agar	8000
Sucrose	30000
pH 5.7	-

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ได้แก่ อาหารสังเคราะห์สูตร MS 4.43 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร แล้วนำมาละลายน้ำปริมาตรครึ่งหนึ่งของปริมาตรทั้งหมดที่ต้องการเตรียม
2. ปรับปริมาตรอาหารด้วยกระบอกตวงตามปริมาตรอาหารที่ต้องการเตรียม
3. แบ่งอาหารใส่บีกเกอร์ตามจำนวนความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต้องการเตรียม
4. คำนวณปริมาตรของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต้องเติมลงในอาหารในแต่ละความเข้มข้น จากสูตรดังต่อไปนี้

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

หรือ ปริมาตรที่ใช้ $= \dfrac{\text{ความเข้มข้นที่ต้องการเตรียม} \times \text{ปริมาตรอาหารทั้งหมด}}{\text{ความเข้มข้นจาก stock เริ่มต้น}}$

5. ดูดสารควบคุมการเจริญเติบโตจาก stock เติมลงในบีกเกอร์ แล้วปรับปริมาตรอาหารด้วยกระบอกตวงตามปริมาตรอาหารที่ต้องการเตรียมในแต่ละความเข้มข้น
6. นำอาหารไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารให้อยู่ระหว่าง 5.6-5.8
7. เติมวุ้น 2.6 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารแต่ละบีกเกอร์ แล้วทำการละลายวุ้นด้วยไมโครเวฟ นาน 1-2 นาที
8. แบ่งใส่ขวดแก้วที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปริมาตร 10-20 มิลลิลิตร
9. นำอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
10. นำอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อไปเก็บไว้ในห้องเพาะเลี้ยงนาน 2-3 วัน เพื่อสังเกตการปนเปื้อนในอาหารก่อนการนำไปใช้งาน