

การทนแล้งของถั่วท่าพระสโตโล CIAT 184 และฮามาต้า  
โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

DROUGHT TOLERANCE OF  
*Stylosanthes guianensis* CIAT 184 AND  
*Stylosanthes hamata* cv. Verano BY TISSUE CULTURE



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL-2019-SC-M-020-010

การทนแล้งของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 และฮามาต้า  
โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

DROUGHT TOLERANCE OF  
*Stylosanthes guianensis* CIAT 184 AND  
*Stylosanthes hamata* cv. Verano BY TISSUE CULTURE



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL-2019-SC-M-020-010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DROUGHT TOLERANCE OF  
*Stylosanthes guianensis* CIAT 184 AND  
*Stylosanthes hamata* cv. Verano BY TISSUE CULTURE



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY  
DEPARTMENT OF BIOLOGY  
FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
2019  
KMITL-2019-SC-M-020-010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2019

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทนแล้งของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 และฮามาต้าโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
ชื่อนักศึกษา	นางสาวลีลาวดี เงินงาม
รหัสประจำตัว	59605054
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ	2562
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.อนุรักษ์ โปธิ์เอี่ยม

### บทคัดย่อ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 (*Stylosanthes guianensis* CIAT 184) สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดคือ ร้อยละ 100 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนยอดและความยาวยอดเฉลี่ยคือ 36.80 ยอดต่อเมล็ด และ 0.76 เซนติเมตร ตามลำดับ และเมล็ดถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดร้อยละ 88.33 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *mT* ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนยอดและความยาวยอดเฉลี่ย 7.00 ยอดต่อเมล็ด และ 4.54 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อนำต้นมาชักนำให้เกิดราก พบว่าต้นถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 สามารถชักนำให้เกิดรากได้ร้อยละ 40 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนรากเฉลี่ย 6.50 รากต่อต้น และต้นถั่วฮามาต้าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุดร้อยละ 90.00 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนรากเฉลี่ย 7.50 รากต่อต้น การศึกษาหาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมในการชักนำข้อให้เกิดแคลลัสและยอด พบว่าชิ้นส่วนถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 และถั่วฮามาต้าสามารถชักนำให้เกิดต้นร้อยละ 100 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนยอดเฉลี่ยคือ 6.67 และ 13.50 ยอดต่อข้อ ตามลำดับ และความยาวยอดเฉลี่ยคือ 0.52 และ 1.03 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยจากการนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบเลี้ยงถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงสุดอยู่ที่ 18-21 วัน ถั่วฮามาต้าเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงสุดอยู่ที่ 15-18 วัน และสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุดร้อยละ 100 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *mT* ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันต่อการเจริญของเมล็ดที่ปริมาณ 0 5 10 15 20 25 30 และ 50 กิโลเรด พบว่าเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 มีค่า  $GR_{50(30)}$  และ  $LD_{50(30)}$  เท่ากับ 44.38 และ 38.06 กิโลเรด และเมล็ดถั่วฮามาต้า มีค่า  $GR_{50(30)}$  และ  $LD_{50(30)}$  มีค่าเท่ากับ 34.95 และ 28.38 กิโลเรด ส่วนการศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของแคลลัสที่ปริมาณ 0 2 4 6 8 และ 10 กิโลเรด แคลลัสถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า  $LD_{50}$  เท่ากับ 6.91 กิโลเรดและแคลลัสถั่วฮามาต้าพบว่า  $LD_{50}$  เท่ากับ 5.8 กิโลเรด ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างต้นควบคุมกับต้นที่กลายพันธุ์โดยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอฟดี พบว่าถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 หลังจากตรวจสอบลักษณะแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างไปจากต้นควบคุมคือไพรเมอร์ OPC02 และ OPD02 และถั่วฮามาต้าพบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างไปจากต้นควบคุม คือไพรเมอร์ OPV03 และ OPY15

การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของเมล็ดประกอบด้วย PEG(6000) ความเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 มีค่า  $GR_{50(2)}$  เท่ากับ 17.73 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า  $LD_{50(30)}$  มีค่าเท่ากับ 14.83 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ดถั่วฮามาต้ามีค่า  $GR_{50(2)}$  เท่ากับ 17.88 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า  $LD_{50(30)}$  มีค่าเท่ากับ 15.28 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษาความสามารถในการทนแล้งของแคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้น 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ แคลลัสถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 มีค่า  $LD_{50(16)}$  เท่ากับ 6.09 เปอร์เซ็นต์ และแคลลัสถั่วฮามาต้า  $LD_{50(16)}$  เท่ากับ 4.31 เปอร์เซ็นต์

**คำสำคัญ** การเจริญเป็นต้นใหม่ การทนแล้ง การกลายพันธุ์ ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ถั่วฮามาต้า

<b>Thesis Title</b>	Drought Tolerance of <i>Stylosanthes guianensis</i> CIAT 184 and <i>Stylosanthes hamata</i> cv. Verano by Tissue Culture
<b>Student Name</b>	Miss Leelawadee Ngoenggam
<b>Student ID</b>	59605054
<b>Degree</b>	Master of Science (Biotechnology)
<b>Department</b>	Biology
<b>Year</b>	2019
<b>Thesis Advisor</b>	Assoc. Prof. Dr. Anurug Poeaim

### Abstract

This study was optimized media to shoots induction from seeds of Pasture Legume. The results for multiple shoots induction of *Stylosanthes guianensis* CIAT 184, seeds were cultured on MS medium supplemented with 3 mg/L TDZ. The percentage of shoot induction was 100%, the average shoots were 36.80 per seed and the average high shoots were 0.76 cm respectively, *Stylosanthes hamata* cv. Verano on MS medium supplemented with 3 mg/L mT. The percentage of shoots induction was 88.33%, the average shoots were 7.00 per seed and the average high shoots were 4.54 cm respectively, The shoots of *Stylosanthes guianensis* CIAT 184 were transferred to rooting on MS medium supplemented with 0.3 mg/L IAA. The percentage of root induction was 40% and average root was 6.50 per shoot. *Stylosanthes hamata* cv. Verano was cultured on MS medium supplemented with 0.3 mg/L IBA, percentage of roots induction was 90% and average roots was 7.50 per shoot. Callus and shoots were induced from node on MS medium supplemented with 0.5 mg/L IBA combined with 3 mg/L TDZ. The result showed percentage of embryogenic callus induction was 100%. The average shoot of *Stylosanthes guianensis* CIAT 184 was 6.67 shoots per node and *Stylosanthes hamata* cv. Verano were 13.50 shoots per node respectively, the average high of shoots were 0.52 and 1.03 cm, respectively. Cell suspension culture of callus that developed from cotyledon of *Stylosanthes guianensis* CIAT 184 and transferred to liquid MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D. The result showed the highest average fresh and dry

weight were 18-21 days of culture. Cell suspension of *Stylosanthes hamata* cv. Verano on MS medium supplemented with 0.5 mg/L IBA combined with 3 mg/L TDZ, the highest average fresh and dry weight were 15-18 days of culture. The highest percentage of shoots regeneration was 100% on MS medium supplemented with 3 mg/L mT.

The effective of gamma irradiation to induced mutant seed were irradiated with 0 5 10 15 20 25 30 and 50 Krad. The results showed that *Stylosanthes guianensis* CIAT 184 were GR<sub>50(30)</sub> at 44.38 Krad and LD<sub>50(30)</sub> were 38.06 Krad. The GR<sub>50(30)</sub> values of *Stylosanthes hamata* cv. Verano was 34.95 Krad and LD<sub>50(30)</sub> was 28.38 Krad. And callus was treated with 0 2 4 6 8 and 10 Krad of gamma ray. The LD<sub>50</sub> values of *Stylosanthes guianensis* CIAT 184 and *Stylosanthes hamata* cv. Verano to acute irradiation were 6.91 and 5.8 Krad, respectively after 8 weeks. RAPD analysis was used to determine polymorphism of mutata and control plant. These results suggest that RAPD markers were useful in detecting mutation of *Stylosanthes guianensis* CIAT 184 by gel electrophoresis, primer OPC02 and OPD02 were shown polymorphism band while primer OPV03 and OPY15 were shown polymorphism band in *Stylosanthes hamata* cv. Verano.

Drought tolerance of seeds supplemented with 0 5 10 15 and 20% of PEG-6000. The GR<sub>50(2)</sub> of *Stylosanthes guianensis* CIAT 184 was 17.73% and LD<sub>50(30)</sub> was 14.83% after 4 weeks. And *Stylosanthes hamata* cv. Verano had GR<sub>50(2)</sub> and LD<sub>50(30)</sub> were 17.88% and 15.28% after 4 weeks. The drought tolerance callus was cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/L IBA combined with 3 mg/L TDZ. and supplemented with 0 2 4 6 8 and 10% of PEG. It was found that after culturing for 16 weeks, *Stylosanthes guianensis* CIAT 184 had LD<sub>50</sub> as 6.09% and *Stylosanthes hamata* cv. Verano LD<sub>50</sub> as 4.31%.

**Keywords :** Drought tolerance Mutation Regeneration *Stylosanthes guianensis* CIAT 184  
*Stylosanthes hamata* cv. Verano

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โปธิเอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้คำแนะนำปรึกษา ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี อาจารย์ประจำบัณฑิต และ ดร. วิมลมาศ บุญมี ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจสอบความถูกต้อง พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องและมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โปธิเอี่ยม ที่ให้ความอนุเคราะห์คำปรึกษาด้านเทคนิคทางโมเลกุล พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณกลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ จังหวัดปทุมธานี ซึ่งให้ความอนุเคราะห์เมล็ดถั่วที่นำมาใช้ในการทดลอง รวมถึงคุณจันทกานต์ อรณนันท ผู้เชี่ยวชาญด้านวิเคราะห์อาหารสัตว์ ที่ได้ให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์แก่การทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอบคุณนางสาวสุภานัน สุขศิริ และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนที่ได้สนับสนุน ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีสิ่งขาดตกบกพร่องหรือผิดพลาดประการใด ผู้เขียนขออภัยเป็นอย่างสูงในข้อบกพร่องและความผิดพลาดนั้น และผู้เขียนหวังว่าการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้เขียนต้องขออภัย ณ ที่นี้ด้วย

นางสาว ลีลาวดี เงินงาม

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ต
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ธ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>4</b>
2.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184.....	4
2.2 ถั่วฮามาต้า.....	5
2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	7
2.3.1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส.....	7
2.3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย.....	7
2.4 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	8
2.5 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช.....	9
2.6 การกลายพันธุ์.....	10
2.6.1 การกลายจากการเหนี่ยวนำ.....	10
2.6.2 การเหนี่ยวนำให้พืชเกิดการกลายโดยรังสี.....	11
2.6.3 ผลของเซลล์พืชเมื่อได้รับรังสี.....	11
2.6.4 การเหนี่ยวนำให้พืชเกิดการกลายโดยสารเคมี.....	12
2.7 รังสีที่นิยมใช้ในการเหนี่ยวนำให้พืชกลายพันธุ์.....	14
2.7.1 รังสีแกมมา.....	14
2.8 หน่วยวัดรังสี.....	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.9 ปริมาณและอัตรารังสี.....	15
2.9.1 ปริมาณรังสี.....	15
2.9.2 อัตรารังสี.....	16
2.10 พืชกับการเกิดความเครียดน้ำ.....	16
2.11 กลไกการปรับตัวของพืชต่อสภาพแห้งแล้ง.....	16
2.11.1 การหนีแล้ง.....	16
2.11.2 การทนทานต่อการขาดน้ำ.....	17
2.11.3 การเลี้ยงการขาดน้ำ.....	17
2.12 การคัดเลือกพืชที่ทนทานต่อสภาพแล้ง.....	17
2.13 เครื่องหมายโมเลกุล.....	18
2.13.1 เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี.....	18
2.14 การสกัดดีเอ็นเอ.....	18
2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	19
2.15.1 การศึกษาการชักนำให้เกิดต้น.....	19
2.15.2 การศึกษาการทนทานต่อสภาพแล้ง.....	21
2.15.3 การศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยรังสีแกมมา.....	22
2.15.4 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของพืชที่เกิดจากการชักนำด้วยรังสีโดยใช้ เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี.....	23
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>24</b>
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	24
3.1.1 พันธุ์ถั่วอาหารสัตว์.....	24
3.1.2 ภาชนะและอุปกรณ์.....	24
3.1.3 เครื่องมือวิทยาศาสตร์.....	24
3.1.4 สารเคมี.....	25
3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง.....	27
3.2.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดเพื่อชักนำให้เกิด ยอดจำนวนมาก.....	27

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำราก.....	28
3.2.3 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในชักนำข้อให้เกิดแคลลัสและยอด.....	29
3.2.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย.....	29
3.2.5 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากการเลี้ยง เซลล์แขวนลอยให้เจริญเป็นต้นใหม่.....	31
3.2.6 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของเมล็ด.....	32
3.2.7 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของแคลลัส.....	33
3.2.8 การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของเมล็ด.....	34
3.2.9 การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของแคลลัส.....	35
3.2.10 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอฟดี.....	36
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....</b>	<b>39</b>
4.1 การศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดเพื่อชักนำให้ เกิดยอดจำนวนมาก.....	39
4.1.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184.....	39
4.1.2 ถั่วฮามาต้า.....	44
4.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำราก.....	48
4.2.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184.....	48
4.2.2 ถั่วฮามาต้า.....	51
4.3 การศึกษาหาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมในการชักนำข้อให้เกิดแคลลัสและ ยอด.....	54
4.3.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184.....	54
4.3.2 ถั่วฮามาต้า.....	56
4.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย.....	58
4.4.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184.....	58
4.4.2 ถั่วฮามาต้า.....	64
4.5 การศึกษาหาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากการเลี้ยง เซลล์แขวนลอยให้เจริญเป็นต้นใหม่.....	67
4.5.1 ถั่วฮามาต้า.....	67
4.6 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของเมล็ด.....	70

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184.....	70
4.6.2 ถั่วฮามาต้า.....	75
4.7 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของแคลลัส.....	82
4.7.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184.....	82
4.7.2 ถั่วฮามาต้า.....	88
4.8 การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของเมล็ด.....	94
4.8.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184.....	94
4.8.2 ถั่วฮามาต้า.....	98
4.9 การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของแคลลัส.....	102
4.9.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184.....	102
4.9.2 ถั่วฮามาต้า.....	106
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</b> .....	<b>110</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	110
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	112
เอกสารอ้างอิง.....	113
ภาคผนวก.....	124
ภาคผนวก ก.....	125
ภาคผนวก ข.....	126
ประวัติผู้เขียน.....	131

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโตจากตัวทำละลายและสถานะเก็บรักษา.....	9
2.2 พันธุ์กลายของประเทศไทยที่ส่งไปขึ้นทะเบียนไว้ใน Mutant Varieties Database of the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture.....	13
2.3 การเปลี่ยนแปลงหน่วยวัดของรังสี.....	15
3.1 ชื่อไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีสำหรับ ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184.....	37
3.2 ชื่อไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีสำหรับ ถั่วฮามาต้า.....	38
3.3 ส่วนประกอบสารเคมีในเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี ต่อ 1 ตัวอย่าง .....	38
3.4 แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในเทคนิค PCR.....	38
4.1 ผลการชักนำเมล็ดของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA <i>mT</i> และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	40
4.2 ผลการชักนำเมล็ดของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA <i>mT</i> และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	41
4.3 ผลการชักนำเมล็ดของถั่วฮามาต้าให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA <i>mT</i> และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	45
4.4 ผลการชักนำเมล็ดของถั่วฮามาต้าให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA <i>mT</i> และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	46
4.5 ผลการชักนำยอดของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ให้เกิดรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA IBA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	49
4.6 ผลการชักนำยอดถั่วฮามาต้าให้เกิดรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA IBA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	52

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.7 ผลการชักนำข้อของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ให้เกิดแคลลัสและยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	55
4.8 ผลการชักนำข้อของถั่วฮามาต้าให้เกิดแคลลัสและยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	57
4.9 ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยง เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	59
4.10 ค่าน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเซลล์แขวนลอยในถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 30 วัน.....	62
4.11 ค่าน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเซลล์แขวนลอยในถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 30 วัน.....	65
4.12 ผลการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจากแคลลัสจากข้อของถั่วฮามาต้าบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต mT และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	68
4.13 ผลของจำนวนรอดชีวิตของเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ร้อยละการงอก ร้อยละการเกิดยอดและราก และ ค่าเฉลี่ยความยาวยอดและราก หลังจากฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน.....	71
4.14 ผลของจำนวนรอดชีวิตของเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ร้อยละการงอก ร้อยละการเกิดยอดและราก และ ค่าเฉลี่ยความยาวยอดและราก หลังจากฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน.....	73

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.15 ผลของจำนวนรอดชีวิตของเมล็ดถั่วฮามาต้า ร้อยละการงอก ร้อยละการเกิดยอดและรากเฉลี่ย และ ค่าเฉลี่ยความยาวยอดและรากหลังจากฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน.....	77
4.16 ผลของจำนวนรอดชีวิตของเมล็ดถั่วฮามาต้า ร้อยละการงอก ร้อยละการเกิดยอดและรากเฉลี่ย และ ค่าเฉลี่ยความยาวยอดและรากหลังจากฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสาร ควบคุมการเจริญเติบโต <i>mT</i> ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็น ระยะเวลา 30 วัน.....	79
4.17 ผลของจำนวนรอดชีวิตของแคลลัสของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และ ค่าเฉลี่ยความยาวยอดหลังจากฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	83
4.18 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของคูไพร์เมอร์จำนวน 3 คู่ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี..	87
4.19 ผลของจำนวนรอดชีวิตของแคลลัสของถั่วฮามาต้า ร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และค่าเฉลี่ยความยาวยอดหลังจากฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	89
4.20 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของคูไพร์เมอร์จำนวน 6 คู่ ด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี.....	93
4.21 ผลของการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ร้อยละการงอก ร้อยละการรอดชีวิต และค่าเฉลี่ยความยาวยอด ความยาวรากบนอาหาร สังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์...	95
4.22 ผลของการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วฮามาต้า ร้อยละการงอก ร้อยละการรอดชีวิต และค่าเฉลี่ยความยาวยอด ความยาวรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	99
4.23 ผลของการเพาะเลี้ยงแคลลัสของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อระยะเวลาผ่านไป 16 สัปดาห์.....	103

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.24	
ผลของการเพาะเลี้ยงแคลลัสของถั่วฮามาต้าบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อระยะเวลาผ่านไป 16 สัปดาห์.....	107



## สารบัญญรพ

รพที่		หน้า
2.1	(ก) ลักษณขงถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ( <i>Stylosanthes guianensis</i> CIAT 184) (ข) ลักษณดอก.....	5
2.2	ลักษณขงเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล ( <i>Stylosanthes guianensis</i> CIAT 184).....	5
2.3	(ก) ลำต้นขงถั่วฮามาต้า ( <i>Stylosanthes hamata</i> cv. Verano) (ข) ลักษณดอก.....	6
2.4	ลักษณเมล็ดขงถั่วฮามาต้า ( <i>Stylosanthes hamata</i> cv. Verano).....	7
4.1	การเพาะเลียงถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) เมื่อเพาะเลียงเป็นเวลา 5-7 วัน (ข) การเกิดแคลลัสจากส่วนขงราก (ค) การเกิดต้นใหม่จากแคลลัสเมื่อเพาะเลียงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ง) เมื่อเพาะเลียงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	42
4.2	การเพาะเลียงถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (ก-ค) BA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง-ฉ) mT ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช-ญ) และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสังเคราะห์ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ฎ) ตามลำดับ เมื่อเพาะเลียงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	43
4.3	การเพาะเลียงถั่วฮามาต้า (ก) บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) การเกิดแคลลัสจากส่วนขงราก (radicle) ที่เพาะเลียงบนสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) การเกิดต้นใหม่จากแคลลัส เมื่อเพาะเลียงบน mT ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ .....	46
4.4	การเพาะเลียงถั่วฮามาต้าบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (ก-ค) BA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง-ฉ) mT ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช-ญ) และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสังเคราะห์ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ฎ) ตามลำดับ เมื่อเพาะเลียงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	47
4.5	แสดงลักษณการเจริญเติบโตขงรากถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่เพาะเลียงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (ก-ค) IAA ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง-ฉ) IBA ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช-ญ) และ NAA ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลียงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	50

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.6 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของรากถั่วฮามาต้าเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (ก-ค) IAA ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง-ฉ) IBA ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช-ญ) และ NAA ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	53
4.7 ข้อถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ก) เมื่อเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ (ข) IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	55
4.8 ข้อถั่วฮามาต้าเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ก) เมื่อเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ (ข) IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	57
4.9 การชักนำแคลลัสจากส่วนของใบเลี้ยง (ก) ใบเลี้ยงถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) ลักษณะของแคลลัสสีน้ำตาลใส ฉ่ำน้ำ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (ค) ลักษณะของแคลลัสสีน้ำตาล แคลลัสที่เกาะกันแน่น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	59
4.10 ใบเลี้ยงถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 อายุ 7 วัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D (ก) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	60

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.11 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ในสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) ลักษณะเซลล์แขวนลอยในขวดเพาะเลี้ยง (ข) ลักษณะของเซลล์แขวนลอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า เซลล์มีลักษณะ ยาว เป็นรูปท่อน (ค) เซลล์แขวนลอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 400 เท่า เซลล์ที่มีชีวิตเกิดสีเขียวเรืองแสงเมื่อย้อมด้วยสีฟลูออเรสซินไดอะซิเตต เซลล์ที่มีชีวิตเกิดสีเขียวเรืองแสงเมื่อย้อมด้วยสีฟลูออเรสซินไดอะซิเตต.....	63
4.12 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ในสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) น้ำหนักสด (ข) น้ำหนักแห้ง.....	63
4.13 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วฮามาต้าในสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) ลักษณะเซลล์แขวนลอยในขวดเพาะเลี้ยง (ข) ลักษณะของเซลล์แขวนลอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า เซลล์มีลักษณะกลม ยาว เป็นรูปท่อน (ค) เซลล์แขวนลอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 400 เท่า เซลล์ที่มีชีวิตเกิดสีเขียวเรืองแสงเมื่อย้อมด้วยสีฟลูออเรสซินไดอะซิเตต.....	66
4.14 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วฮามาต้าในสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) น้ำหนักสด (ข) น้ำหนักแห้ง.....	66
4.15 แคลลัสของถั่วฮามาต้าเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต <i>mT</i> ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ข) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ค) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ และ (ง) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	68
4.16 แคลลัสของถั่วฮามาต้าเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (ก-ค) <i>mT</i> ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง-จ) และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	69
4.17 ถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะรากมีสีขาว รากยาวแตกแขนง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.18 ความสัมพันธ์ระหว่างรังสีกับการงอก และความอยู่รอดของเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน.....	72
4.19 การเจริญเป็นต้นจากเมล็ดของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 หลังจากฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน.....	72
4.20 แสดงความยาวยอดจากเมล็ดของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 หลังจากฉายรังสีแกมมาในปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน.....	74
4.21 แสดงความยาวรากจากเมล็ดของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 หลังจากฉายรังสีแกมมาในปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน.....	74
4.22 การเจริญเป็นต้นจากเมล็ดของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 หลังจากฉายรังสีแกมมาในปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน.....	75
4.23 ความสัมพันธ์ระหว่างรังสีกับการงอก และความอยู่รอดของเมล็ดถั่วฮามาต้าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน.....	78
4.24 การเจริญเป็นต้นจากเมล็ดของถั่วฮามาต้าหลังจากฉายรังสีแกมมาในปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน.....	78
4.25 แสดงความยาวยอดจากเมล็ดของถั่วฮามาต้า หลังจากฉายรังสีแกมมาในปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต mT ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน.....	80

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.26	แสดงความยาวรากเมล็ดของถั่วฮามาต้า หลังจากฉายรังสีแกมมาในปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต <i>mT</i> ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน.....	80
4.27	การเจริญเป็นต้นจากเมล็ดของถั่วฮามาต้าหลังจากฉายรังสีแกมมาในปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต <i>mT</i> ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน.....	81
4.28	(ก) ลักษณะแคลลัสที่รอดชีวิตหลังจากผ่านการฉายรังสี (ข) ลักษณะแคลลัสที่ตายหลังจากการผ่านฉายรังสี.....	84
4.29	การรอดชีวิตของแคลลัสถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 หลังได้รับรังสีแกมมาปริมาณรังสีต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์.....	84
4.30	การเกิดยอดจากแคลลัสของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากที่ผ่านมาการฉายรังสีปริมาณรังสีที่ต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ก) ไม่ผ่านการฉายรังสี (ต้นควบคุม) (ข) การฉายรังสี 2 กิโลเรด (ค) การฉายรังสี 4 กิโลเรด (ง) การฉายรังสี 6 กิโลเรด (จ) การฉายรังสี 8 กิโลเรด และ (ฉ) ผ่านการฉายรังสี 10 กิโลเรด.....	85
4.31	ต้นถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่พัฒนามาจากแคลลัส (ก) การฉายรังสี 2 กิโลเรด (ข) การฉายรังสี 4 กิโลเรด และ (ค) การฉายรังสี 6 กิโลเรด นำมาชักนำให้เกิดรากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะรากมีสีขาว ราก สั้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	85
4.32	ผลการเปรียบเทียบไพรมอร์ 3 ไพรมอร์ OPA09 OPC02 และ OPD02 จากตัวอย่างต้นควบคุมและฉายรังสี 6 กิโลเรด.....	87
4.33	(ก) ลักษณะแคลลัสที่รอดชีวิตหลังจากผ่านการฉายรังสี (ข) ลักษณะแคลลัสที่ตายหลังจากการผ่านฉายรังสี.....	90
4.34	การรอดชีวิตของแคลลัสถั่วฮามาต้าหลังได้รับรังสีปริมาณรังสีต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์.....	90

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.35 การเกิดยอดจากแคลลัสของถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากที่ผ่านมาการฉายรังสีปริมาณรังสีที่ต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ก) ไม่ผ่านการฉายรังสี (ต้นควบคุม) (ข) การฉายรังสี 2 กิโลแตรด (ค) การฉายรังสี 4 กิโลแตรด (ง) การฉายรังสี 6 กิโลแตรด (จ) การฉายรังสี 8 กิโลแตรด และ (ฉ) ผ่านการฉายรังสี 10 กิโลแตรด.....	91
4.36 ต้นถั่วฮามาต้าที่พัฒนามาจากแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสี 4 กิโลแตรด ชักน้ำให้เกิดราก เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะรากมีสีขาว ราก สั้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์.....	91
4.37 ผลการเปรียบเทียบไพรมอร์ 6 ไพรมอร์ OPV02 OPV03 OPH05 OPN15 OPY15 และ OPZ04 จากตัวอย่างต้นควบคุมและฉายรังสี 6 กิโลแตรด.....	93
4.38 ความสัมพันธ์ระหว่าง PEG กับการงอก และความอยู่รอดของเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่เพาะเลี้ยงใน PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงเป็น ระยะเวลา 30 วัน.....	96
4.39 การเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์.....	96
4.40 การเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	97
4.41 การเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	97
4.42 ความสัมพันธ์ระหว่าง PEG กับการงอก และความอยู่รอดของเมล็ดถั่วฮามาต้า ที่เพาะเลี้ยงใน PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน.....	100
4.43 การเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วฮามาต้าบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์.....	100
4.44 การเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วฮามาต้าบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	101

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.45 การเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วฮามาต้าบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์.....	101
4.46 การรอดชีวิตของแคลลัสถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อระยะเวลาผ่านไป 16 สัปดาห์.....	103
4.47 การรอดชีวิตของแคลลัสของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีสภาวะความเข้มข้นของ PEG ต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์ (ก) ไม่เติม PEG (ข) PEG 2 เปอร์เซ็นต์ (ค) PEG 4 เปอร์เซ็นต์ (ง) PEG 6 เปอร์เซ็นต์ (จ) PEG 8 เปอร์เซ็นต์ และ (ฉ) PEG 10 เปอร์เซ็นต์.....	104
4.48 การรอดชีวิตของแคลลัสของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 หลังฉายรังสี 6 กิโลแรม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) PEG 6 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ (ข) เพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ (ค) PEG 6 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ (ง) เพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์.....	105
4.49 การรอดชีวิตของแคลลัสถั่วฮามาต้าบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อระยะเวลาผ่านไป 16 สัปดาห์.....	107
4.50 การรอดชีวิตของแคลลัสของถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรและมีสภาวะความเข้มข้นของ PEG ต่างกัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์ (ก) ไม่เติม PEG (ข) PEG 2 เปอร์เซ็นต์ (ค) PEG 4 เปอร์เซ็นต์ (ง) PEG 6 เปอร์เซ็นต์ (จ) PEG 8 เปอร์เซ็นต์ และ (ฉ) PEG 10 เปอร์เซ็นต์.....	108

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.51	109

การรอดชีวิตของแคลัสของถั่วฮามาต้า หลังฉายรังสี 6 กิโลแตรด ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) PEG 4 เปอร์เซนต์ เพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ (ข) เพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ (ค) PEG 6 เปอร์เซนต์ เพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ (ง) เพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์.....



## คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ	สัญลักษณ์
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
BA	6-benzlyaminopurine
GR <sub>50</sub>	Growth reduction
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
LD <sub>50</sub>	50% lethal dose
mt	<i>meta</i> -Topolin
MS	อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog
NAA	$\alpha$ -Naphthaleneacetic acid
PEG	Polyethylene glycol
RAPD	Random Amplifird Polymorphic DNA
TBE	Tris-borate EDTA buffer
TDZ	Thidiazuron

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมซึ่งประชากรส่วนใหญ่ในประเทศล้วนมีอาชีพหลักทางการเกษตร เช่น การเลี้ยงสัตว์ และเพาะปลูกพืช โดยสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่นิยมเลี้ยงกันมาก ได้แก่ โค (ทั้งโคนเนื้อ และโคนม) กระบือ และ สุกร เป็นต้น โดยการพัฒนาทางการเกษตรมีทรัพยากรน้ำเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ ซึ่งปัญหาหลักที่พบเป็นส่วนมากของไทยคือ ปัญหาการขาดแคลนน้ำ และสภาพแห้งแล้ง

ภาวะแห้งแล้งจะเกิดขึ้นในหน้าแล้งและหน้าร้อน มีสาเหตุมาจากฝนทิ้งช่วงเป็นเวลานาน ทำให้แหล่งน้ำตามธรรมชาติแห้ง ไม่เพียงพอต่อการอุปโภคบริโภคของประชาชน สภาพแห้งแล้งนี้มีผลกระทบต่อการทำเกษตรของไทยอย่างยิ่ง (สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2560) ทั้งในด้านการปลูกพืชเศรษฐกิจและยังรวมถึงด้านปศุสัตว์ โดยเฉพาะโคกระบือ ที่อาจจะได้รับผลกระทบมาก เนื่องมาจากการขาดแคลนพืชอาหารสัตว์หรืออาหารสัตว์มีคุณภาพต่ำ ปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการบริโภคโดยเฉพาะเกษตรกรรายย่อยที่ปล่อยให้สัตว์เลี้ยงหาอาหารกินเองตามธรรมชาติ ส่วนการเลี้ยงสุกรและสัตว์ปีกต่างๆ จะมีผลกระทบไม่มากนักเนื่องจากผู้เลี้ยงสามารถที่จะเตรียมการดูแลได้ ซึ่งจะส่งผลเสียหายโดยรวมต่อประเทศ

ในปัจจุบันสถานการณ์ภัยแล้งของประเทศไทยมีแนวโน้มที่จะทวีความรุนแรงขึ้นทุกปี (สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2560) การศึกษาเกี่ยวกับพันธุ์พืชอาหารสัตว์ทนแล้งจึงเป็นเรื่องสำคัญ เพื่อช่วยให้เกษตรกรมีพืชอาหารสัตว์ให้สัตว์ได้กินตลอดปี และสามารถให้ผลผลิตในฤดูแล้งที่ขาดแคลนน้ำได้ ผลที่ตามมาคือจะทำให้วงจรการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของโค กระบือ มีความต่อเนื่องไม่มีหยุดชะงัก กรมปศุสัตว์จึงได้ทำการพัฒนาพันธุ์พืชอาหารสัตว์ และส่งเสริมให้เกษตรกรใช้หญ้าและถั่วเป็นอาหารหลักในการเลี้ยงสัตว์ให้มากขึ้น โดยเพิ่มปริมาณการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชให้เพียงพอับความต้องการของเกษตรกร พร้อมทั้งพัฒนาเทคโนโลยีด้านพืช อาหารสัตว์ และถ่ายทอดความรู้สู่เกษตรกร เช่น การปลูก การจัดการแปลงหญ้า การใช้ประโยชน์ และการผลิตเมล็ดพันธุ์ เป็นต้น (กรมปศุสัตว์, 2551)

จากการศึกษาวิจัยพบว่าถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 (*Stylosanthes guianensis* CIAT 184) เป็นถั่วอาหารสัตว์ที่มีโปรตีนสูงชนิดหนึ่งให้ผลผลิตน้ำหนักแห้ง 2,096 กิโลกรัมต่อไร่ (ศูนย์วิจัยอาหารสัตว์ขอนแก่น, 2541) พบว่าทนทานต่อโรคแอนแทรกคโนสได้ดีกว่าพันธุ์แกรมสไตโล ไม่ทนดินเค็มและดินด่าง (pH มากกว่า 8.5) ไม่ทนต่อการทะเลี่ยมการเหยียบย่ำของสัตว์หรือการตัดบ่อย ผลผลิตน้ำหนักแห้ง 1.5 ถึง 2.5 ตันต่อไร่ต่อปี โปรตีน 14-18 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประกอบทางเคมีของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัดอายุ 45 วัน จะมีวัตถุแห้ง 18.30 เปอร์เซ็นต์ มีโปรตีน 17.57 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 1.36 เปอร์เซ็นต์ NDF 51.43 เปอร์เซ็นต์ ADF 41.43 เปอร์เซ็นต์ Ca และ P เท่ากับ 1.2 เปอร์เซ็นต์ และ 0.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (วารุณี และวลัยกานต์, 2541) เป็นถั่วอาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางโภชนาสูงชนิดหนึ่ง จึงได้นำถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่เป็นพืชมีโปรตีนสูงมาเสริมอาหารหยาบคุณภาพต่ำเพื่อใช้เลี้ยงโคนม ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตและลดต้นทุนค่าอาหาร ถั่วฮามาต้าสามารถปลูกได้ดีในสภาพดินฟ้าอากาศทั่วไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูง ทนต่อการแทะเล็มของสัตว์ ไม่มีรายงานว่าทำให้โคกระปือท้องอืดเหมือนถั่วบางชนิดและให้ผลผลิตเมล็ดที่มีคุณภาพสูง (จินดา, 2525) ในการทดสอบเปรียบเทียบพันธุ์ที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น บุญฤ (2522) พบว่าถั่วฮามาต้าให้ผลผลิตสูงกว่าถั่วพืชอาหารสัตว์หลายชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับถั่วสไตโลชนิดอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Topark-Ngarm *et al.* (1979) สำหรับในการผลิตเมล็ดมีการทดลองหาวิธีการต่างๆ เพื่อที่จะทำให้ได้ผลผลิตของเมล็ดสูงสุด เช่น ระยะเวลาที่เหมาะสมในการปล่อยแกะหรือโคแทะเล็มก่อนที่จะเก็บเมล็ด (Wilaipon and Humphreys 1976; Wilaipon and Humphreys, 1981) หรือระยะเวลาการตัดต้นถั่วก่อนที่จะเก็บเกี่ยวเมล็ด (Wilaipon *et al.*, 1979) ในปัจจุบันเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีบทบาทอย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยอาจใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีหรือสารเคมี ซึ่งการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในพืช เนื่องจากรังสีแกมมามีคุณสมบัติเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า มีอำนาจทะลุทะลวงสูง วิธีการฉายรังสีไม่ยุ่งยากและไม่มีรังสีตกค้างอยู่ในพืช (สิรินุช, 2536)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการศึกษารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และศึกษาเทคนิคการปรับปรุงสายพันธุ์ในถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 และถั่วฮามาต้าด้วยวิธีการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันโดยทำการศึกษาดังแต่การชักนำให้เกิดต้น การชักนำให้เกิดราก การชักนำให้เกิดแคลลัส การหาค่าการรอดชีวิตลดลงร้อยละ 50 เปอร์เซ็นต์ (LD<sub>50</sub>) และปริมาณรังสีที่ทำให้การเจริญของเมล็ดและแคลลัสลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (GR<sub>50</sub>) ศึกษาความสามารถในการทนแล้งของเมล็ด และแคลลัส รวมถึงความสามารถในการเจริญเป็นต้นใหม่ภายใต้สภาวะแล้ง และการตรวจสอบต้นกลายพันธุ์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) เพื่อเป็นพื้นฐานของการปรับปรุงพันธุ์ถั่วอาหารสัตว์เพื่อเป็นอาหารหลักในการเลี้ยงสัตว์มากขึ้น

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 และฮามาต้าให้เกิดเป็นยอดหลายยอด และชักนำให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์
- 1.2.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงข้อถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 และฮามาต้าให้เจริญเป็นแคลลัส
- 1.2.3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 และฮามาต้า
- 1.2.4 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 และฮามาต้าให้เกิดรากที่สมบูรณ์
- 1.2.5 ศึกษาปริมาณรังสีแกมมาที่ทำให้เมล็ด และแคลลัสของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 และฮามาต้ารอดชีวิตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (LD<sub>50</sub>) และปริมาณรังสีที่ทำให้การเจริญของเมล็ดและแคลลัสลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (GR<sub>50</sub>)
- 1.2.6 ศึกษาความสามารถในการทนแล้งของเมล็ด และแคลลัส รวมถึงความสามารถในการเจริญเป็นต้นใหม่ภายใต้สภาวะแล้ง
- 1.2.7 ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตในสูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำเมล็ดให้เกิดยอดหลายยอด การชักนำให้เกิดแคลลัส การชักนำให้เกิดราก ความสามารถในการทนแล้งของเมล็ด และแคลลัสรวมถึงการเจริญเป็นต้นใหม่ภายใต้สภาวะแล้งของถั่วอาหารสัตว์ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ถั่วอาหารสัตว์ให้ทนต่อสภาวะแล้งหลังจากผ่านการฉายรังสีแกมมา แล้วพัฒนาให้เกิดต้น และการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของต้นถั่วด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดหลายยอด การชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส และชักนำให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์
- 1.4.2 ได้ข้อมูลพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการฉายรังสีแกมมา เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 และถั่วฮามาต้าต่อไป
- 1.4.3 ทราบความสามารถในการทนแล้งของเมล็ดและแคลลัส รวมถึงความสามารถในการเจริญเป็นต้นใหม่ภายใต้สภาวะแล้ง

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและหลักการ

### 2.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 เป็นพืชพื้นเมืองของอเมริกากลางพบที่ประเทศเบลีซ คอสตาริกา (ตะวันออกเฉียงเหนือ) กัวเตมาลา ฮอนดูรัส เม็กซิโก (ใต้) นิคารากัว (ตะวันออกเฉียง) และปานามา ทวีปอเมริกาใต้ พบที่ประเทศ โบลิเวีย (เหนือ) บราซิล โคลัมเบีย French Guiana, Guyana, Suriname เปรู และ เวเนซุเอลา ถั่วพันธุ์ท่าพระสไตโล CIAT 184 (CPI 133548, ILCA-00164 ATF 493 ATF 2755) ได้มาจาก Valle del Cauca ในโคลัมเบีย นำเข้าประเทศไทยครั้งแรกในปี 1995 โดย Werner Stur (กองอาหารสัตว์, 2544)

ถั่วพันธุ์ท่าพระสไตโล (*Stylosanthes guianensis* CIAT 184) ได้ปลูกทดสอบที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ขอนแก่น พบว่าทนทานต่อโรคแอนแทรกโนสได้ดีกว่าพันธุ์แกรมสไตโล จึงคัดเลือกจนได้สายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับประเทศไทย กองอาหารสัตว์จึงได้นำออกเผยแพร่ในปี พ.ศ. 2541 กรมปศุสัตว์ (2549) อธิบายลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ดังนี้ เป็นพืชหลายฤดู(perennial) อายุ 2 ถึง 3 ปี ต้นสูงประมาณ 1 เมตร มีกิ่งแขนงหนาแน่น ลำต้นมีขน ทรงต้นมีทั้งแบบตั้งตรงและแผ่ราบ ใบเป็นแบบ trifoliolate ใบย่อยจะคล้ายแบบ elliptic คือ มีส่วนที่กว้างที่สุดอยู่ที่กึ่งกลางใบ แต่จะมีความกว้างของใบน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวใบ ใบย่อยกว้าง 6 ถึง 9 มิลลิเมตร ยาว 35 ถึง 50 มิลลิเมตร (รูปที่ 2.1 ก) ช่อดอกมีขนและอยู่รวมกันเป็นกระจุกดอกสี่เหลี่ยม (รูปที่ 2.1 ข) เริ่มออกดอกประมาณต้นเดือนตุลาคมไปจนถึงปลายเดือนพฤศจิกายน ฝักมีลักษณะโค้งงอ สั้นกว่า 1 มิลลิเมตร ใน 1 ฝักมี 1 เมล็ด เมล็ดสี่เหลี่ยมจนถึงสีน้ำตาลและอาจพบเมล็ดสีดำ (รูปที่ 2.2)

#### อนุกรมวิธาน

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

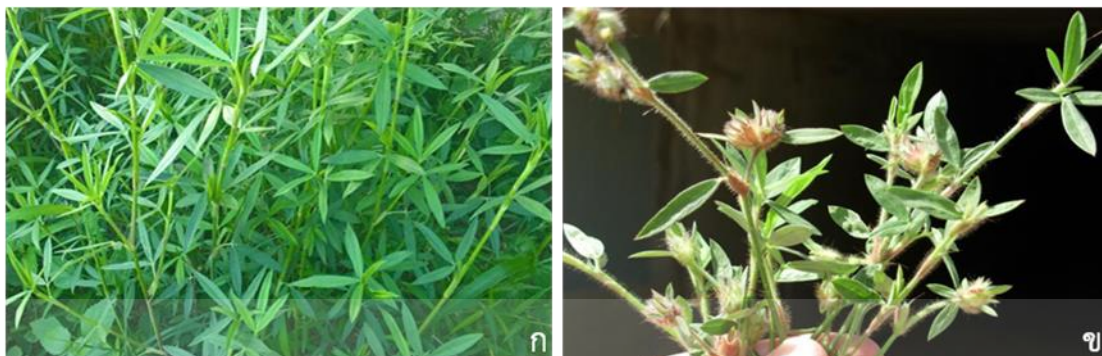
Order: Fabales

Family: Fabaceae

Genus: *Stylosanthes*

Species: *guianensis*

ที่มา : [http https://www.feedipedia.org/node/251](http://www.feedipedia.org/node/251)



รูปที่ 2.1 (ก) ลักษณะของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 (*Stylosanthes guianensis* CIAT 184)

(ข) ลักษณะดอก

ที่มา : <http://trungtambocobavi.com/san-pham/co-stylo-stylosanthes-guianensis-ciat-184/>



รูปที่ 2.2 ลักษณะของเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล (*Stylosanthes guianensis* CIAT 184)

ที่มา : ภาพจากผู้จัดทำ

## 2.2 ถั่วฮามาต้า (บุญฤๅ, 2533)

ถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) เป็นพืชตระกูลถั่วที่เกษตรกรผู้ปลูกหญ้าเลี้ยงสัตว์เรียกกันติดปากหรือมีชื่อเรียกทางราชการว่า ถั่วเวอร์นาโนสไตโล ซึ่งเป็นถั่วพื้นเมืองของประเทศเวเนซุเอลล่า ซึ่งอยู่ในแถบอเมริกาใต้ถูกนำเข้ามาประเทศไทยเพื่อทดสอบครั้งแรก ที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปี พ.ศ.2513 โดยได้รับเมล็ดพันธุ์จาก Dr. HM. Shelton และ Dr. LR Humpherys แห่งมหาวิทยาลัยควีนสแลนด์ ประเทศออสเตรเลีย ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของถั่วฮามาต้าคือ เป็นไม้ล้มลุก อายุฤดูเดียว หรือหลายฤดู สูงได้ถึง 75 เซนติเมตร กิ่งแผ่ออกด้านข้างเป็นคู่ ลำต้นมีขนขาวละเอียด ใบประกอบมี 3 ใบย่อย รูปแถบกว้าง 0.5 ถึง 1 เซนติเมตร ยาว 4 ถึง 10 เซนติเมตร หูใบ ยาว 4 ถึง 6 เซนติเมตร คล้ายซี่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชมัชช ดอกเป็นแบบช่อกระจายยาว 2 เซนติเมตร (รูปที่ 2.3 ก) ดอกย่อย 8 ถึง 14 ดอกสีเหลือง ใบประดับ มีขน กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันเป็นถ้วย ปลายแยกเป็น 4 ถึง 5 แฉก กลีบดอกรูปดอกถั่วสีเหลือง เกสรเพศผู้ 10 อัน เชื่อมติด 2 กลุ่ม รังไข่เหนือวงกลีบ (รูปที่ 2.3 ข) ผลมีลักษณะแบบฝักถั่ว ฝักเดี่ยว เมล็ดเดี่ยว โคนงอฝักแก่สีน้ำตาลดำ เมล็ดถั่วฮามาต้ามีขนาดเล็ก เปลือกมีขน สีน้ำตาลปนดำ (รูปที่ 2.4)

### อนุกรมวิธาน

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Order: Fabales

Family: Fabaceae

Genus: *Stylosanthes*

Species: *hamata*

ที่มา : <https://www.feedipedia.org/node/7740>



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

ที่มา : <https://fezzgator.deviantart.com/art/Stylosanthes-hamata-Cheesytoes-369039502>



รูปที่ 2.4 ลักษณะเมล็ดของฮามาต้า (*Stylosanthes hamata* cv. Verano)

ที่มา : ภาพจากผู้จัดทำ

### 2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (อนรรักษ์, 2540)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพาะเลี้ยงได้จากทุกๆ ส่วนของเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ การเพาะเลี้ยงจะประสบความสำเร็จหรือไม่นั้น อาจจะต้องทดลองนำส่วนต่างๆ ของพืชเหล่านั้นมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ซึ่งในส่วนของเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เพราะเซลล์แต่ละชนิดมีความสามารถในการเจริญเติบโตไม่เท่ากัน โดยส่วนมากนิยมใช้ส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

#### 2.3.1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส (Callus culture)

แคลลัส (Callus) หมายถึง กลุ่มเซลล์พารงโคมา (Parenchyma) ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อต่างๆ แคลลัสมีขนาดต่างๆ กันหลายรูปแบบ มีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีส่วนประกอบของแวคิวโอลสูง แคลลัสสามารถแบ่งออกเป็นสองประเภทได้แก่ แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น มีความแข็ง เรียกว่า Compact callus และแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันอย่างหลวมๆ ฉ่ำน้ำ คล้ายกับฟองน้ำ เรียกว่า Friable callus ในบางครั้งอาจพบแคลลัสทั้งสองแบบอยู่ในก้อนหรือชิ้นเนื้อเยื่อเดียวกัน เนื้อเยื่อทุกส่วนที่ยังมีชีวิต สามารถที่จะชักนำให้พัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ยกตัวอย่างเช่น ส่วนของเอ็มบริโอ ยอด ใบเลี้ยง ลำต้น ราก ใบอ่อน ดอกอ่อน เมล็ด เรณู อับเรณู แคมเปียม คอร์เทกซ์ และท่อลำเลียงอาหาร เป็นต้น

#### 2.3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (Suspension culture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยนั้น อาจเริ่มต้นได้จากการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช โดยนำเอาชิ้นส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอ็มบริโอ อับเรณู รังไข่ ตาข้าง ดอก และผล มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เช่น สูตร Murashige และ Skoog ซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินในอัตราส่วนค่อนข้างสูง โดยสารที่นิยมใช้ได้แก่ 2,4-D NAA และ 2,4,5-T เป็นต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหารสังเคราะห์จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเนื้อเยื่อพืชไปเป็นแคลลัสซึ่งกลุ่มเซลล์จะเกาะกันอย่างหลวมๆ จากนั้นนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า ซึ่งมีผลทำให้กลุ่มเซลล์ที่เกาะกันอย่างหลวมๆ สามารถหลุดแยกออกจากกันมาแขวนลอยอยู่ในอาหาร ในบางกรณีอาจใช้แท่งแก้วหรือข้อตักสารเคมีช่วยกวนอย่างเบาๆ เพื่อให้เซลล์หลุดจากก้อนแคลลัสก็ได้ เซลล์แขวนลอยที่ได้นั้นควรประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก และมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ที่มีความสม่ำเสมอในการเจริญเติบโต

## 2.4 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (ริงสฤชฎ์, 2540)

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมต่อชนิดของพืชพันธุ์ตลอดจนชนิดและสภาพของชิ้นส่วนพืช (Explants) ที่จะนำมาเลี้ยง อย่างไรก็ตามอาหารที่นิยมใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากที่สุดคืออาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้เลี้ยงกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์ที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา (Differentiated) มีช่องว่างในเซลล์จำนวนมากและเซลล์ยังไม่มีการจัดรูปแบบที่แน่นอน ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงแคลลัส (Callus culture) และเซลล์แขวนลอย (Suspension culture) ของพืชส่วนใหญ่เกือบทุกชนิดทำได้ง่ายกว่าการเลี้ยงจากส่วนอื่นๆ แคลลัสเหล่านี้ได้จากการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหารกึ่งแข็ง (Semi-solid medium) ที่อย่างน้อยประกอบด้วยเกลือของธาตุอาหารที่ต้องการคือ ส่วนประกอบอินทรีย์หรือสารประกอบอินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง

แม้พืชจะมีความต้องการขั้นพื้นฐานในการเจริญเติบโตไม่ซับซ้อนก็ตาม แต่การนำชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นั้น มีความต้องการธาตุอาหารและสารอาหารบางอย่างที่จำเป็นที่มีความซับซ้อนมากกว่าและมีลักษณะเป็น Seldom autotrophic กล่าวคือ ต้องการทั้งธาตุอาหารหลัก (Macro-element/nutrients) และธาตุอาหารรอง (Micro-element/nutrients) ที่ใช้กันตามปกติในการเลี้ยงพืชในสารละลาย นอกจากนี้ยังต้องการธาตุอาหารอื่นๆ เช่น แหล่งของคาร์บอนและวิตามินอย่างมาก ปกติแล้วเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่แยกออกมาเลี้ยงจะต้องการวิตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ ซึ่งปกติสังเคราะห์ได้เองจากส่วนหนึ่งของต้นเพื่อไปสะสมไว้ยังอีกส่วนหนึ่งของต้นพืชแล้วเคลื่อนย้ายไปยังส่วนอื่นๆ เพื่อใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม อย่างไรก็ตามผลของแต่ละสารประกอบที่จำเป็นนี้ยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน โดยเฉพาอย่างยิ่งในกรณีของสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึม เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารที่ใช้มักถูกดัดแปลงไปตามความมุ่งหมายเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อกำเนิดอวัยวะ (Organogenesis) และ การกำเนิดคัพภะ (Embryogenesis) จึงทำให้ยากต่อการหาข้อสรุปพื้นฐานที่สอดคล้องไปในทางเดียวกันได้โดยง่าย อย่างไรก็ตามโดยทั่วๆ ไปแล้วสามารถจำแนกสารเหล่านี้เป็นกลุ่มๆ ได้ดังนี้

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเหล่านี้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายและเก็บรักษาไว้ในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโตจากตัวทำละลายและสถานะเก็บรักษา

กลุ่มสาร	ชื่อสาร	ตัวทำละลาย	การเก็บ
ออกซิน (auxins)	Indole-3-acetic acid (IAA)	1N NaOH	0 °C
	Indole-3-butyric acid (IBA)	1N NaOH	0-5°C
	$\alpha$ -Naphthaleneacetic acid (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
กลุ่มไซโตไคนิน (cytokinins)	N <sub>6</sub> -Benzyladenine (BA)	1N NaOH	อุณหภูมิห้อง
	Kinetin	1N NaOH	0 °C
	Zeatin	1N NaOH	0 °C
	N <sub>6</sub> -isopentenyl adenine (2iP)	1N NaOH	0 °C
สารควบคุมการ เจริญเติบโตอื่นๆ	Pactlobutrazol, abscissic acid (ABA)	1N NaOH	0 °C
	Gibberellic acid (GA <sub>3</sub> )	50%EtOH	อุณหภูมิห้อง
	Picloram	0.2M KOH	0 °C

หมายเหตุ

EtOH = Ethanol alcohol

NaOH = Sodium hydroxide

KOH = Potassium hydroxide

N = Normality

M = Molarity

## 2.5 เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืช (อนุรักษ์, 2540)

การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืชถือว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะประสบความสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับขั้นตอนนี้ ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่สามารถนำมาฟอกฆ่าเชื้อได้แก่ เนื้อเยื่อเจริญ ปลายยอด ปลายราก ใบ เมล็ด เอ็มบริโอ อับเรณู รังไข่ ตาข้าง และดอก เป็นต้น โดยจะต้องทำเนื้อเยื่อพืชเหล่านั้นปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อนที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เพราะว่าในสภาพธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ อากาศ จะมีเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย รา และไวรัสแพร่กระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุสำคัญของการปนเปื้อน (Contamination) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และเชื้อจุลินทรีย์มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่าเนื้อเยื่อพืชในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และทำให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และจะตายในที่สุด ซึ่งการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์นี้เป็นสาเหตุสำคัญที่สุดที่ทำให้เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่ประสบความสำเร็จ การฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เป็นการทำให้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช ปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์โดยสารเคมีจะมีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์นั้นตายได้โดยการเข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ระบบการควบคุมสารผ่านเข้าออกเสียไป พร้อมทั้งกรดอะมิโน น้ำ และแร่ธาตุต่างๆ ภายในจะสูญเสียไปด้วย สารเคมีสามารถทำปฏิกิริยากับสารในไซโตพลาสซึม จะมีผลทำให้เกิดการขัดขวางการทำงานของ เอนไซม์ หรือสารเคมีสามารถจับกับโปรตีนทำให้เอนไซม์ และโปรตีนเสียสภาพไม่สามารถทำงานได้ ตามปกติ สารเคมีที่ใช้สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อมีจำนวนมากหลายชนิด ซึ่งมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึง จะต้องใช้ดุลยพินิจในการเลือกใช้สารเคมีให้เกิดความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการ โดยมีแนวทางในการเลือกใช้ดังต่อไปนี้

- 2.5.1 มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด และมีเปอร์เซ็นต์ ความปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์สูง
- 2.5.2 สารเคมีสามารถออกฤทธิ์ได้รวดเร็ว
- 2.5.3 สามารถละลายหรือผสมกับน้ำได้ง่าย และคงสภาพหลังจากการละลายแล้ว
- 2.5.4 ไม่ควรมีสี และกลิ่นอันไม่พึงประสงค์
- 2.5.5 ราคาไม่แพง และหาซื้อได้ง่าย
- 2.5.6 ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ และไม่เป็นอันตรายต่อชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช

## 2.6 การกลายพันธุ์ (สิริณัฐ, 2540)

การกลายพันธุ์ คือ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของเซลล์ การกลายพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับ การสูญหายไปของส่วนของยีน หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของยีน (Gene mutation) ส่วนของการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนส่วนของโครโมโซม การสูญหายไปหรือการเพิ่มเข้ามาของส่วนของโครโมโซมที่ครอบคลุมมากกว่าหนึ่งยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของโครโมโซม (Chromosome mutation)

### 2.6.1 การกลายจากการเหนี่ยวนำ (Induced หรือ Man-made mutation)

หมายถึง การกลายที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์ การกลายนอกจากจะเกิดได้เองตามธรรมชาติแล้ว ยังสามารถใช้วิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายได้ด้วย โดยจะได้อัตราการกลายสูงกว่าที่เกิดเองตามธรรมชาติอีกหลายเท่า ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่นำมาเหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย สำหรับสิ่งที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย โดยทั่วไปเรียกว่สิ่งก่อการกลาย (Mutagen) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด

- 2.6.1.1. สิ่งก่อการกลายประเภทกายภาพ (Physical mutagen) ได้แก่ รังสีประเภทต่างๆ เช่น รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา หรือรังสีนิวตรอน
- 2.6.1.2 สิ่งก่อการกลายประเภทสารเคมี (Chemical mutagen) ได้แก่ Ethyl Methane-Sulphonate (EMS), Ethyleneimine (EI) หรือ di Ethyl Sulphate (dES)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6.2 การเหนี่ยวนำให้พืชเกิดการกลายโดยรังสี

รังสีที่นำมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายในพืช ควรเป็นรังสีก่อกอไอออน ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา และรังสีนิวตรอน เพราะมีสมบัติทำให้อะตอมหรือโมเลกุลที่ได้รับรังสีแตกตัวเป็นไอออนได้ออนุภาคบีตาหรืออิเล็กตรอน ซึ่งเป็นรังสีก่อกอไอออนเช่นกัน จะมีผลต่อเนื้อเยื่อคล้ายกับผลของรังสีเอกซ์และรังสีแกมมา แต่ความสามารถในการทะลุทะลวงผ่านตัวกลางต่ำกว่ารังสีเอกซ์และรังสีแกมมา จึงไม่ค่อยนิยมนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์โดยการกลายพันธุ์ในพืช ส่วนรังสีอัลตราไวโอเล็ตไม่จัดเป็นรังสีก่อกอไอออน เนื่องจากพลังงานไม่สูงพอที่จะทำให้อะตอมหรือโมเลกุลแตกตัว นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการทะลุทะลวงผ่านตัวกลางได้ต่ำ จึงไม่นิยมนำมาใช้กับพืช แต่อย่างไรก็ตามรังสีอัลตราไวโอเล็ตในช่วงคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร เป็นช่วงคลื่นที่กรดนิวคลีอิกดูดกลืนพลังงานจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้ดี จึงเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายของยีนได้ แต่การใช้กับพืชมีข้อจำกัด ต้องเลือกใช้เฉพาะกับละอองเรณู หรือเซลล์เพาะเลี้ยงของพืช ซึ่งเป็นเซลล์เดี่ยวๆ

## 2.6.3 ผลของเซลล์พืชเมื่อได้รับรังสี

เมื่อเซลล์พืชได้รับรังสี หรืออนุภาคนิวตรอน รังสีหรืออนุภาคถ่ายทอดพลังงานให้กับโมเลกุลต่างๆ ของเซลล์ ในกระบวนการถ่ายทอดพลังงาน ทำให้โมเลกุลที่ได้รับพลังงานแตกตัวเป็นไอออน (ion) และฟรีเรดิคัล (Free radical) ต่างๆ จะมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลใหม่ มีการทำปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างกัน เกิดเป็นโมเลกุลที่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างไปจากเดิม รังสีทำให้อะตอมต่างๆ ภายในเซลล์เกิดการแตกตัวเป็นไอออน โดยเฉพาะการเกิด Chemical radicals ที่ไวต่อการทำปฏิกิริยาและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีขึ้นมาในเซลล์ ทำให้เกิดความเสียหายต่อการทำหน้าที่ต่างๆ ของเซลล์ เซลล์พืชที่ได้รับความเสียหายจากรังสีและเกิดการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลทางพันธุกรรมได้คือ เซลล์เนื้อเยื่อเจริญ (Meristematic cells) ที่อยู่ส่วนต่างๆ ของพืช มีความสามารถในการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ ซึ่งภายในเซลล์จะมีชีวมoleกุลที่สำคัญคือ ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic : DNA) โดยผลของรังสีจะทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไปดังนี้

- 2.6.3.1 เกิดการสลายตัวของพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) ที่เชื่อมระหว่างคู่เบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ
- 2.6.3.2 เกิดการตัดขาดระหว่างพันธะที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลฟอสเฟต ที่ทำหน้าที่เป็น backbone ของดีเอ็นเอ (Phosphate diester bond) ทำให้เกิด single strand break และ double strand break
- 2.6.3.3 เกิดการแตกหักที่พันธะโควาเลนต์ (Covalent bond) อื่นๆ ของดีเอ็นเอ
- 2.6.3.4 เกิด cross linkage ระหว่างสายและภายในสายของดีเอ็นเอ
- 2.6.3.5 เกิด dimer ระหว่าง pyrimidine base ภายในสายของดีเอ็นเอสายใดสายหนึ่ง เช่น เกิด TT หรือ CC เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.3.6 เกิด DNA-protein crosslink เป็นการเชื่อมต่อระหว่างเบสและกรดอะมิโนด้วย sulfide linkage (SH)

#### 2.6.4 การเหนี่ยวนำให้พืชเกิดการกลายโดยสารเคมี

สารเคมีหลายชนิดมีสมบัติเป็นสื่อก่อการกลายในสิ่งมีชีวิตได้เช่นเดียวกับรังสีสารเคมีก่อการกลายที่มีประสิทธิภาพสูงในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย ส่วนใหญ่ทำงานโดยเข้าทำปฏิกิริยากับเบสของดีเอ็นเอโดยตรง หรืออาจแทรกเข้าไปอยู่ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ สารเคมีก่อการกลายบางชนิด มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับเบสของดีเอ็นเอ จึงสามารถเข้าแทนที่คู่เบสในดีเอ็นเอได้ ทั้งก่อนและหลังการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ นอกจากนี้ ยังสามารถจับคู่กับเบสที่ไม่ใช่คู่ปกติเป็นสาเหตุให้เกิดการกลายได้ สารเคมีก่อการกลายในกลุ่มนี้นิยมใช้ EMS (Ethyl Methane Sulfonate) ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายกับพืชมากที่สุด นอกจากจะเป็นสารเคมีก่อการกลายแล้ว EMS ยังเป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogen) อีกด้วย สารเคมีอีกชนิดหนึ่งคือ เอไซด์ (Azide) ที่อยู่ในรูปของโซเดียมเอไซด์ (Sodium azide) หรือโพแทสเซียมเอไซด์ (Potassium azide) ก็เป็นสารเคมีที่มีสมบัติเป็นสื่อก่อการกลายที่ดีที่สุดชนิดหนึ่ง สามารถนำมาใช้ได้อย่างปลอดภัย แต่ก็มีข้อจำกัดคือใช้ได้ผลดีกับพืชบางชนิดเท่านั้น เช่น ในข้าวบาร์เลย์ จะทำให้เกิดการกลายในอัตราที่สูงมาก โดยไม่กระทบกระเทือนกับความอยู่รอดและการติดเมล็ดของข้าวบาร์เลย์ นอกจากนี้เอไซด์ยังใช้ได้ผลดีกับข้าวและถั่วเขียว

ตารางที่ 2.2 พันธุ์กลายของประเทศไทยที่ส่งไปขึ้นทะเบียนไว้ใน Mutant Varieties Database of the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture.

List Number	Scientific Name	Common name	Mutant Variety Name	Registration
1	<i>Oryza sativa</i> L.	rice	RD 6	1997
2	<i>Oryza sativa</i> L.	rice	RD 15	1978
3	<i>Oryza sativa</i> L.	rice	RD 10	1981
4	<i>Oryza sativa</i> L.	rice	Khao Jao Hawm Pitsanulok 1	1998
5	<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	carnation	Chaichoompon	1983
6	<i>Musa</i> sp.	banana	KLue Hom Thong KU 1	1985
7	<i>Glycine max</i> L.	soybean	Doi kham	1986
8	<i>Glycine max</i> L.	soybean	Chiang Mai 5	2006
9	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Chrysanthemum	Golden Cremon	1987
10	<i>Vigna radiata</i> (L.) Wil	Mung bean	Chai Nat 72	1999
11	<i>Canna indica</i> L.	Canna lilies	Cream Prapanpong	1999
12	<i>Canna indica</i> L.	Canna lilies	Orange Siranut	1999
13	<i>Canna indica</i> L.	Canna lilies	Pink Peeranuch	1999
14	<i>Portulaca grandiflora</i> L.	Portulaca/moss rose	KU 1	1999
15	<i>Portulaca grandiflora</i> L.	Portulaca/moss rose	Chompoo Preparat	2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.7 รังสีที่นิยมใช้ในการเหนี่ยวนำให้พืชกลายพันธุ์ (อรุณี, 2546)

### 2.7.1 รังสีแกมมา

รังสีแกมมา (Gamma rays) เป็นรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่สูง ไม่มีมวล ไม่มีประจุ มีอำนาจทะลุทะลวงสูง เกิดจากการปล่อยพลังงานของนิวไคลด์กัมมันตรังสี (Radionuclide หรือ Radioactive nuclide) ที่สลายตัวให้รังสีชนิดอื่นแล้ว แต่ยังมีพลังงานเหลืออยู่ จึงปล่อยพลังงานออกมาในรูปของรังสีแกมมา รังสีแกมมาจัดเป็นรังสีนิวเคลียร์ เนื่องจากเกิดจากนิวเคลียสของนิวไคลด์กัมมันตรังสี ตัวอย่างของนิวไคลด์กัมมันตรังสีคือ โคบอลต์-60 (Cobalt-60,  $^{60}\text{Co}$ ) และ ซีเซียม-137) ซึ่งนิยมนำมาใช้เป็นต้นกำเนิดรังสีแกมมาในการกำเนิดให้เกิดการกลายในพืช รังสีแกมมามีพลังงานอยู่ในช่วง keV-MeV สำหรับความสามารถในการทะลุทะลวงผ่านตัวกลางใดๆ ขึ้นอยู่กับพลังงานและชนิดของตัวกลาง นักปรับปรุงพันธุ์พืชนิยมใช้รังสีแกมมาในการเหนี่ยวนำให้พืชเกิดการกลายมากกว่ารังสีเอกซ์ เนื่องจากสามารถฉายรังสีตัวอย่างพืชได้ 2 แบบ คือ การฉายรังสีแบบเฉียบพลัน (Acute irradiation) คือ ให้อัตรา (Dose rate) และปริมาณ (Total dose) รังสีสูง ใช้ระยะเวลาในการฉายรังสีสั้น เช่น นาทีหรือ ชั่วโมง ส่วนของพืชที่ฉายรังสีด้วยวิธีนี้มักเป็นเมล็ด หรือเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง และการฉายรังสีแบบโครนิก (Chronic irradiation) โดยฉายในอัตราและปริมาณรังสีต่ำแต่ให้ตัวอย่างพืชได้รับรังสีเป็นระยะเวลานานๆ เช่น สัปดาห์ เดือน หรือปี นิยมใช้กับพืชที่กำลังเติบโต ทั้งนี้ เพื่อให้พืชได้รับรังสีตลอดระยะเวลาในการเติบโต หรือ เลือกให้เฉพาะช่วงใดช่วงหนึ่งของการเติบโตก็ได้ เครื่องฉายรังสีทั้งแบบเฉียบพลันและโครนิกมีหลายรูปแบบขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการใช้งาน

## 2.8 หน่วยวัดรังสี (อรุณี, 2546)

หน่วยวัดรังสี (radiation unit) มีหลายประเภทขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการวัด เช่น วัดอัตราการสลายตัวของธาตุกัมมันตรังสี วัดปริมาณการแตกตัวเป็นไอออนของตัวกลาง วัดการดูดกลืนพลังงานจากรังสีของตัวกลาง วัดผลทางชีววิทยาที่เกิดขึ้นเมื่อได้รับรังสี หน่วยงานที่กำหนดการวัดรังสีและหน่วยวัดรังสีคือ International Commission on Radiation Units and Measurement (ICRU)

สำหรับการใช้รังสีในการเหนี่ยวนำให้พืชกลายพันธุ์นั้นจะเกี่ยวข้องกับการวัดการดูดกลืนพลังงานจากรังสีของตัวกลาง หรือเรียกว่าปริมาณรังสีดูดกลืน (Absorbed dose) เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นในที่นี้จะขอกล่าวเฉพาะหน่วยวัดปริมาณรังสีดูดกลืนเท่านั้น

ใน ค.ศ. 1953 ICRU ได้ให้ข้อกำหนดของปริมาณรังสีดูดกลืนเป็นครั้งแรก โดยเน้นถึงพลังงานรังสีที่ตัวกลางใดๆ ดูดกลืนไว้ต่อหน่วยน้ำหนักของตัวกลางนั้นเมื่อได้รับรังสี

หน่วยวัดปริมาณรังสีดูดกลืน คือ แรต (rad, Radiation absorbed dose) โดยที่ปริมาณรังสี 1 แรต หมายถึง ปริมาณรังสีที่ตัวกลางสามารถดูดกลืนพลังงานไว้ได้ 100 เอร์กต่อกรัมของตัวกลาง

สำหรับหน่วยสากล (The International System of Unit, SI unit) จะใช้หน่วย เกรย์ (Gray, Gy) แทน แรต โดยมีความสัมพันธ์ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad}$$

$$\text{หรือ } 1 \text{ rad} = 10^{-2}$$

### ตารางที่ 2.3 การเปลี่ยนแปลงหน่วยวัดของรังสี

การเปลี่ยนแปลงหน่วยวัดของรังสี	
1 eV	= $1.6 \times 10^{-19}$
106 eV	= 1 MeV
1 Gy	= 1 J/kg = 107 erg/kg
1 Gy	= $6.242 \times 10^{18}$ eV/kg = 0.24 gram-calorie/kg = 100 rad
1 kGy	= 100 krad
10 kGy	= 1 Mrad
1 rem	= 0.001 Sv

ที่มา : ดัดแปลงจาก Rosenthal (1992)

## 2.9 ปริมาณและอัตรารังสี (อรุณี, 2546)

2.9.1 ปริมาณรังสี จะใช้ปริมาณรังสีเท่าใดขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และส่วนของพืชที่ใช้ในการฉายรังสี ตลอดจนวิธีฉายรังสี พืชแต่ละชนิดมีความไวต่อรังสีแตกต่างกันออกไป ลักษณะด้านทนต่อรังสีหรือไวต่อรังสี ส่วนหนึ่งควบคุมด้วยยีน สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ สำหรับปริมาณรังสีที่เหมาะสมของพืชแต่ละชนิด นักวิจัยอาจค้นคว้าจากผลงานวิจัยที่ผู้อื่นทำไว้ หรือแนะนำโดยทบวงการพลังงานปรมาณูระหว่างประเทศ (IAEA, 1977) ในการฉายรังสีแบบเฉียบพลัน นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถคาดคะเนปริมาณรังสีที่เหมาะสม โดยทำการทดลองหาค่า LD<sub>50</sub> (50% Lethal Dose) ซึ่งหมายถึงปริมาณรังสีที่ทำให้พืชตาย คิดเป็นร้อยละ 50 ของชุดควบคุม เมื่อตรวจสอบต้นพืชที่ระยะใดระยะหนึ่งหลังจากการฉายรังสี เช่น 30 วัน (LD<sub>50(30)</sub>) หรือ 60 วัน (LD<sub>50(60)</sub>) ปริมาณรังสีที่เหมาะสมควรอยู่ระหว่าง LD<sub>30</sub> ถึง LD<sub>50</sub> หรือ ค่าร้อยละการเจริญเติบโตที่อยู่ในช่วงปริมาณรังสีที่ทำให้การเจริญเติบโตลดลงร้อยละ 30 ถึง 50 หรือ GR<sub>50</sub> (50% Growth Reduction) สำหรับการฉายรังสีแบบโครนิกนั้น ไม่ค่อยมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับปริมาณรังสีที่เหมาะสมไว้มากนัก เนื่องจากมีความหลากหลายในเรื่องของอัตรารังสี และระยะเวลาในการฉาย

**2.9.2 อัตรารังสี** อัตรารังสีที่ปริมาณรังสีใดๆ จะมีผลต่อพืชทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพดังนั้นการเลือกใช้อัตรารังสีควรต้องพิจารณาให้ดี และในการทดลองทุกครั้งนอกจากจะบันทึกเรื่องปริมาณรังสีแล้วควรบันทึกอัตรารังสีด้วย การศึกษาส่วนใหญ่แสดงให้เห็นว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลาย จะมีประสิทธิภาพสูงเมื่อใช้อัตรารังสีสูงมากกว่าอัตรารังสีต่ำ แต่ก็มีหลายการทดลองที่อัตรารังสีไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเมื่อให้ได้รับปริมาณรังสีเท่ากัน

## 2.10 พืชกับการเกิดความเครียดน้ำ (Plant and Water Stress) (เฉลิมพล, 2535)

พืชเกิดความเครียดน้ำ (Water tress) หมายถึง พืชมีน้ำในระบบในลำต้นไม่เพียงพอ ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ 2 กรณีด้วยกัน คือ เกิดจากการที่พืชขาดน้ำ (Water deficit) หรือเกิดจากการที่พืชได้รับน้ำมากเกินไป (Water excess) เช่น เมื่อพืชมีน้ำขัง ถ้าพืชเกิดความเครียดน้ำอันเนื่องมาจากพืชขาดน้ำหรือมีความแห้งแล้งเรียกว่า Water deficit stress หรือ Drought stress

ความเครียดน้ำจะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช แต่ผลกระทบจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ระดับความรุนแรง และเวลาที่เกิดความเครียดน้ำ พืชแต่ละชนิดจะตอบสนองต่อการเกิดความเครียดน้ำไม่เหมือนกัน แม้แต่พืชต้นเดียวกันแต่อวัยวะคนละส่วนก็มีความทนทานต่อความเครียดน้ำไม่เท่ากัน การเจริญของเซลล์จะไวต่อความเครียดน้ำมากที่สุด คือ เมื่อพืชขาดน้ำการเจริญของเซลล์จะได้รับผลกระทบก่อน เมื่อขาดน้ำรุนแรงขึ้นอีกจะนำไปสู่การสังเคราะห์โปรตีน ปฏิกิริยาของเอนไซม์ การสร้างคลอโรฟิลล์ และการแบ่งตัวขยายเซลล์ลดลง เป็นต้น

## 2.11 กลไกการปรับตัวของพืชต่อสภาพแห้งแล้ง (นิมิตร, 2544)

เมื่อพืชมีการเจริญเติบโตภายใต้สภาพแห้งแล้งซึ่งเกิดจากสภาวะที่ฝนไม่ตกติดต่อกันหลายวันหรือหลายสัปดาห์ จนทำให้น้ำในดินซึ่งถูกใช้ไปโดยกระบวนการคายระเหยน้ำ (Evapotranspiration) ลดต่ำลง สภาพเช่นนี้พืชบางชนิดสามารถดำรงชีวิตและให้ผลผลิตได้ โดยการปรับอวัยวะบางส่วนที่เป็นกลไกให้ทนต่อสภาพแห้งแล้งนั้นได้แตกต่างกันไปตามชนิดและพันธุ์ของพืช รวมทั้งความรุนแรงความแห้งแล้งที่เกิดขึ้น ซึ่ง Turner (1986) ได้จำแนกกลไกการปรับตัวของพืชต่อสภาพแห้งแล้งไว้เป็น 3 ประเภทดังนี้

### 2.11.1. การหนีแล้ง (Drought escape)

เป็นลักษณะของพืชที่มีความสามารถหลีกเลี่ยงต่อสภาพแห้งแล้งที่เกิดขึ้นเนื่องจากมีช่วงฤดูฝนสั้น พืชมีกลไกการปรับตัวที่สำคัญอยู่ 2 ประการ คือ การพัฒนาการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว (rapid phenological development) เช่น ในถั่วลิสง พบว่า ถั่วลิสงพันธุ์ VB และ Q18801 เมื่อประสบความแห้งแล้งในช่วงปลายแล้วจะมีอายุสั้นสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ก่อนกำหนดถึง 11 วัน (Wright *et.al.*, 1991) และประการที่สอง พืชจะมีการยืดหยุ่นทางการพัฒนา (development plasticity) โดยพืชจะปรับตัวในแต่ละช่วงของการเจริญเติบโตให้เหมาะสม เพราะฉะนั้นพืชกลุ่มนี้จึงจะเหมาะสมกับสภาพแวดล้อมที่มีช่วงฤดูแล้ง 8 ถึง 9 เดือน เช่น ประเทศไทยและออสเตรเลียตอนเหนือ

### 2.11.2 การทนทานต่อการขาดน้ำ (Drought tolerance)

หมายถึงความสามารถของพืชในการที่จะทนต่อการลดลงของน้ำภายในพืชได้ คือ มี Dehydration tolerance ดังนั้นพืชที่มีกลไกแบบนี้จะยังคงสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้ที่ระดับ Water potential ต่ำๆ ได้ โดยกระบวนการต่างๆ ภายในของพืชเหล่านี้ยังคงดำเนินต่อไปได้โดยการรักษาความเต่งของเซลล์ได้ ขณะที่ Water potential ลดลง มีการปรับตัวของ Osmotic potential พืชเหล่านี้จะมีการสะสมของ solute เกิดขึ้นเมื่อพืชขาดน้ำ ซึ่งจะมีผลต่อการลดลงของ Osmotic potential ในขณะที่ potential รวมลดลง ผลที่ได้รับจากการปรับตัวนี้ คือ ช่วยให้พืชยังคงรักษาความเต่ง (turgor) ให้คงที่ ซึ่งการรักษาความเต่งของเซลล์มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของต้นและการปิด-เปิดของปากใบและกระบวนการทาง metabolic

### 2.11.3 การเลี่ยงการขาดน้ำ (Drought avoidance)

หมายถึงความสามารถของพืชในการป้องกันหรือลดการสูญเสียน้ำภายในพืชหรือลดการคายน้ำโดยมีกลไก Dehydration postponement

## 2.12 การคัดเลือกพืชที่ทนทานต่อสภาพแล้ง (สายพันธุ์, 2547)

การคัดเลือกพืชที่ทนทานต่อสภาพแล้งภายใต้สภาพธรรมชาติ เป็นกระบวนการที่ใช้เวลานาน และขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ ดังนั้นจึงมีการพัฒนากระบวนการคัดเลือกพืชที่ทนแล้งภายใต้สภาวะที่สามารถควบคุมได้ (Georgieva *et.al.*, 2004) เช่น อาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ ซึ่งสามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือกลุ่มเซลล์บนอาหารที่เติมสารออสโมติกคัมบางชนิด เช่น โพลีเอทธิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) น้ำตาลแมนนิทอล (Mannitol) ซูโครส (Sucrose) และกลูโคส (Glucose) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะไปลด Osmotic potential ของสารละลายที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ทำให้เซลล์ อยู่ในสภาวะที่ขาดน้ำ (Bressan *et.al.*, 1981) PEG ถูกนำมาใช้เพื่อทำให้เกิดภาวะเครียดจากการขาดน้ำมากกว่าสารละลายอื่นๆ เพราะเป็นสารเฉื่อยเมื่อละลายน้ำไม่มีสีไม่มีกลิ่น ไม่มีพิษต่อคน และสัตว์รวมทั้งไม่ดูดซึมเข้าไปในเซลล์พืช (Satvir *et.al.*, 1998) ในขณะที่ซอร์บิทอล และแมนนิทอลสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์พืชและยังทำให้ค่า osmotic potential ของเซลล์ลดลง เช่น การศึกษาความแตกต่างของสารที่ใช้ชักนำให้เกิดความเครียดจากการขาดน้ำระหว่าง PEG และซอร์บิทอล ที่ -1.5 เมกะปาสคาล ในข้าว (*Oryza sativa* c.v. Taichung Native 1) พบว่า PEG สามารถชักนำให้ใบข้าวเกิดความเครียดจากการขาดน้ำได้มากกว่าซอร์บิทอล (Hsu and Kao, 2003) และการเปรียบเทียบผลของแมนนิทอล และ PEG ที่ -0.8 และ -1.8 เมกะปาสคาล ต่อการเจริญของผักเบี้ยทะเลลดลงมากกว่าแมนนิทอลอย่างมีนัยสำคัญ (Slama *et.al.*, 2007) การใช้ PEG ชักนำให้เกิดภาวะเครียดจากการขาดน้ำกับต้นพืช เพื่อทดสอบและคัดเลือกพืชทนแล้งในห้องปฏิบัติการ เช่น การคัดเลือกพันธุ์ข้าวทนแล้งจากแคลลัส ที่ชักนำจากเมล็ด ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ PEG ความเข้มข้น

100 และ 200 กรัมต่อลิตร โดยพิจารณาการงอก การชักนำให้เกิดแคลลัส และการเกิดต้นใหม่พบว่าพันธุ์ข้าว C 14-8 เป็นพันธุ์ที่สามารถทนแล้งได้ดีที่สุด

### 2.13 เครื่องหมายโมเลกุล (สุวีพร, 2546)

เครื่องหมายโมเลกุลสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมและสามารถใช้ในการตรวจวัดความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณและคุณภาพ ซึ่งเป็นการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มประชากรเดียวกัน หรือสิ่งมีชีวิตต่างกลุ่มกัน หรือใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด แต่ละตัวได้อีกด้วย เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีการใช้กันมานานแล้วในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ การใช้ลักษณะรูปร่างพรรณสัณฐานพืชที่มีความแตกต่างกันมาใช้เป็นเครื่องหมาย เช่น ความสูง ลักษณะทรงพุ่ม สีของลำต้น ขนาดรูปร่างและสีของเมล็ด อายุวันออกดอก และวันเก็บเกี่ยว เป็นต้น โดยเรียกเครื่องหมายบ่งชี้นี้ว่า “เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา” (morphological markers) อย่างไรก็ตาม พบว่าลักษณะดังกล่าวมักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ นอกจากนั้นแล้ว การเปรียบเทียบลักษณะภายนอกนี้ ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชบางชนิดที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาเครื่องบ่งชี้ชนิดอื่นมาประกอบ เพื่อช่วยให้การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์มีความถูกต้อง

#### 2.13.1 เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA หรือ RAPD) (สุชาติ, 2553)

เป็นการใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นที่มีลำดับเบสแบบสุ่มประมาณ 10-12 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ และใช้อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ก่อนข้างต่ำ (ประมาณ 37-40 องศาเซลเซียส) จึงสามารถเพิ่มการเกิด PCR product ขนาดต่างๆ โดยเป็นการตรวจดีเอ็นเอหลายตำแหน่งพร้อมกัน (Multi-locus) จำนวนผลผลิตของแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 1-10 แถบ โดยความแตกต่างจะเป็นการเกิดหรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ โดยแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะแสดงการข่มต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีจึงไม่สามารถแยกสภาพเฮเทอโรไซกัสออกจากโฮโมไซกัส และข้อดีของเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี สามารถทำได้ง่าย เนื่องจากไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาก่อนเพื่อใช้ออกแบบไพรเมอร์ แต่มีข้อจำกัดในเรื่องการทดลองซ้ำ เนื่องจากเทคนิคอาร์เอพีดีมีความไวต่อสภาวะต่างๆ บางครั้งผลที่ได้จะแตกต่างไปจากเดิม จึงต้องระมัดระวังและควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่เสมอ

### 2.14 การสกัดดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอไม่ได้อยู่เป็นเกลียวคู่อิสระในเซลล์แต่จะรวมตัวอยู่กับฮิสโตน (Histone) เกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนของโครมาติน (Chromatin) นอกจากนี้ในเซลล์ยังประกอบด้วยสารอื่นๆ อีก เช่น โพรตีนคาร์โบไฮเดรต และอาร์เอ็นเอ ดังนั้นการสกัดดีเอ็นเอจึงมีหลายขั้นตอนเพื่อแยกให้ได้ ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อเผยแพร่เห็นไปใช้ประโยชน์อื่นใดเป็นการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสกัดดีเอ็นเอจากพืชมีขั้นตอนมากกว่าการสกัดดีเอ็นเอจากจุลินทรีย์ เนื่องจากเซลล์พืชมีผนังเซลล์เป็นพอลิแซคคาไรด์และมีสารทุติยภูมิเป็นองค์ประกอบรวมอยู่ด้วย ซึ่งสารทั้งสองอาจรบกวนการสกัดดีเอ็นเอ ทำให้ได้ดีเอ็นเอคุณภาพต่ำลง

สิ่งที่ควรระมัดระวัง ได้แก่ เอนไซม์นิวคลีเอส (Nuclease) ที่มีอยู่ในเซลล์พืชเองสามารถทำลายดีเอ็นเอได้ จึงต้องหยุดยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ด้วยสารละลาย Ethylenediamine Tetraacetate (EDTA) นอกจากนี้การปนเปื้อนด้วยสารประกอบพอลิแซคคาไรด์จากผนังเซลล์ การปะปนของสารกลุ่มฟีนอลและสารประกอบทุติยภูมิของพืชเองอาจทำลายโมเลกุลดีเอ็นเอหรือขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะหรือเอนไซม์ *Taq polymerase* ได้ ในกรณีที่จะนำดีเอ็นเอที่ได้เข้าสู่การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

สารกลุ่มฟีนอล (Polyphenol) และสารที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของฟีนอล ซึ่งทำให้ดีเอ็นเอมีสีน้ำตาล อาจรบกวนการทำหน้าที่ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนั้นต้องกำจัดออกโดย

- 1) การใช้สารดูดซับ Polyvinylpyrrolidone (PVP) หรือ Bovine Serum Albumin (BSA)
  - 2) การใช้สารต้านออกซิเดชัน เช่น Ascorbic acid Cysteine sodium bisulfite หรือ  $\beta$ -mercaptoethanol
  - 3) การใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์ Phenoloxidase เช่น Diethyldithiocarbamic Acid (DIECA)
- เติมลงไปในบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ

การสกัดจีโนมดีเอ็นเอจากพืชมีหลายวิธี วิธีที่นิยมใช้ได้แก่การสกัดโดยใช้ Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มซักฟอก (Detergent) ที่มีประจุบวกสามารถสลายเยื่อหุ้มเซลล์และจับกับกรดนิวคลีอิกในสารละลายบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิเหมาะสม เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน CTAB-DNA สามารถตกตะกอนได้ด้วยไอโซโพรพานอลหรือเอทานอล วิธีนี้มีต้นทุนต่ำ ทำได้สะดวก รวดเร็ว ดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดี

## 2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.15.1 การศึกษาการชักนำให้เกิดต้น

กริยา (2547) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วฮามาต้า โดยชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนใบเลี้ยง (Cotyledon) และลำต้นใต้ใบเลี้ยง (Hypocotyl) เพื่อใช้ศึกษาการถ่ายโอนยีนส์ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ NAA ความเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าจากการใช้เนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยง เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสมากที่สุด มีค่าน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.26 กรัมต่อชิ้น และจากการศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ Kinetin ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลาระยะเวลา 45 วัน พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 9.0 ยอดต่อชิ้นแคลลัส และเมื่อนำยอดมาชักนำให้เกิดรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากร้อยละ 40

ขนิษฐา (2547) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วฮามาต้า โดยทำการเพาะเลี้ยงลำต้นใต้ใบเลี้ยง และใบเลี้ยง เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ มีการเกิดแคลลัสมากที่สุดคือร้อยละ 90 ลักษณะของแคลลัสเป็นกลุ่มก้อน (Compact callus) มีสีเขียว เมื่อนำแคลลัสที่ได้มาชักนำให้เจริญเป็นเซลล์แขวนลอยพบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยเคซีนไฮโดรไลเซท (Casein hydrolysate) ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอยได้ และนำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอด 96.66 และเมื่อนำยอดมาชักนำให้เกิดราก พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดรากได้บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

อนุรักษ และคณะ (2551) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัส และการเจริญเป็นต้นใหม่โดยใช้ส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของถั่วคาวาลแคต โดยนำลำต้นใต้ใบเลี้ยงเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าลำต้นใต้ใบเลี้ยงสามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ในทุกสูตรอาหาร แต่สูตรอาหารที่สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีพื้นที่เฉลี่ยของแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 57.09 ตารางมิลลิเมตร จากนั้นนำแคลลัสที่ได้มาชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่ โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดโดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อแคลลัสคือ 3.5 ยอดต่อแคลลัส และนำยอดมาชักนำให้เกิดรากโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด โดยมีการพัฒนาเป็นรากร้อยละ 70 จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้นเท่ากับ 13.71 ราก และสามารถย้ายออกปลูกลงดินเป็นผลสำเร็จ

Suresh. *et al.* (2010) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัสและการเจริญเป็นต้นใหม่โดยใช้ส่วนของใบเลี้ยงและลำต้นใต้ใบของถั่วฮามาต้า เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ

สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ในทุกสูตรอาหาร แต่พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการชักนำแคลลัสมากที่สุดเท่ากับ 90 และ 75 จากนั้นนำแคลลัสที่ได้มาชักนำให้เจริญเป็นต้นใหม่ นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 1 1.5 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการชักนำให้เกิดยอดมากที่สุดเท่ากับ 67 เมื่อนำยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด โดยมีการพัฒนาเป็นรากร้อยละ 82.33 และสามารถย้ายออกปลูกลงดินเป็นผลสำเร็จ

รัตนภรณ์ และคณะ (2555) ศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่ของถั่วฮามาต้าจากเมล็ด โดยเพาะเลี้ยงเมล็ดที่สมบูรณ์บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 ถึง 8 สัปดาห์ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 2.57 และ 5.06 ยอดต่อเมล็ด ที่ระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาด้านความสูง พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความสูงเฉลี่ย 45.84 และ 54.29 มิลลิเมตรต่อยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ และสามารถชักนำให้เกิดรากเมื่อย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

### 2.15.2 การศึกษาการทนทานต่อสภาพแล้ง

Dhole and Reddy (2010) ศึกษาการดูดซึมน้ำของถั่วเขียว (*Vigna radiata* L. Wilczek) ที่ถูกชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมา โดยนำเมล็ดถั่วเขียว 2 สายพันธุ์ คือ Samrat และ Long root mutant (LRM) เป็นสายพันธุ์ที่ฉายรังสีแกมมาที่ระดับรังสี 450 เกรย์ เมื่อนำเมล็ดในรุ่นที่ 5 มาจุ่มใน PEG 6000 ความเข้มข้น 15 20 25 30 และ 35 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นทันที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ พบว่าเมื่อความเข้มข้น PEG สูงขึ้น การดูดซึมน้ำ การงอก และความยาวรากและยอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่พบว่าสายพันธุ์ LRM มีการดูดซึมน้ำ และมีความยอดและรากที่ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ Samrat เมื่อนำออกปลูกสู่สภาวะ

ภายนอกพบว่าสายพันธุ์ LMR ให้ผลผลิตที่ดีกว่า ซึ่งผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเมื่อพืชมีระบบรากที่แข็งแรงก็สามารถปรับตัวให้อยู่รอดได้ในสภาวะแล้ง

Yin. *et al.* (2015) ศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาของถั่วเขียวในการออกดอกในสภาวะแล้ง โดยนำเมล็ดถั่วเขียว 4 สายพันธุ์ มาจุ่มใน PEG 6000 ความเข้มข้น 5 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 6 วัน พืชมีการสร้างเอนไซม์ superoxide dismutase (S.O.D.) ที่ PEG ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และวันที่ 6 ที่ PEG ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ พืชมีการผลิตกรดแอบไซซิก (abscisic acid) และสร้างเอนไซม์ Peroxidase (POD) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เหนี่ยวนำการป้องกันตัวเองของพืช สำหรับการออกดอกและความทนแล้งของถั่วเขียวสามารถระบุได้จากการวิเคราะห์หัตถ์ดัชนีทางสรีรวิทยาทั้งสี่แบบ ซึ่งแสดงให้เห็นลำดับความสัมพันธ์เป็นลำดับกิจกรรมดังนี้ คือ การสร้างเอนไซม์ SOD 0.8589 > กรดแอบไซซิก 0.8290 > การนำไฟฟ้า 0.7160 > การสร้างเอนไซม์ POD 0.6637 ซึ่งดัชนีดังกล่าวต้องศึกษาในเชิงลึกต่อไป

### 2.15.3 การศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยรังสีแกมมา

Fiki. *et al.* (2005) ทำการทดลองโดยใช้เมล็ดพันธุ์ถั่วอัลฟาลฟา 2 ชนิด คือ cv. AL-Wadi และ cv. Siwa ทำการฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 0 4 8 และ 12 กิโลแตรต และนำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม NAA 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัม ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัม พบว่าชักนำให้เกิดแคลลัสในสายพันธุ์ cv. AL-wadi ดีกว่า cv. Siwa และเกิดความผิดปกติของใบที่มีขนาดเล็กและหนามีจำนวนรากน้อย

จิตติมา และคณะ (2552) ทำการศึกษาถั่วเหลืองสายพันธุ์กลายโปรตีนสูงโดยการฉายรังสีเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีปริมาณโปรตีนในเมล็ดสูง โดยนำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ไปฉายรังสีแกมมาปริมาณ 20 กิโลแตรต คัดเลือกสายพันธุ์กลายโปรตีนสูงในรุ่น M2-M4 พบว่าถั่วเหลืองสายพันธุ์กลาย 4 สายพันธุ์มีโปรตีนเฉลี่ย 42.8 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่พันธุ์ตรวจสอบที่ไม่ฉายรังสีมีโปรตีนเฉลี่ย 41.2 เปอร์เซ็นต์ และมีผลผลิตเฉลี่ย 352-387 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งสูงกว่าพันธุ์ตรวจสอบเชียงใหม่ 60 ระหว่าง 10-20 เปอร์เซ็นต์ จึงนำถั่วเหลืองสายพันธุ์กลายที่ให้ผลผลิตและโปรตีนสูง ทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ไปทดสอบการปรับตัวและประเมินผลผลิตโปรตีนในศูนย์วิจัยและในไร่เกษตรกรต่อไป

Sema and Ayse (2011) ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการเจริญเติบโต ปัจจัยทางชีวเคมีและการสะสมแร่ธาตุในถั่วเหลือง (*Glycine max* L. Merrill) โดยนำเมล็ดไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ระดับรังสี 0 10 20 30 40 และ 50 กิโลแตรต หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าพืชมีอัตราการเจริญเติบโตลดลงแสดงด้วยค่า GR<sub>50</sub> มีค่าเท่ากับ 25 กิโลแตรต เมื่อปริมาณรังสีสูงขึ้น ความสูงพืชน้ำหนักสด และปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง และยังพบว่าเมื่อปริมาณรังสีสูงขึ้นปริมาณของ ธาตุเหล็ก ทองแดง โปรตีนและ malondialdehyde ก็สูงขึ้นตามไปด้วย แต่กิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase และ เอนไซม์ peroxidase ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชุมพล (2556) ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในถั่วอัลฟัลฟา โดยนำเมล็ดไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ระดับรังสี 0 10 20 30 40 50 60 70 80 และ 90 กิโลเรต การปลูกในรุ่นที่ 1 (M1) นำเมล็ดไปเพาะ พบว่าที่ปริมาณรังสี 10 กิโลเรต ทำให้ร้อยละความงอกลดลงเป็น 39 ในขณะที่เมล็ดที่ไม่ได้รับรังสีจะมีร้อยละความงอก 94 และพบว่าระดับรังสีที่เหมาะสมต่อการกลายพันธุ์ แสดงด้วยค่า LD<sub>30</sub> และ LD<sub>50</sub> มีค่าเท่ากับ 100 เกรย์ และระดับรังสีที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้ต้นอ่อนมีอัตราการตายเพิ่มขึ้น

Horn and Shimelis (2013) ศึกษาการตอบสนองต่อรังสีแกมมาของถั่วฝักยาว โดยนำเมล็ดถั่วฝักยาว 3 สายพันธุ์คือ Nakare Shindimba และ Bira ไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ระดับรังสี 0 10 20 30 40 50 และ 60 กิโลเรต หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าที่ปริมาณรังสี 20 กิโลเรต สายพันธุ์ Nakare มีร้อยละการงอกเท่ากับ 43 สายพันธุ์ Nakare และ Shindimba ไม่สามารถงอกได้ที่ปริมาณรังสีสูงกว่า 40 กิโลเรต ส่วนสายพันธุ์ Bira สามารถงอกได้ที่ระดับรังสี 60 กิโลเรต และพบว่าสายพันธุ์ Nakare and Shindimba ระดับรังสีที่เหมาะสมต่อการกลายพันธุ์ แสดงด้วยค่า LD<sub>50</sub> มีค่าเท่ากับ 15 และ 20 กิโลเรต ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ Bira สามารถเจริญเติบโตได้ในปริมาณรังสีที่สูงกว่า 60 กิโลเรต

#### 2.15.4 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของพืชที่เกิดจากการชักนำด้วยรังสีโดยใช้เครื่องหมาย

##### โมเลกุลอาร์เอพีดี

Arulbalachandran, *et al.* (2010) ศึกษาการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาและสารเคมีเอทิลมีซัลโฟเนตเพื่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในการกลายพันธุ์ของถั่วสีดำ (*Vigna mungo*) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD ใช้ไพรเมอร์จำนวน 20 ชนิด พบว่าแสดงแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 202 แถบ ไพรเมอร์ OPA14 และ OPI ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างจากต้นควบคุม

รัตนภรณ์ (2556) ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ถั่วอาหารสัตว์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมาที่ระดับปริมาณรังสีที่ทำให้ถั่วควาลเคตตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD<sub>50</sub>) คือ 8.3 กิโลเรต หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบลักษณะผิดปกติคือ ยอดเจริญเติบโตช้า แตกกอเป็นกระจุก ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD พบว่าไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิด คือ OPV02 OPV03 OPH05 OPN15 OPY15 และ OPZ04 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา และไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมาได้ และในถั่วฮามาต้า LD<sub>50</sub> คือ 5.89 กิโลเรต พบว่าไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิด คือ OPV02 OPV03 OPH05 OPN15 OPY15 และ OPZ04 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา และไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมาได้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 วัสดุและอุปกรณ์

##### 3.1.1 พันธุ์ถั่วอาหารสัตว์

-ถั่ว *Stylosanthes guianensis* CIAT 184

-ถั่วฮามาต้า *Stylosanthes hamata* cv. Verano

ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ จังหวัดปทุมธานี

##### 3.1.2 ภาชนะและอุปกรณ์

-บีกเกอร์ (Beaker); Kartell

-ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

-ปิเปต (Pipet)

-แท่งแก้วคนสาร (Glass Rod)

-จานแก้ว (Petri dish); ANUMBRA

-กระบอกตวง (Cylinder); Vit Lab

-มีดผ่าตัด (Knives); Dura

-ปากคีบ (Forceps); AMICO Germany stainless

-อลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium Foil)

-ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

-ช้อนตักสารเคมี (Spectula)

-หลอดทดลอง (Microcentrifuge tube) ขนาด 0.2 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร; Quality Scientific Plastics

-ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Bottle)

-กระดาษกรองแบคทีเรียขนาด 1 มิลลิเมตร; Whatman

##### 3.1.3 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

-เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและหยาบ (Balance); AG204, Metler Toledo

-เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

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

-ไมโครเวฟ (Microwave oven)

-ตู้เย็น (Refrigerator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เครื่องเขย่า (Shaker); Innova 2000, New Brunswick Scientific
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow); Faster BHA 48
- กล้องถ่ายภาพ (Camera)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis)
- เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier calipers); Labnet
- ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)
- ทิปขนาดต่างๆ (Tip); Quality Scientific Plastics
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath); Heto CBN 28-30
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge); Hettich Mikro 22R
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer); Eppendorf
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle); Eppendorf
- เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (Vortex mixer); Scientific Industries
- ตู้เย็น 4 และ -20 องศาเซลเซียส (Refrigerator)
- โกร่งบดยา (Mortar and pestle)
- ตะแกรงขนาดขนาด 1 มิลลิเมตร

### 3.1.4 สารเคมี

#### 3.1.4.1 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ

- สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (Chlorox)
- แอลกอฮอล์ 90 เปอร์เซ็นต์ และ 70 เปอร์เซ็นต์
- สารลดแรงตึงผิว Tween-20

#### 3.1.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการปรับความเป็นกรดต่าง

- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- ไฮโดรคลอริกซ์ (HCL)

#### 3.1.4.3 อาหารเพาะเลี้ยงพืช

- อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (MS, 1962)
- น้ำตาลซูโครส (Sucrose)
- เจลแลนแกม (Gellan gum)

#### 3.1.4.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

##### 3.1.4.4.1 สารในกลุ่มออกซิน (auxins)

- 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); Phytotech
- Indole-3-butyric acid (IBA); Phytotech

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-  $\alpha$ -Naphthaleneacetic acid (NAA); Phytotech

-Indole-3-acetic acid (IAA); Phytotech

#### 3.1.4.4.2. สารในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinins)

-6-benzlyaminopurine (BAP หรือ BA) ; Phytotech

-Thidiazuron (TDZ); Phytotech

-*meta*-Topolin (*mT*); Phytotech

#### 3.1.4.4.3 Polyethylene glycol (PEG)

#### 3.1.4.4.4 สียฟลูออเรสซินไดอะซีเตต (Fluorescence diacetate)

#### 3.1.4.5 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA โดยวิธี CTAB

-ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

-CTAB buffer

-chloroform isoamyl alcohol

- $\beta$  - mercaptoethanol; GE Healthcare Bio-science AB

-10% CTAB

-Isopropanol

-RNase A; Vivantis

-สารละลายบัฟเฟอร์ TBE (TBE buffer); Biolabs

-น้ำปราศจากไอออน (deionize H<sub>2</sub>O)

-สารละลาย ethylene diamine tetraacetate (EDTA); Vivantis

#### 3.1.4.6 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคอาร์เอพีดี

-Mix dNTPs; Vivantis

-MgCl<sub>2</sub>; Biolabs

-Tri-borate-EDTA (TBE buffer) ความเข้มข้น 1X; Biolabs

-เอนไซม์ *Tag* DNA polymerase; Biolabs

-Tris-HCl; United States Biological

#### 3.1.4.7 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

-อะกาโรสเจล (Agarose gel)

-สารละลายบัฟเฟอร์ TBE (TBE buffer)

-สีย้อม (Loading dye); Vivantis

-สารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide); Vivantis

-ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 100 คู่เบส; Vivantis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง

### 3.2.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

#### 3.2.1.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

คัดเลือกเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่มีความสมบูรณ์ นำมาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที หลังจากนั้นย้ายลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อที่เติมสารลดแรงตึงผิว 1-2 หยด และสารละลายคลอโรกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ เขย่าอย่างต่อเนื่อง 15 นาที และย้ายเมล็ดลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง เขย่าอย่างต่อเนื่องครั้งละ 5 นาที ฟุ้งเมล็ดถั่วให้แห้ง จากนั้นย้ายลงอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบไปด้วย เจลแลนแกม 2.6 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 5.8 และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *mT* และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และควบคุมอุณหภูมิที่  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ เก็บผล และบันทึกผลการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์ นำผลที่ได้มาคำนวณร้อยละการเกิดยอด บันทึกจำนวนยอด วัดความยาวของยอดด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 เมล็ด วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

$$\text{ร้อยละการเกิดยอด} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่เกิดยอดหลายยอด}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100$$

#### 3.2.1.2 ถั่วฮามาต้า

คัดเลือกเมล็ดถั่วฮามาต้าที่มีความสมบูรณ์ นำมาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที หลังจากนั้นย้ายลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อที่เติมสารลดแรงตึงผิว 1-2 หยด และสารละลายคลอโรกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ เขย่าอย่างต่อเนื่อง 15 นาที และย้ายเมล็ดลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง เขย่าอย่างต่อเนื่องครั้งละ 5 นาที ฟุ้งเมล็ดถั่วให้แห้ง จากนั้นย้ายลงอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบไปด้วย เจลแลนแกม 2.6 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 5.8 และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *mT* และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และควบคุมอุณหภูมิที่  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ เก็บผล และบันทึกผลการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์ นำผลที่ได้มาคำนวณร้อยละการเกิดยอด บันทึกจำนวนยอด วัดความยาวของยอดด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 เมล็ด วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

$$\text{ร้อยละการเกิดยอด} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่เกิดยอดหลายยอด}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100$$

### 3.2.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำราก

#### 3.2.2 1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

ย้ายต้นถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยอดจากเมล็ด เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 5.8 และสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA IBA และ NAA ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และควบคุมอุณหภูมิที่  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง นำผลที่ได้มาคำนวณร้อยละการเกิดราก บันทึกการเจริญเติบโตของราก ความยาวของรากทุกสูตรอาหาร จำนวนและลักษณะของรากที่เกิดขึ้นทุกๆ 2 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ต้น วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

$$\text{ร้อยละการเกิดราก} = \frac{\text{จำนวนยอดที่เกิดราก}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนยอดทั้งหมด}} \times 100$$

#### 3.2.2.2 ถั่วฮามาต้า

ย้ายต้นถั่วฮามาต้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยอดจากเมล็ด เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 5.8 และสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA IBA และ NAA ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และควบคุมอุณหภูมิที่  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง นำผลที่ได้มาคำนวณร้อยละการเกิดราก บันทึกการเจริญเติบโตของราก ความยาวของรากทุกสูตรอาหาร จำนวนและลักษณะของรากที่เกิดขึ้นทุกๆ 2 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

$$\text{ร้อยละการเกิดราก} = \frac{\text{จำนวนยอดที่เกิดราก}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนยอดทั้งหมด}} \times 100$$

### 3.2.3 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำข้อให้เกิดแคลลัสและยอด

#### 3.2.3.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

ย้ายต้นถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดที่เกิดยอดแล้ว นำแต่ละต้นมาตัดเฉพาะส่วนข้อ (Node) ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบไปด้วย เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 5.8 และสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และควบคุมอุณหภูมิที่  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เพื่อนำแคลลัสที่ได้ไปฉายรังสีแกมมาดูการเจริญของแคลลัส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ เก็บผล และบันทึกผลการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์ นำผลที่ได้มาคำนวณร้อยละการเกิดแคลลัสและยอด วัดความยาวของยอดด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ซีน วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

$$\text{ร้อยละการเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนข้อที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนชิ้นส่วนข้อทั้งหมด}} \times 100$$

#### 3.2.3.2 ถั่วฮามาต้า

ย้ายต้นถั่วฮามาต้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดที่เกิดยอดแล้ว นำแต่ละต้นมาตัดเฉพาะส่วนข้อ ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบไปด้วย เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 5.8 และสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และควบคุมอุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เพื่อนำแคลลัสที่ได้ไปฉายรังสีแกมมาดูการเจริญของแคลลัส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ เก็บผล และบันทึกผลการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์ นำผลที่ได้มาคำนวณร้อยละการเกิดแคลลัสและยอด วัดความยาวของยอดด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ซีน วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี NOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

### 3.2.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

#### 3.2.4.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

นำเมล็ดที่สมบูรณ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เป็นระยะเวลา 1-2 สัปดาห์ คัดเลือกใบเลี้ยง (cotyledon) ที่มีความสมบูรณ์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS และสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ประกอบไปด้วย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และควบคุมอุณหภูมิที่  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ จากการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตแคลลัส คือ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำแคลลัสซึ่งน้ำหนักสด 0.4 กรัม ทำการแยกแคลลัสโดยตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เซลล์จะหลุดออกเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยทุก 3 วัน ในช่วง 0-30 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละช่วงเวลา เมื่อเพาะเลี้ยงถึงเวลาตามกำหนด นำเซลล์แขวนลอยมาหาน้ำหนักสด โดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (ที่ผ่านการหาล้างน้ำหนักของกระดาษที่แท้จริงโดยการอบ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นลงในโถดูดความชื้น บันทึกน้ำหนักของกระดาษกรอง) กรองด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ และต่อเครื่องดูดอากาศเป็นเวลา 1 นาที นำเซลล์ที่กรองได้ซึ่งน้ำหนักสด (คำนวณได้จาก : น้ำหนักสดที่ซั่งได้ - น้ำหนักกระดาษกรอง) จากนั้นนำเซลล์มาอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ซั่งกระดาษกรองที่มีเซลล์ที่อบแห้ง บันทึกน้ำหนักแห้ง ซั่งหาน้ำหนักแห้ง (คำนวณได้จาก : น้ำหนักแห้งที่ซั่งได้ - น้ำหนักกระดาษกรอง) และจดบันทึก นำค่าเฉลี่ยของเซลล์ทั้ง 3 ชุดที่ได้มาเขียนกราฟของน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งกับระยะเวลา และตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยด้วยสีฟลูออเรสซินไดอะซิเทต จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนซ์ (อนุรักษ์, 2550) และวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

#### 3.2.4.2 ถั่วฮามาต้า

นำแคลลัสถั่วฮามาต้าที่ได้จากการทดลองที่ (4.3.2) ซึ่งน้ำหนักสด 0.5 กรัม ทำการแยกแคลลัสโดยตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เซลล์จะหลุดออกเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่าเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของแคลลัส ทำการแยกแคลลัสโดยตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เซลล์จะหลุดออกเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยทุก 3 วัน ในช่วง 0 ถึง 30 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละช่วงเวลา เมื่อเพาะเลี้ยงถึงเวลาตามกำหนด นำเซลล์แขวนลอยมาหาน้ำหนักสด โดยการกรองด้วยกระดาษกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (ที่ผ่านการหาล้างน้ำหนักของกระดาษที่แท้จริงโดยการอบ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นลงในโถดูดความชื้น บันทึกน้ำหนักของกระดาษกรอง) กรองด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ และต่อเครื่องดูดอากาศ

เป็นเวลา 1 นาที นำเซลล์ที่กรองได้ซึ่งน้ำหนักสด (คำนวณได้จาก : น้ำหนักสดที่ซั่งได้ – น้ำหนักกระดาษกรอง) จากนั้นนำเซลล์ มาอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน โถดูดความชื้น ซึ่งกระดาษกรองที่มีเซลล์ที่อบแห้ง บันทึกน้ำหนักแห้ง ซึ่งหาน้ำหนักแห้ง (คำนวณได้จาก : น้ำหนักแห้งที่ซั่งได้- น้ำหนักกระดาษกรอง) และจดบันทึก นำค่าเฉลี่ยของเซลล์ทั้ง 3 ชุดที่ได้มาเขียนกราฟของน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งกับระยะเวลา และตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยด้วยสีฟลูออเรสซินไดอะซีเทต จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนซ์ (อนุรักษ์, 2550) และวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสด คำนวณได้จาก :  $\frac{\text{ค่าน้ำหนักสดบวกกันตามจำนวนซ้ำ}}{\text{จำนวนซ้ำ}}$   
 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้ง คำนวณได้จาก :  $\frac{\text{ค่าน้ำหนักแห้งบวกกันตามจำนวนซ้ำ}}{\text{จำนวนซ้ำ}}$

### 3.2.5 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยให้

#### เจริญเป็นต้นใหม่

##### 3.2.5.1 ถั่วฮามาต้า

นำแคลลัสของถั่วฮามาต้าที่ได้จากการทดลองที่ 4.4.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *mT* และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และควบคุมอุณหภูมิที่  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ เก็บผลและบันทึกผลการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์ นำผลที่ได้มาคำนวณร้อยละการเกิดยอด วัดความยาวยอดด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขึ้นแคลลัส และยอดที่ได้จากเซลล์แขวนลอยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดรากและได้ต้นที่สมบูรณ์ วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0

$$\text{ร้อยละการพัฒนาคือต้นของแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนแคลลัสที่พัฒนาเป็นต้นใหม่}}{\text{จำนวนแคลลัสทั้งหมด}} \times 100$$

### 3.2.6 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของเมล็ด

#### 3.2.6.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

นำเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0 5 10 15 20 30 และ 50 กิโลเรด โดยใช้เครื่องฉายรังสีแกมมา (รุ่น Mark I มีซีเซียม 137 เป็นต้นกำเนิดรังสีของศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ) เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่ประกอบไปด้วย เจลแลนกรัม 2.6 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และควบคุมอุณหภูมิที่  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส หลังเพาะเลี้ยง เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์ นำผลที่ได้คำนวณหาร้อยละการงอกของเมล็ด วัดความยาวยอดและรากด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ โดยคิดเทียบเป็นร้อยละของเมล็ดที่ไม่ฉายรังสี เพื่อหาปริมาณรังสีที่ทำให้ถั่วอยู่รอด 50 เปอร์เซ็นต์ ( $LD_{50}$ ) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน โดยดูจากสัญญาณวิทยาของต้นถั่ว คือต้นถั่วที่มีชีวิตจะมีสีเขียว เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ และต้นถั่วที่ไม่รอดชีวิตจะมีสีเหลืองและตายในที่สุด และปริมาณรังสีที่ลดการเจริญเติบโตของถั่ว 50 เปอร์เซ็นต์ ( $GR_{50}$ ) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน ดูการงอกของเมล็ด โดยเมล็ดต้องเกิดยอดและราก ถ้าเกิดยอดหรือรากเพียงอย่างเดียวจะไม่ทำการตรวจวัดและเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเมล็ดถั่วโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 30 เมล็ด วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0 โดยการคำนวณค่า  $LD_{50}$  และ  $GR_{50}$  จากโปรแกรม GraphPad Prism 8

$$\text{ร้อยละการงอก} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอกหลังจากฉายรังสีผ่านไป 30 วัน}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{ร้อยละความอยู่รอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนต้นที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$$

#### 3.2.6.2 ถั่วฮามาต้า

นำเมล็ดถั่วฮามาต้าฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0 5 10 15 25 30 และ 45 กิโลเรด เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่ประกอบไปด้วย เจลแลนกรัม 2.6 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และควบคุมอุณหภูมิที่  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส หลังเพาะเลี้ยงเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์ นำผลที่ได้คำนวณหาร้อยละการงอกของเมล็ด วัดความยาวยอดและรากด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ โดยคิดเทียบเป็นร้อยละของเมล็ดที่ไม่ฉายรังสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อหาปริมาณรังสีที่ทำให้ถั่วอยู่รอด 50 เปอร์เซ็นต์ ( $LD_{50}$ ) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน โดยดูจากสัญญาณวิทยาของต้นถั่ว คือต้นถั่วที่มีชีวิตจะมีสีเขียว เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ และต้นถั่วที่ไม่รอดชีวิตจะมีสีเหลืองและตายในที่สุด และปริมาณรังสีที่ลดการเจริญเติบโตของถั่ว 50 เปอร์เซ็นต์ ( $GR_{50}$ ) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน ดูการงอกของเมล็ด โดยเมล็ดต้องเกิดยอดและราก ถ้าเกิดยอดหรือรากเพียงอย่างเดียว จะไม่ทำการตรวจวัดและเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเมล็ดถั่วโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต  $mT$  ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 30 เมล็ด วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0 โดยการคำนวณค่า  $LD_{50}$  และ  $GR_{50}$  จากโปรแกรม GraphPad Prism 8

### 3.2.7 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของแคลลัส

#### 3.2.7.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

นำแคลลัสถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 (4.3.1) มาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0 2 4 6 8 และ 10 กิโลเรด จากนั้นนำไปพัฒนาเป็นต้น เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรอาหาร MS ที่ประกอบไปด้วย เจลแลนกรัม 2.6 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 5.8 และสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และควบคุมอุณหภูมิที่  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ หลังเพาะเลี้ยงบันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตโดยแคลลัสที่มีชีวิตจะมีสีเขียว และแคลลัสที่ตายจะมีสีน้ำตาล แต่ละปริมาณรังสี เพื่อหา  $LD_{50}$  ที่ระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ซ้ำ วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เปอร์เซ็นต์ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0 โดยการคำนวณค่า  $LD_{50}$  จากโปรแกรม GraphPad Prism 8

#### 3.2.7.2 ถั่วฮามาต้า

นำแคลลัสถั่วฮามาต้า (4.3.2) มาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0 2 4 6 8 และ 10 กิโลเรด จากนั้นนำไปพัฒนาเป็นต้น เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบไปด้วย เจลแลนกรัม 2.6 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 5.8 และสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และควบคุมอุณหภูมิที่  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ หลังเพาะเลี้ยงบันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตโดยแคลลัสที่มีชีวิตจะมีสีเขียว และแคลลัสที่ตายจะมีสีน้ำตาล แต่ละปริมาณรังสี เพื่อหา  $LD_{50}$  ที่ระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 60 ซ้ำ วิเคราะห์ทางสถิติด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์อื่นใดเป็นการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เปอร์เซ็นต์ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0 โดยการคำนวณค่า LD<sub>50</sub> จากโปรแกรม GraphPad Prism 8

### 3.2.8 การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของเมล็ด

#### 3.2.8.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

คัดเลือกเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่มีความสมบูรณ์ ทำการพอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที หลังจากนั้นย้ายลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อที่เติมสารลดแรงตึงผิว 1-2 หยด และสารละลายคลอโรกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ เขย่าอย่างต่อเนื่อง 15 นาที และย้ายเมล็ดลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง เขย่าอย่างต่อเนื่องครั้งละ 5 นาที ผึ่งเมล็ดถั่วให้แห้ง จากนั้นย้ายลงอาหารสังเคราะห์สูตรMS ที่ประกอบไปด้วย Polyethylene glycol (PEG)6000 ที่มีความเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ใช้สำลีเพื่อการค้ำจุนต้นถั่ว พีเอช 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส หลังเพาะเลี้ยง เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง นำผลที่ได้คำนวณหาร้อยละการงอกของเมล็ด วัดความยาวยอดและรากด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ โดยคิดเทียบเป็นร้อยละของเมล็ดที่เพาะเลี้ยงโดยไม่เติม PEG เพื่อหา LD<sub>50</sub> เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์ โดยดูจากสัญญาณวิทยาของต้นถั่วคือต้นถั่วมีชีวิตจะมีสีเขียว เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ และต้นถั่วที่ไม่รอดชีวิตจะมีสีเหลืองและตายในที่สุด และหาค่า GR<sub>50</sub> เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ดูการงอกของเมล็ด โดยเมล็ดต้องเกิดยอดและราก ถ้าเกิดยอดหรือรากเพียงอย่างเดียว จะไม่ทำการตรวจวัด โดยดูร้อยละการงอกของเมล็ด และศึกษาว่าถั่วสามารถทนสถานะแล้งได้มากที่สุดที่ PEG ความเข้มข้นเท่าใด วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 25 ต้น วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0 โดยการคำนวณค่า LD<sub>50</sub> และ GR<sub>50</sub> จากโปรแกรม GraphPad Prism 8

#### 3.2.8.2 ถั่วฮามาต้า

คัดเลือกเมล็ดถั่วฮามาต้าที่ความสมบูรณ์ ทำการพอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที หลังจากนั้นย้ายลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อที่เติมสารลดแรงตึงผิว 1-2 หยดและสารละลายคลอโรกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ เขย่าอย่างต่อเนื่อง 15 นาที และย้ายเมล็ดลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง เขย่าอย่างต่อเนื่องครั้งละ 5 นาที ผึ่งเมล็ดถั่วให้แห้ง จากนั้นย้ายลงอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบไปด้วย Polyethylene glycol (PEG)6000 ที่มีความเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ใช้สำลีเพื่อการค้ำจุนต้นถั่ว พีเอช 5.8 เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส หลังเพาะเลี้ยง เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลอง นำผลที่ได้คำนวณหาร้อยละการงอกของเมล็ด วัดความยาวยอดและรากด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ โดยคิดเทียบเป็นร้อยละของเมล็ดที่เพาะเลี้ยงโดยไม่เติม PEG เพื่อหา LD<sub>50</sub>

เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์ โดยดูจากสัญญาณวิทยาของต้นแก้ว คือต้นแก้วมีชีวิตจะมีสีเขียว เกิดยอดและรากที่สมบูรณ์ และต้นแก้วที่ไม่รอดชีวิตจะมีสีเหลืองและตายในที่สุดและหาค่า  $GR_{50}$  เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ดูการงอกของเมล็ด โดยเมล็ดต้องเกิดยอดและราก ถ้าเกิดยอดหรือรากเพียงอย่างเดียว จะไม่ทำการตรวจวัด โดยดูร้อยละการงอกของเมล็ด และศึกษาว่าต้นแก้วสามารถทนสภาวะแล้งได้มากที่สุดที่ PEG ความเข้มข้นเท่าใด วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 25 ต้น วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0 โดยการคำนวณค่า  $LD_{50}$  และ  $GR_{50}$  จากโปรแกรม GraphPad Prism 8

### 3.2.9 การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของแคลลัส

#### 3.2.9.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

คัดเลือกแคลลัสถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 จากการทดลอง (4.3.1) ที่มีความสมบูรณ์ และเป็นชนิด compact callus ย้ายลงอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบไปด้วย PEG ที่ความเข้มข้น 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ใช้สำลีเพื่อการค้ำจุนต้นแก้ว พีเอช 5.8 และสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และควบคุมอุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส หลังเพาะเลี้ยงบันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตโดยแคลลัสที่มีชีวิตจะมีสีเขียว และแคลลัสที่ตายจะมีสีน้ำตาล แต่ละปริมาณรังสี เพื่อหา  $LD_{50}$  ที่ระยะเวลา 16 สัปดาห์ และศึกษาว่าแคลลัสของถั่วสามารถทนสภาวะแล้งได้มากที่สุดที่ PEG ความเข้มข้นเท่าใด วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ชิ้นแคลลัส วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0 โดยการคำนวณค่า  $LD_{50}$  จากโปรแกรม GraphPad Prism 8

#### 3.2.9.2 ถั่วฮามาต้า

คัดเลือกแคลลัสถั่วฮามาต้าจากการทดลอง (4.3.2) ที่มีความสมบูรณ์ และเป็นชนิด compact callus ย้ายลงอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบไปด้วย PEG ที่ความเข้มข้น 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ใช้สำลีเพื่อการค้ำจุนต้นแก้ว พีเอช 5.8 และสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และควบคุมอุณหภูมิที่  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส หลังเพาะเลี้ยงบันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตโดยแคลลัสที่มีชีวิตจะมีสีเขียว และแคลลัสที่ตายจะมีสีน้ำตาล แต่ละปริมาณรังสี เพื่อหา  $LD_{50}$  ที่ระยะเวลา 16 สัปดาห์ และศึกษาว่าแคลลัสของถั่วสามารถทนสภาวะแล้งได้มากที่สุดที่ PEG ความเข้มข้นเท่าใด วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ชิ้นแคลลัส วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารทบทวนเนื้อหาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนักผู้ใดเห็นประโยชน์ในการนำเอกสารนี้ไปใช้ กรุณาแจ้งให้ทราบล่วงหน้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0 โดยการคำนวณค่า LD<sub>50</sub> จากโปรแกรม GraphPad Prism 8

### 3.2.10 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี (RAPD)

คัดเลือกโคลนที่มีลักษณะแตกต่างไปจากต้นควบคุม สกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB ภาคนวอก ข นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์พีดี ทำการเตรียมสารละลายที่เป็นส่วนประกอบในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ได้แก่ ไพรเมอร์ ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร จีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA) ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม สารละลาย dNTPs ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ พีซีอาร์บัฟเฟอร์ (PCR buffer) ความเข้มข้น 1 เท่า น้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionized H<sub>2</sub>O) เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 0.2 มิลลิลิตร โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร (ตารางที่ 3.3) แล้วนำเข้าเครื่อง DNA thermal cycle เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) (ตารางที่ 3.4) ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตารางที่ 3.1 ชื่อไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีสำหรับ  
ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
OPA04	5'-AATCGGGCTG-3'
OPA07	5'-GAAACGGGTG-3'
OPA09	5'-GGGTAACGCC-3'
OPA11	5'-CAATCGCCGT-3'
OPA13	5'-CAGCACCCAC-3'
OPA14	5'-TCTGTGCTGG-3'
OPA16	5'-AGCCAGCGAA-3'
OPA17	5'-GACCGCTTGT-3'
OPA19	5'-CAAACGTCGG-3'
OPA20	5'-GTTGCGATCC-3'
OPC02	5'-GTGAGGCGTC-3'
OPC05	5'-GATGACCGCC-3'
OPC08	5'-TGGACCGCTG-3'
OPD02	5'-TCGGACGTGA-3'
OPG02	5'-GGCACTGAGG-3'
OPG04	5'-AGCGTGTCTG-3'
OPG05	5'-CTGAGACGGA-3'
OPG08	5'-TCACGTCCAC-3'
OPG11	5'-TGCCCGTTCGT-3'
OPG12	5'-CAGCTCACGA-3'
OPG17	5'-ACGACCGACA-3'
OPG19	5'-GTCAGGGCAA-3'
OPN04	5'-GACCGACCCA-3'
OPN06	5'-GAGACGCACA-3'
OPN07	5'-CAGCCAGAG-3'
OPN09	5'-TGCCGGCTTG-3'
OPN11	5'-TCGCCGCAA-3'
OPK11	5'-AATGCCCCAG-3'
OPK15	5'-CTCCTGCCAA-3'
OPU03	5'-CTATGCCGAC-3'

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 ชื่อไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีสำหรับ ถั่วฮามาต้า (รัตนภรณ์, 2556)

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
OPV02	5'-AGTCACTCC3'
OPV03	5'-CTCCCTGCA3'
OPH05	5'AGTCGTCCCC3'
OPN15	5'-CAGCGACTGT3'
OPY15	5'-AGTCGCCCTT-3'
OPZ04	5'-AGGCTGTGCT-3'

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบสารเคมีในเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี ต่อ 1 ตัวอย่าง (รัตนภรณ์, 2556)

สารเคมี	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
DI water	-	-	10.6
dNTPs	1.25 mM	0.16mM	3.2
Standing Taq buffer	10X	1x	2.5
Primer	100 $\mu$ M	1.6 $\mu$ M	2
Taq DNA polymerase	5000 U/ml	1 U	0.2
Magnesium chloride	50 mM	3 mM	1.5
DNA template	-	100 ng	5
<b>ปริมาตรรวม</b>			<b>25</b>

ตารางที่ 3.4 แสดงอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบในแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในเทคนิค PCR

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

# ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

### 4.1 การศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดเพื่อชักนำให้เกิดยอด

#### จำนวนมาก

##### 4.1.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

จากการศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ให้เกิดยอดจำนวนมากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบไปด้วยเจลแลน 2.6 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 5.8 และสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินคือ BA *mT* และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยง 5-7 วันเริ่มมีการงอกเจริญเป็นต้นอ่อน และการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสามชนิดให้ผลที่แตกต่างกันในสัปดาห์ที่ 2 อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ *mT* ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีลักษณะลำต้นพอมและยืดยาว เกิดแคลลัสที่บริเวณราก (radicle) ส่วนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ทุกความเข้มข้นกระตุ้นใหม่บริเวณราก ในสัปดาห์ที่ 4 (ตารางที่ 4.1) และ (รูปที่ 4.1 ก-ง) ซึ่ง Rizvi and Singh, 2000; Parveena *et.al.* (2012) รายงานว่า TDZ มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิด organogenesis และ somatic embryogenesis ในถั่วลูกไก่ ( Chick Pea ) ลักษณะการเจริญมีลักษณะลำต้นอวบและต้นเตี้ย (รูปที่ 4.1ข-ง) เนื่องจาก TDZ สามารถช่วยกระตุ้นให้เกิดแคลลัส somatic embryogenesis และยอดจำนวนมากโดยใช้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ เมื่อเทียบกับไซโตไคนินตัวอื่น ๆ แต่ที่ระดับความเข้มข้นสูงอาจส่งผลให้ความแข็งแรงของยอดและพัฒนาการที่เป็นปกติของเอ็มบริโอลดลง (วราภรณ์, 2552)

จากการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ พบว่าทุกความเข้มข้นมีการเกิดยอดร้อยละ 100 โดยความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนยอด และความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุดคือ 36.80 ยอดต่อเมล็ด และความยาวยอดเฉลี่ย 4.24 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.2) (รูปที่ 4.2 ญ) สอดคล้องกับ Basalma. *et al.* (2008) ทำการศึกษาการชักนำเมล็ดให้เกิดยอดในถั่ว (*Astragalus cicer* L.) โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ พบว่ามีร้อยละการเกิดยอดสูงสุด วราภรณ์ (2552) รายงานว่า TDZ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ในจำนวนที่มากกว่า BA ที่ความเข้มข้นเท่ากันในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะพืชใบเลี้ยงคู่ ซึ่ง Mok *et al.* (2000) พบว่าสารที่มีสมบัติคล้ายคลึงกับไซโตไคนินมาก และสามารถใช้ทดแทน BA ได้ คือ ซีเอทิน (zeatin) หรือ TDZ เป็นอนุพันธ์ของฟิโนลยูเรีย

(phenyl urea) มีหมู่ phenyl urea มาแทนที่หมู่ adenine ในไซโตโคนิน และเป็น non-purine cytokinin ที่มีประสิทธิภาพสูงมาก เช่นเดียวกับไซโตโคนินในกลุ่มพิวรีน (purine)

**ตารางที่ 4.1** ผลการชักนำเมล็ดของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *mT* และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

BA (มก./ล.)	<i>mT</i> (มก./ล.)	TDZ (มก./ล.)	จำนวน เมล็ด	จำนวน และร้อยละ การเกิดยอด	ค่าเฉลี่ย จำนวน ยอด/เมล็ด	ค่าเฉลี่ย ความยาว ยอด/เมล็ด (ซม.)
0.5	0	0	60	46 (76.67)	2.80 <sup>f</sup> ±0.48	1.54 <sup>de</sup> ±0.23
1	0	0	60	47 (78.33)	2.40 <sup>f</sup> ±0.40	3.23 <sup>ab</sup> ±0.15
3	0	0	60	48 (80.00)	7.00 <sup>e</sup> ±0.00	3.80 <sup>a</sup> ±0.45
0	0.5	0	60	31 (51.67)	10.00 <sup>d</sup> ±0.00	3.46 <sup>ab</sup> ±0.47
0	1	0	60	38 (63.33)	14.00 <sup>c</sup> ±0.70	2.34 <sup>cd</sup> ±0.12
0	3	0	60	39 (65.00)	23.40 <sup>b</sup> ±1.43	2.87 <sup>ab</sup> ±0.75
0	0	0.5	60	60 (100)	25.80 <sup>b</sup> ±1.39	1.76 <sup>e</sup> ±0.14
0	0	1	60	60 (100)	34.80 <sup>a</sup> ±0.96	0.88 <sup>e</sup> ±0.09
0	0	3	60	60 (100)	35.40 <sup>a</sup> ±1.07	0.76 <sup>e</sup> ±0.14

\*หมายเหตุ <sup>1/</sup> ค่าเฉลี่ย ±SE แสดงจากการนับ 5 ซ้ำ

<sup>2/</sup> ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

ตารางที่ 4.2 ผลการชักนำเมล็ดของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *mT* และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

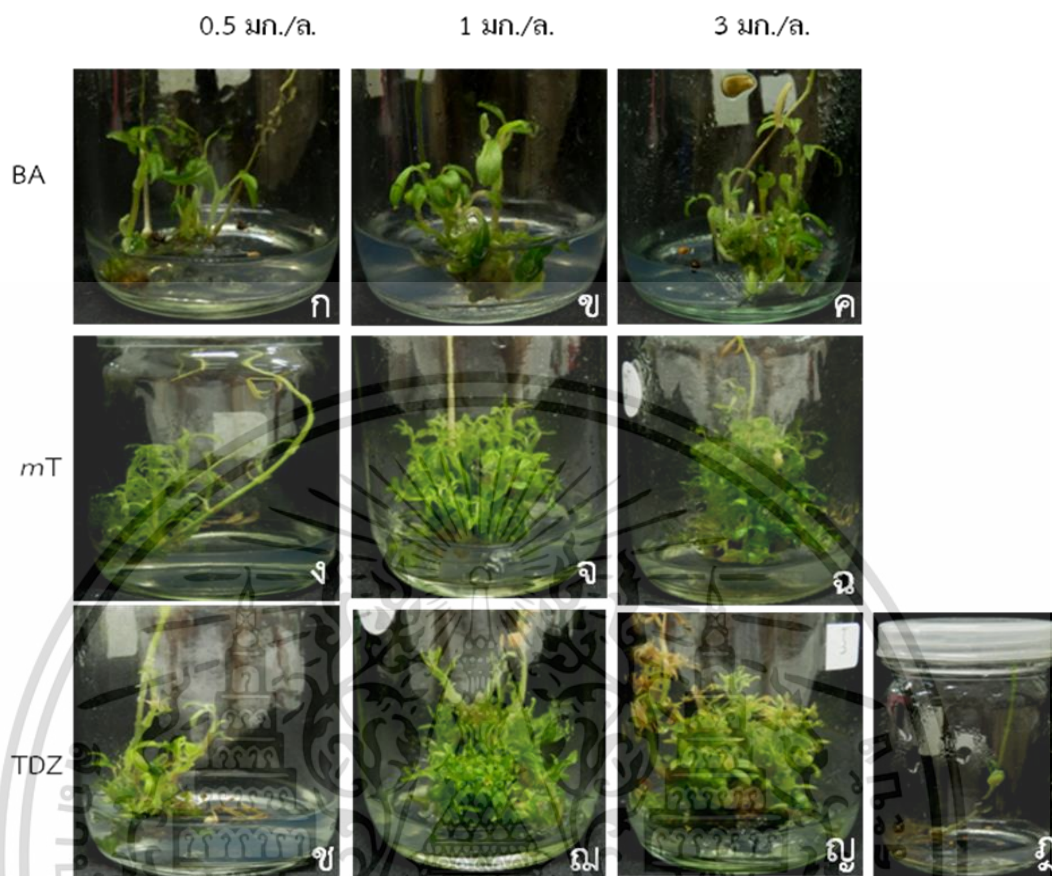
BA (มก./ล.)	<i>mT</i> (มก./ล.)	TDZ (มก./ล.)	จำนวน เมล็ด	จำนวน และร้อยละ การเกิดยอด	ค่าเฉลี่ย จำนวน ยอด/เมล็ด	ค่าเฉลี่ย ความยาว ยอด/เมล็ด (ซม.)
0.5	0	0	60	46 (76.67)	3.00 <sup>f</sup> ±0.31	2.71 <sup>c</sup> ±0.30
1	0	0	60	47 (78.33)	2.60 <sup>f</sup> ±0.24	4.17 <sup>a</sup> ±0.10
3	0	0	60	48 (80.00)	7.20 <sup>e</sup> ±0.20	4.16 <sup>a</sup> ±0.094
0	0.5	0	60	31 (51.67)	10.60 <sup>d</sup> ±0.40	3.84 <sup>ab</sup> ±0.21
0	1	0	60	38 (63.33)	17.80 <sup>c</sup> ±1.24	3.38 <sup>b</sup> ±0.13
0	3	0	60	39 (65.00)	23.40 <sup>b</sup> ±3.20	4.24 <sup>a</sup> ±0.06
0	0	0.5	60	60 (100)	25.80 <sup>b</sup> ±3.11	2.73 <sup>c</sup> ±0.15
0	0	1	60	60 (100)	34.80 <sup>a</sup> ±1.87	3.86 <sup>ab</sup> ±0.10
0	0	3	60	60 (100)	36.80 <sup>a</sup> ±0.83	4.24 <sup>a</sup> ±0.11

\*หมายเหตุ <sup>1</sup>/ ค่าเฉลี่ย ±SE แสดงจากการนับ 5 ซ้ำ

<sup>2</sup>/ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.1 การเพาะเลี้ยงกล้วยท่าพระสไตโล CIAT 184 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5-7 วัน (ข) การเกิดแคลลัสจากส่วนของราก (radicle) (ค) การเกิดต้นใหม่จากแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ง) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์



รูปที่ 4.2 การเพาะเลี้ยงกล้วยทำพระสไตโล CIAT 184 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (ก-ค) BA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง-ฉ) mT ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช-ญ) และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสังเคราะห์ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ฎ) ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

#### 4.1.2 ถั่วฮามาต้า

จากการศึกษาหาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วฮามาต้าให้เกิดยอดจำนวนมากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA *mT* และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยง 7 วัน ถั่วฮามาต้าเริ่มมีการงอกเจริญเป็นต้นใหม่ (รูปที่ 4.3 ก) และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.3) พบว่าทุกสูตรอาหารเมล็ดเริ่มมีการชักนำให้เกิดยอด ซึ่งจะสังเกตว่าสูตรอาหารที่ประกอบด้วย TDZ เกิดแคลลัสที่บริเวณราก ลักษณะแคลลัสสีเขียวแข็ง (รูปที่ 4.3 ข) ซึ่งสอดคล้องกับการเกิด organogenesis บริเวณรากของถั่วฮามาต้า (Scowcroft and Adamson, 1976)

เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ *mT* ต้นมีลักษณะผอมและบาง ความสูงใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันมาก อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *mT* ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดร้อยละ 88.33 เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 7.00 ยอดต่อเมล็ด ความยาวยอดเฉลี่ย 4.54 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.4) (รูปที่ 4.4 ฉ) โดยสูตรอาหารที่ประกอบด้วย BA และ *mT* เกิดแคลลัสบริเวณเนื้อเยื่อรากแคลลัสมีลักษณะสีเหลืองแข็ง (compact callus) เป็นจำนวนมาก

สำหรับสูตรอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดร้อยละ 53.33 เกิดยอดเฉลี่ย 3.20 ยอดต่อเมล็ด ความยาวยอดเฉลี่ย 4.68 เซนติเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ รัตนภรณ์ (2556) ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วฮามาต้าบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 4.63 ยอดต่อเมล็ด ความยาวยอดเฉลี่ย 4.91 เซนติเมตร และสามารถเกิดยอดได้ร้อยละ 75 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดย Kiran *et al.* (2010) กล่าวว่า การเกิด somatic embryo และการเจริญต้นใหม่จากเมล็ดถั่วลูกไก่ สามารถชักนำให้เกิดต้นร้อยละ 60 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับกรดแอบไซลิก 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

และสูตรอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ทุกความเข้มข้น จะมีการชักนำให้เกิดแคลลัสมากกว่าการชักนำให้เกิดราก พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 3.40 ยอดต่อเมล็ด และความยาวยอดเฉลี่ย 3.39 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

จากผลการทดลองพบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต *mT* สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด ซึ่งมีงานวิจัยหลายการทดลองพบว่า *mT* เป็นไซโทไคนินชนิดใหม่มีคุณสมบัติช่วยชักนำให้เกิด

ยอดให้ได้จำนวนมากและสามารถกระตุ้นการเกิดรากได้เช่นกัน (Mala *et al.*, 2013) โดยสามารถชัก  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นใบเซอร์ประโชชน์ด้านการศึกษา  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้เกิดยอดได้ดีกว่า BA ใน กล้าย (*Musa spp.*) (Escalona *et.al.* 2003; Bairu *et.al.*, 2008), ขมิ้น (*Curcuma longa*) (Salvi *et.al.*, 2002) และ กระบองเพชร (*Huernia hystrix*) (Amoo and Staden, 2013) โดยยังไม่มีรายงานในถั่ว

**ตารางที่ 4.3** ผลการชักนำเมล็ดของถั่วฮามาต้าให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต BA *mT* และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

BA (มก./ล.)	<i>mT</i> (มก./ล.)	TDZ (มก./ล.)	จำนวน เมล็ด	จำนวน และร้อยละ การเกิด ยอด	ค่าเฉลี่ย จำนวน ยอด/เมล็ด	ค่าเฉลี่ย ความยาว ยอด/เมล็ด (ซม.)	การเกิด แคลลัส
0.5	0	0	60	23 (38.33)	2.00 <sup>cd</sup> ±0.31	3.51 <sup>c</sup> ±0.07	+
1	0	0	60	35 (58.33)	1.60 <sup>d</sup> ±0.2	3.80 <sup>b</sup> ±0.20	+
3	0	0	60	32 (53.33)	2.80 <sup>bc</sup> ±0.2	4.28 <sup>a</sup> ±0.07	+
0	0.5	0	60	43 (71.67)	3.40 <sup>b</sup> ±0.2	4.32 <sup>a</sup> ±0.35	+
0	1	0	60	46 (76.67)	5.00 <sup>a</sup> ±0.31	4.13 <sup>a</sup> ±0.04	+
0	3	0	60	53 (88.33)	5.80 <sup>a</sup> ±0.37	4.37 <sup>a</sup> ±0.05	+
0	0	0.5	60	39 (65.00)	1.40 <sup>d</sup> ±0.24	2.49 <sup>e</sup> ±0.06	+
0	0	1	60	47 (78.33)	1.60 <sup>d</sup> ±0.40	2.69 <sup>e</sup> ±0.08	+
0	0	3	60	49 (81.67)	1.80 <sup>d</sup> ±0.20	3.19 <sup>d</sup> ±0.05	+

\*หมายเหตุ <sup>1/</sup> - ไม่เกิดแคลลัส

+ เกิดแคลลัส

<sup>2/</sup> ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

ตารางที่ 4.4 ผลการชักนำเมล็ดของถั่วฮามาต้าให้เกิดยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต BA *mT* และ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

BA (มก./ล.)	<i>mT</i> (มก./ล.)	TDZ (มก./ล.)	จำนวน เมล็ด	จำนวน และร้อยละ การเกิด ยอด	ค่าเฉลี่ย จำนวน ยอด/เมล็ด	ค่าเฉลี่ย ความยาว ยอด/เมล็ด (ซม.)	การเกิด แคลลัส
0.5	0	0	60	23 (38.33)	3.75 <sup>cd</sup> ±0.75	4.13 <sup>c</sup> ±0.01	+
1	0	0	60	35 (58.33)	2.40 <sup>cde</sup> ±0.50	4.42 <sup>b</sup> ±0.09	+
3	0	0	60	32 (53.33)	3.20 <sup>cde</sup> ±1.01	4.68 <sup>a</sup> ±0.01	+
0	0.5	0	60	43 (71.67)	4.20 <sup>bc</sup> ±0.37a	4.43 <sup>b</sup> ±0.06	+
0	1	0	60	46 (76.67)	5.80 <sup>ab</sup> ±0.37	4.39 <sup>b</sup> ±0.06	+
0	3	0	60	53 (88.33)	7.00 <sup>a</sup> ±0.31	4.54 <sup>a</sup> ±0.06	+
0	0	0.5	60	39 (65.00)	1.60 <sup>f</sup> ±0.40	3.17 <sup>e</sup> ±0.08	+
0	0	1	60	47 (78.33)	2.20 <sup>de</sup> ±0.73	3.48 <sup>d</sup> ±0.13	+
0	0	3	60	49 (81.67)	3.40 <sup>cde</sup> ±0.67	3.39 <sup>d</sup> ±0.05	+

\*หมายเหตุ <sup>1/</sup> - ไม่เกิดแคลลัส

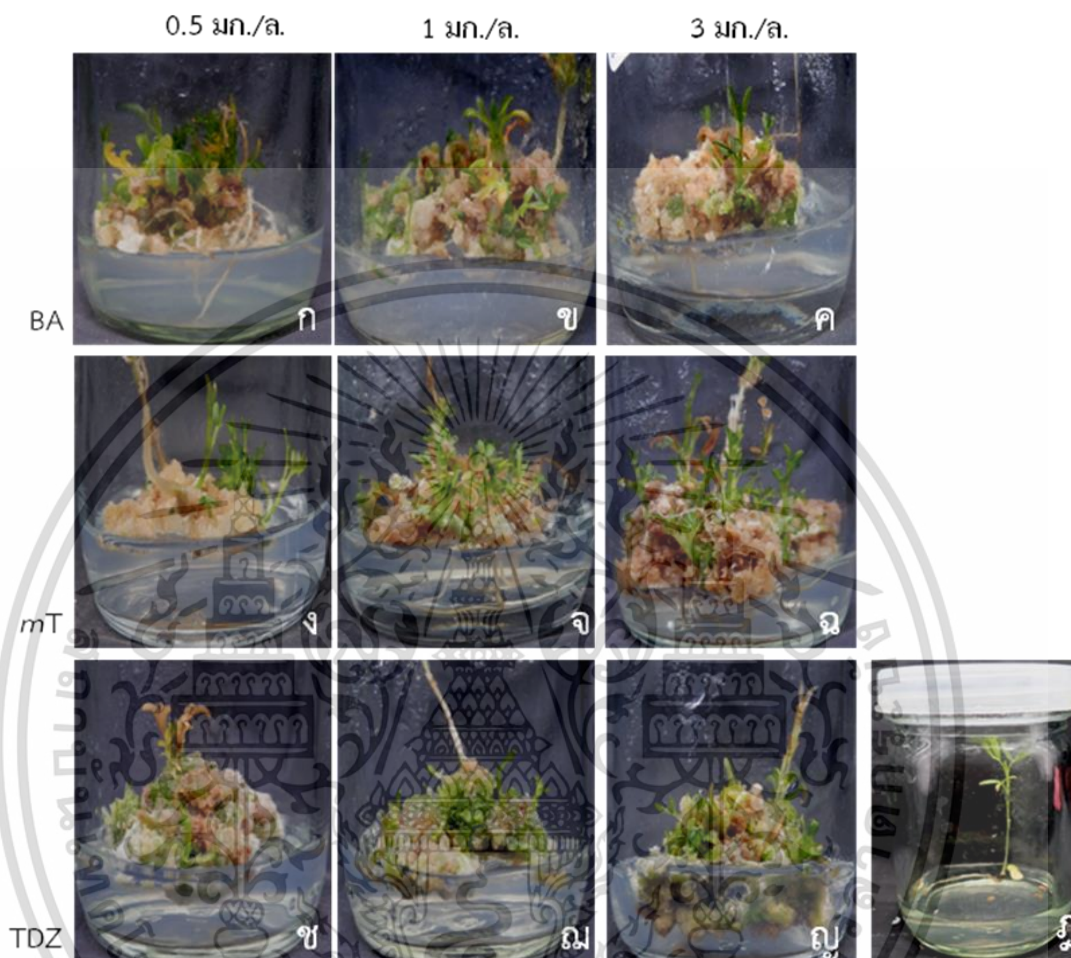
+ เกิดแคลลัส

<sup>2/</sup> ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.3 การเพาะเลี้ยงถั่วฮามาต้า (ก) บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) การเกิดแคลลัสจากส่วนของราก ที่เพาะเลี้ยงบนสารควบคุม การเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) การเกิดต้นใหม่จากแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงบน *mT* ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 การเพาะเลี้ยงกล้วยฮามาตาบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (ก-ค) BA ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง-ฉ) *mT* ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช-ญ) และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสังเคราะห์ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ม) ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

## 4.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำราก

### 4.2.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

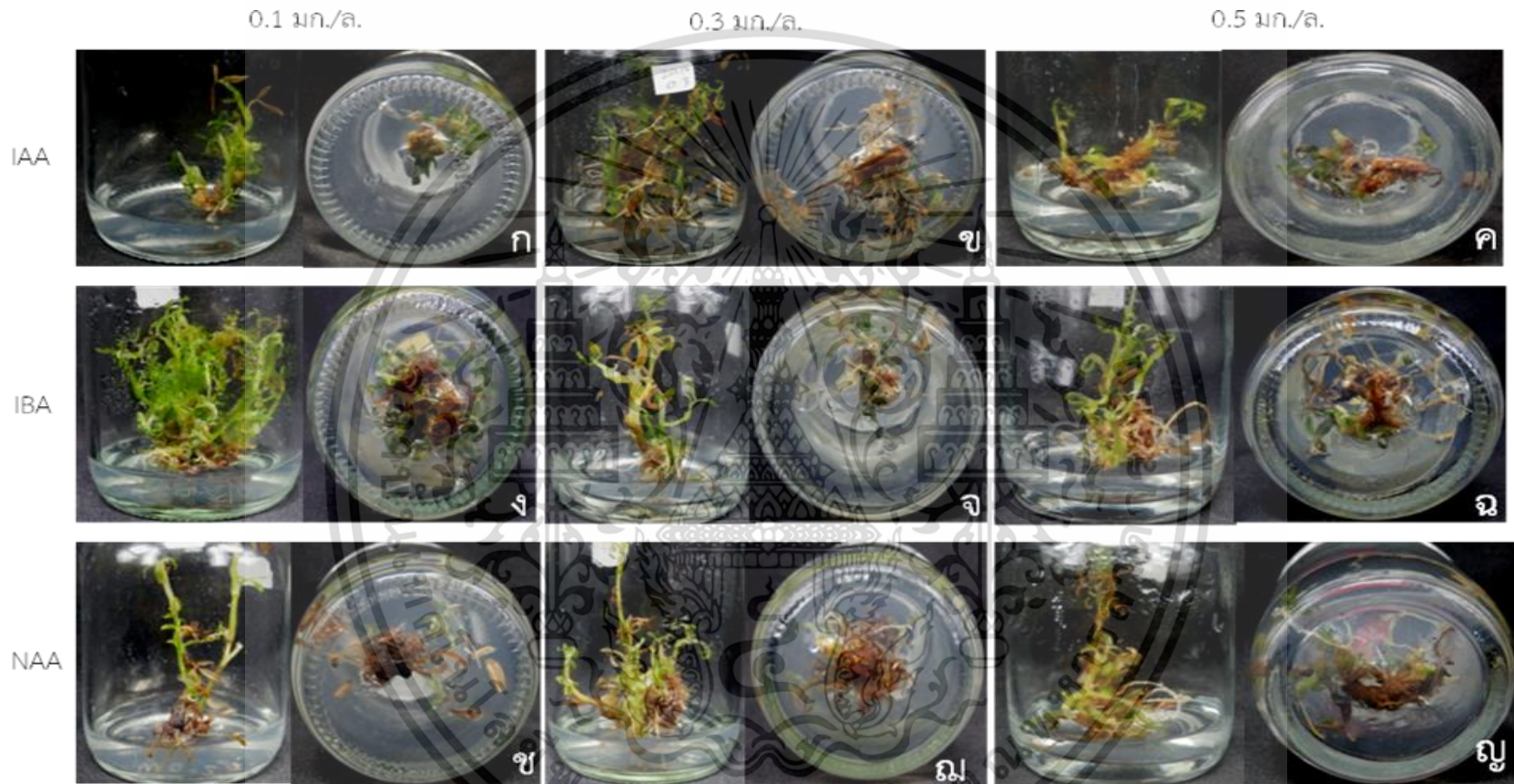
จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเพื่อชักนำให้เกิดรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินคือ IAA IBA และ NAA ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA IBA หรือ NAA ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดรากได้ทุกสูตรอาหาร (ตารางที่ 4.5) สารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำรากยาวที่มีลักษณะสีขาวปนน้ำตาล (รูปที่ 4.5 ข) สามารถชักนำรากได้ร้อยละ 40 จำนวนรากเฉลี่ยได้มากที่สุด 6.5 รากต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ย 1.18 เซนติเมตร ในทำนองเดียวกัน Barik *et.al.* (2006) ได้ทำการชักนำรากในถั่วลูกไก่ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากเฉลี่ย 3.6 รากต่อต้น ความยาวรากเฉลี่ย 3.90 เซนติเมตร สารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากที่มีลักษณะยาวสีขาว สามารถชักนำรากได้ร้อยละ 36.67 จำนวนรากเฉลี่ยได้ 5.5 รากต่อต้นและความยาวรากเฉลี่ย 1.12 เซนติเมตร (รูปที่ 4.5 ฉ) และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากที่มีลักษณะสั้นสีน้ำตาลสามารถชักนำรากได้ร้อยละ 33.33 จำนวนรากเฉลี่ยได้ 4.40 รากต่อต้นและความยาวรากเฉลี่ย 0.89 เซนติเมตร (รูปที่ 4.5 ฉ) Graves *et.al.* (1978) รายงานว่าจำนวนรากลดลง เมื่อสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นนั้นเนื่องจากความเข้มข้นของออกซินสูงมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อราก มีรายงานการวิจัยของ Norton and Skiruin (2001) พบว่าความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่มากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้รากขององุ่นสายพันธุ์ Norton เกิดรากอ้วนสั้นเปราะหักง่าย เมื่อย้ายปลูกลงดิน อีกทั้งสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เป็นออกซินที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถเคลื่อนย้ายภายในพืชได้ดีและสลายตัวช้าจึงทำให้เป็นพิษต่อชิ้นส่วนพืช (Zaerrand Mapes, 1982) และ Hansen and Grossmann (2000) กล่าวว่าความเข้มข้นออกซินสูงจะทำให้การพัฒนาของรากข้างและพืชจะผลิตเอทิลีนมากขึ้น

เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จากการทดลองสังเกตว่าพืชสามารถสร้างยอดใหม่ ร่วมกับการสร้างราก วันທີ (2542) กล่าวว่า สารกลุ่มออกซินเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำจะมีผลกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชมีการแบ่งเซลล์มากขึ้น ช่วยให้มีการสร้างรากหรือยอดใหม่ขึ้นมาพร้อมกัน ซึ่งมีการนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้สำเร็จ

ตารางที่ 4.5 ผลการชักนำยอดของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ให้เกิดรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA IBA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

IAA (มก./ล.)	IBA (มก./ล.)	NAA (มก./ล.)	จำนวน ต้นที่ เพาะเลี้ยง	จำนวน และร้อยละ การเกิดราก	ค่าเฉลี่ย จำนวน ราก/ต้น	ค่าเฉลี่ย ความยาว ราก/ต้น (ซม.)
0.1	0	0	30	4 (13.33)	0.60 <sup>e</sup> ±0.84	0.47 <sup>c</sup> ±0.20
0.3	0	0	30	12 (40.00)	6.50 <sup>a</sup> ±6.38	1.18 <sup>ab</sup> ±0.21
0.5	0	0	30	12 (40.00)	2.80 <sup>bcde</sup> ±2.20	0.88 <sup>bc</sup> ±0.05
0	0.1	0	30	11 (36.67)	4.80 <sup>abc</sup> ±0.38	1.12 <sup>ab</sup> ±0.14
0	0.3	0	30	13 (43.33)	3.70 <sup>bcd</sup> ±0.59	1.33 <sup>ab</sup> ±0.21
0	0.5	0	30	13 (36.67)	5.50 <sup>ab</sup> ±0.70	1.12 <sup>ab</sup> ±0.12
0	0	0.1	30	14 (46.67)	2.70 <sup>cde</sup> ±0.57	1.54 <sup>a</sup> ±0.32
0	0	0.3	30	10 (33.33)	4.40 <sup>abcd</sup> ±0.45	0.89 <sup>bc</sup> ±0.09
0	0	0.5	30	13 (43.33)	4.00 <sup>abcd</sup> ±0.81	1.10 <sup>ab</sup> ±0.05

\*หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของรากแก้วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (ก-ค) IAA ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง-ฉ) IBA ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช-ญ) และ NAA ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

#### 4.2.2 ถั่วฮามาต้า

จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเพื่อชักนำให้เกิดรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA IBA และ NAA ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากร้อยละ 90 มากที่สุดเฉลี่ย 7.5 รากต่อต้น ความยาวรากเฉลี่ย 1.20 เซนติเมตรต่อราก (ตารางที่ 4.6 รูปที่ 4.6 จ) เนื่องจาก IBA เป็นสารที่แสดงผลของออกซินค่อนข้างต่ำ เคลื่อนย้ายได้ช้ามาก แต่สลายตัวได้รวดเร็ว ซึ่งเป็นลักษณะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดราก (พีรเดช, 2537) และผลเป็นไปในทางเดียวกับ Ahmad *et.al.* (2012) ทำการชักนำให้เกิดรากในแก้ว (*Cyamopsis tetragonoloba*) โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.62 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุดเฉลี่ย 3 รากต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ย 2.5 เซนติเมตรต่อราก เช่นเดียวกับ Sheikh *et.al.* (2015) ทำการชักนำให้เกิดรากในแก้วโดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA<sub>3</sub> สามารถชักนำให้เกิดรากร้อยละ 72 ส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA จากการทดลองสามารถชักนำให้เกิดรากร้อยละ 70 จำนวนรากเฉลี่ย 6.80 รากต่อต้นและความยาวรากเฉลี่ย 1.12 เซนติเมตร ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.6 ฉ) และส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA สามารถชักนำให้เกิดรากร้อยละ 40 จำนวนรากเฉลี่ยได้ 3.1 รากต่อต้นและความยาวรากเฉลี่ย 1.01 เซนติเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.6 ค) อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของออกซินที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปตามชนิดพืชโดยไม่ต้องไม่สูงเกินไป เพราะถ้าใช้สารที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะยับยั้งการเจริญของตา ทำให้ใบเหลือง ร่วง และตายในที่สุด (ปิยะณัฐ และคณะ, 2555)

Bhojwani and Razdan (1996) และรังสฤษฎ์ (2540) แนะนำว่าการเกิดรากจากยอดที่ชักนำได้ในพืชหลายชนิดสามารถเกิดขึ้นได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง หรือ 1/4 ของความเข้มข้น ทั้งนี้เนื่องจากการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงเป็นการลดความเข้มข้นของไนโตรเจนที่มีอยู่ในสูตรอาหาร ซึ่งการที่พืชได้รับไนโตรเจนมากเกินไป จะมีการเจริญทางด้านลำต้นมาก ในขณะที่รากมีการเจริญน้อย (Hopkin and Huner, 2004) ส่วนความยาวรากในทางปฏิบัตินิยมรากที่สั้น มีความยาวไม่เกิน 0.5 เซนติเมตร ทั้งนี้เนื่องจากรากที่ยาวเกินไปอาจขาดระหว่างการย้ายปลูกลงและทำให้ต้นตายได้ในภายหลัง (Bhojwani and Razdan, 1996) ซึ่งจากการทดลองยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม IBA มีความยาวรากเพียง 1-2 เซนติเมตร และไม่มีปัญหาการขาดหรือขาดเมื่อนำออกปลูกลง

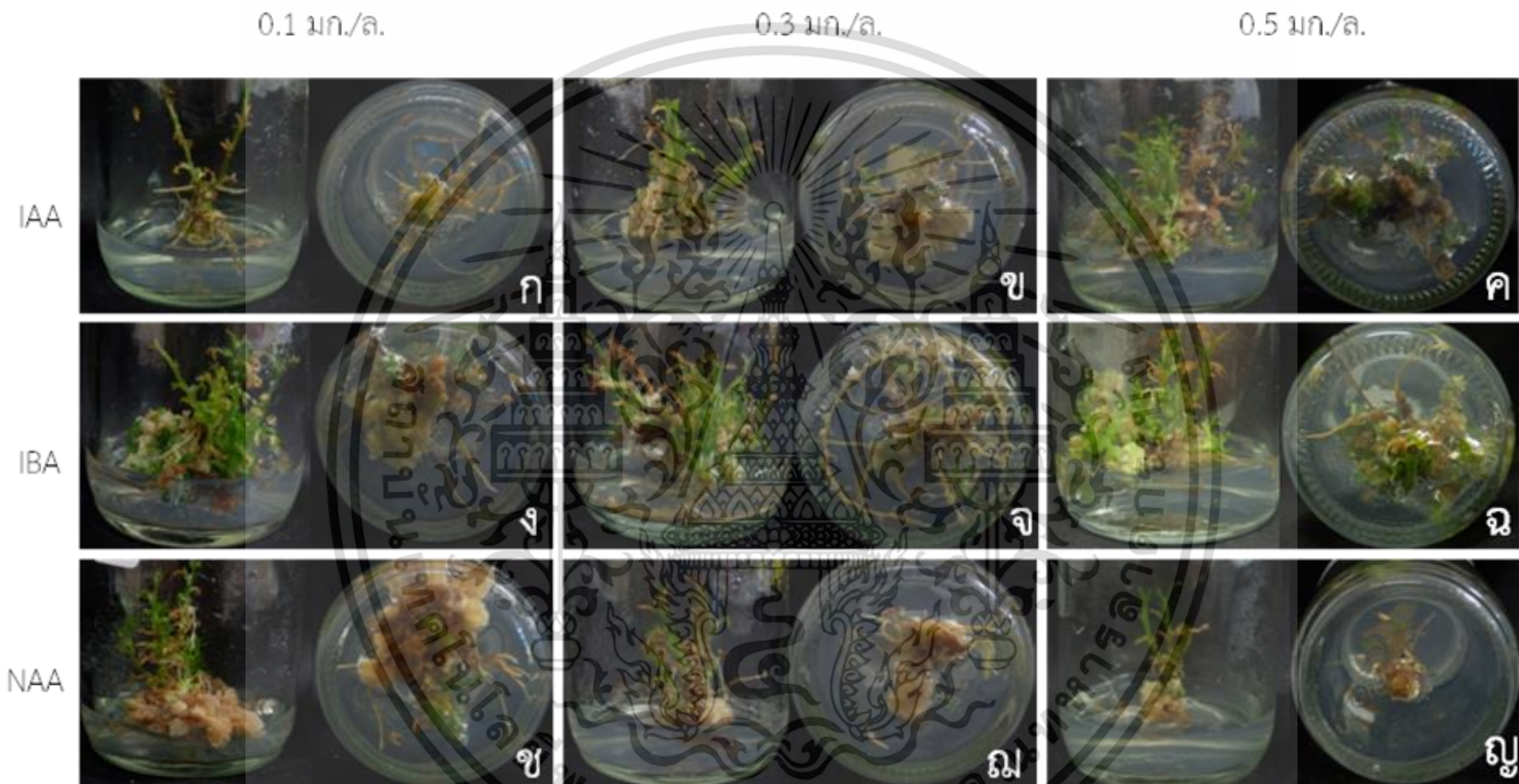
ตารางที่ 4.6 ผลการชักนำยอดถั่วฮามาต้าให้เกิดรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต IAA IBA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

IAA (มก./ล.)	IBA (มก./ล.)	NAA (มก./ล.)	จำนวน ต้นที่ เพาะเลี้ยง	จำนวน และร้อยละ การเกิดราก	ค่าเฉลี่ย จำนวน ราก/ต้น	ค่าเฉลี่ยความ ยาวราก/ต้น (ซม.)	การเกิด แคลลัส
0.1	0	0	10	6 (60.00)	2.70 <sup>bc</sup> ±1.39	0.96 <sup>bc</sup> ±3.32	-
0.3	0	0	10	5 (50.00)	3.00 <sup>bc</sup> ±2.22	1.28 <sup>abc</sup> ±3.07	+
0.5	0	0	10	4 (40.00)	3.10 <sup>bc</sup> ±1.79	1.01 <sup>bc</sup> ±2.33	+
0	0.1	0	10	8 (80.00)	6.00 <sup>ab</sup> ±1.36	2.02 <sup>a</sup> ±3.38	+
0	0.3	0	10	9 (90.00)	7.50 <sup>a</sup> ±1.34	1.20 <sup>bc</sup> ±2.15	-
0	0.5	0	10	5 (50.00)	4.50 <sup>abc</sup> ±0.54	0.93 <sup>bc</sup> ±3.25	-
0	0	0.1	10	5 (50.00)	6.10 <sup>ab</sup> ±1.08	1.56 <sup>ab</sup> ±1.05	+
0	0	0.3	10	7 (70.00)	6.80 <sup>ab</sup> ±0.78	1.12 <sup>bc</sup> ±1.77	+
0	0	0.5	10	7 (70.00)	1.10 <sup>c</sup> ±0.97	0.46 <sup>c</sup> ±2.03	+

\*หมายเหตุ <sup>1/</sup> - ไม่เกิดแคลลัส

+ เกิดแคลลัส

<sup>2/</sup> ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของรากแก้วฮามาต้าเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (ก-ค) IAA ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง-ฉ) IBA ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช-ญ) และ NAA ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

### 4.3 การศึกษาหาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมในการชักนำข้อให้เกิดแคลลัสและยอด

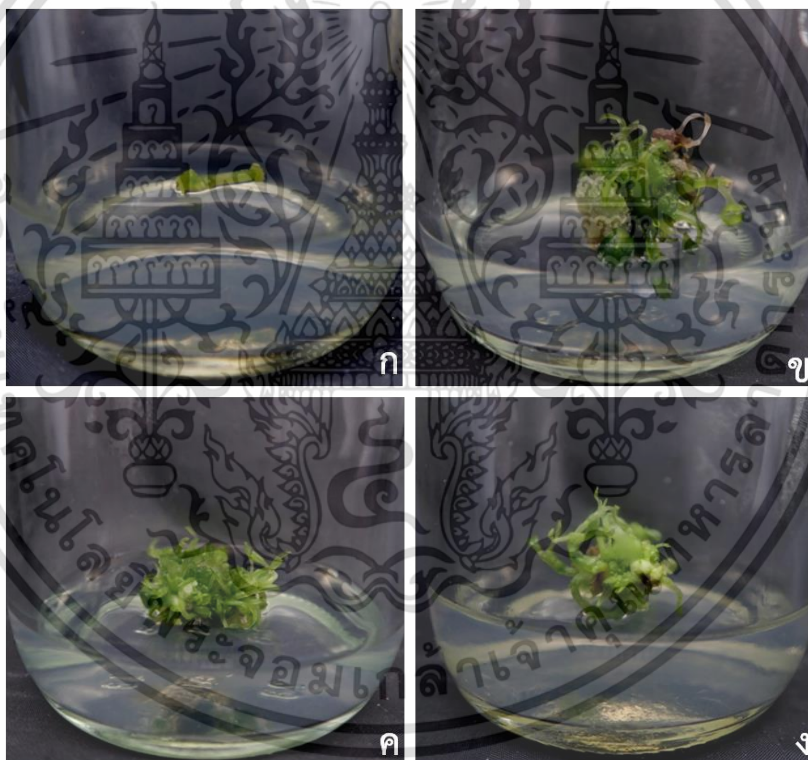
#### 4.3.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดที่เกิดยอดแล้ว นำแต่ละต้นมาตัดเฉพาะส่วนข้อ ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร (รูปที่ 4.7 ก) เมื่อนำชิ้นส่วนข้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนข้อสามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสและพัฒนาการเป็นต้นใหม่ ได้ทุกระดับความเข้มข้น จากการรายงานพบว่าเมื่อสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ใช้ร่วมกับ TDZ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดจากข้อในถั่วหัวช้าง (*Cicer arietinum* L.) ได้ดีกว่าการใช้ สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เพียงอย่างเดียว (Sharma and Amla, 1998) จากการทดลอง หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าข้อสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและยอด โดยสาร ควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดร้อยละ 100 จำนวนยอดและความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด คือ 6.67 ยอดต่อข้อ และความยาวยอดเฉลี่ย 0.52 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.7) (รูปที่ 4.7 ค) ลำต้น มีลักษณะเตี้ย โดยสาเหตุที่ความยาวของยอดลดลงน่าจะเกิดจาก TDZ ไปกระตุ้นการทำงานของ ไซโตไคนินในชิ้นเนื้อเยื่อมากเกินไปจนส่งผลต่อการยับยั้งความยาวของยอด ซึ่ง TDZ มีผลต่อ เมตาบอลิซึมของ cytokinin ในเซลล์พืช โดยพบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เปลี่ยนสภาพของ เนื้อเยื่อที่ต้องการ cytokinin มาเป็นสถานะที่สร้าง cytokinin ได้ด้วยตัวเอง (Huetteman and Preece, 1993) และผลยังไปในทางเดียวกับ วราภรณ์ (2552) ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสของถั่วลิมา (*Phaseolus lunatus*) เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ สามารถยับยั้งการสลายตัวของ cytokinin และทำให้แคลลัสของถั่ว ลิมาเจริญเติบโตในอาหารที่ไม่มี cytokinin และสอดคล้องกับรายงานของ Bui van Le (1999) ทำการติดตาม TDZ ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีในเนื้อเยื่อพบว่า TDZ สามารถอยู่ในสภาพ เดิมนานถึง 48 ชั่วโมง เมตาบอลิซึมที่สำคัญของ TDZ ในเซลล์พืชคือ อนุพันธ์ของกลูโคซิล (glucosyl) ซึ่งแสดงว่าการทำงานที่คล้าย cytokinin ของ TDZ นั้น ไม่ได้ถูกเปลี่ยนไปเป็น cytokinin ที่เป็น อนุพันธ์ของอะดีนีน และการที่ยอดที่ได้จากการชักนำของ TDZ มักไม่ยืดตัว จึงเป็นไปได้ว่า TDZ เข้า ไปรบกวนเมตาบอลิซึมของจิบเบอเรลลินด้วย (Murthy *et al.*, 1998) เช่นเดียวกับการทดลองเลี้ยง ส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยได้สูงสุด 3.8 ยอด มีความสูงเฉลี่ย 3.96 เซนติเมตร และยอดที่ได้จากการชักนำของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ มักไม่ยืดตัว (ไตรรัตน์, 2555)

ตารางที่ 4.7 ผลการชักนำข้อของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ให้เกิดแคลลัสและยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

IBA (มก./ล.)	TDZ (มก./ล.)	จำนวน ข้อ	จำนวน และร้อยละ การเกิดแคลลัส	จำนวนยอด เฉลี่ย/ข้อ	ค่าเฉลี่ย ความยาวยอด (ซม.)
0.5	1	40	40 (100)	4.00 <sup>b</sup> ±0.19	0.55 <sup>a</sup> ±0.36
0.5	3	40	40 (100)	6.67 <sup>a</sup> ±0.55	0.52 <sup>a</sup> ±0.33
0.5	5	40	40 (100)	3.06 <sup>b</sup> ±0.24	0.49 <sup>a</sup> ±0.29

\*หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's.



รูปที่ 4.7 ข้อถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ก) เมื่อเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ (ข) IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

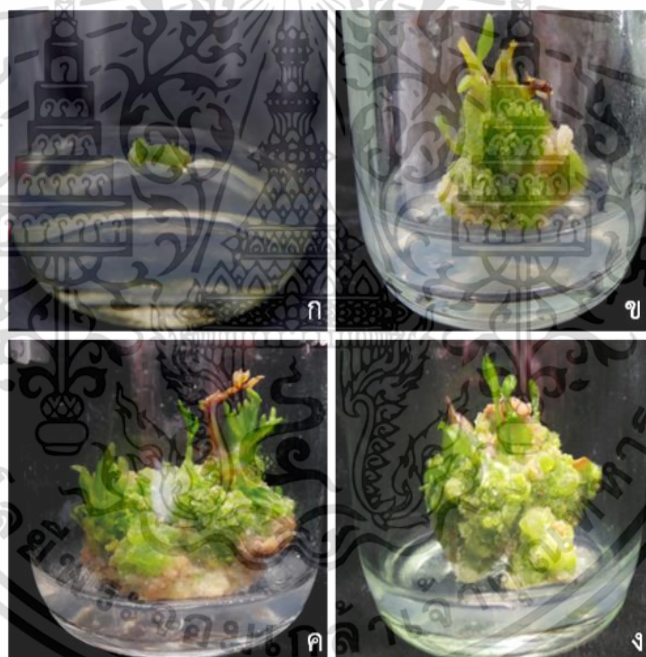
### 4.3.2 ถั่วฮามาต้า

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดที่เกิดยอดแล้ว นำแต่ละต้นมาตัดเฉพาะส่วนข้อ ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร (รูปที่ 4.8 ก) เมื่อนำขึ้นส่วนข้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าขึ้นส่วนข้อสามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสและพัฒนาการเป็นต้นใหม่ได้ ทุกระดับความเข้มข้น หลักจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ข้อมีการพัฒนาเป็นแคลลัส มีลักษณะแข็ง เกาะกันเป็นกลุ่มก้อน กลุ่มเซลล์มีสีเขียว และเป็นแคลลัสได้สมบูรณ์ทั้งขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สุพรรณณี (2532) กล่าวว่าเซลล์ที่ประกอบกันเป็นแคลลัสชนิดที่เป็น compact callus นี้ มักจะเป็นเซลล์ที่มีไซโทพลาสซึมเข้มข้น และมีออร์แกเนลหนาแน่น และแคลลัสชนิดนี้มักจะสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ง่าย โดยทั่วไปถ้าใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้นต่ำจะได้แคลลัสที่แน่น สีเขียว โดยในรายงานของ Hong (1995) เมื่อใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้นสูงจะได้แคลลัสที่มีสีเขียว แต่เมื่อเกิดเอ็มบริโอยอดของเอ็มบริโอจะมีขนาดเล็กและมีลักษณะชุ่มน้ำ จากการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสร้อยละ 100 เกิดยอดเฉลี่ยได้มากที่สุด คือ 13.5 ยอดต่อข้อ ความยาวยอดเฉลี่ย 1.03 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.8) (รูปที่ 4.8 ค) สอดคล้องกับ Lata *et al.* (2013) ทำการเพาะเลี้ยงขึ้นส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 1 3 5 7 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้นต่ำจะชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ จำนวนมากกว่าความเข้มข้นสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้นต่ำที่สุดคือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากที่สุดคือ 60.31 ยอดต่อขึ้น และงานวิจัยของ Knyazev *et al.* (2018) ได้ศึกษาการพัฒนาเป็นต้นใหม่จากแคลลัสที่พัฒนามาจากใบของ *Parasponia andersonii*planch โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นยอดเฉลี่ย 3.43 ยอดต่อขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 4.8 ผลการชักนำข้อของถั่วฮามาต้าให้เกิดแคลลัสและยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

IBA (มก./ล.)	TDZ (มก./ล.)	จำนวน ข้อ	จำนวน และร้อยละ การเกิดแคลลัส	จำนวนยอด เฉลี่ย/ข้อ	ค่าเฉลี่ย ความยาวยอด (ซม.)
0.5	1	40	40 (100)	2.25 <sup>c</sup> ±0.19	0.58 <sup>bc</sup> ±0.04
0.5	3	40	40 (100)	13.5 <sup>a</sup> ±0.14	1.03 <sup>a</sup> ±0.40
0.5	5	40	24 (60.00)	6.50 <sup>b</sup> ±0.06	0.71 <sup>b</sup> ±0.04

\*หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.8 ข้อถั่วฮามาต้าเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ก) เมื่อเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ (ข) IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย

##### 4.4.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

จากการนำเมล็ดของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน เมล็ดสามารถเจริญเป็นต้นอ่อนและมีใบเลี้ยงคู่ เมื่อนำใบเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.9 ก) ใบเลี้ยงสามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ทุกระดับความเข้มข้น โดยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D สามารถชักนำแคลลัสหรือร่วมกับไซโตไคนินได้ (Castillo. *et.al.*, 1998) และ Evan *et.al.* (1981) รายงานว่า 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยจะกระตุ้นกระบวนการแบ่งเซลล์ทำให้เซลล์ขยายขนาดจนเกิดเป็นก้อนแคลลัส

หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ใบเลี้ยงมีการพัฒนาเป็นแคลลัส ที่เกาะกันหลวม กลุ่มเซลล์มีสีเหลือง ฉ่ำน้ำ (Friable callus) และเป็นแคลลัสสมบูรณ์ได้ทั้งชิ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (รูปที่ 4.10 ก-ง) สูตรอาหารที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดแคลลัส 96.67 และน้ำหนักสดมากที่สุด 0.63 กรัม และสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ร้อยละ 97 (ตารางที่ 4.9) (รูปที่ 10 ข) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (รัตนภรณ์, 2554) ได้ศึกษาการเจริญของเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากส่วนของใบเลี้ยงของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 พบว่าสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และงานวิจัยของ Yuan *et.al.* (2011) ทำการชักนำใบเลี้ยงให้เกิดแคลลัสของ *Stylosanthes guianensis* cv. 'Reyan 2' บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดแคลลัส 74 แคลลัสมีลักษณะเป็นก้อนสีเหลือง (yellow granule) และ Godwin *et. al.* (1987) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสของถั่ว (*Stylosanthes scabra* Vog) จากส่วนใบโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 0.5-2 มิลลิกรัมต่อลิตร

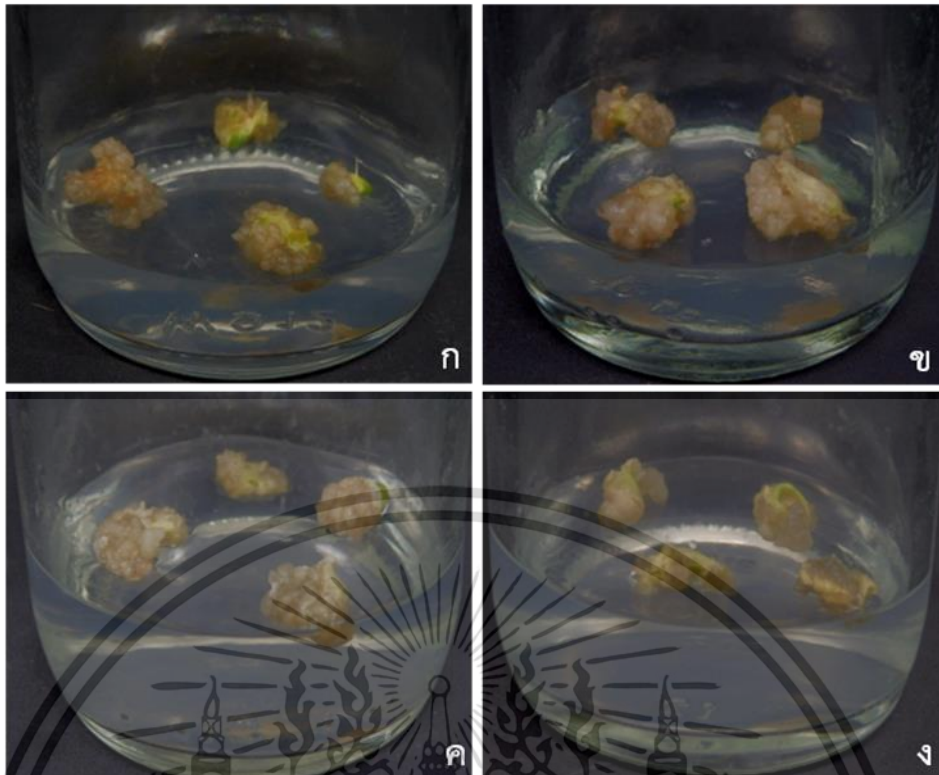
ตารางที่ 4.9 ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

2,4-D (มก./ล.)	จำนวน ใบเลี้ยง	จำนวนและร้อยละ การเกิดแคลลัส	น้ำหนักสดของแคลลัส (กรัม)
0.5	30	27 (90.00)	0.55 <sup>ab</sup> ±0.04
1	30	29 (96.67)	0.63 <sup>a</sup> ±0.05
3	30	28 (93.33)	0.62 <sup>a</sup> ±0.18
5	30	28 (93.33)	0.43 <sup>c</sup> ±0.06

\*หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.9 การชักนำแคลลัสจากส่วนของใบเลี้ยง (ก) ใบเลี้ยงถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) ลักษณะของแคลลัสสีน้ำตาลใส ฉ่ำน้ำ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (ค) ลักษณะของแคลลัสสีน้ำตาล แคลลัสที่เกาะกันแน่น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์



รูปที่ 4.10 ไบเลี่ยนถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 อายุ 7 วัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D (ก) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค) ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

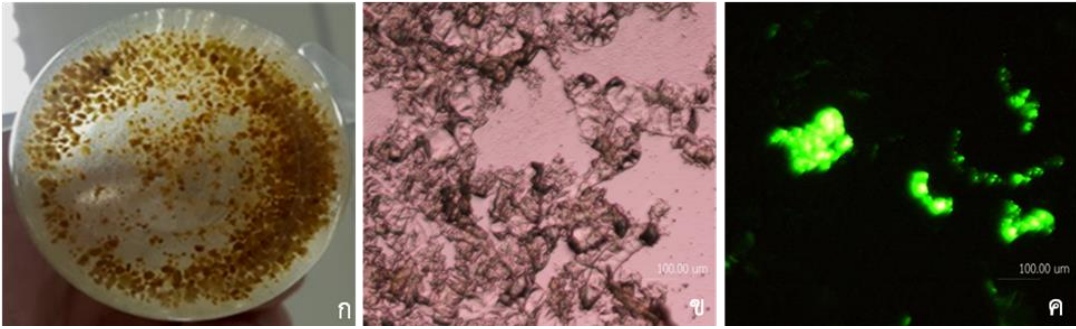
นำแคลลัสจากส่วนใบของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 จากการทดลอง 4.4.1 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ชั่งน้ำหนักสด 0.4 กรัม ทำการแยกแคลลัสโดยตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เซลล์จะหลุดออกเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาระยะการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่ว (ตารางที่ 4.10) และ (รูปที่ 4.11 ก) เซลล์จะเกาะกันเป็นกลุ่มขนาดเล็ก และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปลักษณะของเซลล์แขวนลอยจะเกาะกันเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ขึ้น แยกออกจากกันได้ง่าย และจากการหาค่าน้ำหนักสด (รูปที่ 4.12 ก) และค่าน้ำหนักแห้ง (รูปที่ 4.12 ข) ของเซลล์จากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่าเซลล์แขวนลอยของถั่วมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 9-21 วัน น้ำหนักสดเซลล์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งในระยะนี้เป็นช่วง log phase ซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกับงานวิจัยของ Poearim *et al.* (1996) รายงานว่าการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของข้าวสาลีพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร N6 ที่ประกอบด้วย 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวิธีหาค่าน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง พบว่าระยะ log phase อยู่ที่ช่วงเวลา 6-16 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์แขวนลอยเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเหมาะสำหรับนำเซลล์ไปเลี้ยงเป็นต้นใหม่และการแยกโพรโทพลาส จากการทดลองจะเข้าสู่ stationary phase 21-24 วัน และ death phase 27-30 วัน ในวันที่ 21 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงสุด 1.0691 กรัมต่อ 20 มิลลิลิตรของอาหาร และ 0.1148 กรัมต่อ 20 มิลลิลิตรของอาหาร ตามลำดับ อนุรักษ์ (2550) กล่าวว่าเซลล์ที่อยู่ในระยะ log phase เป็นช่วงที่เซลล์เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว เหมาะสำหรับนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ เช่น เปลี่ยนอาหารใหม่ หรือนำไปชักนำให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ เมื่อศึกษาเซลล์แขวนลอยที่อายุ 21 วัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Bright-field microscope จะเห็นเซลล์แขวนลอยมีรูปร่างกลมรี และเป็นท่อนยาวอยู่ปะปนกัน ลักษณะสีดำและสีใส เนื่องจากการทึบแสงของเซลล์แขวนลอยที่รวมกลุ่มซ้อนทับกัน (รูปที่ 4.11 ข) เซลล์แขวนลอยที่เห็นไม่สามารถบอกได้ชัดเจนว่ามีชีวิตหรือไม่จึงตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ไดอะซิติล พบว่าจำนวนเซลล์แขวนลอยที่มีชีวิตยังพบได้อยู่ในอาหาร แล้วมีเซลล์แขวนลอยที่ตายแล้วอยู่ปะปนในอาหาร เนื่องจากปกติเซลล์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์เอสเตอเรส (esterase) อยู่ภายในเซลล์ ดังนั้นเมื่อนำเซลล์แขวนลอยมาย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ไดอะซิติล สีนี้ จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เอสเตอเรสที่อยู่ภายในเซลล์แขวนลอย จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนต์ เซลล์แขวนลอยที่มีการเรืองแสงจะมีสีเหลือง-เขียว แสดงว่าเซลล์นั้นยังมีชีวิตอยู่ (รูปที่ 4.11 ค) แต่ถ้าเซลล์แขวนลอยไม่ติดสีแสดงว่าเป็นเซลล์แขวนลอยที่ไม่มีชีวิต

ตารางที่ 4.10 ค่าน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเซลล์แขวนลอยในแก้วท่าพระสโตโล CIAT 184 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 30 วัน

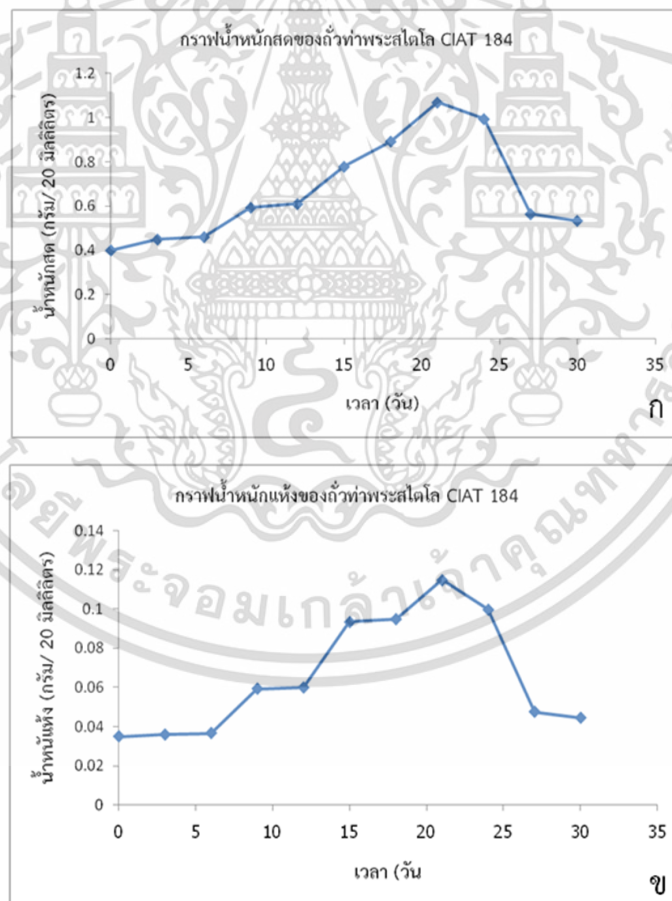
วัน	น้ำหนักสดเฉลี่ย (0.4 กรัม/ 20 มิลลิลิตร)	น้ำหนักแห้งเฉลี่ย (กรัม/ 20 มิลลิลิตร)
0	0.40000 <sup>e</sup> ±0.00	0.0349 <sup>e</sup> ±0.01
3	0.4494 <sup>de</sup> ±0.17	0.0358 <sup>e</sup> ±0.00
6	0.4604 <sup>de</sup> ±0.08	0.0366 <sup>e</sup> ±0.02
9	0.5935 <sup>d</sup> ±0.07	0.0593 <sup>c</sup> ±0.02
12	0.6099 <sup>d</sup> ±0.03	0.0599 <sup>c</sup> ±0.03
15	0.7786 <sup>c</sup> ±0.09	0.0934 <sup>ab</sup> ±0.01
18	0.8927 <sup>bc</sup> ±0.37	0.0949 <sup>ab</sup> ±0.03
21	1.0691 <sup>a</sup> ±0.14	0.1148 <sup>a</sup> ±0.01
24	0.9944 <sup>ab</sup> ±0.81	0.0997 <sup>ab</sup> ±0.04
27	0.5642 <sup>de</sup> ±0.00	0.0475 <sup>d</sup> ±0.02
30	0.5341 <sup>de</sup> ±0.01	0.0444 <sup>d</sup> ±0.01

\*หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ในสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) ลักษณะเซลล์แขวนลอยในขวดเพาะเลี้ยง (ข) ลักษณะของเซลล์แขวนลอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า เซลล์มีลักษณะ ยาว เป็นรูปท่อน (ค) เซลล์แขวนลอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 400 เท่า เซลล์ที่มีชีวิตเกิดสีเขียวเรืองแสงเมื่อย้อมด้วยสีฟลูออเรสซินไดอะซีเตต



รูปที่ 4.12 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ในสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) น้ำหนักสด (ข) น้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

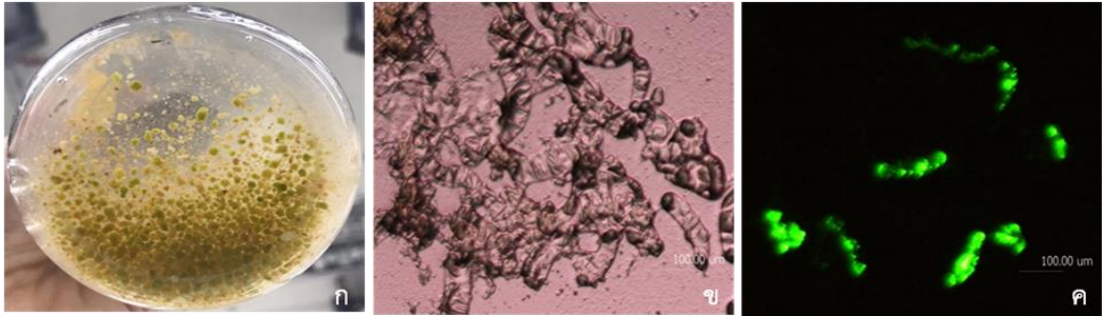
#### 4.4.2 ถั่วฮามาต้า

นำแคลลัสจากส่วนข้อของถั่วฮามาต้าจากการทดลอง 4.3.2 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ชั่งน้ำหนักสด 0.5 กรัม ทำการแยกแคลลัสโดยตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เซลล์จะหลุดออกเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการขยายตัวของเซลล์แขวนลอยของถั่ว พบว่าลักษณะของเซลล์แขวนลอยจะเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีเขียว เซลล์มีลักษณะกลม เกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่ (รูปที่ 4.13 ก) และจากการหาค่าน้ำสด (ตารางที่ 4.11) และ (รูปที่ 4.14 ก) และค่าน้ำหนักแห้ง (รูปที่ 4.14 ข) ของเซลล์จากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลาต่างๆ ในช่วง 0-9 วัน เซลล์แขวนลอยอยู่ในระยะ lag phase เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์แขวนลอยมีการเจริญต่อเนื่อง และมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 15-18 วัน ในระยะนี้เป็นช่วง log phase จากนั้นจะเข้าสู่ระยะ stationary phase 18-21 วัน และ death phase 27-30 วัน ในวันที่ 18 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงสุด 2.9469 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหาร และ 0.2742 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหาร ตามลำดับ จากการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์แขวนลอย โดยนำเซลล์แขวนลอยอายุ 18 วัน ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ bright-field microscope จะเห็นเซลล์แขวนลอยมีรูปร่างกลม กลมรี และเป็นท่อนยาวอยู่ปะปนกัน ลักษณะสีดำ (รูปที่ 4.13 ข) เซลล์ที่มีชีวิตเกิดสีเขียวเรืองแสงเมื่อย้อมด้วยสีฟลูออเรสซินไดอะซิเตต (รูปที่ 4.13 ค) Steward. et al. (1999) ทำการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์จากเอนไซม์เอสเตอเรสในเซลล์ พบว่าในถั่วอัลฟัลฟา (*Medicago sativa* L.) มีกิจกรรมเอนไซม์เอสเตอเรสภายในไซโตพลาสซึมที่จะสามารถย่อยสีฟลูออเรสซินไดอะซิเตตทำให้เกิดสีเขียวเรืองแสง

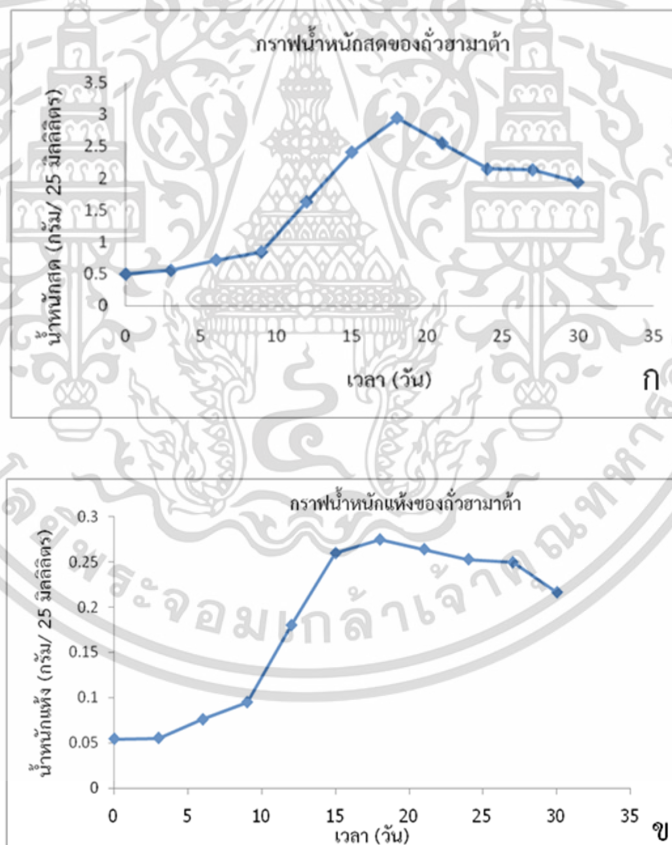
ตารางที่ 4.11 ค่าน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเซลล์แขวนลอยในถั่วฮามาต้าของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 30 วัน

วัน	น้ำหนักสดเฉลี่ย (0.5 กรัม/ 25 มิลลิตร)	น้ำหนักแห้งเฉลี่ย (กรัม/ 25 มิลลิตร)
0	0.5000 <sup>s</sup> ±0.000	0.0544 <sup>s</sup> ±0.00
3	0.559 <sup>fs</sup> ±0.25	0.0553 <sup>s</sup> ±0.00
6	0.7193 <sup>fs</sup> ±0.34	0.0758 <sup>f</sup> ±0.00
9	0.8455 <sup>f</sup> ±0.08	0.0948 <sup>e</sup> ±0.00
12	1.6329 <sup>e</sup> ±0.16	0.1798 <sup>d</sup> ±0.00
15	2.4107 <sup>bc</sup> ±0.84	0.2592 <sup>ab</sup> ±0.00
18	2.9469 <sup>a</sup> ±0.13	0.2742 <sup>a</sup> ±0.00
21	2.5525 <sup>b</sup> ±0.13	0.2635 <sup>ab</sup> ±0.00
24	2.1457 <sup>cd</sup> ±0.20	0.2524 <sup>b</sup> ±0.00
27	2.1343 <sup>c</sup> ±0.13	0.2491 <sup>b</sup> ±0.01
30	1.9400 <sup>d</sup> ±0.04	0.2160 <sup>c</sup> ±0.00

\*หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.13 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วฮามาต้าในสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) ลักษณะเซลล์แขวนลอยในขวดเพาะเลี้ยง (ข) ลักษณะของเซลล์แขวนลอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า เซลล์มีลักษณะกลม ยาว เป็นรูปท่อน (ค) เซลล์แขวนลอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่กำลังขยาย 400 เท่า เซลล์ที่มีชีวิตเกิดสีเขียวเรืองแสงเมื่อย้อมด้วยสียฟลูออเรสซินไดอะซิเตต



รูปที่ 4.14 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยของถั่วฮามาต้าในสูตรอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) น้ำหนักสด (ข) น้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.5 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยให้เจริญเป็นต้นใหม่

### 4.5.1 ถั่วฮามาต้า

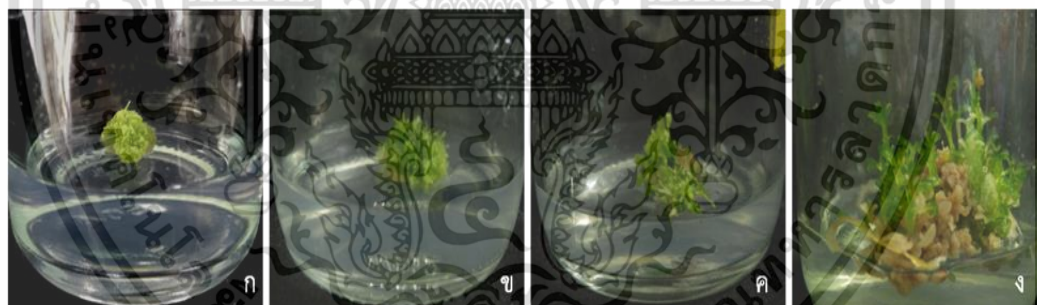
จากการนำแคลลัสถั่วฮามาต้าที่ได้จากการทดลอง 4.4.2 ให้พัฒนาเป็นต้นบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต  $mT$  และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าลักษณะการเจริญเติบโตของยอดจากแคลลัส 2 สัปดาห์แรก แคลลัสมีการขยายตัวและมีขนาดใหญ่ (รูปที่ 4.15 ก) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสสีเหลืองอ่อนมีการพัฒนาเกิดเป็นเซลล์สีเขียว (รูปที่ 4.15 ข) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (รูปที่ 4.15 ค) พบว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต  $mT$  แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นได้บนอาหารทุกสูตรโดยแคลลัสเริ่มมีการพัฒนาเกิดเป็นยอดจำนวนมากเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ (รูปที่ 4.15 ง) สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดคือ อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต  $mT$  ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดร้อยละ 100 เกิดยอดเฉลี่ยได้สูงสุด 5.35 ยอดต่อแคลลัส ความยาวยอดเฉลี่ย 0.85 เซนติเมตรต่อยอด (ตารางที่ 4.12 และ รูปที่ 4.16 ค) และยอดที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย นำมาเพาะเลี้ยงอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ (รูปที่ 4.17 ก-ข) ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้สำหรับการชักนำเซลล์แขวนลอยในถั่วฮามาต้าให้กลายเป็นยอด ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 7.33 ยอดต่อแคลลัส ยอดมีความสูงเฉลี่ย 0.49 เซนติเมตรต่อยอด (รัตนภรณ์, 2556) และชินษฐา (2547) ชักนำเซลล์แขวนลอยในถั่วฮามาต้าให้กลายเป็นยอด ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ร้อยละ 96 โดย  $mT$  เป็นไซโทไคนินชนิดใหม่มีคุณสมบัติช่วยชักนำให้เกิดยอดให้ได้จำนวนมาก และสามารถกระตุ้นการเกิดรากได้เช่นกัน (Mala. *et.al.*, 2013) โดยยังไม่มีรายงานในถั่ว

ส่วนสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ร้อยละ 85 เกิดยอดเฉลี่ย 0.50 ยอดต่อแคลลัส และความยาวยอดเฉลี่ย 0.06 เซนติเมตร และพบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้

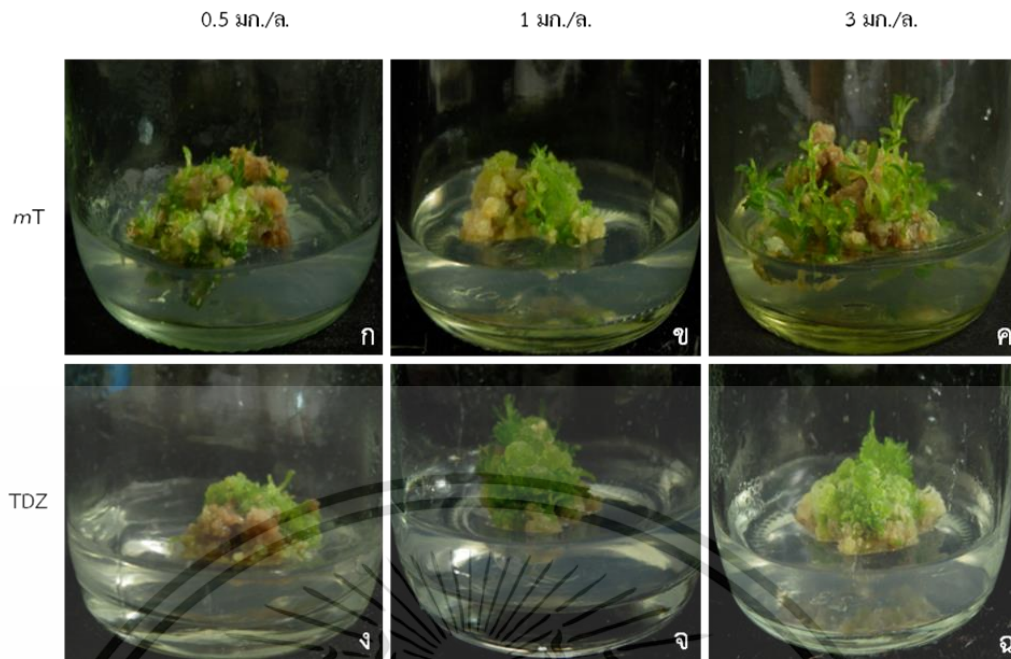
ตารางที่ 4.12 ผลการชักนำให้เกิดยอดอ่อนจากแคลลัสจากข้อของถั่วฮามาต้าบนอาหารสังเคราะห์ สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *mT* และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

<i>mT</i> (มก./ล.)	TDZ (มก./ล.)	จำนวนชิ้น แคลลัส	จำนวนและ ร้อยละ การเกิดยอด	จำนวนยอด เฉลี่ยต่อ แคลลัส	ค่าเฉลี่ยความ ยาวยอด (ซม.)
0.5	0	20	16 (80.00)	1.70 <sup>b</sup> ±1.01	0.15 <sup>b</sup> ±0.72
1	0	20	13 (65.00)	0.45 <sup>b</sup> ±0.35	0.10 <sup>bc</sup> ±0.06
3	0	20	20 (100)	5.35 <sup>a</sup> ±0.94	0.85 <sup>a</sup> ±0.05
0	0.5	20	6 (30.00)	0.10 <sup>b</sup> ±0.10	0.03 <sup>bc</sup> ±0.03
0	1	20	15 (85.00)	0.50 <sup>b</sup> ±0.31	0.06 <sup>bc</sup> ±0.03
0	3	20	0	0.00 <sup>b</sup> ±0.00	0.00±0.00

\*หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.15 แคลลัสของถั่วฮามาต้าเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *mT* ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ข) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ค) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ และ (ง) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์



รูปที่ 4.16 แคลลัสของกล้วยฮามาต้าเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (ก-ค) mT ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ง-ฉ) และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์



รูปที่ 4.17 กล้วยฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะรากมีสีขาว รากยาว แตกแขนง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.6 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของเมล็ด

##### 4.6.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

จากการนำเมล็ดฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0 5 10 15 20 30 และ 50 กิโลเรด เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าปริมาณรังสีที่ไปลดการเจริญเติบโตของพืช  $GR_{50(30)}$  และความอยู่รอด  $LD_{50(30)}$  มีค่าเท่ากับ 44.38 กิโลเรด และ 38.06 กิโลเรด (ตารางที่ 4.13) (รูปที่ 4.18) ซึ่งผลแนวโน้มไปในทางเดียวกับ สุระ (2547) ทำการฉายรังสีแกมมาเมล็ดถั่วเขียวพันธุ์ กำแพงแสน 1 ที่ 0 10 20 30 40 50 60 70 80 และ 100 กิโลเรด พบว่าปริมาณรังสีที่ไปลดการเจริญเติบโตของพืช  $GR_{50(15)}$  และความอยู่รอด  $LD_{50(30)}$  มีค่าเท่ากับ 46 กิโลเรด และ 45 กิโลเรด ดังนั้นปริมาณรังสีที่เหมาะสมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 ควรอยู่ในช่วงไม่เกิน 45-46 กิโลเรด และจากการทดลองยังพบว่าปริมาณรังสี 20 กิโลเรด มีค่าเฉลี่ยความยาวยอด สูงที่สุดคือ 12.67 เซนติเมตร ซึ่งผลไปทางเดียวกับงานวิจัยของ Beyaz *et.al.* (2016) ทำการศึกษา ถั่ว *Lathyrus chrysanthus* โดยนำเมล็ดฉายรังสีแกมมา 0 5 10 15 20 และ 25 กิโลเรด พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน รังสี 15 กิโลเรด มีร้อยละการงอก การเกิดยอด และการเกิดรากดีที่สุด ซึ่งผลของปริมาณรังสีต่ำอาจช่วยกระตุ้นกิจกรรมการสังเคราะห์โปรตีน (Abdel-Hady *et.al.*, 2008)

เมื่อระยะเวลาผ่านไป 30 วัน ปริมาณรังสี 30 กิโลเรด มีการงอกร้อยละ 71.67 มีค่าเฉลี่ยความยาวยอดและความยาวราก คือ 10.50 และ 10.27 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยปริมาณรังสี 50 กิโลเรด มีการงอกร้อยละ 46.67 ค่าเฉลี่ยความยาวต้นและความยาวราก คือ 6.29 และ 8.46 เซนติเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.19) ซึ่ง Chaomei and Yanlin (1993) รายงานว่า ปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้นการเจริญเติบโตของพืชจะลดลง มีรายงานว่า การฉายรังสีเมล็ดที่ปริมาณสูง รังสีแกมมาจะรบกวนการสังเคราะห์โปรตีน (Xiuzher, 1994) การลำเลียงน้ำในพืช การเปลี่ยนแปลงและการสังเคราะห์เอนไซม์ (Rabie *et.al.*, 1996) การผลิตฮอร์โมนที่ใช้ในการเจริญเติบโต และกรดอะซิติก อินโดลหรือ IAA (Chandorkar and Clark, 1986)

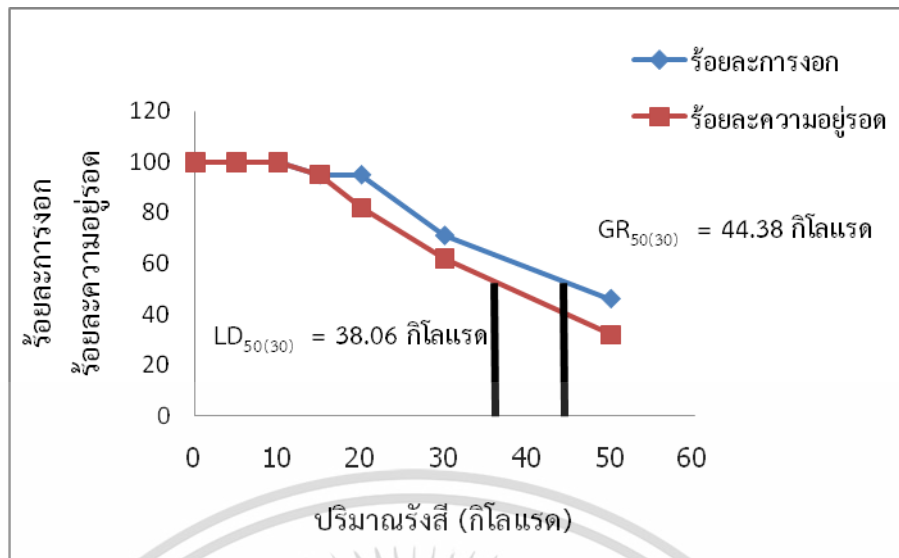
เมื่อทำการเปรียบเทียบเมล็ดที่ฉายรังสีในปริมาณต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตและอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.14) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน เมล็ดที่ปริมาณรังสี 30 กิโลเรด ที่เพาะเลี้ยงใน TDZ (รูปที่ 4.20 และ รูปที่ 4.21) สามารถรอดชีวิตได้มากกว่าอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และ TDZ ชักนำให้เกิดยอดหลายยอดบริเวณราก ทั้งนี้เป็นเพราะ TDZ เป็นสารควบคุมการเติบโตที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดยอดในพืชหลายชนิดรวมทั้งพืชตระกูลถั่ว (Wang *et.al.*, 2008) และ TDZ ยังช่วยเพิ่มปริมาณรังสี 50 กิโลเรดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS สามารถรอดชีวิตได้มากขึ้น (รูปที่ 4.22) พืชมีร้อยละการรอดชีวิตคือ 92.45

ตารางที่ 4.13 ผลของจำนวนรอดชีวิตของเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ร้อยละการงอก ร้อยละการเกิดยอดและราก และ ค่าเฉลี่ยความยาวยอดและรากหลังจากฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน

ปริมาณรังสี (Krad)	จำนวน เมล็ด	จำนวนและ ร้อยละ การงอก	จำนวนและ ร้อยละการ รอดชีวิต	จำนวนและ ร้อยละ การเกิดยอด	ค่าเฉลี่ย ความยาวยอด (ซม.)	จำนวนและ ร้อยละ การเกิดราก	ค่าเฉลี่ย ความยาวราก (ซม.)
0(control)	60	60 (100)	60 (100)	60 (100)	11.32 <sup>b</sup> ±0.17	60 (100)	11.09 <sup>a</sup> ±0.12
5	60	60 (100)	60 (100)	54 (90.00)	11.15 <sup>b</sup> ±0.14	60 (100)	10.81 <sup>ab</sup> ±0.07
10	60	60 (100)	60 (100)	50 (83.33)	11.10 <sup>b</sup> ±0.19	60 (100)	10.54 <sup>bc</sup> ±0.14
15	60	57 (95.00)	54 (94.73)	47 (82.45)	11.04 <sup>bc</sup> ±0.11	55 (96.49)	10.53 <sup>bc</sup> ±0.25
20	60	57 (95.00)	47 (82.45)	44 (77.19)	12.67 <sup>a</sup> ±0.22	55 (96.49)	10.40 <sup>bc</sup> ±0.05
30	60	43 (71.67)	27 (62.79)	30 (69.76)	10.50 <sup>d</sup> ±0.14	25 (58.13)	10.27 <sup>c</sup> ±0.07
50	60	28 (46.67)	9 (32.14)	13 (46.42)	6.29 <sup>e</sup> ±0.26	12 (42.85)	8.46 <sup>d</sup> ±0.18

\*หมายเหตุ 1/ ค่าเฉลี่ย ±SE แสดงจากการนับ 10 ซ้ำ

2/ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



รูปที่ 4.18 ความสัมพันธ์ระหว่างรังสีกับการงอก และความอยู่รอดของเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน



รูปที่ 4.19 การเจริญเป็นต้นจากเมล็ดของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 หลังจากฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

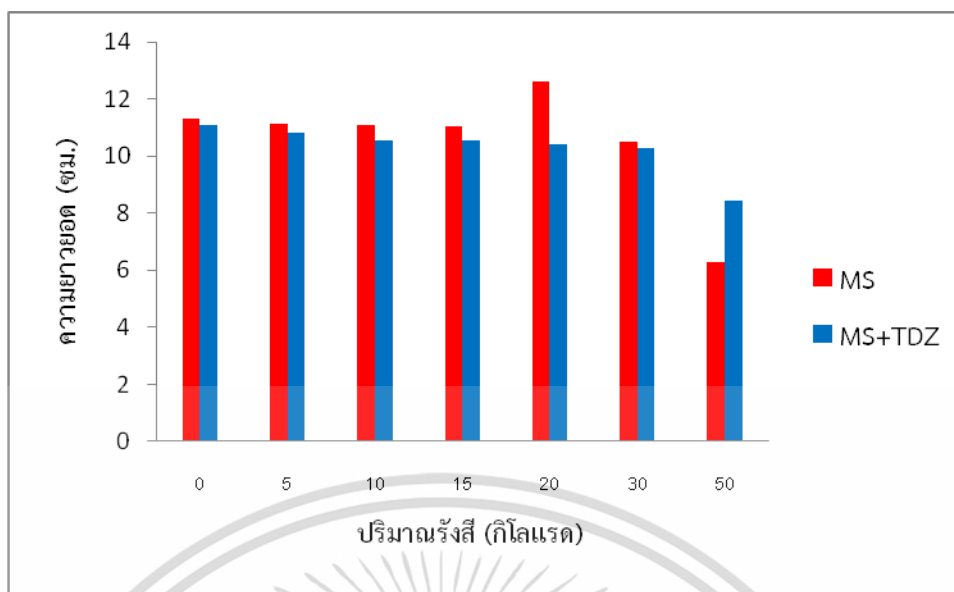
**ตารางที่ 4.14** ผลของจำนวนรอดชีวิตของเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ร้อยละการงอก ร้อยละการเกิดยอดและราก และ ค่าเฉลี่ยความยาวยอดและรากหลังจากฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน

ปริมาณรังสี (Krad)	จำนวน เมล็ด	จำนวนและ ร้อยละ การงอก	จำนวน และร้อยละ การรอด ชีวิต	จำนวนและ ร้อยละ การเกิดยอด	ค่าเฉลี่ย ความยาวยอด (ซม.)	จำนวนและ ร้อยละ การเกิดราก	ค่าเฉลี่ย ความยาวราก (ซม.)
TDZ3 (control)	60	60 (100)	60 (100)	60 (100)	3.66 <sup>b</sup> ±0.75	60 (100)	1.78 <sup>a</sup> ±0.05
5	60	60 (100)	60 (100)	60 (100)	3.74 <sup>b</sup> ±0.92	60 (100)	1.74 <sup>a</sup> ±0.41
10	60	60 (100)	60 (100)	60 (100)	3.71 <sup>b</sup> ±1.01	60 (100)	1.72 <sup>a</sup> ±1.40
15	60	60 (100)	60 (100)	60 (100)	4.49 <sup>a</sup> ±1.42	60 (100)	1.63 <sup>ab</sup> ±0.50
20	60	57 (95.00)	60 (100)	57 (100)	3.58 <sup>ab</sup> ±0.81	57 (100)	1.47 <sup>bc</sup> ±1.05
30	60	57 (95.00)	60 (100)	57 (100)	3.28 <sup>c</sup> ±1.64	57 (100)	1.35 <sup>c</sup> ±0.45
50	60	53 (88.33)	49 (92.45)	53 (100)	2.75 <sup>d</sup> ±1.23	53 (100)	1.28 <sup>c</sup> ±0.29

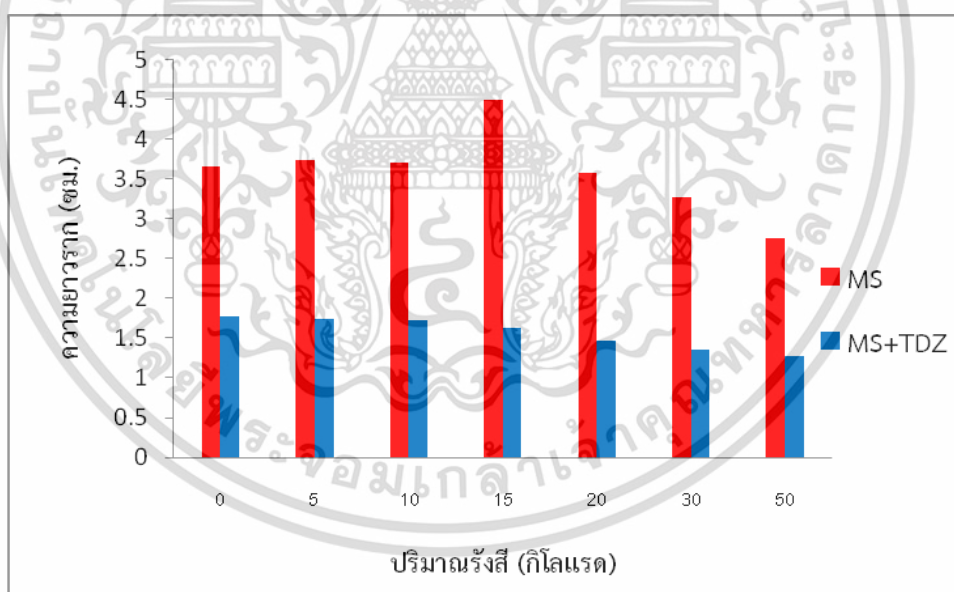
\*หมายเหตุ <sup>1</sup>/ ค่าเฉลี่ย ±SE แสดงจากการนับ 10 ซ้ำ

<sup>2</sup>/ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี

Duncan's

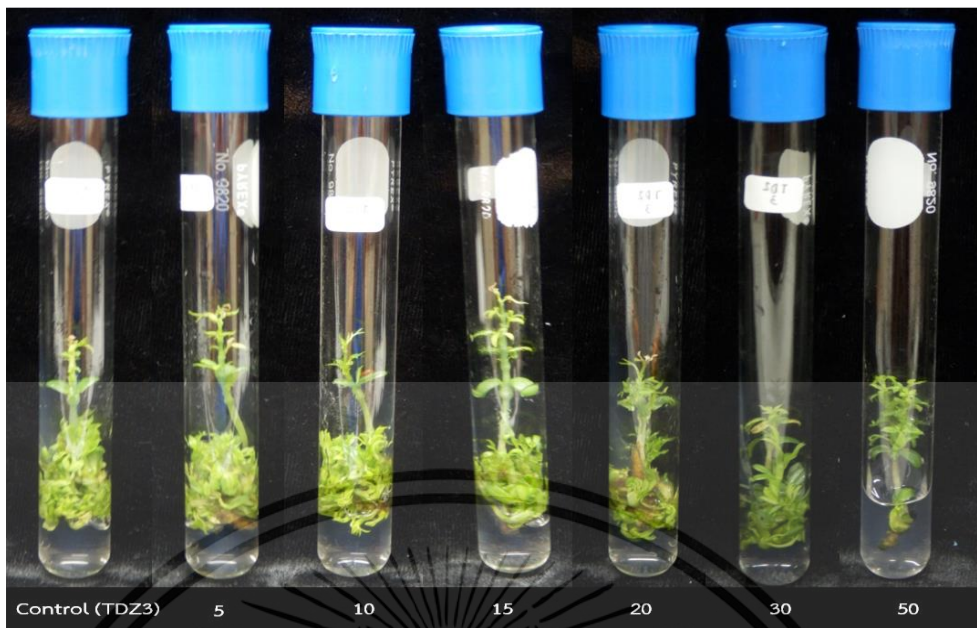


รูปที่ 4.20 แสดงความยาวยอดจากเมล็ดของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 หลังจากฉายรังสีแกมมาในปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน



รูปที่ 4.21 แสดงความยาวรากจากเมล็ดของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 หลังจากฉายรังสีแกมมาในปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.22 การเจริญเป็นต้นจากเมล็ดของข้าวท่าพระสไตโล CIAT 184 หลังจากฉายรังสีแกมมาในปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน

#### 4.6.2 ถั่วฮามาต้า

จากการนำเมล็ดฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0 5 10 15 20 25 30 และ 45 กิโลแตรต เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าเมล็ดที่ได้รับปริมาณรังสี 34.95 กิโลแตรตมีการงอกลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ( $GR_{50}$ ) (ตารางที่ 4.15) (รูปที่ 4.23) ซึ่งสอดคล้องกับ Kimno and Chepkoech (2014) ได้ทำการปรับปรุงพันธุ์ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) โดยนำเมล็ดฉายรังสีแกมมาที่ 0 20 40 และ 60 กิโลแตรต พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ เมล็ดข้าวฟ่างที่ได้รับปริมาณรังสี 40 กิโลแตรต มีการงอกลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาของ Beyaz *et.al.* (2016) ทำการศึกษาถั่ว (*Lathyrus chrysanthus*) โดยนำเมล็ดฉายรังสีแกมมา 0 5 10 15 20 และ 25 กิโลแตรต พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ เมล็ดที่ได้รับรังสี 25 กิโลแตรต ทำให้ร้อยละการงอก ความยาวต้น และความยาวรากลดลงและยังส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงด้วย Chaomei and Yanlin (1993) กล่าวว่าร้อยละการงอกของเมล็ดจะลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น โดยทั่วไปค่าร้อยละการอยู่รอดลดลงเมื่อได้รับปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น ความทนทานต่อปริมาณรังสียังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ เช่นในเมล็ดลำไยที่ได้รับรังสีแกมมาปริมาณ 6 กิโลแตรต พบว่าต้นกล้าในแปลงอายุ 16 เดือนของพันธุ์ตอและพันธุ์ชมพูมีร้อยละการอยู่รอดน้อยกว่าพันธุ์แก้วและพันธุ์เปี้ยวเขียว (ประภาพร, 2538) ต้นกล้าถั่วเขียวพันธุ์ กพส 1 มีร้อยละการอยู่รอดสูงกว่าต้นกล้าพันธุ์ มทส 1 และพันธุ์ชยันนาท 1 เมื่อเมล็ดได้รับรังสีแกมมาปริมาณ 60 กิโลแตรต (บัณฑิต, 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

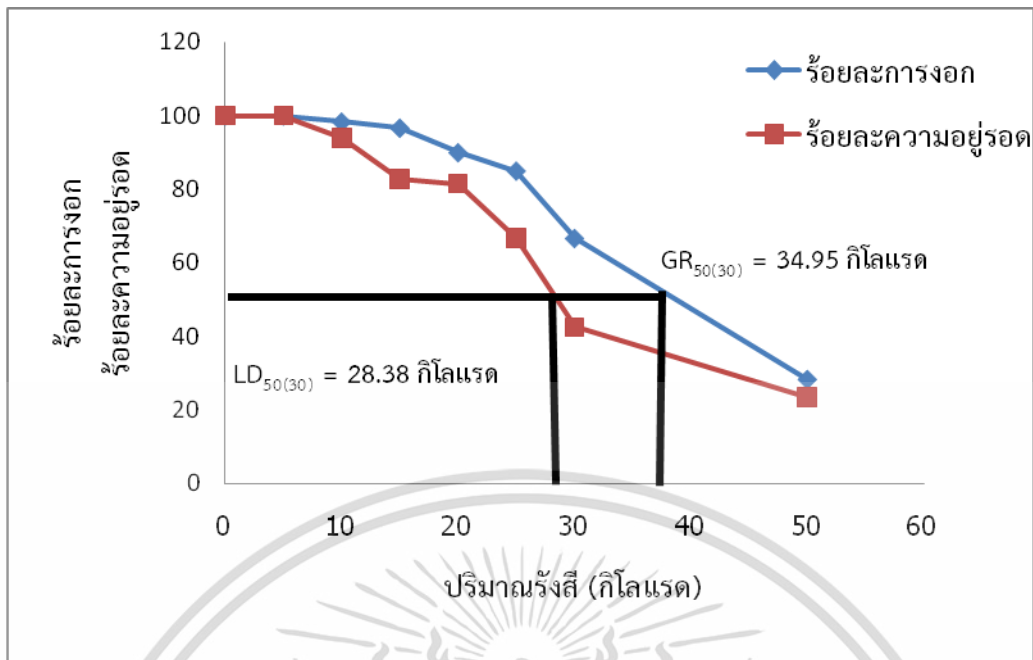
เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน ค่า  $LD_{50(30)}$  มีค่าเท่ากับ 28.38 กิโลแตร (รูปที่ 4.23 และ รูป 4.24) พบว่าเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นคือ รังสี 30 และ 45 กิโลแตร ความยาวยอดและความยาวรากลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งผลเป็นไปในทางเดียวกับ Cheema and Atta (2003) ทำการเพาะเลี้ยงข้าว 3 สายพันธุ์ คือ Basmati 370 Basmati Pak และ Super Basmati ฉายรังสีเมล็ด 15 20 25 และ 30 กิโลแตร พบว่าความอยู่รอด  $LD_{50}$  มีค่าเท่ากับ 24 23 และ 22 กิโลแตร ตามลำดับ พบว่าปริมาณรังสี 20 และ 25 กิโลแตร ซึ่งเป็นปริมาณรังสีที่สูงที่ให้ให้ค่าการตายพันธุ์สูงสุด เช่นเดียวกับ สุมนา และคณะ (2555) ปรับปรุงถั่วเขียวพันธุ์ชยันนาท 84-1 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา ปริมาณรังสี 50 กิโลแตร ทำให้ถั่วเขียวให้มีผลผลิตสูง ขนาดเมล็ดใหญ่เหมาะสำหรับการแปรรูปเป็น วุ้นเส้นและถั่วงอก และ Rajarajanc *et.al.* (2016) ทำการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการนำเมล็ดข้าวฉายรังสี 0 15 20 25 30 และ 35 กิโลแตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์  $LD_{50(2)}$  มีค่าเท่ากับ 30 กิโลแตร

เมื่อทำการเปรียบเทียบเมล็ดที่ฉายรังสีในปริมาณต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตและอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *mT* ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน เมล็ดในปริมาณรังสี 25 30 และ 50 กิโลแตร ที่เพาะเลี้ยงใน *mT* (ตารางที่ 4.16) สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *mT* ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าเฉลี่ยความยาวยอด (รูปที่ 4.25) และค่าเฉลี่ยความยาวราก (รูปที่ 4.26) เพิ่มขึ้น ทำให้พืชสามารถรอดชีวิตได้มากขึ้นถึงแม้พืชจะถูกฉายรังสีในปริมาณรังสีที่สูง (รูปที่ 4.27)

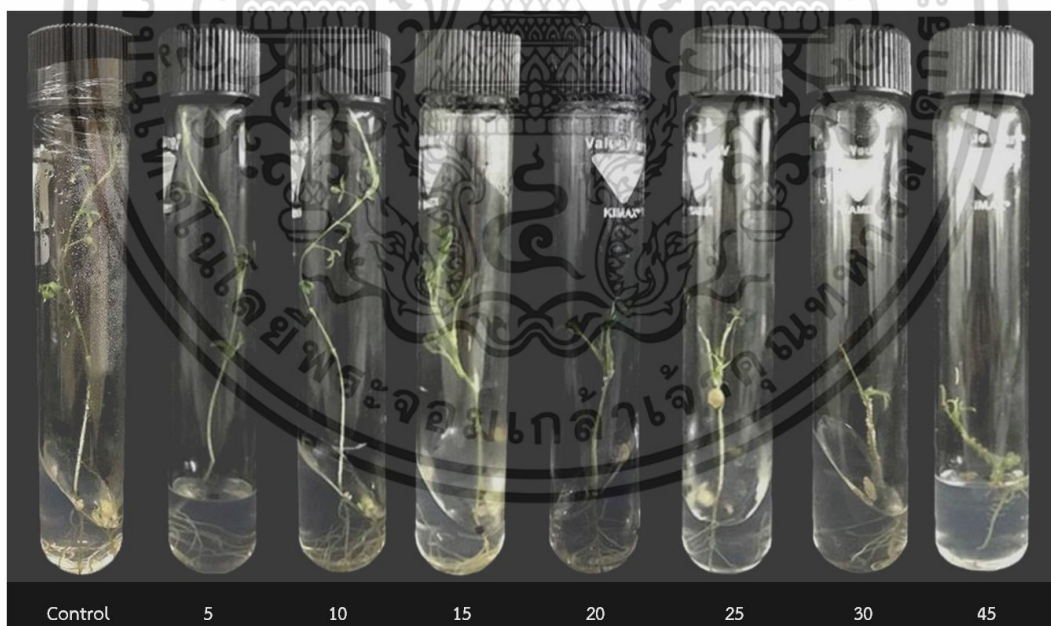
ตารางที่ 4.15 ผลของจำนวนรอดชีวิตของเมล็ดถั่วฮามาต้า ร้อยละการงอก ร้อยละการเกิดยอดและรากเฉลี่ย และ ค่าเฉลี่ยความยาวยอดและรากหลังจากฉายรังสีแกมมา ที่ปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน

ปริมาณรังสี (Krad)	จำนวน เมล็ด	จำนวนและ ร้อยละ การงอก	จำนวนและ ร้อยละ การรอดชีวิต	จำนวนและ ร้อยละ การเกิดยอด	ค่าเฉลี่ย ความยาวยอด (ซม.)	จำนวนและ ร้อยละ การเกิดราก	ค่าเฉลี่ยความ ยาวราก (ซม.)
0(control)	60	60 (100)	60 (100)	60 (100)	6.80 <sup>a</sup> ±0.70	60 (100)	5.46 <sup>a</sup> ±0.10
5	60	60 (100)	60 (100)	55 (91.67)	6.25 <sup>b</sup> ±0.66	38 (63.33)	3.44 <sup>b</sup> ±0.35
10	60	59 (98.33)	56 (93.91)	37 (62.71)	4.23 <sup>c</sup> ±0.40	37 (62.71)	3.48 <sup>b</sup> ±0.15
15	60	58 (96.67)	48 (82.75)	31 (53.44)	3.67 <sup>d</sup> ±0.52	33 (56.89)	3.11 <sup>b</sup> ±0.75
20	60	54 (90.00)	44 (81.48)	28 (51.85)	3.53 <sup>d</sup> ±0.50	25 (46.29)	2.57 <sup>c</sup> ±1.27
25	60	51 (85.00)	34 (66.67)	23 (45.09)	3.10 <sup>e</sup> ±1.10	11 (21.56)	1.14 <sup>d</sup> ±0.65
30	60	40 (66.67)	17 (42.50)	13 (32.50)	2.14 <sup>f</sup> ±1.45	8 (20.00)	1.12 <sup>d</sup> ±0.64
45	60	17 (28.33)	4 (23.52)	3 (17.64)	1.14 <sup>g</sup> ±0.57	2 (11.76)	0.50 <sup>e</sup> ±0.56

\*หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan' s



รูปที่ 4.23 ความสัมพันธ์ระหว่างรังสีกับการงอก และความอยู่รอดของเมล็ดถั่วฮามาต้าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน



รูปที่ 4.24 การเจริญเป็นต้นจากเมล็ดของถั่วฮามาต้าหลังจากฉายรังสีแกมมาในปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

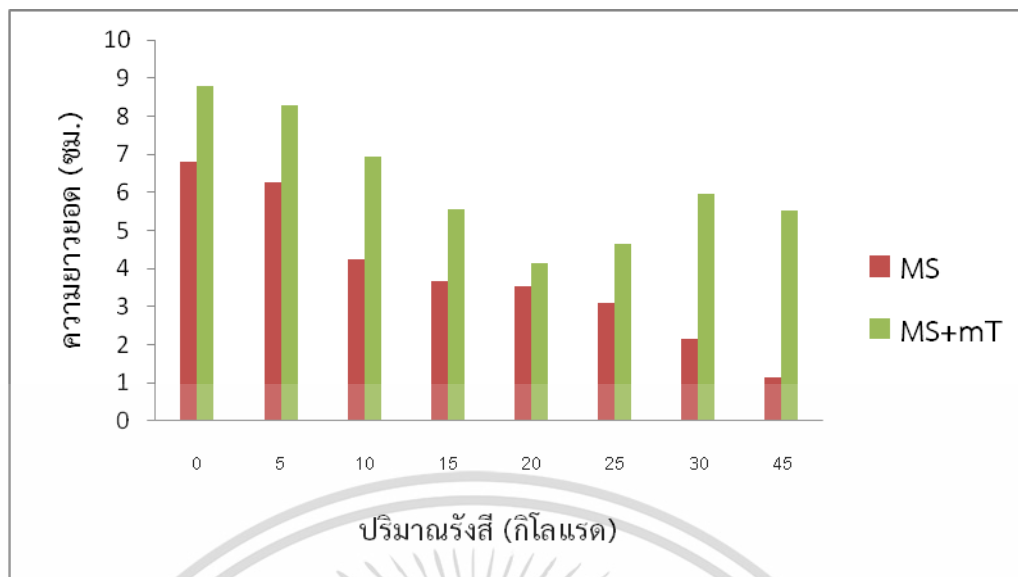
**ตารางที่ 4.16.** ผลของจำนวนรอดชีวิตของเมล็ดถั่วฮามาต้า ร้อยละการงอก ร้อยละการเกิดยอดและรากเฉลี่ย และ ค่าเฉลี่ยความยาวยอดและรากหลังจากฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *mT* ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน

ปริมาณรังสี (Krad)	จำนวน เมล็ด	จำนวนและ ร้อยละ การงอก	จำนวนและ ร้อยละการ รอดชีวิต	จำนวนและ ร้อยละ การเกิดยอด	ค่าเฉลี่ยความ ยาวยอด (ซม.)	จำนวนและ ร้อยละ การเกิดราก	ค่าเฉลี่ย ความยาว ราก (ซม.)
<i>mT3</i> (control)	60	60 (100)	60 (100)	60 (100)	8.80 <sup>a</sup> ±1.44	60 (100)	3.51 <sup>a</sup> ±1.15
5	60	60 (100)	60 (100)	56 (93.33)	8.29 <sup>a</sup> ±0.05	35 (58.33)	2.06 <sup>b</sup> ±0.35
10	60	59 (98.33)	59 (98)	46 (77.96)	6.95 <sup>b</sup> ±0.60	38 (64.40)	2.25 <sup>b</sup> ±1.12
15	60	58 (96.67)	51 (85)	37 (63.79)	5.55 <sup>c</sup> ±1.27	40 (68.96)	2.43 <sup>b</sup> ±0.75
20	60	59 (98.33)	48 (80)	28 (47.45)	4.14 <sup>d</sup> ±1.25	40 (67.79)	2.36 <sup>b</sup> ±1.52
25	60	57 (95.00)	47 (78)	30 (52.63)	4.64 <sup>d</sup> ±0.70	38 (66.67)	2.32 <sup>b</sup> ±0.11
30	60	49 (81.66)	31 (52)	28 (57.14)	5.95 <sup>c</sup> ±0.50	45 (91.83)	3.26 <sup>a</sup> ±0.30
45	60	34 (56.67)	30 (50)	21 (61.72)	5.52 <sup>c</sup> ±0.26 <sup>c</sup>	22 (64.40)	3.21 <sup>b</sup> ±0.35

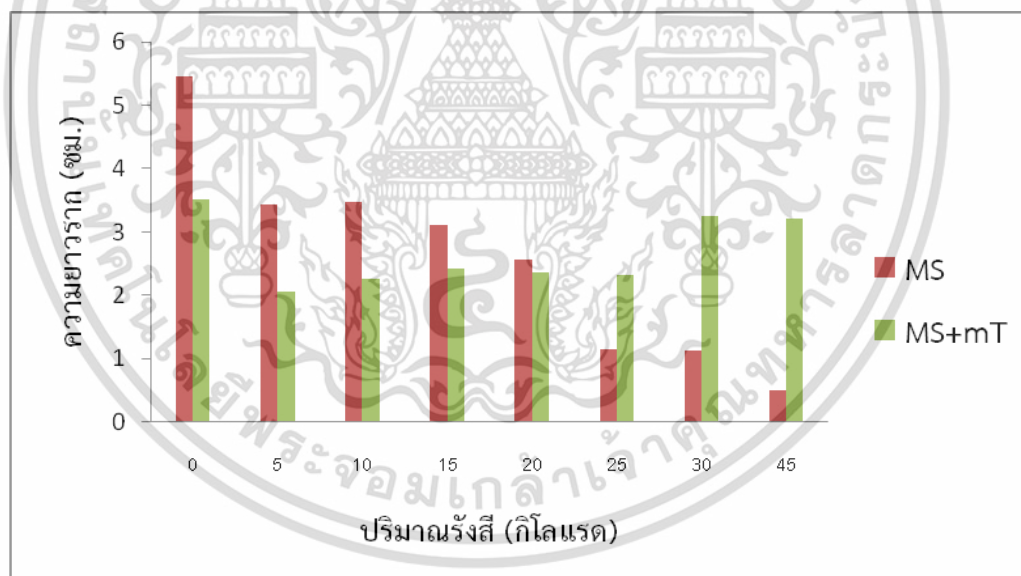
\*หมายเหตุ <sup>1/</sup> ค่าเฉลี่ย ±SD แสดงจากการนับ 10 ซ้ำ

<sup>2/</sup>ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี

Duncan's

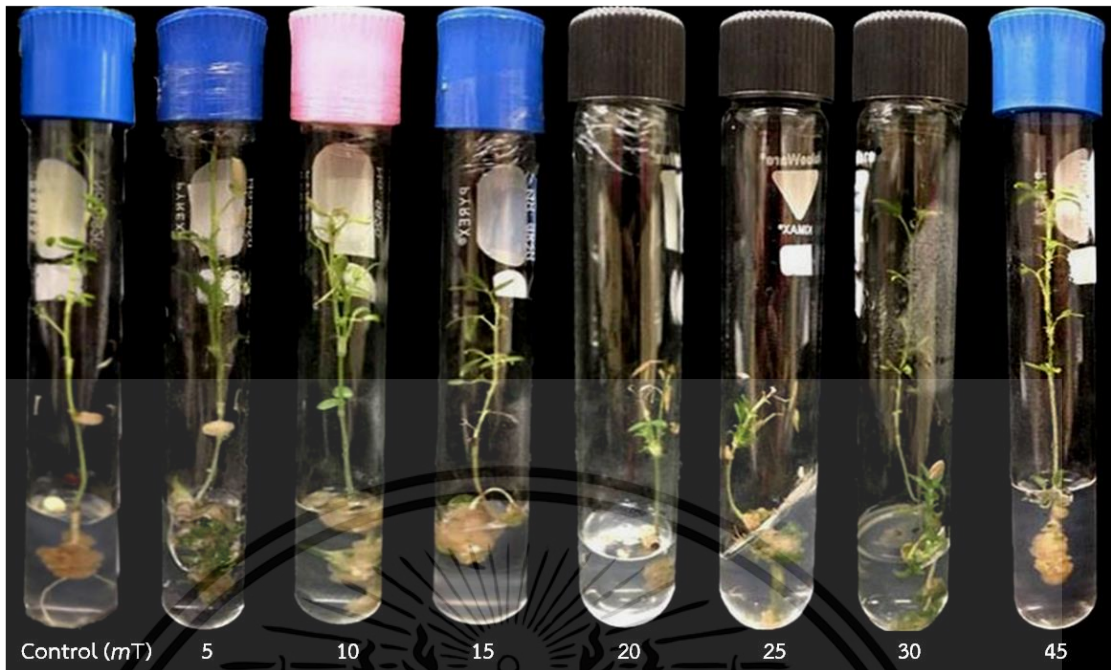


รูปที่ 4.25 แสดงความยาวยอดจากเมล็ดของถั่วฮามาต้า หลังจากฉายรังสีแกมมาในปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต  $mT$  ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน



รูปที่ 4.26 แสดงความยาวรากเมล็ดของถั่วฮามาต้า หลังจากฉายรังสีแกมมาในปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต  $mT$  ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.27 การเจริญเป็นต้นจากเมล็ดของข้าวฮามาต้าหลังจากฉายรังสีแกมมาในปริมาณรังสีต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต  $mT$  ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.7 การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของแคลลัส

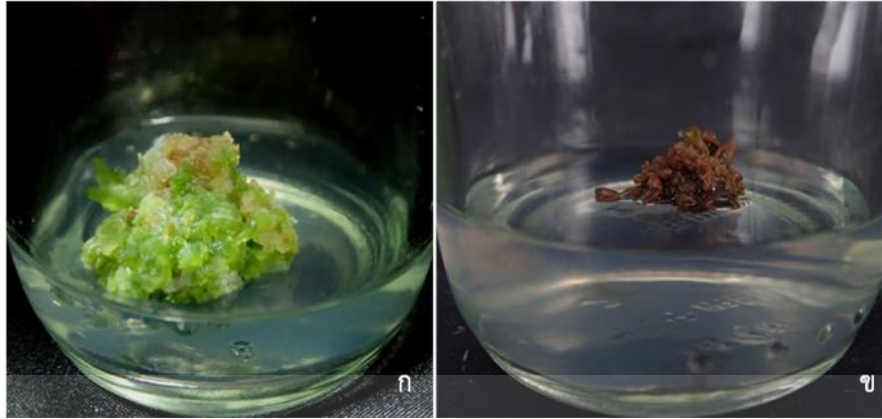
### 4.7.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

จากการนำแคลลัสฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0 2 4 6 8 และ 10 กิโลแตร แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่ได้รับปริมาณรังสี 8.0 6.91 และ 6.12 กิโลแตร มีการรอดชีวิตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ( $LD_{50}$ ) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.17) และ (รูปที่ 4.29) ร้อยละการรอดชีวิตของแคลลัสจะลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ รัตนภรณ์ (2556) ได้ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ถั่วอาหารสัตว์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ร่วมกับการฉายรังสีแกมมา นำแคลลัสถั่วควาเคดฉายรังสีในปริมาณต่างๆ คือ 0 2 4 6 8 10 กิโลแตร พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ แคลลัสมีการรอดชีวิตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ปริมาณรังสี 8 6 และ 5 กิโลแตร โดยร้อยละการรอดชีวิตของแคลลัสจะลดลงเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้น จากการทดลองแคลลัสที่ไม่สามารถอยู่รอดได้จะเปลี่ยนเป็นสีดำและตายในที่สุด (รูปที่ 4.28 ข) ค่า  $LD_{50}$  ที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับผลของการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันและเรื้อรังต่อเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงแฟก มีค่า  $LD_{50(60)}$  เท่ากับ 4.1 กิโลแตร (สิรินธร, 2556) และหญ้าอื่นๆ เช่น แคลลัสของหญ้าเนเปียร์แคระ (*Pennisetum purpureum*) มีค่า  $LD_{50}$  เท่ากับ 1.06 กิโลแตร (จันทกานต์, 2544) หรือในแคลลัสของหญ้าอะตราตัม (*Aspalum atratum*. Swallen) มีค่า  $LD_{50}$  เท่ากับ 2.2 กิโลแตร (ธนภักษ์, 2545) ที่เป็นเช่นนี้ อาจเนื่องจากปริมาณรังสีมีผลทำให้พืชมีร้อยละการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ขนาดของนิวเคลียส จำนวนและขนาดของโครโมโซม ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดของเซลล์ เป็นต้น (Sparrow *et.al.*, 1963) โดยแคลลัสที่ได้รับรังสีปริมาณ 10 กิโลแตร จะไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ สอดคล้องกับ Gaul (1977) ที่พบว่าแคลลัสที่ได้รับรังสีในปริมาณที่สูง เซลล์จะหยุดการเจริญเติบโต จากการทดลองแคลลัสที่ได้รับรังสีปริมาณ 6 กิโลแตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ แคลลัสจะสามารถพัฒนาเกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 7.60 ยอดต่อแคลลัส (ตารางที่ 4.17) (รูปที่ 4.30 ง) ยอดที่พัฒนามาจากแคลลัสที่รอดชีวิตจากการฉายรังสีแกมมานี้ สามารถพบความแปรปรวนในลักษณะสัณฐานวิทยา ได้แก่ ต้นเตี้ยแคระแกรน (รูปที่ 4.30 ข-ค) และยอดที่ได้จากการฉายรังสีแกมมา นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายอดที่พัฒนาจากแคลลัสที่ฉายรังสีที่ปริมาณรังสี 2 4 และ 6 กิโลแตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ลักษณะรากมีสีขาว รากสั้น (รูปที่ 4.31) ซึ่ง Kovalchuk *et.al.* (2007) กล่าวว่ารังสีมีผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนา ถ้าให้รังสีในปริมาณต่ำก็จะกระตุ้นการเจริญเติบโตและการพัฒนาแต่ถ้าได้รับปริมาณรังสีสูงขึ้นจะเกิดความเสียหายได้

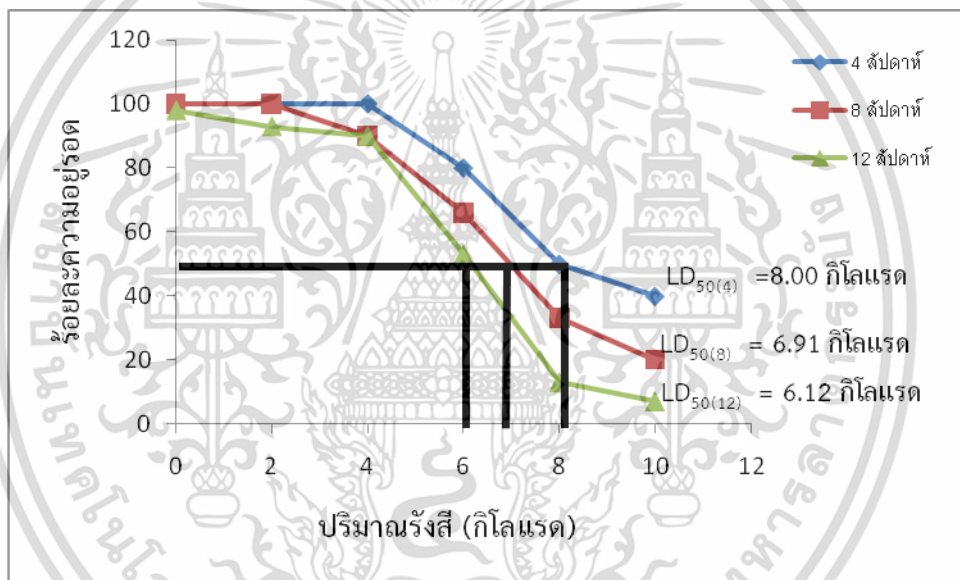
ตารางที่ 4.17 ผลของจำนวนรอดชีวิตของแคล์สของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และ ค่าเฉลี่ยความยาวยอดหลังจากฉายรังสีแกมมาที่ ปริมาณรังสีต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

ปริมาณรังสี (Krad)	จำนวนและร้อยละ การรอดชีวิต		จำนวนและร้อยละ การเกิดยอด		จำนวนยอดเฉลี่ย/แคล์ส		ค่าเฉลี่ยความยาวยอด (ซม.)	
	0 สัปดาห์	12 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์
0	30	30 (100)	30 (100)	30 (100)	6.40 <sup>a</sup> ±0.87	7.80 <sup>a</sup> ±0.83	0.41 <sup>a</sup> ±0.06	1.14 <sup>a</sup> ±0.05
2	30	28 (93.33)	18 (64.28)	26 (92.85)	3.20 <sup>b</sup> ±0.58	1.20 <sup>c</sup> ±0.20	0.46 <sup>a</sup> ±0.49	0.85 <sup>b</sup> ±0.13
4	30	27 (90.00)	16 (59.25)	25 (92.59)	4.20 <sup>b</sup> ±0.73	5.80 <sup>b</sup> ±0.48	0.51 <sup>a</sup> ±0.49	0.65 <sup>b</sup> ±0.05
6	30	16 (53.33)	3 (18.78)	10 (62.50)	0.40 <sup>c</sup> ±0.40	7.60 <sup>a</sup> ±0.50	0.10 <sup>b</sup> ±0.10	0.84 <sup>b</sup> ±0.08
8	30	4 (13.33)	0	1 (25.00)	0.0 <sup>c</sup> ±0.00	0.40 <sup>c</sup> ±0.40	0.00 <sup>b</sup> ±0.00	0.10 <sup>c</sup> ±0.10
10	30	2 (6.67)	0	1 (50.00)	0.0 <sup>c</sup> ±0.00	0.80 <sup>c</sup> ±0.80	0.00 <sup>b</sup> ±0.00	0.11 <sup>c</sup> ±0.11

\*หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

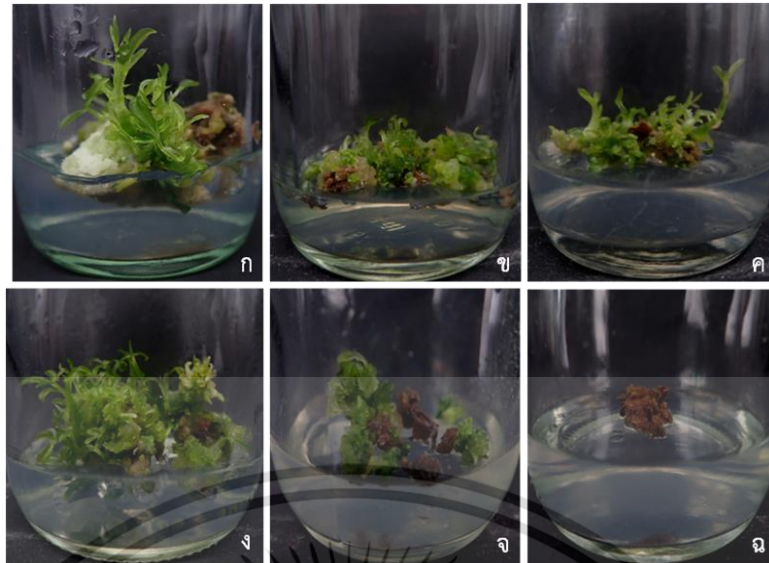


รูปที่ 4.28 (ก) ลักษณะแคลลัสที่รอดชีวิตหลังจากผ่านการฉายรังสี (ข) ลักษณะแคลลัสที่ตายหลังจากการผ่านฉายรังสี



รูปที่ 4.29 การรอดชีวิตของแคลลัสถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 หลังได้รับรังสีแกมมาปริมาณรังสีต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.30 การเกิดยอดจากแคลลัสของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากที่ผ่านมาการฉายรังสีปริมาณรังสีที่ต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ก) ไม่ผ่านการฉายรังสี (ต้นควบคุม) (ข) การฉายรังสี 2 กิโลแตร (ค) การฉายรังสี 4 กิโลแตร (ง) การฉายรังสี 6 กิโลแตร (จ) การฉายรังสี 8 กิโลแตร และ (ฉ) ผ่านการฉายรังสี 10 กิโลแตร



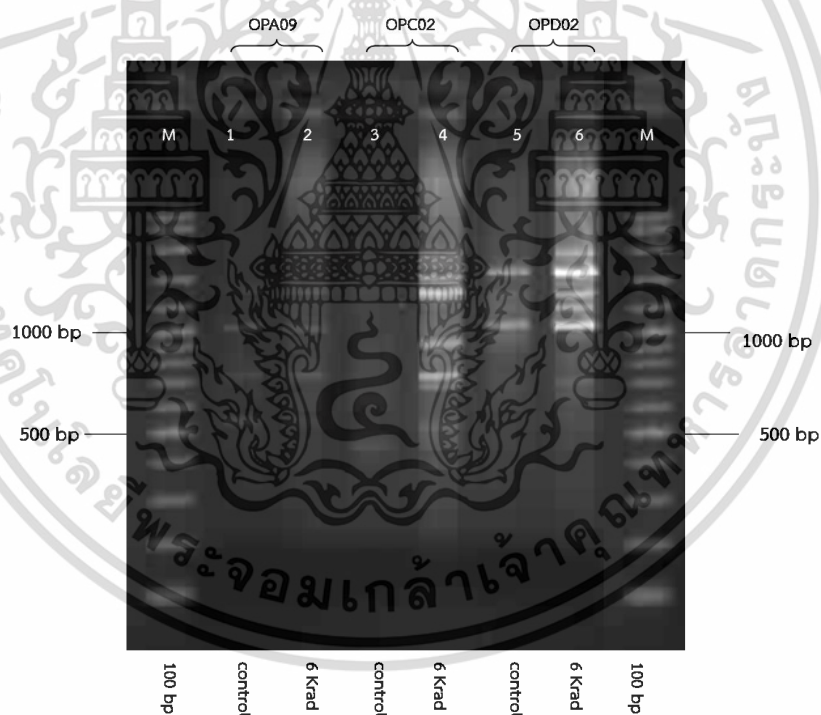
รูปที่ 4.31 ต้นถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่พัฒนามาจากแคลลัส (ก) การฉายรังสี 2 กิโลแตร (ข) การฉายรังสี 4 กิโลแตร และ (ค) การฉายรังสี 6 กิโลแตร นำมาชักนำให้เกิดรากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะรากมีสีขาว ราก สั้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีเอ็นเอที่กล่าวทำพระสไตโล CIAT 184 จากการคัดเลือกคูไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการการคัดเลือกโคลนต้นกล้าทำพระสไตโล CIAT 184 ที่ผ่านการฉายรังสีที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นที่ไม่ผ่านการฉายรังสีหรือต้นควบคุม (Control) จำนวน 1 ต้น คือที่ปริมาณรังสี 6 กิโลเรต เมื่อนำโคลนที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุมและต้นควบคุมมาสกัดดีเอ็นเอ ใช้ไพรเมอร์จำนวน 30 คูไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.1) หลังการตรวจสอบลักษณะแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างไปจากต้นควบคุมมีไพรเมอร์จำนวน 2 ชนิด คือ OPC02 และ OPD02 (ตารางที่ 4.18) แต่ละคูไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ปรากฏแถบดีเอ็นเอหลายลักษณะ เช่น คูไพรเมอร์ OPA09 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่าง (monomorphic bands) ระหว่างต้นที่ไม่ผ่านการฉายรังสีและต้นที่ผ่านการฉายรังสี (รูปที่ 4.32) คูไพรเมอร์ OPC02 แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งขนาดขั้นดีเอ็นเอประมาณ 400 คู่เบส โดยต้นที่ไม่ได้รับการฉายรังสีไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ในขณะที่ตำแหน่งขนาดขั้นดีเอ็นเอประมาณ 900 คู่เบส มีเพียงต้นที่ได้รับการฉายรังสีปรากฏแถบดีเอ็นเอ และคูไพรเมอร์ OPD02 แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งขนาดขั้นดีเอ็นเอประมาณ 700 คู่เบส โดยต้นที่ไม่ได้รับการฉายรังสีไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ในขณะที่ตำแหน่งขนาดขั้นดีเอ็นเอประมาณ 2000 คู่เบส มีเพียงต้นที่ได้รับการฉายรังสีปรากฏแถบดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงมี 2 คูไพรเมอร์ ได้แก่ OPC02 และ OPD02 ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน มีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความเข้ม สามารถแยกและนับจำนวนแถบดีเอ็นเอได้ รวมทั้งให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic bands) ในแต่ละตำแหน่ง ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 19 แถบ เฉลี่ยเท่ากับ 6.3 แถบต่อคูไพรเมอร์ เป็นแถบที่แสดงความแตกต่างจำนวน 9 แถบ คิดเป็นร้อยละความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอร้อยละ 3 โดยคูไพรเมอร์ OPC02 และ OPD02 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ 5 แถบ จะเห็นได้ว่าไพรเมอร์จำนวน 2 ชนิด คือ OPC02 และ OPD02 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่ผ่านการฉายรังสีแถมมา และไม่ผ่านการฉายรังสีแถมมาได้ และไพรเมอร์อีก 27 คูไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้น

ตารางที่ 4.18 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของคูไพร์เมอร์จำนวน 3 คู่ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี

คูไพร์เมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง	ร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง
OPA09	4	0	0
OPC02	9	5	55.55
OPD02	6	4	66.67
รวม	19	9	122.22
จำนวนเฉลี่ย	6.3	3	40.74



รูปที่ 4.32 ผลการเปรียบเทียบไพร์เมอร์ 3 ไพร์เมอร์ OPA09 OPC02 และ OPD02 จากตัวอย่างต้นควบคุมและฉายรังสี 6 กิโลแรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

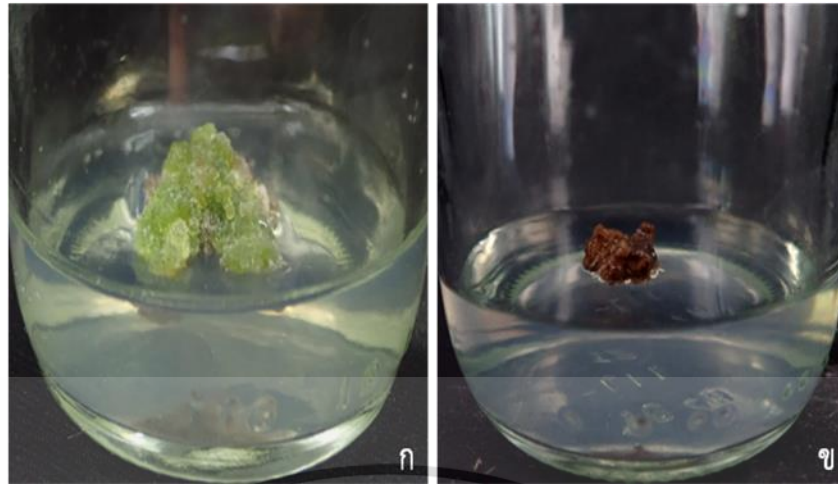
#### 4.7.2 ถั่วฮามาต้า

หลังจากนำแคลลัสถั่วฮามาต้าที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณต่างๆ คือ 0 2 4 6 8 และ 10 กิโลแรม ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ พบว่าปริมาณรังสีที่ทำให้แคลลัสรอดชีวิตร้อยละ 50 (LD<sub>50</sub>) เท่ากับ 6.71 5.8 และ 2.8 กิโลแรม (รูปที่ 4. 34) เมื่อพิจารณาลักษณะของแคลลัสพบว่าแคลลัสที่ได้รับการฉายรังสีที่ความเข้มข้นสูง แคลลัสมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายลงในที่สุด (ตารางที่ 4.19 ) และ (รูปที่ 4 33 ข) การที่รังสีแกมมาส่งผลให้ถั่วฮามาต้าเจริญเติบโตช้า เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเป็นกลุ่มของแคลลัส หรือเกิดความแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้รับรังสีแกมมา เนื่องจากรังสีแกมมาทำให้อะตอมต่างๆ ภายในเซลล์เกิดการแตกตัวเป็นไอออนที่ไวต่อปฏิกิริยา ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีภายในเซลล์ ทำให้กระบวนการสร้าง RNA และโปรตีนลดต่ำลง องค์ประกอบภายในไซโตพลาสซึมเกิดความเสียหาย และส่งผลให้โครโมโซมเกิดความผิดปกติจึงทำให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวอย่างล่าช้า หรือไม่เกิดการแบ่งเซลล์ และตายในที่สุด (สิรินุช, 2540;สุชาติ, 2550) หากใช้ปริมาณรังสีที่สูงเกินไปอาจไม่พบการกลายพันธุ์ แต่จะทำให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโต และส่งผลให้เนื้อเยื่อตายลงในที่สุด จากการทดลองต้นที่พัฒนาจากแคลลัสที่ฉายรังสีแกมมา 6 กิโลแรม มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น โดยเป็นการกลายพันธุ์จากลักษณะต้นสูง เป็นลักษณะต้นเตี้ย ใบมีลักษณะกว้างขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ แคลลัสจะสามารถพัฒนาเกิดยอดเฉลี่ยจำนวน 4.30 ยอดต่อแคลลัส และความยาวยอดเฉลี่ย 0.43 เซนติเมตร (รูปที่ 4. 33 ง) การฉายรังสีแกมมามีผลทำให้ความสูงลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสี (control) ผลของรังสีที่มีต่อสัญญาณวิทยาเกิดขึ้นได้กับรูปร่างลักษณะของพืช อาจเกิดขึ้นกับลำต้น ใบ รากและดอกอาจทำให้ต้นแคระแกรน (dwarf) หรือมีใบที่ผิดปกติ เช่น ใบเล็กหรือใบกว้างขึ้น เนื่องจากรังสีไปทำลายออกซินซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เร่งการเจริญเติบโต (อรุณี, 2530) หรือรังสีไปมีผลในการยับยั้งกระบวนการสร้างจิบเบอเรลลิน (GA biosynthesis) ซึ่งจะมีผลต่อการยืดยาวของลำต้น การกลายพันธุ์ในลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัญญาณวิทยาได้มีรายงาน เช่น รังสีทุกระดับไม่ทำให้กิ่งปักชำสุบุดำตาย พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัญญาณวิทยาจากกิ่งปักชำที่ได้รับการฉายรังสีซ้ำได้แก่ ใบต่าง ก้านใบแดง รูปร่างใบผิดปกติ ความยาวของกิ่งเกิดใหม่ กิ่งปักชำที่ผ่านการฉายรังสีที่ระดับ 2 กิโลแรมเพียงครั้งเดียว พบว่ามีระยะเวลาการออกดอกเร็วกว่าชุดควบคุม 11 วัน (นงลักษณ์ และ อัญชิสสา, 2558) จากการทดลองยอดที่ได้จากการฉายรังสีแกมมา นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายอดที่พัฒนาจากแคลลัสที่ฉายรังสีที่ปริมาณรังสี 2 และ 4 สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ลักษณะรากมีสีขาวรากสั้น (รูปที่ 4. 36) แต่ยอดที่ได้จากการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 6 กิโลแรม ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้

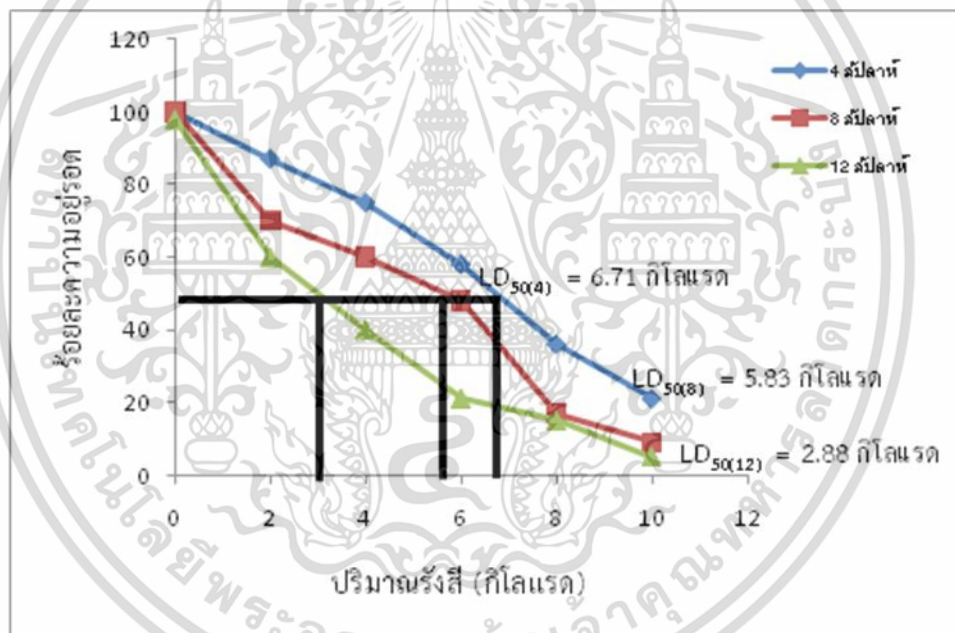
ตารางที่ 4.19 ผลของจำนวนรอบชีวิตของแคลัสของถั่วฮามาต้า ร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และค่าเฉลี่ยความยาวยอดหลังจากฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

ปริมาณรังสี (กิโลแตร)	ร้อยละการรอดชีวิต		ร้อยละการเกิดยอด		จำนวนยอดเฉลี่ย/แคลัส		ค่าเฉลี่ยความยาวยอด (ซม.)	
	0 สัปดาห์	12 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์
0	120	118 (98.33)	120 (100)	120 (100)	3.80 <sup>a</sup> ±0.37	6.00 <sup>a</sup> ±0.66	0.43 <sup>a</sup> ±0.05	0.61 <sup>a</sup> ±0.04
2	120	72 (60.00)	69 (90.78)	70 (97.22)	2.60 <sup>ab</sup> ±0.60	3.20 <sup>b</sup> ±0.32	0.35 <sup>a</sup> ±0.13	0.42 <sup>b</sup> ±0.03
4	120	48 (40.00)	35 (72.91)	38 (79.16)	2.40 <sup>ab</sup> ±0.40	3.70 <sup>b</sup> ±0.70	0.41 <sup>a</sup> ±0.08	0.59 <sup>a</sup> ±0.04
6	120	26 (21.67)	17 (65.38)	18 (69.23)	2.20 <sup>ab</sup> ±0.80	4.30 <sup>ab</sup> ±1.08	0.38 <sup>a</sup> ±0.06	0.43 <sup>b</sup> ±0.08
8	120	18 (15.00)	2 (11.11)	4 (22.22)	1.20 <sup>bc</sup> ±0.58	0.50 <sup>c</sup> ±0.34	0.04 <sup>b</sup> ±0.11	0.80 <sup>c</sup> ±0.05
10	120	6 (5.00)	0	0	0.00 <sup>c</sup> ±0.00	0.00 <sup>c</sup> ±0.00	0.00 <sup>b</sup> ±0.00	0.00 <sup>c</sup> ±0.00

\*หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

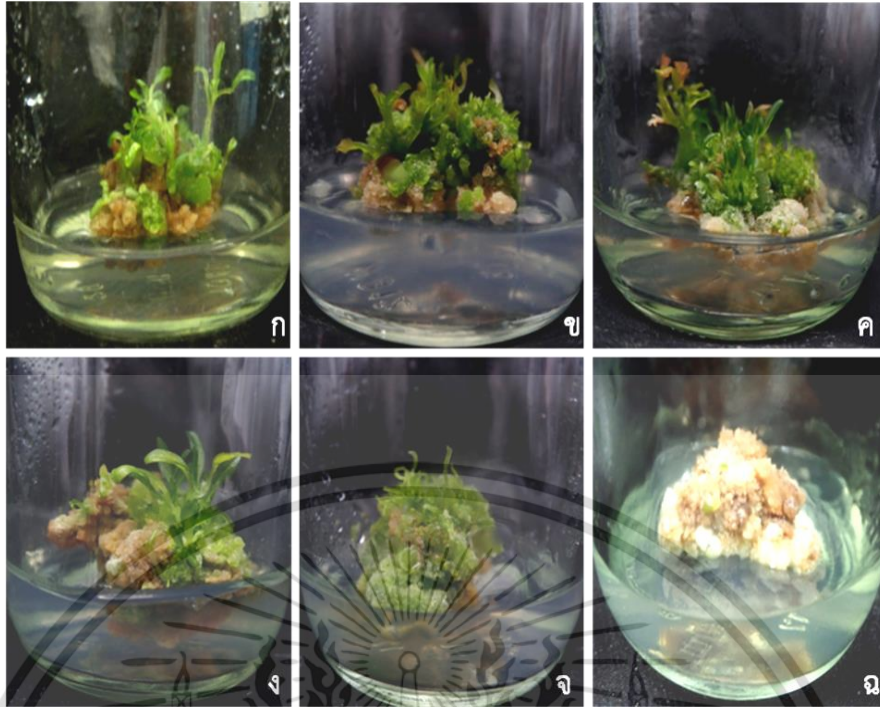


รูปที่ 4.33 (ก) ลักษณะแคลลัสที่รอดชีวิตหลังจากผ่านการฉายรังสี (ข) ลักษณะแคลลัสที่ตายหลังจากการผ่านฉายรังสี



รูปที่ 4.34 การรอดชีวิตของแคลลัสถั่วฮามาต้าหลังได้รับรังสีปริมาณรังสีต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.35 การเกิดยอดจากแคลลัสของกล้วยหอมตัดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากที่ผ่านมาการฉายรังสีปริมาณรังสีที่ต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ก) ไม่ผ่านการฉายรังสี (ต้นควบคุม) (ข) การฉายรังสี 2 กิโลแตรต (ค) การฉายรังสี 4 กิโลแตรต (ง) การฉายรังสี 6 กิโลแตรต (จ) การฉายรังสี 8 กิโลแตรต และ (ฉ) ผ่านการฉายรังสี 10 กิโลแตรต



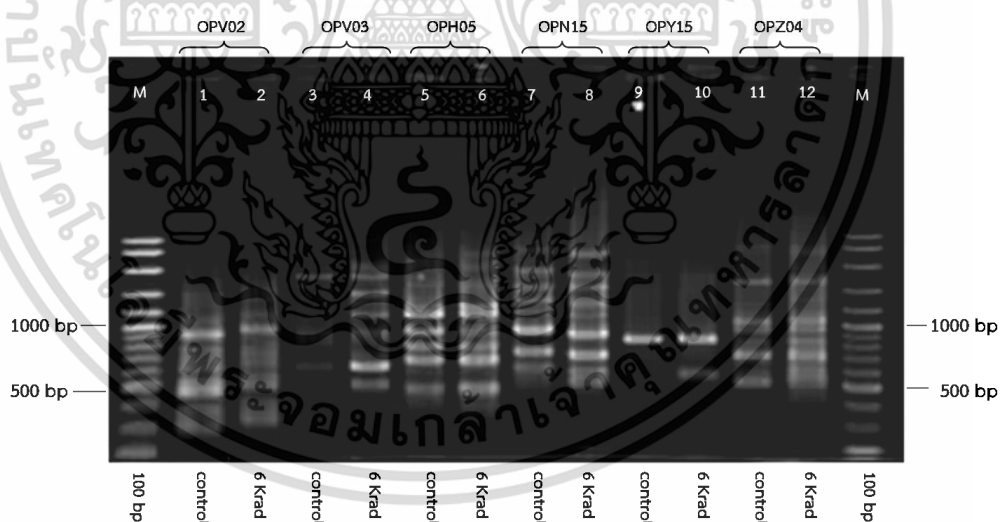
รูปที่ 4.36 ต้นกล้วยหอมตัดที่พัฒนามาจากแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสี 4 กิโลแตรต ชักนำให้เกิดราก เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ลักษณะรากมีสีขาว รากสั้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการใช้ไพรเมอร์ไพร่จำนวน 6 ชนิด คือ OPV02 OPV03 OPH05 OPN15 OPY15 และ OPZ04 (ตารางที่ 3.2) คัดเลือกโคลนต้นแก้วฮามาต้าที่ผ่านการฉายรังสีที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นที่ไม่ผ่านการฉายรังสีหรือต้นควบคุม (Control) จำนวน 1 ต้น คือที่ปริมาณรังสี 6 กิโลเรด เมื่อนำโคลนที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นควบคุมและต้นควบคุมมาสกัดดีเอ็นเอ หลังจากการตรวจสอบลักษณะแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างไปจากต้นควบคุมมีไพรเมอร์จำนวน 2 ชนิด คือ OPV03 และ OPY15 (รูปที่ 4.37) พบว่าคู่ไพรเมอร์มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน ปรากฏขนาดแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 300 ถึง 2500 คู่เบส ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 35 แถบ เฉลี่ยเท่ากับ 5.8 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เป็นแถบที่แสดงความแตกต่างจำนวน 7 แถบ คิดเป็นร้อยละความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 23.61 โดยคู่ไพรเมอร์ OPH05 และ OPN15 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ 8 แถบ และคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันมากที่สุดคือ OPV03 มีจำนวน 4 แถบ คิดเป็นร้อยละ 66.67 และ OPY 15 มีจำนวน 1 แถบ คิดเป็นร้อยละ 50 (ตารางที่ 4.20) โดยคู่ไพรเมอร์ที่แสดงเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของดีเอ็นเอสูง แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนและบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดี สอดคล้องกับรัตนภรณ์ (2556) ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ถั่วอาหารสัตว์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมาที่ระดับปริมาณรังสีที่ทำให้ถั่วควาลเคตตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD<sub>50</sub>) คือ 8.3 กิโลเรด หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบลักษณะผิดปกติคือ ยอดเจริญเติบโตช้า แตกกอเป็นกระจุก ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RAPD พบว่า ไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิด คือ OPV02 OPV03 OPH05 OPN15 OPY15 และ OPZ04 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา และไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมาได้ และในถั่วฮามาต้า LD<sub>50</sub> คือ 5.89 กิโลเรด พบว่าไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิด คือ OPV02 OPV03 OPH05 OPN15 OPY15 และ OPZ04 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา และไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมาได้

ตารางที่ 4.20 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของคู่ไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี

คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง	ร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง
OPV02	5	0	0
OPV03	6	4	66.67
OPH05	8	2	25
OPN15	8	0	0
OPY15	2	1	50
OPZ04	6	0	0
รวม	35	7	141.67
จำนวนเฉลี่ย	5.8	1.17	23.61



รูปที่ 4.37 ผลการเปรียบเทียบไพรเมอร์ 6 ไพรเมอร์ OPV02 OPV03 OPH05 OPN15 OPY15 และ OPZ04 จากตัวอย่างต้นควบคุมและฉายรังสี 6 กิโลแตรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.8 การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของเมล็ด

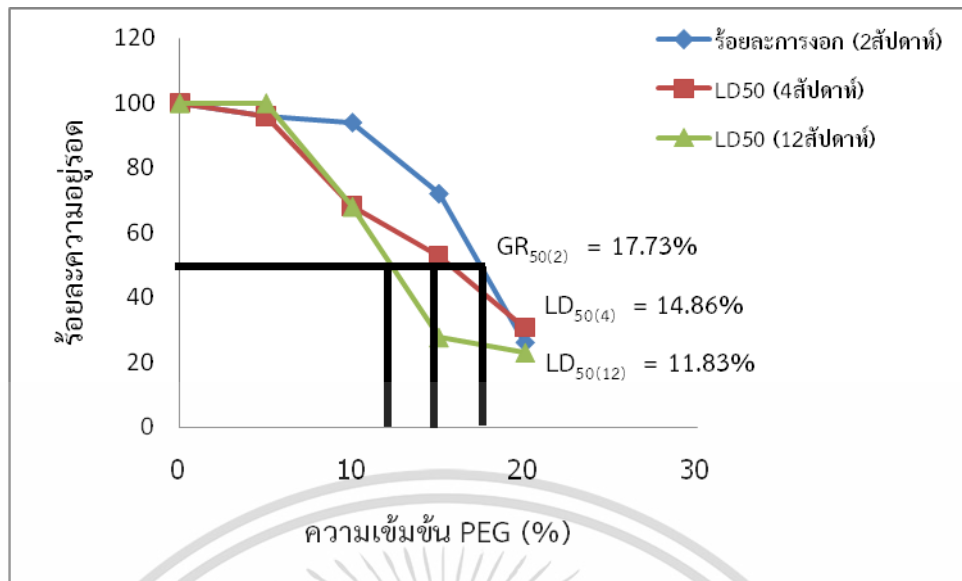
### 4.8.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

จากการศึกษาความสามารถในการทนแล้งของเมล็ด โดยทำการเพาะเลี้ยงถั่วบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ประกอบไปด้วย PEG ที่ระดับความเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นการปรับแรงดันออสโมติก (osmotic potential) ของอาหารให้ลดลง ทำให้เมล็ดที่นำมาคัดเลือกอยู่ในสภาพขาดน้ำ ซึ่ง Bressan *et.al.* (1981) กล่าวว่า PEG เป็นสารในกลุ่ม ออสโมติคัมชนิดที่ไม่แตกตัวเป็นไอออน ทำหน้าที่ลดแรงดันออสโมซิส ของสารละลายที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ เซลล์จะดูดซึมน้ำได้น้อยลงทำให้อยู่ในสภาพขาดน้ำ โดยนิยมนำ PEG มาใช้ในการจำลองในสภาพหลอดทดลองเพื่อคัดเลือกเซลล์หรือพืชที่ทนต่อสภาวะแล้งได้ จากการทดลองพบว่า ร้อยละการงอกของเมล็ดนั้นลดลงเมื่อระดับความเข้มข้น PEG สูงขึ้น เมล็ดงอกเกิดเป็นต้นอ่อนเมื่อเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ จากการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดที่เพาะเลี้ยงใน PEG 17.73 เปอร์เซ็นต์ มีการงอกลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (GR<sub>50</sub>) (ตารางที่ 4.21) และ (รูปที่ 4.38 และ รูป 4.39) และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีร้อยละการงอกสูงสุด 96 และ 94 ตามลำดับ และค่าเฉลี่ยความยาวยอดสูงสุด 5.31 และ 3.67 เซนติเมตร และค่าเฉลี่ยความยาวราก 3.61 และ 1.71 เซนติเมตร ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นของ PEG 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ความยาวยอดและความยาวรากลดลงอย่างเห็นได้ชัด พบว่าค่าเฉลี่ยความยาวยอดและราก คือ 0.94 และ 0.63 เซนติเมตร และสอดคล้องกับ Bheemesh *et.al.* (2018) ปรับปรุงพันธุ์ข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica*) 6 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นพืชในตระกูลหญ้าให้อยู่ในสภาพความเครียดเกิดจากแห้งแล้งโดยเพาะเลี้ยงเมล็ด ใน PEG ความเข้มข้น 0 15 20 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ พบว่า PEG 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ข้าวฟ่างทั้ง 6 สายพันธุ์มีร้อยละการงอก ความยาวยอด และความยาวรากต่ำที่สุด เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 และ 12 สัปดาห์ ค่า LD<sub>50</sub> ก็จะลดลงเมื่อความเข้มข้น PEG สูงขึ้น โดยต้นอ่อนที่ไม่สามารถรอดชีวิตจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและตายในที่สุด จากการทดลองพบว่าเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG ความเข้มข้นมากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ ร้อยละการรอดชีวิตจะลดลง และจะตายหมดเมื่อความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้นเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.40 และ รูปที่ 4.41) โดยความเข้มข้นของ PEG ที่ทำให้ร้อยละการรอดชีวิตของเมล็ดลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์คือ ค่า LD<sub>50</sub> เท่ากับ 14.86 และ 11.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับ Sani and Boureima (2014) ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์หญ้าไซมุก (*Pennisetum glaucum*) ให้อยู่ในสภาพทนแล้ง ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดใน PEG 0 10 20 30 32.5 35 37.5 และ 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่า LD<sub>50</sub> เท่ากับ 26.2 เปอร์เซ็นต์ และ (GR<sub>50</sub>) เท่ากับ 24.2 เปอร์เซ็นต์

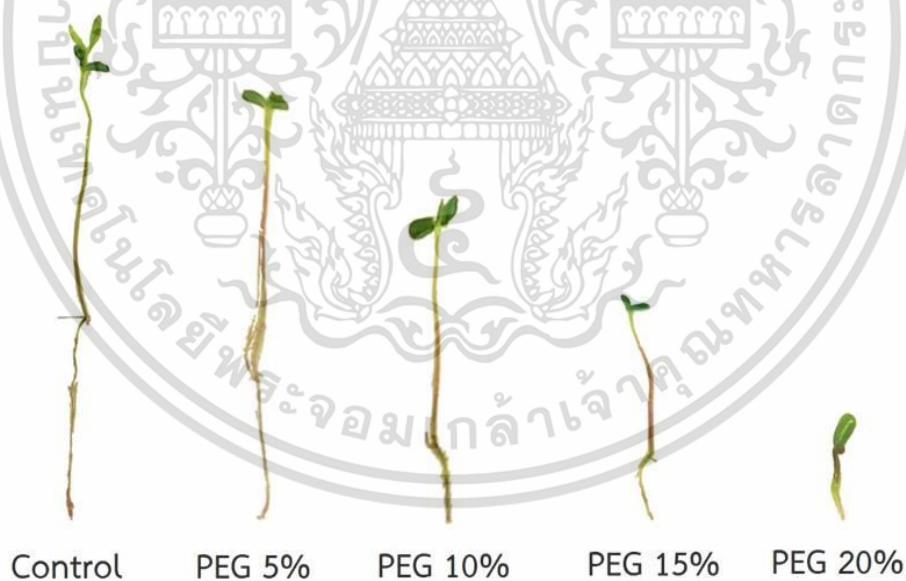
ตารางที่ 4.21 ผลของการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ร้อยละการงอก ร้อยละการรอดชีวิต และ ค่าเฉลี่ยความยาวยอด ความยาวรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

ความเข้มข้น PEG (%)	จำนวน เมล็ด	ร้อยละการงอก			ร้อยละการรอดชีวิต		ค่าเฉลี่ยความยาวยอด (ซม.)		ค่าเฉลี่ยความยาวราก (ซม.)	
		2	4	12	4	12	4	12	4	12
		สัปดาห์	สัปดาห์	สัปดาห์	สัปดาห์	สัปดาห์	สัปดาห์	สัปดาห์	สัปดาห์	สัปดาห์
0	50	50 (100)	50 (100)	50 (100)	6.81 <sup>a</sup> ±0.11	13.93 <sup>a</sup> ±0.13	5.09 <sup>a</sup> ±0.42	11.09 <sup>a</sup> ±0.95		
5	50	48 (96.00)	48 (96.00)	48 (100)	5.31 <sup>b</sup> ±0.14	9.77 <sup>b</sup> ±0.31	3.61 <sup>b</sup> ±0.15	8.33 <sup>a</sup> ±2.37		
10	50	47 (94.00)	32 (68.08)	32 (68.08)	3.67 <sup>c</sup> ±0.10	6.89 <sup>c</sup> ±0.14	1.71 <sup>c</sup> ±0.09	2.74 <sup>b</sup> ±0.17		
15	50	36 (72.00)	19 (52.77)	10 (27.77)	1.57 <sup>d</sup> ±0.59	4.69 <sup>d</sup> ±0.16	1.33 <sup>c</sup> ±0.81	1.92 <sup>b</sup> ±0.28		
20	50	13 (26.00)	4 (30.76)	3 (23.07)	0.94 <sup>e</sup> ±0.01	2.44 <sup>e</sup> ±0.07	0.63 <sup>d</sup> ±0.06	0.66 <sup>b</sup> ±0.11		

\*หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

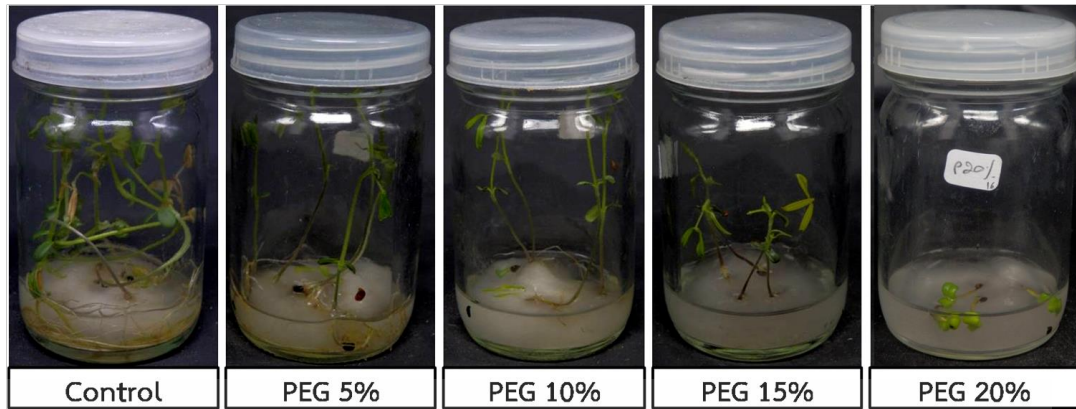


รูปที่ 4.38 ความสัมพันธ์ระหว่าง PEG กับการงอก และความอยู่รอดของเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่เพาะเลี้ยงใน PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน

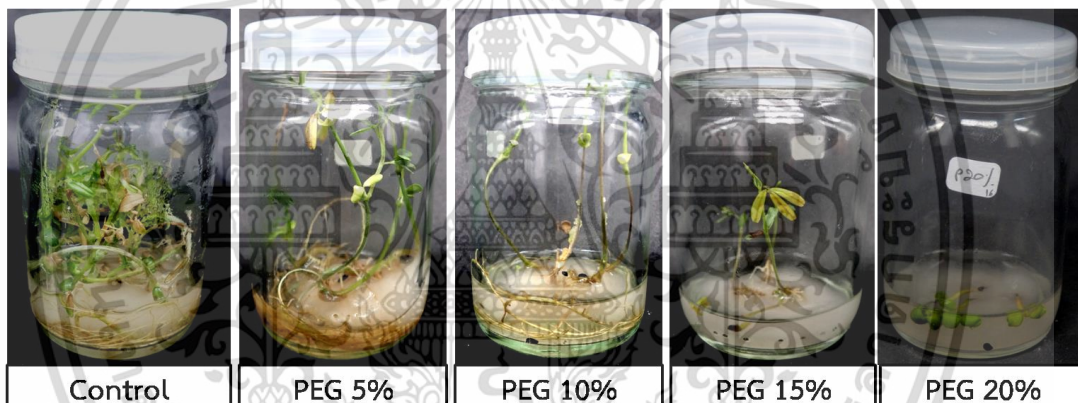


รูปที่ 4.39 การเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.40 การเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.41 การเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.8.2 ถั่วฮามาต้า

จากการศึกษาความสามารถในการทนแล้งของเมล็ด โดยทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ประกอบไปด้วย PEG ที่ระดับความเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่า ร้อยละการงอกของเมล็ดนั้นลดลงเมื่อระดับความเข้มข้น PEG สูงขึ้น เมล็ดงอกเกิดเป็นต้นอ่อนเมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน จากการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดที่เพาะเลี้ยงใน PEG 17.88 เปอร์เซ็นต์ มีการงอกลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ( $GR_{50}$ ) (ตารางที่ 4.22) และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีร้อยละการงอกสูงสุด 94 และ 80 ตามลำดับ (รูปที่ 4.42 และ รูปที่ 4.43) ค่าเฉลี่ยความยอดคือ 3.75 และ 2.84 เซนติเมตร ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นของ PEG 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ความยาวยอดและความยาวรากลดลงอย่างเห็นได้ชัด พบว่าค่าเฉลี่ยความยอดและรากคือ 0.90 และ 0.38 เซนติเมตร

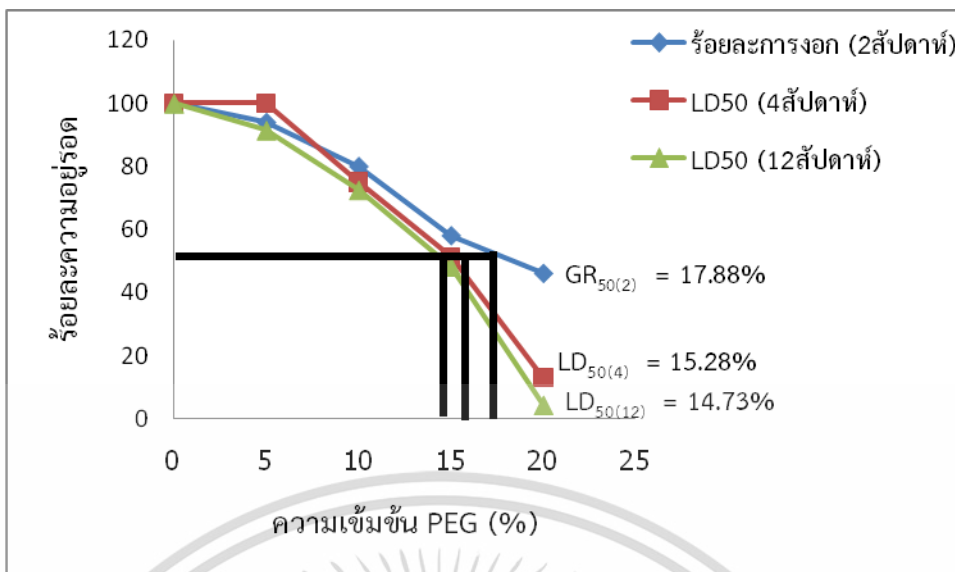
เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 และ 12 สัปดาห์ ค่า  $LD_{50}$  ก็จะลดลงเมื่อความเข้มข้น PEG สูงขึ้น โดยต้นอ่อนที่ไม่สามารถรอดชีวิตจะเปลี่ยนแปลงเป็นสีเหลืองและตายในที่สุด จากการทดลองพบว่าเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG ความเข้มข้นมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ร้อยละการรอดชีวิตจะลดลง (รูปที่ 4.44) และจะตายหมดเมื่อความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้นเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.45) โดยความเข้มข้นของ PEG ที่ทำให้ร้อยละการรอดชีวิตของเมล็ดลดลง 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์คือ ค่า  $LD_{50}$  เท่ากับ 15.28 และ 14.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Hadas (1977) รายงานว่าการทดสอบการงอกของเมล็ดข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) ถั่วลันเตา (Pea) ถั่วลูกไก่ (Chickpea) และ Vetch เมื่อเพาะเลี้ยงใช้สารละลายของ PEG 6000 ควบคุม water potential และเมื่อเพาะในแปลงทดลองที่ควบคุมระดับ water potential ระดับต่างๆ พบว่าการงอกเมื่อเพาะโดยใช้สารละลาย PEG และเมื่อเพาะในแปลงทดลองมีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นเราสามารถที่จะทดสอบความงอกโดยใช้เพาะในสารละลาย PEG ควบคุม water potential แทนการทดสอบในไร่ได้ และควรจะได้ผลดีกว่าการทดสอบในไร่โดยตรง เพราะในไร่เราควบคุมปัจจัยเกี่ยวกับความชื้นในดินได้ยากกว่าการทดสอบในห้องปฏิบัติการ

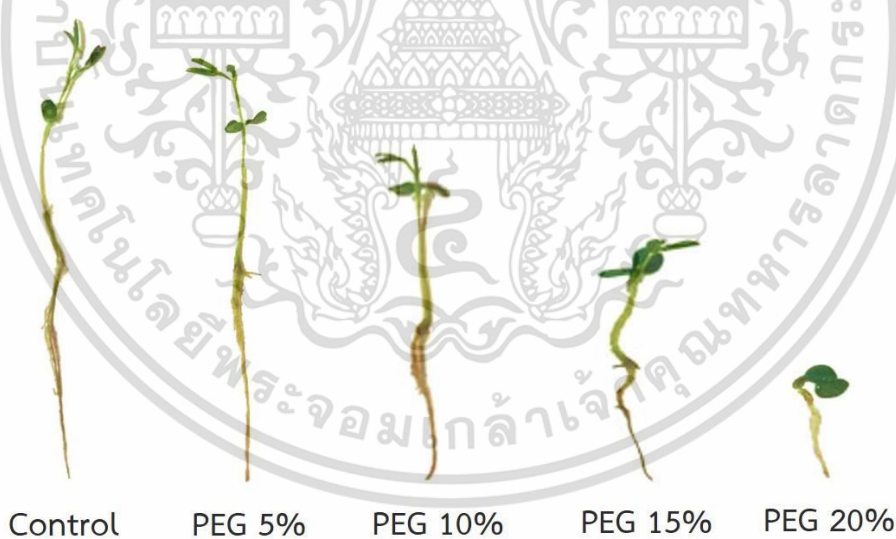
ตารางที่ 4.22 ผลของการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วฮามาต้า ร้อยละการงอก ร้อยละการรอดชีวิต และค่าเฉลี่ยความยาวยอด ความยาวรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

ความเข้มข้น PEG (%)	จำนวน เมล็ด	ร้อยละการงอก			ร้อยละ การรอดชีวิต		ค่าเฉลี่ย ความยาวยอด (ซม.)		ค่าเฉลี่ย ความยาวราก (ซม.)	
		2	4	12	4	12	4	12		
		สัปดาห์	สัปดาห์	สัปดาห์	สัปดาห์	สัปดาห์	สัปดาห์	สัปดาห์		
0	50	50 (100)	50 (100)	50 (100)	5.89 <sup>a</sup> ±0.15	13.14 <sup>a</sup> ±0.40	6.30 <sup>a</sup> ±0.17	13.72 <sup>a</sup> ±2.16		
5	50	47 (94.00)	47 (100)	43 (91.48)	3.75 <sup>b</sup> ±0.20	10.78 <sup>b</sup> ±0.31	5.20 <sup>b</sup> ±0.20	5.60 <sup>b</sup> ±0.47		
10	50	40 (80.00)	30 (75.00)	29 (72.50)	2.84 <sup>c</sup> ±0.18	4.18 <sup>c</sup> ±0.11	2.36 <sup>c</sup> ±0.27	3.88 <sup>bc</sup> ±0.48		
15	50	29 (58.00)	15 (51.72)	14 (48.27)	2.14 <sup>d</sup> ±0.29	3.28 <sup>d</sup> ±0.16	1.57 <sup>d</sup> ±0.08	2.63 <sup>bc</sup> ±0.09		
20	50	23 (46.00)	3 (13.04)	1 (4.34)	0.90 <sup>e</sup> ±0.08	2.51 <sup>e</sup> ±0.60	0.38 <sup>e</sup> ±0.06	1.88 <sup>c</sup> ±0.12		

\*หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

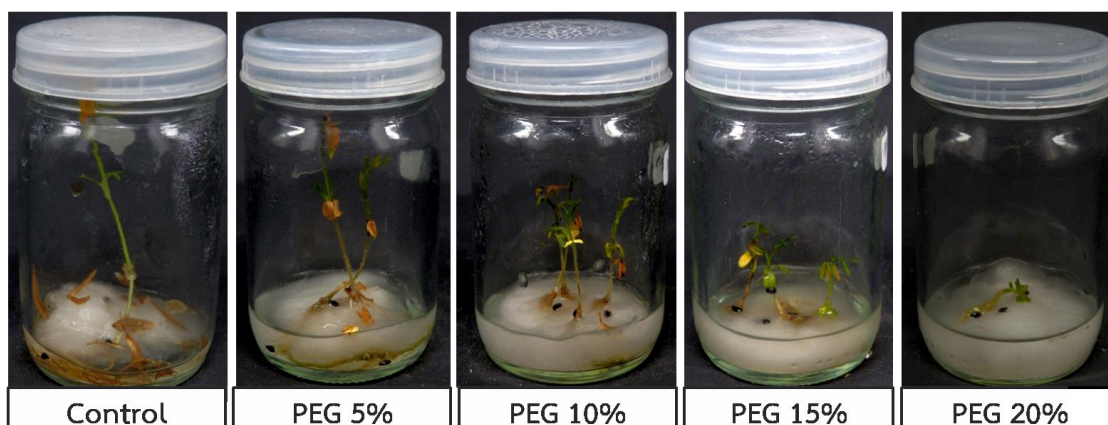


รูปที่ 4.42 ความสัมพันธ์ระหว่าง PEG กับการงอก และความอยู่รอดของเมล็ดถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงใน PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน

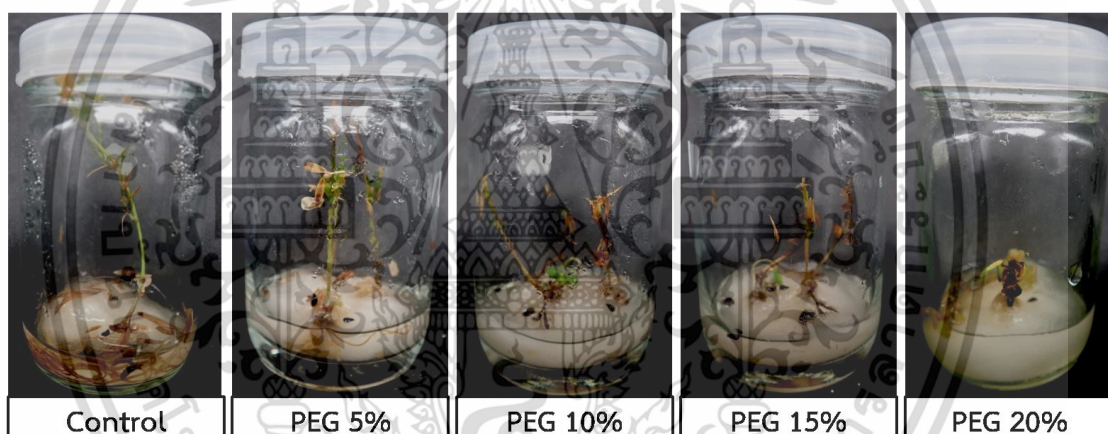


รูปที่ 4.43 การเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วฮามาต้าบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.44 การเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วฮามาต้าบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.45 การเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วฮามาต้าบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้นในระดับต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.9 การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของแคลลัส

### 4.9.1 ถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184

จากการศึกษาความสามารถในการทนแล้งจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ประกอบด้วย PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นการปรับแรงดันออสโมติกของอาหารให้ลดลง ทำให้เซลล์ที่นำมาคัดเลือกอยู่ในสภาพขาดน้ำ จากการทดลองพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าไม่พบการตายของแคลลัส และที่ความเข้มข้น PEG 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีแคลลัสสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้มากที่สุด ลักษณะของแคลลัสที่พบเป็น compact callus สีของแคลลัสที่พบมีทั้งสีเหลืองและสีเขียว ซึ่งแสดงถึงการมีชีวิตรอดอยู่ได้ในอาหารที่มีการเติม PEG หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ PEG 8 (รูปที่ 4.47 จ) และ 10 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.47 ฉ) แคลลัสไม่สามารถเจริญเติบโตได้ แคลลัสมีลักษณะสีน้ำตาลปนดำ แสดงว่าเนื้อเยื่อถูกทำลายหรือถูกยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อและตายลงในที่สุด ซึ่งระดับความเข้มข้นของ PEG มากขึ้น พบว่ามีร้อยละการรอดชีวิตลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาถึงผลของ PEG-6000 โดยพบว่าเมื่อนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ความเข้มข้นของ PEG ที่สูงขึ้นก็ทำให้แคลลัสเจริญเติบโตช้าลง และเกิดการตายได้ (มัทนภรณ์ และคณะ 2010) และสอดคล้องกับ ศรีณย์ (2552) พบว่าร้อยละการรอดชีวิตเซลล์แขวนลอยของหญ้าไอน์นั้นก็จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ PEG สูงขึ้น จากการทดลองพบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG ความเข้มข้นมากกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ ร้อยละการรอดชีวิตจะลดลงอย่างมาก และจะตายหมดเมื่อความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้นเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยความเข้มข้นของ PEG ที่ทำให้ร้อยละการรอดชีวิตแคลลัสของถั่วลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ( $LD_{50}$ ) มีค่าเท่ากับ 6.09 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.23) (รูปที่ 4.46) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ ให้ผลไปในทางเดียวกับการทดลองของ Galovic. *et al.* (2005) รายงานว่า PEG ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้แคลลัสของข้าวสาลีสายพันธุ์ NS55/25 และ Pesma มีร้อยละการรอดชีวิตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ และ Wahid *et.al.* (2007) กล่าวว่า การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมของพืชได้ เช่น ลักษณะที่ทนต่อสภาพแวดล้อม (ทนร้อนหรือทนแล้ง) หลังจากนั้นนำแคลลัสที่ทราบค่า  $LD_{50}$  แล้ว คือแคลลัสที่ฉายรังสี 6 กิโลแตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ประกอบด้วย PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ เพื่อคัดเลือกถั่วทนแล้ง พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ (รูปที่ 4.48) และยอดที่ได้จากการคัดเลือกทนแล้ง นำมาชักนำให้เกิดรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อ

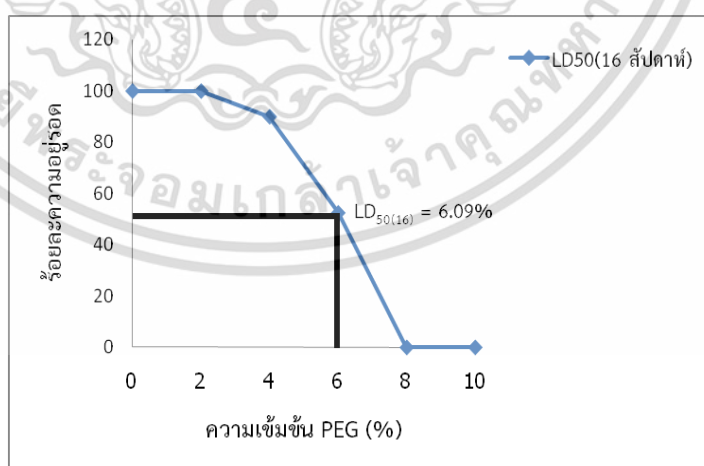
ลิตร พบว่าไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ เช่นเดียวกับการทดลองของ Wang. *et al.* (2003) ทำการเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คัดเลือกมันเทศทนแล้ง โดยนำแคลล์สมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG ความเข้มข้น 0 ถึง 35 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีมันเทศ 3 ต้น ที่สามารถทนต่อสภาวะแล้งได้มากกว่าต้นควบคุม หรืองานวิจัยที่ทำการคัดเลือกข้าวทนแล้ง โดยนำแคลล์สมาเพาะเลี้ยงที่เติม PEG ความเข้มข้น 10 และ 18 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่าแคลล์สที่รอดชีวิตมีปริมาณโพลินเพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้ทนต่อสภาวะแล้งมากขึ้น (Muhammad *et.al.*, 2007)

**ตารางที่ 4.23** ผลของการเพาะเลี้ยงแคลล์สของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อระยะเวลาผ่านไป 16 สัปดาห์

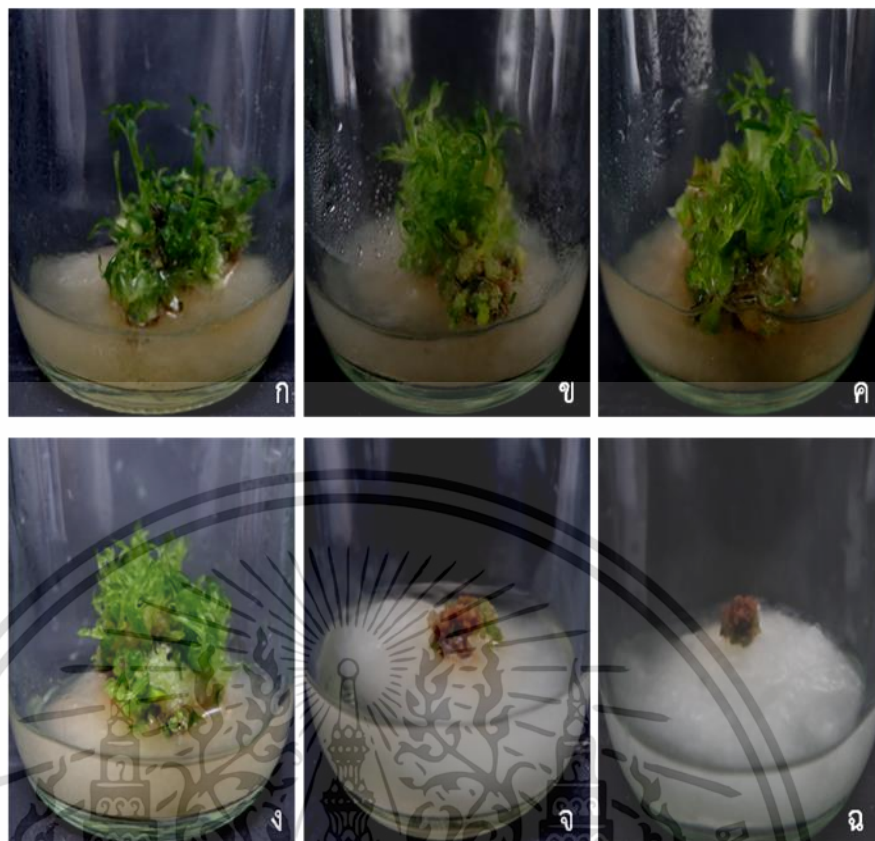
สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)	จำนวนแคลล์ส	ความเข้มข้น PEG (%)	ร้อยละการรอดชีวิต
IBA 0.5+TDZ 3	40	0 (control)	40 (100)
	40	2	40 (100)
	40	4	36 (90.00)
	40	6	21 (52.50)
	40	8	0
	40	10	0

\*หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's



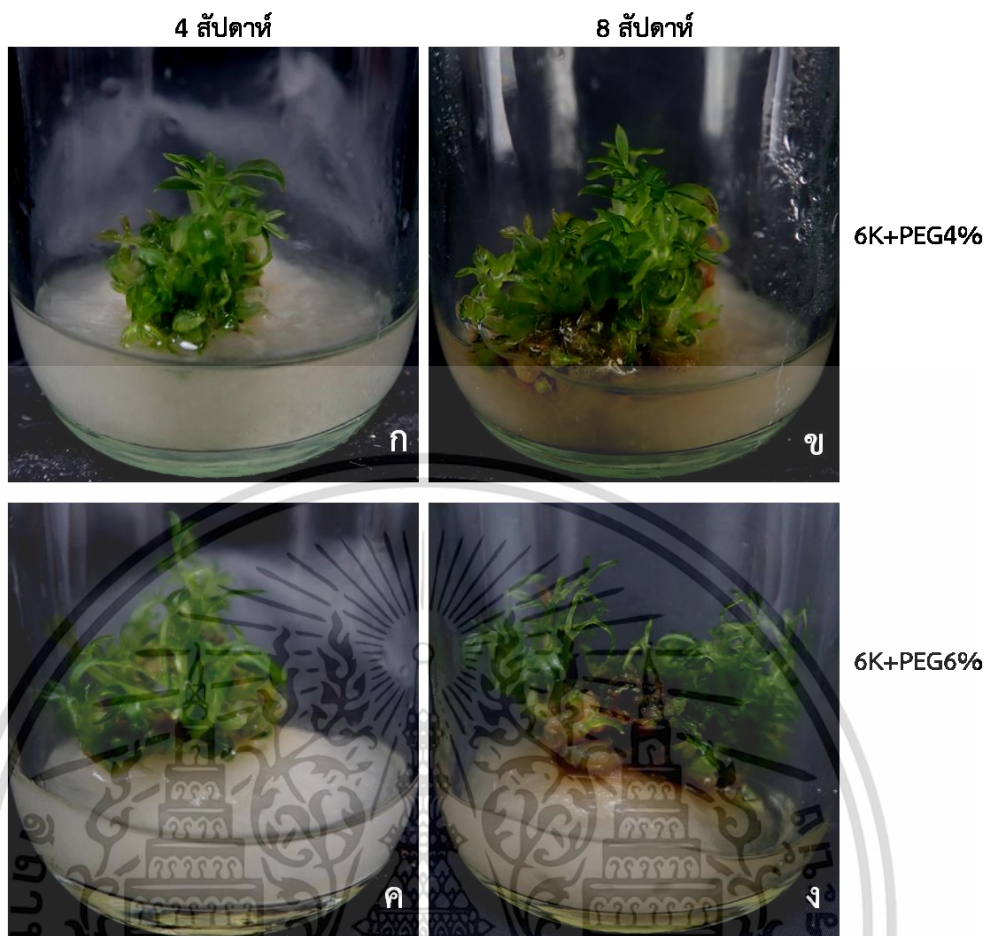
**รูปที่ 4.46** การรอดชีวิตของแคลล์สถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อระยะเวลาผ่านไป 16 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.47 การรอดชีวิตของแคลลัสของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีสภาวะความเข้มข้นของ PEG ต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์ (ก) ไม่เติม PEG (ข) PEG 2 เปอร์เซ็นต์ (ค) PEG 4 เปอร์เซ็นต์ (ง) PEG 6 เปอร์เซ็นต์ (จ) PEG 8 เปอร์เซ็นต์ และ (ฉ) PEG 10 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.48 การรอดชีวิตของแคลลัสของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 หลังฉายรังสี 6 กิโลแตรต ที่ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) PEG 4 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ (ข) เพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ (ค) PEG 6 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ (ง) เพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์

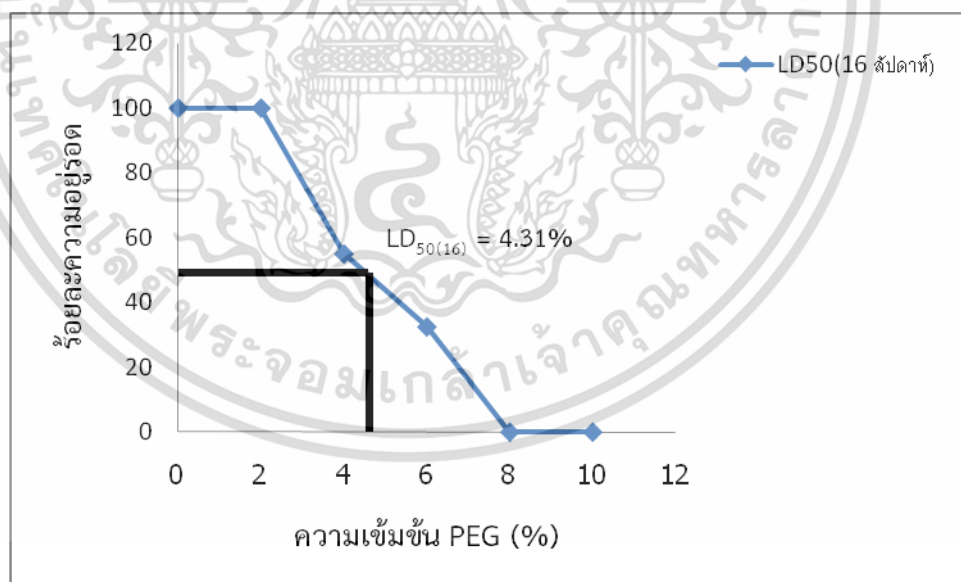
#### 4.9.2 ถั่วฮามาต้า

จากการศึกษาความสามารถในการทนแล้งจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ประกอบด้วย PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสถั่วในอาหารที่เติม PEG 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ มีการขยายขนาดและแคลลัสสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ แคลลัสที่พบจะมีลักษณะสีเขียวและสีเหลือง แต่ยังไม่พบการตายของแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ สำหรับอาหารที่เติม PEG 6 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ แสดงว่าการใช้สาร PEG มีผลต่อการยับยั้งหรือชะลอการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อทำให้ไม่สามารถชักนำให้แคลลัสเกิดต้นจำนวนมากเหมือนแคลลัสปกติ สอดคล้องกับการทดลองของ Islam *et al.* (2009) รายงานว่าเมื่อนำแคลลัสออกจากที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสาร PEG ความเข้มข้น 5-10 เปอร์เซ็นต์ มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเพื่อศึกษาลักษณะอ้อยทนแล้ง พบว่าความสามารถของแคลลัสในการชักนำให้เกิดเป็นต้นหรือยอดลดลง และจากการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ อาหารที่เติม PEG 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแคลลัสเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล ไม่มีการขยายขนาดและตายในที่สุด ไม่พบแคลลัสที่รอดชีวิต (รูปที่ 4.50 จ-ฉ) เมื่อพิจารณาร้อยละการรอดชีวิตของแคลลัสจากการใช้ PEG โดยใช้ LD<sub>50</sub> เป็นเกณฑ์ พบว่า LD<sub>50</sub> เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ คือ 4.31 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.24) (รูปที่ 4.49) ซึ่งส่งผลให้การเจริญเติบโตของถั่วลดลง เห็นได้จากจำนวนต้นและความยาวต้น ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อพืชอยู่ในสภาวะแล้งจะมีปริมาณน้ำในเซลล์ลดลง ส่งผลให้แรงดันเต่งของเซลล์ลดลง ซึ่งทำให้เซลล์ไม่สามารถขยายตัวและเจริญเติบโตได้เต็มที่ นอกจากนี้สภาวะแล้งอาจส่งผลให้เกิดการปิดปากใบ ทำให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ไม่สามารถแพร่เข้าสู่เนื้อเยื่อของใบ ส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงลดต่ำลง ซึ่งทำให้การเจริญเติบโตรวมลดลง (ปาริชาติ และ วัฒนา, 2559) หลังจากนั้นนำแคลลัสที่ทราบค่า LD<sub>50</sub> แล้ว คือแคลลัสที่ฉายรังสี 6 กิโลเรด มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ประกอบด้วย PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ เพื่อคัดเลือกถั่วทนแล้ง พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ ซึ่งลักษณะต้นที่พบไม่มีความแข็งแรง ต้นเล็ก และอ่อนแอ (รูปที่ 4.51) ซึ่ง Hung *et al.* (2008) กล่าวว่าเมื่อเซลล์อยู่ในสภาพขาดน้ำแรงดันเต่งภายในเซลล์ลดลงทำให้การแบ่งเซลล์และการขยายตัวของเซลล์ลดลง ส่งผลให้เซลล์มีขนาดเล็กกว่าปกติ เมื่อเซลล์มีขนาดเล็กจะทำให้รูปแบบการเจริญของพืชทั้งต้นผิดปกติโดยขึ้นอยู่กับระยะเจริญเติบโตของพืช เช่น ถ้าพืชขาดน้ำช่วงที่มีการแบ่งเซลล์ และขยายตัวของเซลล์จะทำให้พื้นที่ใบลดลง ส่งผลให้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่จะเข้ามาน้อยลงเนื่องจากใบมีขนาดเล็ก

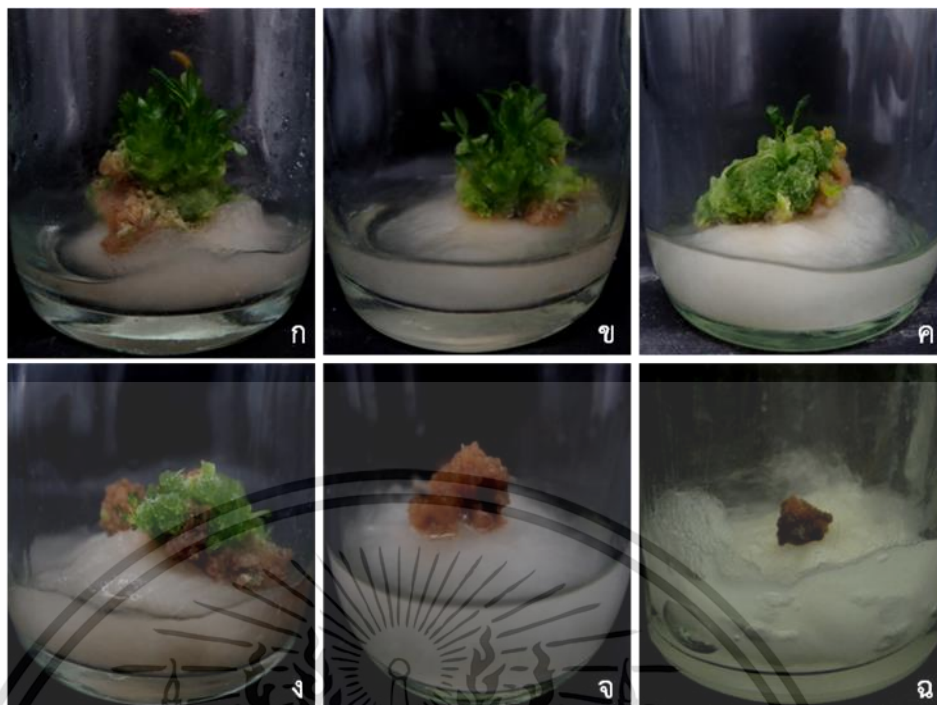
ตารางที่ 4.24 ผลของการเพาะเลี้ยงแคลลัสของถั่วฮามาต้าบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อระยะเวลาผ่านไป 16 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)	จำนวนแคลลัส	ความเข้มข้น PEG (%)	ร้อยละการรอดชีวิต
IBA 0.5+TDZ 3	40	0 (control)	40(100)
	40	2	40(100)
	40	4	22(55.00)
	40	6	13(32.50)
	40	8	0
	40	10	0

\*หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบด้วยวิธี Duncan's

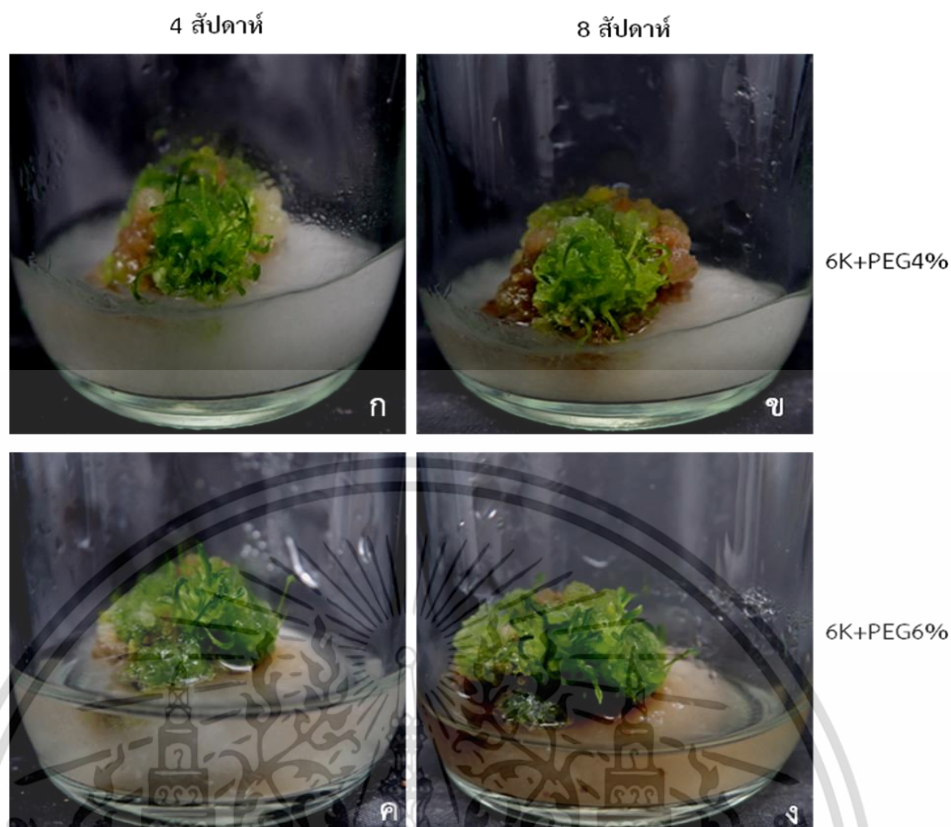


รูปที่ 4. 49 การรอดชีวิตของแคลลัสถั่วฮามาต้าบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย PEG ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อระยะเวลาผ่านไป 16 สัปดาห์



รูปที่ 4.50 การรอดชีวิตของแคลลัสของถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีสถานะความเข้มข้นของ PEG ต่างกัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์ (ก) ไม่เติม PEG (ข) PEG 2 เปอร์เซ็นต์ (ค) PEG 4 เปอร์เซ็นต์ (ง) PEG 6 เปอร์เซ็นต์ (จ) PEG 8 เปอร์เซ็นต์ และ (ฉ) PEG 10 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.51 การรอดชีวิตของแคลลัสของถั่วฮามาต้า หลังฉายรังสี 6 กิโลแตรด ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) PEG 4 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ (ข) เพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ (ค) PEG 6 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ (ง) เพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก โดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 และถั่วฮามาต้า ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบไปด้วย เจลแลนกรัม 2.6 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 5.8 และสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินทั้ง 3 ชนิด คือ BA *mT* และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่ร้อยละ 100 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนยอดและความยาวยอดเฉลี่ยคือ 36.80 ยอดต่อเมล็ด และความยาวยอดเฉลี่ย 4.24 เซนติเมตร และเมล็ดถั่วฮามาต้าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดที่ร้อยละ 88.33 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต *mT* ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนยอดและความยาวยอดเฉลี่ยคือ 7.00 ยอดต่อเมล็ด และความยาวยอดเฉลี่ย 4.39 เซนติเมตร

การชักนำต้นถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 และถั่วฮามาต้าที่ได้จากเมล็ดให้เกิดรากหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินทั้ง 3 ชนิด คือ IAA IBA และ NAA ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าต้นถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 สามารถชักนำให้เกิดรากร้อยละ 40 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนรากและความยาวรากเฉลี่ยคือ 6.50 รากต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ย 1.18 เซนติเมตร และต้นถั่วฮามาต้าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุดที่ร้อยละ 90.00 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนรากและความยาวรากเฉลี่ยคือ 7.50 รากต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ย 1.20 เซนติเมตร

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำข้อให้เกิดแคลลัสและยอด เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนข้อถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 และถั่วฮามาต้าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ร้อยละ 100 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนยอดและความยาวยอดเฉลี่ยคือ 6.67 และ 13.50 ยอดต่อข้อ และความยาวยอดเฉลี่ย 0.52 และ 1.03 เซนติเมตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยจากการนำแคลลัสที่ได้ในแก้วทั้ง 2 สายพันธุ์มาศึกษา โดยแก้วทำพระสไตโล CIAT 184 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบค่าน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 21 ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 1.0691 กรัมต่อ 20 มิลลิลิตรของอาหาร และน้ำหนักแห้งเฉลี่ย 0.1148 กรัมต่อ 20 มิลลิลิตรของอาหาร แก้วฮามาต้าเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบค่าน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 18 ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 2.9469 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหาร และน้ำหนักแห้งเฉลี่ย 0.2742 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตรของอาหาร

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสจากการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยให้เจริญเป็นต้นใหม่ เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต  $mT$  และ TDZ ความเข้มข้น 0.5 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดร้อยละ 100 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต  $mT$  ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนยอดและความยาวยอดเฉลี่ยคือ 5.35 ยอดต่อแคลลัส และความยาวยอดเฉลี่ย 0.85 เซนติเมตร

การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของเมล็ด ฉายปริมาณรังสีต่างๆ คือ 0 5 10 15 20 25 30 40 และ 50 กิโลเรด เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เมล็ดแก้วทำพระสไตโล CIAT 184 พบว่าปริมาณรังสีที่ไปลดการเจริญเติบโตของแก้ว  $GR_{50(30)}$  และการรอดชีวิตของเมล็ดถั่วลดลง 50 เปอร์เซ็นต์  $LD_{50(30)}$  มีค่าเท่ากับ 44.38 และ 38.06 กิโลเรด และเมล็ดถั่วฮามาต้า พบว่าปริมาณรังสีที่ไปลดการเจริญเติบโตของแก้ว  $GR_{50(30)}$  และการรอดชีวิตของเมล็ดถั่วลดลง 50 เปอร์เซ็นต์  $LD_{50(30)}$  มีค่าเท่ากับ 34.95 และ 28.38 กิโลเรด

การศึกษาผลของปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญของแคลลัส ฉายปริมาณรังสีต่างๆ คือ 0 2 4 6 8 และ 10 กิโลเรด เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสแก้วทำพระสไตโล CIAT 184 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 8 และ 12 สัปดาห์ พบว่า  $LD_{50}$  เท่ากับ 8.0 6.91 และ 6.12 กิโลเรด และแคลลัสถั่วฮามาต้า พบว่า  $LD_{50}$  เท่ากับ 6.71 5.8 และ 2.8 กิโลเรด จากนั้นนำเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีมาใช้ในการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างต้นควบคุมกับต้นที่กลายพันธุ์ จากการทดลองพบว่าแก้วทำพระสไตโล CIAT 184 หลังจากตรวจสอบลักษณะแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างไปจากต้นควบคุมมีไพรเมอร์จำนวน 2 ชนิด คือ OPC02 และ OPD02 และถั่วฮามาต้าพบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างไปจากต้นควบคุมมีไพรเมอร์จำนวน 2 ชนิด คือ OPV03 และ OPY15

การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของเมล็ด เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมล็ดแก้วทำพระสไตโล CIAT 184 ความเข้มข้น PEG ที่ไปลดการเจริญเติบโตของแก้ว  $GR_{50(2)}$  เท่ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17.73 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 และ 12 สัปดาห์ พบว่า  $LD_{50(30)}$  มีค่าเท่ากับ 14.83 และ 11.83 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ดถั่วฮามาต้า ความเข้มข้น PEG ที่ไปลดการเจริญเติบโตของถั่ว  $GR_{50(2)}$  เท่ากับ 17.88 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 และ 12 สัปดาห์ พบว่า  $LD_{50(30)}$  มีค่าเท่ากับ 15.28 และ 14.73 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาความสามารถในการทนแล้งของแคลลัสเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ประกอบด้วย PEG ความเข้มข้น 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ แคลลัสถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 ความเข้มข้น PEG ที่ทำให้ร้อยละการรอดชีวิตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ( $LD_{50}$ ) เท่ากับ 6.09 เปอร์เซ็นต์ และแคลลัสถั่วฮามาต้า  $LD_{50}$  เท่ากับ 4.31 เปอร์เซ็นต์ และจากการคัดเลือกถั่วทนแล้ง พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ แคลลัสถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184 และถั่วฮามาต้าสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดราก

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการเจริญของเมล็ดและแคลลัส บางรังสีมีลักษณะที่จะเหมาะสมในการใช้ประโยชน์เป็นอาหารสัตว์ในด้านการทำถั่วแห้ง เพราะมีลักษณะลำต้นเล็กสามารถทำแห้งได้ง่าย แต่ถ้ามีการศึกษาเพิ่มเติมเช่น นำไปทดสอบผลผลิตในสภาวะแปลงปลูก หรือนำไปตรวจสอบคุณค่าทางโภชนาการของอาหารสัตว์ เช่น ค่า CP (crude protein), NDF (neutral detergent fiber), DMO (dry matter) จะทำให้สามารถคัดเลือกถั่วอาหารสัตว์ที่มีคุณภาพที่ดีมากขึ้นได้ ส่วนการศึกษาความสามารถในการทนแล้งของแคลลัส ซึ่งจากการทดลองนี้สามารถคัดเลือกแคลลัสถั่วที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ควรนำผลการทดลองไปปรับปรุงเพื่อหาสูตรที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดราก อาจนำต้นทนแล้งมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อปรับสภาพให้พืชก่อน แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดราก จึงคาดว่าจะได้ต้นที่สามารถทนต่อสภาวะแล้งได้มากกว่าสายพันธุ์เดิม หากมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น การนำต้นที่คัดเลือกได้มาทดสอบภายใต้สภาวะแล้งเทียบกับต้นควบคุม แล้วทำการวัดค่าต่างๆ เช่น ปริมาณโพสเฟอรัส คลอโรฟิลล์ หรือปริมาณน้ำที่สะสมในพืช หรือทำการคัดเลือกในสภาพธรรมชาติต่อไป จะทำให้ช่วยคัดเลือกต้นที่สามารถทนต่อสภาวะแล้งได้

## เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2551. รายงานประจำปี 2551. ออนไลน์.สืบค้นจาก : <http://ict.dld.go.th>.
- กองอาหารสัตว์. 2544. ถั่วทำพระสไตโล CIAT 184 กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กรมปศุสัตว์. 2549. พืชอาหารสัตว์และอาหารโคเนื้อ. การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์
- กิริยา สังข์ทองวิเศษ. 2547. “ระบบถ่ายโอนยีนส์ที่เหมาะสมต่อถั่วสายพันธุ์ *Stylosanthes hamata* พันธุ์ Verano.”. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชนิษฐา บุรมย์. 2547. “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วฮามาต้าและหญ้ารูซี่.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืชไร่ นา คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จิตติมา ยถาภูพานนท์, เบญจมาศ คาสีบ, จุลศักดิ์ บุญรัตน์ และ สมศักดิ์ ศรีสมบุญ. 2552. “ถั่วเหลืองสายพันธุ์กลายโปรตีนสูงโดยการฉายรังสี.” หน้า 1-7. ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีนิเวศวิทย ครั้งที่ 11 กรุงเทพฯ
- เฉลิมพล แซมเพชร. 2535. สรีรวิทยาการผลิตพืชไร่. กรุงเทพฯ : โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮาส์ นิมิตรวารสาร. 2544. “การคายระเหยน้ำและความต้องการของพืช.” วิชาอุตุนิยมวิทยาเกษตร. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- จินดา สนิทวงศ์, ประเสริฐ โพธิ์จันทร์, พรเพ็ญ ผดุงศักดิ์ และชาญชัย มณีตุลย์. 2525. “การหาสัมประสิทธิ์การย่อยของ *Stylosanthes hamata* ระยะการตัดต่างๆ กัน.” หน้า 122-129. ใน การประชุมทางวิชาการกรมปศุสัตว์ ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ
- ชุมพล มากทอง. 2556. “ผลของรังสีแกมมาที่มีต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของถั่วอัลฟัลฟา (*Medicago sativa* L.).” สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยรามคำแหง.
- ไตรรัตน์ ประชาทิศ. 2555. “ผลของ Thidiazuron ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวาน.” โครงการวิจัยปริญญาครุศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะครุศาสตร์, มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.
- ธนภักษ์ อินยอด. 2545. “การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในหญ้าอะตราตรัมโดยรังสีแกมมาพร้อมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.” วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิมิต วรสุต. 2544. “การคายระเหยน้ำและความต้องการของพืช.” วิชาอุตุนิยมวิทยาเกษตร. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

นงลักษณ์ เทียนเสรี และ อัญชิสภา ปานแก้ว. 2558. “การชักนำการกลายพันธุ์ในสับปะรดด้วยรังสีแกมมา และตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี.” วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 46(3) : 1-4.

บุญฤกษ์ วิไลพร. 2533. พืชอาหารสัตว์สำหรับภาคอีสาน. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 81- 82.

บัณฑิต ทองพิมาย. 2545, “การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวโดยการอาบรังสี.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ปิยะณัฐ ฝักมาศ, อนงค์ภัทร เหมลา และ มลภา นาถึง. 2555. “ผลของ NAA IBA และส่วนของกิ่งต่อการออกรากกิ่งปักชำสับปะรด.” หน้า 1134-1143. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 9. กรุงเทพฯ

ปาริชาติ ศิลาเลิศ และ วัฒนา พัฒนากุล. 2559. “ผลของกรดแอบไซซิกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อสรีรวิทยา เมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตปริมาณแอนโทไซยานินในใบข้าวเหนียวดำภายใต้สภาวะแล้ง.” หน้า 420-430. ใน การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยบัณฑิตศึกษา ระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 17. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ประภาพร โสถติกุล. 2538. “ผลของรังสีแกมมาต่อการเจริญเติบโตและการกลายพันธุ์ของลำไย.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พีรเดช ทองอำไพ. 2537. ฮอว์โมนพืชและสารสังเคราะห์. กรุงเทพฯ : วิจัยการพิมพ์.

รัตนภรณ์ บุญเรือง. 2556. “การปรับปรุงพันธุ์ถั่วอาหารสัตว์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา”. วิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

รังสฤษฏ์ กาวีตะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วันที สว่างอารมณ์. 2542. การเจริญเติบโตของพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2, กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา.

วรภรณ์ ฉุยฉาย. 2552. “บทบาทของไทเดียมรอนกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.” วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. 4(2) : 123-135.

วารุณี พานิชผล และวัลย์กานต์ เจียมเจตจรูญ. 2541. ตารางคุณค่าทางอาหารสัตว์ กลุ่มงานวิเคราะห์อาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ เอกสารวิชาการที่ 41(2)-0514-079

ศูนย์วิจัยอาหารสัตว์ขอนแก่น. 2541. “การคัดเลือกชนิดของถั่วที่เหมาะสมในการผลิตถั่วอัดก้อน (Cube).” หน้า 87-109 โครงการผลิตพืชอาหารสัตว์สำหรับโคนม. ใน รายงาน

ประจำปี 2540 สำนักงานปศุสัตว์ เขต 4 กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศรันย์ สุขวัฒน์. 2552. “การปรับปรุงพันธุ์หญ้าไนล์ (*Acroceras macrum*) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสี.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สำนักงานนโยบายและแผนพัฒนาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. ม.ม.ป. **ความแห้งแล้ง**. ออนไลน์. สืบค้นจาก : <http://www.onep.go.th/cdm/index.html>.

สุพรรณิ แก่นสาร. 2532. “ผลของรังสีแกมมาต่อการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนในข้าว.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุนา งามผ่องใส, สุวิมล ถนอมทรัพย์, สมทรง โชติชื่น, อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, จิราลักษณ์ ภูมิไธสง, อารดา มาสรี, พัชราพร หนูวิสัย, สันติ พรหมคำ, เซาวนาถ พฤทธิเทพ, ชูชาติ บุญศักดิ์, นริลักษณ์ วรรณสาย, สมชาย บุญประดับ, รวีวรรณ เชื้อกิตติศักดิ์, นงลักษณ์ ปั่นลาย, นัฐภัทร คำหล้า, อรรณพ กสิวิวัฒน์, พรพุดิ ประเสริฐกุล, มัทนา ศรีหัตถกรรม, อัจฉรา จอมสง่าวงศ์, ปวีณา ไชยวรรณ, วันชัย ถนอมทรัพย์, วิไลวรรณ พรหมคำ และศักดิ์ เฟื่องผล. 2555. ถั่วเขียวพันธุ์ใหม่ “ชยันนาท 84-1.” รายงานผลวิจัยและพัฒนาประจำปี 2555. ศูนย์วิจัยพืชไร่ชยันนาท กรมวิชาการเกษตร. หน้า 167-181.

สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2536. **การกลายพันธุ์ของพืช**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2540 **การกลายพันธุ์ของพืช**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

สิรินธร วารินทร์ นวลฉวี รุ่งธนเกียรติ พิรณูช จอมพุก และ พิทยากร ลิมทอง. 2556. “ผลของการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันและเรื้อรังต่อเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงแฝกสองแหล่งพันธุ์.” หน้า 840-852. ใน การประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษาระดับชาติ/นานาชาติ ครั้งที่ 2 บัณฑิตวิทยาลัย : มหาวิทยาลัยศิลปากร.

สายัญห์ ทัดสี. 2547. **พืชอาหารสัตว์เขตร้อน**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สุชาติ สุขห่อง. 2553. **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร**. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

สุระ สุวรรณสันติกุล. 2547 “ความไวต่อรังสีแกมมาของเมล็ดพืช.” ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

อนรรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2550. **เทคโนโลยีชีวภาพของพืช**. โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

อนรรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2555. **ปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม**. โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- อนรรักษ์ โพธิ์เยี่ยม, วิชุดา พิริยพงศ์, ศุภรัรักษณ์ มั่นไทย, ศรันย์ สุขวัฒน์ และจันทกานต์ อรณนันท.  
2551. “การเกิดเป็นต้นใหม่จากแคลลัสที่พัฒนามาจากไฮโพคอติลของถั่วควาลเคด.” หน้า  
1139-1145 ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต  
กำแพงแสน ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อรุณี วงศ์ปิยะสกลิตย์. 2530. “วิธีปรับปรุงพันธุ์โดยการกลายพันธุ์.” กรุงเทพฯ : ภาควิชารังสี  
ประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อรุณี วงศ์ปิยะสกลิตย์. 2546. พืชกลายในประเทศไทย. ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัย  
นิวเคลียร์เทคโนโลยี สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อารีย์ วรรณวัฒน์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพืช. กรุงเทพฯ.
- Anuntalabhochai, S. Chandet, R. Chiangda, J. and Apavatjirut, P. 2000. “ Genetic  
Diversity with in Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) Based on RAPD Analysis.”  
*Acta Hort.* 575 : 253-259.
- Abdel-Hady, M.S. Okasha, E.M. and Talaat, M. 2008. “Effect of Gamma Radiation and  
Gibberellic Acid on Germination and Alkaloid Production in *Atropa  
belladonna*.” *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* 2(3) : 401-  
405.
- Ahmad, N. Faisal, M. and Anis, M. 2012. “Role of PGR on in *Vitro* Shoot Propagation  
in *Cyamopsis tetragonoloba* L. (Taub.): A Drought Tolerant Grain Legume.”  
*Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali.* 24(1) : 7-11.
- Amoo, S.O. and Staden J.V. 2013. “Influence of Plant Growth Regulators on Shoot  
Proliferation and Secondary Metabolite Production in Micropropagated  
*Huernia hystrix*.” *Plant Cell Tissue Organ Culture.* 112 : 197-206.
- Bairu, MW. Stirk, WA. and Van Staden, J. 2008 “The Role of Topolins in  
Micropropagation and Somaclonal Variation of Banana Cultivars ‘Williams’ and  
‘Grand Naine’ (*Musa* spp. AAA).” *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 95 :  
373-379.
- Barik, D. Mohapatra, U. and Chand, P. 2006. “Direct Shoot Regeneration from  
Epicotyl Explants of Grasspea (*Lathyrus sativus*).” *Australian Journal of  
Botany.* 54 505-508.
- Basalma, D. Uranbey, S. Gurlek, D. and Ozcan, S. 2008. “TDZ-Induced Plant  
Regeneration in *Astragalus cicer* L.”. *African Journal of Biotechnology.* 7(8) :  
955-959.

- Ba Vi Cattle and Forage Research Centre. **ลักษณะของถั่วท่าพระสไตโล CIAT 184**  
ออนไลน์.สืบค้นจาก : <http://trungtambocobavi.com/san-pham/co-stylo-Stylosanthes-guianensis-ciat-184/>.
- Beyaz, R. Kahramanogullair, C. Yildiz, C. Darcin, E. and Yildiz, M. 2016. “The Effect of Gamma Radiation on Seed Germination and Seedling Growth of *Lathyrus chrysanthus* Boiss. Under *In Vitro* Conditions.” *Journal of Environmental Radioactivity*. 1-5 : 162-163.
- Bheemesh, S.J. Subba Rao, M. Reddi Sekhar, M. and Latha, P. 2018 “Effect of Peg-Induced Drought Stress on Germination Early Seedling Growth of Foxtail Millet Varieties.” *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6 : 2674-2681.
- Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K. 1996. “Plant Tissue Culture: Theory and Practice.” New York : Elsevier Science Publishing Company Inc.
- Bressan, R.A. Hasegawa, PM. and Honda, AK. 1981. “Resistance of Cultured Higher Plant Cells to Polyethylene Glycol Induced Water Stress.” *Plant Science Lettes. Letters*. 21(1) : 23-30.
- Bui van Le, N.T. Hang Phuong, L.T. Anh Hong, K. and Tran Thanh Van. 1999. “Plant Production via Shoot Regeneration from Thin Cell Layer Pseudo-Bulblet Explants of *Lilium longiflorum In Vitro*.” *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*. 322 : 303-310.
- Castillo, AM. Egana, B. Sanz, JM. and Cisture, L. 1998. “Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Barley Cultivars Grown in Spain.” *Plant Cell Reports*. 17 : 902-906.
- Chandorkar, K.R. and Clark, G.M. 1986 “Physiological and Morphological Responses of *Pinus strobes* L. and *Pinus sylestris* L. Seeding, Subjected to Low-Level Continuous Gamma Irradiation at A Radioactive Waste Disposal Area.” *Environmental and Experimental Botany*. 26 : 259-270.
- Chaomei, Z. and Yanlin, M. 1993 “Irradiation Induced Changes in Enzymes of Wheat During Seed Germination and Seedling Growth.” *Agriculturae Nucleatae Sinica*. 7 : 93-97.
- Cheema, A.A. and Atta, B.M. 2003 “Radiosensitivity Studies in Basmati Rice Akbar Ali Cheema and Babar Manzoor Atta.” *Pakistan Journal of Botany*. 35(2) : 197-207.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Dhole, V.J. and Reddy, K.S. 2010. "Gamma Rays Induced Moisture Stress Tolerant Long Root Mutant in Mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek)." *Electronic Journal of Plant Breeding* 1(5) : 1299-1305.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987 "A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue." *Phytochemical Bulletin*. 19 : 11-15.
- Escalona, M. Cejas, I. Gonzalez-Olmedo, J. Capote, I. Roels, S. Canal, MJ. Rodriguez, R. Sandoval, J. and Debergh, P. 2003. "The Effect of Meta-topolin on Plantain Propagation Using A Temporary Immersion Bioreactor." *Infomusa*. 12 : 28-30.
- Evans, D.A. Flivk, C.E. and Sharp, W.R. 1981. "Growth and Behavior of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis." 45-113. in Thorpe, T.A. **Plant Tissue Culture: Methods and Application in Agriculture**. New York : Academic Press.
- Feedipedia. Caribbean **stylo** (*Stylosanthes hamata*) ออนไลน์.สืบค้นจาก :<https://www.feedipedia.org/node/7740>.
- Feedipedia. Caribbean **Stylo** (*Stylosanthes guianensis*) ออนไลน์.สืบค้นจาก :<https://www.feedipedia.org/node/251>.
- Fezzgator. 2013. **Stylosanthes hamata**. ออนไลน์.สืบค้นจาก : <https://fezzgator.deviantart.com/art/Stylosanthes-hamata-Cheesytoes-369039502>.
- Fiki, A.A. Sayed, A.I.H. and Hameed, A.A.M. '005. "Combined Effect of Gamma Radiation and Mannitol on Callus Formation and Regeneration in Alfalfa (*Medicago sativa* L.)." *Journal of Agriculture Biology*. 7(6) : 966-972.
- Galovic, V. Kotaranin, Z. and Dencic, S. 2005. "In Vitro Assessment of Wheat Tolerance to Drought." *Gentika*. 37 : 165-171.
- Gaul, H. 1977. "Plant Injury and Lethality." 8-87. in Spencer-Lopes, M.M. Forster, B.P. and Jankuloski, L. **Manual on Mutation Breeding**. Vienna : IAEA.
- Georgieva, M. Djilianov, D. Konstantinova, T. and Parvanova, D. 2004. "Screen of Bulgarian Raspberry Cultivars and Elites for Osmotic Tolerance In Vitro." *Biotechnology & Biotechnological*. 95-98.
- 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Graves, C.J. Adam, P. and Winsor, G. 1978. "Some Effects of Micronutrients and Liming on the Yield, Quality and Micronutrients Status of Tomato Grown in Peat." *Plant and Soil*. 50 : 343-354.
- Hadas, A. 1977. "Water Uptake and Germination of Leguminous Seeds in Soils of Changing Matrix and Osmotic Water Potential." *Journal of Experimental Botany*. 28 : 977-985.
- Hansen, H. and Grossmanm, K. 2000. "Auxin-Induced Ethylene Triggers Abscisic Acid Biosynthesis and Growth Inhibition." *Plant Physiology*. 124: 1437-1448.
- Hopkins, W.G. and Huner, N.P. 2004. "Introduction to Plant Physiology." 511-512 in University of Western Ontario. **Introduction to Plant Physiology**. New York : John Wiley and Sons.
- Horn, L. and Shimelis, H. 2013. "Radio-Sensitivity of Selected Cowpea (*Vigna unguiculata*) Genotypes to Varying Gamma Irradiation Doses." *Academic Journals*. 8(40) : 1991-1997.
- Hsu, S.Y. and Kao, C.H. 2003. "Differential Effect of Sorbitol and Polyethylene Glycol on Antioxidant Enzymes in Rice Leaves." *Plant Growth Regulation*. 39 : 83-90.
- Hung, K.T. Cheng, D.G. Hsu, Y.T. and Kao, C.H. 2008. "Abscisic Acid-Induced Hydrogen Peroxide is Required for Anthocyanin Accumulation in Leaves of Rice Seedlings." *Journal of Plant Physiology*. 168 : 1280-1287.
- Huetteman, A. and Preece, E. 1993. "Thidiazuron: A potent Cytokinin for Woody Plant Tissue Culture." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 33 : 105-119.
- Kimno, S. and Chepkoech, E. 2014. "Application of Mutation Techniques to Determine the Optimum Sensitivity Dose for Sorghum." 485 – 486. in Kimno, S. and Chepkoech, E. **Agricultural research Crop husbandry Plant genetics and breeding**. Kenya : Ruforum.
- 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.
- Knyazev, A Kuluev, B. Vershinina, Z. and Chemeris, A. 2018. "Callus Induction and Plant Regeneration from Leaf Segments of Unique Tropical Woody Plant *Parasponia andersonii* Planch." *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 28(1) : 45-55.

- Lata, H. Chandra, S. Wang, YH. Raman, V. and Khan, I.A. 2013 “TDZ-Induced High Frequency Plant Regeneration through Direct Shoot Organogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni: An Important Medicinal Plant and a Natural Sweetener.” *American Journal of Plant Sciences*. 4(1) : 117-128.
- Mala, J. Machova, P. Cvrckova, H. Karady, M. Novak, O. Mikullik, J. Dostal, J. Strnad, M. and Dolezal, K. 2013. “The Role of Cytokinins During Micropropagation of *Wych elm*.” *Biologia Plantarum*. 57(1) : 174-178.
- Mok, C. Martin, C. and Mok, W.S. 2000. “Cytokinins: Biosynthesis, Metabolism and Perception.” *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 36: 102-107.
- Muhammad, S.A. Ahmad, F.J. and Muhammad, A. 2007 “Iso-osmotic Effect of NaCl and PEG on Growth, Cations and Free Proline Accumulation in Callus Tissue of Two Indica Rice (*Oryza sativa* L.) Genotypes.” *Plant Growth Regulation*. 53 : 53-63.
- Murthy, B. N. S. Murch, S.J. and Saxena, K. 1998. “Thidiazuron: A Potent Regulator of *In Vitro* Plant Morphogenesis.” *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 34: 267-275.
- Murashige, T and Skoog, F. 1962. “A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco.” *Tissue Cultures. Journal of Plant Physiology*. 15: 473-497.
- Norton, M.A. and Skiruiou, R.M. 2001 “Micropropagation “Norton” wine grape Hort. Tech. 11206-11208.
- Parveen, S. Venkateshwarlu, M. Srinivas, D. Jagon, K. and Ugandhar, T. 2012. “Direct *In Vitro* Shoots Proliferation of Chick Pea (*Cicer arietinum* L.) from Shoot Tip Explants Parameters in ADT (R) 47 Rice.” *International Journal of Advanced Biological Research* 6(2) : 328-332.
- Poeaim, A Sangduen, N. 1996. “Protoplast Isolation and Culture from Cell Suspension Culture by Using KHAO-DAWK-MALI 105 Rice Callus (*Oryza sativa* L.) 115. in **Abstracts of the Third Asia – Pacific Conference on Agricultural Biotechnology**. Thailand : Issues and Choices. Nation Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) and National Science and Technology Development Agency (NSTDA).

- Rabie, K. Shenata, S. and Bondok, M. 1996 “Hormone Imbalance Germination, Growth and Pod Shedding of Faba beans as Affected By Gamma Irradiation.” *Annals of Agricultural Sciences*. 41 : 551-556.
- Rizvi, S.M.H. and Singh, R.P. 2000 “*In vitro* Plant Regeneration from Immature Leaflet Derived Callus Cultures of (*Cicer arietinum* L). via Organogenesis.” *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*. 1 : 109-114.
- Rosenthal, I. 1992. “Electromagnetic Radiations in Food Science.” 234-235. Rosenthal, L. **Advanced Series in Agricultural Sciences**. 19 Berlin : Springer Verlag.
- Salvi, ND. Georeg, L. and Eapen, S. 2002. “Micropropagation and Field Evaluation of Micropropagated Plants of Turmeric.” *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 68 : 143-151.
- Sani, D.O. and Boureima, M.M. 2014. “Effect of Polyethylene Glycol (PEG) 6000 on Germination and Seedling Growth of Pearl Millet *Pennisetum glaucum* (L). R. BR. and LD<sub>50</sub> for *InVitro* Screening for Drought Tolerance.” *academic Journal*. 13(37) : 3742-3747.
- Satvir, K. Gupta, A.K. and Kaur, N. 1998. “Gibberellic Acid and Kinetin Partially Reverses the Effect of Water Stress on Germination and Seeding Growth in Chickpea.” *Plant Growth Regulation*. 25 : 29-33.
- Scowcroft, W.R. and Adamson, J.A. 1976. “Organogenesis from Callus Cultures of the Legume, *Stylosanthes hamata*.” *Plant Science Letters*. 7(1) : 39-42.
- Sema, A Orkun, Y. and Ayse, S. 2011. “ Effect of Gamma Radiation on Growth Factors, Biochemical Parameters and Accumulation of Trace Elements in Soybean Plants (*Glycine max* L. Merrill).” *Biological Trace Element Research*. 141 : 283–293.
- Sheikh, W.A. Dedhrotiya, A.T. Nargish Khan, T. Gargi, T. Patel, J.B. and Acharya, S. 2015 “An Efficient *In Vitro* Regeneration Protocol from Cotyledon and Cotyledonary Node of Cluster Bean (*Cyamopsis tetragonoloba* L. Taub).” *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 9(2) : 175-181.
- Slama, I. Ghnaya, T. Hessini, K. Messedi, D. Savoure, A. and Abdelly, C. 2007. “ Comparative Study of the Effects of Mannitol and PEG Osmotic Stress on Growth and Solute Accumulation in *Sesuvium portulacastrum*. ” *Environmental and Experimental Botany*. 61 : 10-17.

- Sparrow, A.H. Schairer, L.A. and Sparrow, R.C. 1963. "Relationship Between Nuclear Volumes, Chromosome Number and Relative Radio-Sensitivities." *Science*. 141 : 163-166.
- Steward, N. Martin, R. Engasser, J.M. and Goergen, J.L. 1999. "A New Methodology for Plant Cell Viability Assessment Using Intracellular Esterase Activity." *Plant Cell Reports*. 19 : 171-176.
- Suresh, B. Kumar and Chandra, A. 2010. "In Vitro Plantlet Regeneration in *Stylosanthes* spp via Callus Induction from Cotyledonary and Hypocotyl Expiants" . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 33(9) : 289-297.
- Topark-Ngarm, A. 1979. "Effects of Seeding Rate and Cutting Frequency on Forage Yields of Four *Stylosanther* spp". *Khonkaen University Pasture Improvement Project, Annual* 24-29.
- Turner, N.C. 1979. "Drought Resistance and Adaptation to Water Deficits in Crop Plants." 343-72. In H. Mussell and R.C. Staples (ed). **Stress physiology in crops plants**.
- Wang, Y.P. Liu, Q.C. Li, A.X. Zhai, H. Zhang, S.S. and Liu, B.I. 2003. "In Vitro Selection of Drought-Tolerant Mutants in Sweetpotato." *Agricultural Sciences in China*. 2 : 1314-1320.
- Wang, H.M. Liu, M.H. Wang, M.H. and Zu, Y.G. 2008. "Effects of Thidiazuron Basal Medium and Light Quality on Adventitious Shoot Regeneration from *In vitro* Culture Stem of *Populus alba* x *P. berolinensis*." *Journal of Forestry Research*. 19(3) : 257-259.
- 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
- Wialipon, 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 Humoreys, L.R. 1981. "Influence of Grazing on the Seed Production of *Stylosanthes hamata* cv. Verano." . *Thai Journal Agriculture Science*. 14 : 69- 81.

- Wright, G.C. Hubick, K.T. and Farquhar, G.D. 1991. "Physiological Analysis of Peanut Cultivar Response to Timing and Duration of Drought Stress." *Australian Journal of Agricultural Research*. 42 : 453-470.
- Yuan, X. Liao, L. and Wang, Z. 2011. "Plant Regeneration System from Cotyledons-Derived Calluses Cultures of *Stylosanthes guianensis* cv. 'Reyan 2'." *African Journal of Biotechnology*. 10(56) : 11919-11924.
- Xiuzher, L. 1994 "Effects of Irradiation on Protein Content of Wheat Crop." *Agricultural Sciences in China*. 15 : 53-55.
- Yin, Z. Liang, J. Hao, X. Lu, H. Hao, J. Yin, F. 2015. "Physiological Response of Mung Bean to Polyethylene Glycol Drought Stress at Flowering Period". *American Journal of Plant Sciences* 6 : 785-798.
- Zaerr, J.B. and Maper, M.O. 1982. "Action of Growth Regulators." 231-255. in Bonga, J.M. and Durza, D.J. **Tissue culture in forestry**. The Hague : Junk Publishers.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

ตารางสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS; Murashige and Skoog (1962); Phytotech

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Ammonium Nitrate	1,650
Boric Acid	6.2
Calcium Chloride, Anhydrous	332.2
Cobalt Chloride Hexahydrate	0.025
EDTA, Disodium Salt	37.26
Ferrous Sulfate, Heptahydrate	27.8
Magnesium Sulfate, Anhydrous	180.7
Manganese Sulfate	16.9
Potassium Iodide	0.83
Potassium Nitrate	1,900
Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous	170
Sodium Molybdate (VI), Dihydrate	0.25
Zinc Sulfate, Heptahydrate	8.6
Glycine	2.0
Myo-Inositol	100
Nicotinic Acid	0.5
Phridoxine HCl	0.5
Thiamine HCl	0.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### การเตรียมสารเคมี

#### 1. การเตรียมสารละลาย

##### 1.1 2X CTAB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง CTAB 2 กรัม PVP 1 กรัม NaCl 0.4 กรัม จากนั้นปิเปต EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จำนวน 4 มิลลิลิตร และ 1 โมลาร์ Tris-HCl จำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งหมดในบีกเกอร์ ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยอาจใช้ความร้อนเพื่อช่วยให้สารละลายได้ดีมากขึ้น แล้วปรับปริมาตร ด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

##### 1.2 10% CTAB (ใน 0.7M NaCl) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ปิเปต NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ (จาก stock) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร เติมน้ำ 43 มิลลิลิตร ชั่งสาร CTAB 5 กรัม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้ Magnetic bar คนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

##### 1.3 0.5M EDTA (pH8) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ชั่ง EDTA 93.06 กรัม ลงในภาชนะ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Magnetic bar จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการปรับ pH ให้เท่ากับ 8 แล้วจึงปรับปริมาตร สุดท้ายให้เป็น 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

##### 1.4 10X Tris-borate EDTA buffer (TBE buffer) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris base 108 กรัม ชั่ง Boric acid 61.83 กรัม และชั่ง EDTA 9.305 กรัม นำสารที่ชั่ง มาละลายน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนครบ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และถ้าต้องการเตรียม 1X TBE buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เพื่อใช้งาน ให้ดูดสารละลาย 10X TBE มา 50 มิลลิลิตร แล้วใช้น้ำกลั่นปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

##### 1.5 1M Tris-HCl (pH8) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris 121 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ด้วย 1 โมลาร์ HCl จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วย หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 1.6 10 mM TE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ดูด 1 โมลาร์ Tris-HCl (pH8) มาปริมาตร 10 มิลลิลิตร และดูด 0.5 โมลาร์ EDTA (pH8) มาปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และถ้าต้องการเตรียม 0.1 มิลลิโมลาร์ TE Buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ต้องดูดสารจาก 10 มิลลิโมลาร์ TE Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรเป็น 40 มิลลิลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

### 1.7 20 mg/ml RNase A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ชั่ง RNase A ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับ DI water (deionized water) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้น Vortex จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

## 2. การเตรียมสารในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (PCR)

### 2.1 20 pmol/μl ไพรเมอร์ (ไพรเมอร์ RAPD) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

ดูดแต่ละไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครโมลต่อลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย DI water เป็น 20 ไมโครลิตร

### 2.2 1.25 mM Deoxynucleotide Triphosphate (dNTP) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

จาก stock เบสแต่ละเบสประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ต้องปิเปต dNTPs (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) แต่ละเบส 1.25 ไมโครลิตร รวมเป็น 5 ไมโครลิตร จากนั้นเติม DI water (deionized water) ปริมาตร 95 ไมโครลิตร จะได้ mix dNTPs ที่มีความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 3. การเตรียมสารในวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

### 3.1 การเตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

ชั่งอะกาโรส 0.8 กรัม ลงในพลาสติก เติม 1X TBE buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเทใส่ถาดสำหรับเตรียมเจลที่มีหัว หลังจากนั้น ตั้ง ที่งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เจลเกิดการแข็งตัว

### 3.2 การเตรียม 3X Gel loading dye ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

ดูด 6X Gel loading dye ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำ DI water (deionized water) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

## 4. การเตรียมเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr)

ดูดเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หรือ 500 ไมโครลิตร ลงในภาชนะที่เตรียมไว้ เติม 1X TBE Buffer ปริมาตร 499.5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

### 5.การสกัด DNA โดยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987)

สกัดดีเอ็นเอจากต้นถั่วโดยวิธี CTAB ซึ่งดัดแปลงมาจาก Aldrich and Cullis (Aldrich and Cullis, 1993) เริ่มจากบดต้นอ่อนด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งที่เย็นให้ละเอียดเป็นผง ใส่ 2X CTAB buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บดต่อให้ละเอียด ย้ายตัวอย่างที่บดแล้วใส่ในหลอดขนาด 2.0 มิลลิลิตร เติม  $\beta$ -mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ในตู้ดูดควัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง ทุก 15 นาที เติม chloroform : isoamylalcohol ในอัตรา 24:1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมา 5-6 ครั้ง ทำในตู้ดูดควัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะเห็นว่าตะกอนและส่วนใสถูกแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ดูดสารละลายส่วนใส (300 ไมโครลิตร) ใส่ลงในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม RAase A ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม 10 เปอร์เซ็นต์ CTAB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ เติม chloroform : isoamylalcohol ในอัตรา 24:1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตรในอัตรา 24:1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมา 5-6 ครั้ง ทำในตู้ดูดควัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใส (300 ไมโครลิตร) ควรระวังอย่าให้ตะกอนติดมาด้วย ใส่ลงในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม isopropanol 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ช้ามคืน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วย absolute ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งโดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (บ่มจนกว่าตะกอนจะแห้ง) ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ที่บ่มอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอละลายหมด

## ภาคผนวก ข (ต่อ)

### 6. การวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธี spectrophotometry

ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบมาปริมาตร 3 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 297 ไมโครลิตร (dilution factor = 100) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยมีน้ำกลั่นเป็น blank จากนั้นนำค่า absorbance ที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ นำค่าที่ได้คำนวณหาอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร เพื่อวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ นำมาหาค่า Ratio O.D. 260/280 = 1.8-2.0 แสดงว่าดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ถ้าได้ต่ำกว่านี้แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนมาก

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ ( $\mu\text{g/ml}$ ) =  $A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{dilution factor}$

### 7. การย้อมสี Fluorescein Diacetate (FDA) Stock 5mg/ml

ชั่ง FDA 5 มิลลิกรัม ละลายด้วยอะซิโตน 1 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียม FDA Solution 1 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร โดยดูด FDA จาก Stock 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 200 ไมโครลิตร เติมอะซิโตน 800 ไมโครลิตร เก็บในขวดสีชาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

---

## ***In vitro* effect of gamma irradiation and plant growth regulators (PGRs) for induction and development of *Stylosanthes hamata* cv. Verano**

---

**Ngoengam, L.<sup>1</sup>, Pongtongkam, P.<sup>2</sup>, Arananant, J.<sup>3</sup>, Poeaim, S.<sup>1</sup> and Poeam, A.<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520 Thailand; <sup>2</sup>128/13 Moo5 Tambon Sano Loi, Bang Bua Thong, Nonthaburi, 11110 Thailand; <sup>3</sup>Feed and Forage Analysis Section, Animal Nutrition Division, Department of Livestock Development, Pathumthani Province, 12000 Thailand.

Ngoengam, L., Pongtongkam, P., Arananant, J., Poeaim, S. and Poeam, A. (2019). *In vitro* effect of gamma irradiation and plant growth regulators (PGRs) for induction and development of *Stylosanthes hamata* cv. Verano. International Journal of Agricultural Technology 15(1): 63-74.

**Abstract** Pasture legumes was developed by tissue culture technique using gamma irradiation. Seeds of *Stylosanthes hamata* cv. Verano were received 7 doses of radiation (5, 10, 15, 20, 25, 30 and 45 Krad) and control (without irradiation) cultured on MS medium. Free Plant Growth Regulators (PGRs) and 30 g/L sucrose treatment found that 30 Krad decreased the percentage of shoot and root length of 31.7% and 20.51% respectively in 30 days. While seeds without irradiation were 100% germination. The radiation doses was reduced the growth rate by half in 7 days GR<sub>50(30)</sub> at 39.82 Krad. The lethal dose (LD<sub>50</sub>) of *Stylosanthes hamata* cv. Verano was 26.14 Krad and the higher irradiation level increased death rate. Seeds on MS medium with 3 mg/L of *meta*-Topolin (*mT*) resulted at 60 days after irradiation which higher than 50 % in all treatments. Moreover, every dose of gamma rays stimulated shoots and roots after 60 days.

**Keywords:** gamma irradiation, lethal dose (LD<sub>50</sub>), *Stylosanthes hamata* cv. Verano

### **Introduction**

The most of livestock animals in Thailand are beef cattle and dairy cattle, fed by concentrate and rough food. Rough foods are grasses and beans. Dairy are fed cows by rough food up to 15% of their total daily intake. When the dairy cow receives lower coarse feed than 15%, the milk fat content will decrease, and it effects on digestion system in the rumen and animal health (Thadsri, 1997). Nowadays, Department of Livestock, Thailand has introduced 285 species of beans for study. However, there are only 4 species that produce seed as well are *Centrosema pascuorum* cv. *Cavalcade*, *Desmanthus virgatus*, *Stylosanthes hamata* cv. Verano and *Stylosanthes guianensis*, CIAT 184, which has a seed yield are 67.2, 39.0, 39.7 and 33.0 tons, respectively.

---

\* **Corresponding Author:** Poeaim, A., **Email:** [anurug@hotmail.com](mailto:anurug@hotmail.com)

Hamata beans (*Stylosanthes hamata* cv. Verano), a native bean from Venezuela in South America, was been stuide by Khonkhean University since 1970 by Dr. H.M. Shelton and Dr. L.R. Humphreys, Queenlands University, Australia. (Boonruang *et al.*, 2012). Hamata beans can be grown in a generally general, most cultivated in the Northeast, Thailand, protein content and seed yield are quite high, resistant to animals grazing and it is no report of cattle bloating (Bureau of Animal Nutrition Development, 1982). Khon Kaen university reported the comparative test found that Hamata beans produced higher productivity more than. Another bean in *Stylosanthes* type. This report is similar to (Topark-Ngarm, 1979) reported the various methods to develop the maximum product of seed. For example, the study of appropriate time to release sheep or goat for grazing before seeds harvesting (Wilaipon and Humphreys 1976; Wilaipon and Humphreys, 1981) or period to truncate the bean before seeds harvesting (Wilaipon and Humphreys, 1979).

The feeding beans was done by tissue culture technique with gamma irradiation. Makthong (2013) reported that induction to mutate in (*Medicago sativa* L.) beans by gamma ray. Seed were received doses of radiation of 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, and 900 Gy, the result showed that seeds with 100 Gy of gamma rays decreased the percentage of shoot at 39.2% while seed without gamma irradiation was percentage of shoot at 94.4%, and LD<sub>50</sub> was 100 Gy of gamma rays which suitable for mutation. Benslimani and Khelif (2009) reported that induction of mutation in *Arachis hypogaea* L. by <sup>60</sup>Co irradiation with doses were 50, 100, 150, 200, 300 and 500 Gay. Seeds with 450 Gay of cobalt rays decreased percentage of shoot and root length about 46.5% and 59.0% respectively. Mba *et al.* (2010) suggested doses of gamma irradiation from 0 to 600 Gy should be using for genotype test to choose the optimal treatment condition. Horn and Shimelis. (2013) reported on the various doses of radiation at 0, 100, 200, 300, 400, 500 and 600 Gy in Cowpea (*Vigna unguiculata*) by <sup>60</sup>Co irradiation. The result showed that genotype of Nakard tolerated at 200 Gy, and provided percentage of germination at 43.33%. The optimum dose of 150 Gy made LD<sub>50</sub> of Nakard. Tissue culture technology play a huge role to improve plant variety and combination with gamma irradiation to induce mutation. The aim of experiment was to study the effect of gamma irradiation and plant growth regulators of Hamata beans to induce drought tolerant and salt tolerant.

## **Materials and methods**

### ***Plant material***

Seeds of Hamata beans (*Stylosanthes hamata* cv.Verano) were supported by Feed and Forage Analysis Section, Animal Nautrition

Division, Department of Livestock Development, Pathumthani Province, Thailand.

### ***Gamma Radiation***

The gamma radiation was carried out at the Gamma Irradiation Service and Nuclear Technology Research Center, Kasetsart University, Bangkok, Thailand. In acute irradiation, seeds were irradiated with gamma radiation from Cs-137 using a research irradiator (Mark I) at doses of 0 (control) 5, 10, 15, 20, 25, 30, and 45 Krad. The 0 Gy using as a comparative control. The explants were surface sterilized by using 70% (v/v) ethanol for 2 min, 15%(w/v) sodium hypochlorite solution with 2 to 3 drops of Tween 20 for 15 min, three times rinse in distilled water for 5 min per times. MS medium (Murashike and Skoog, 1962) is used as basal medium with salts and vitamins, added 30 g/L sucrose, 2.6 g/L phytigel, adjusted pH of the medium to 5.8 using 0.5 N NaCl, autoclaved at 121°C for 15 min. The cultures were incubated at 25 ± 2 °C under cool white fluorescent light (27 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) with 16 h light/8 h dark photoperiod. GR<sub>50</sub> (50% growth reduction), a dose can decrease 50% of seeding height. It was determined for all treatments by measuring the seedling height, shoots and root length after 30 days GR<sub>50(30)</sub>. After 30 days, data were calculated the germination percentage (GP) using formula 1 (Dezfuli *et al.*, 2008), the lethal dose 50 percentage (LD<sub>50</sub>) was used by the following formula 2 (Bashir, 2012).

$$GP = \frac{\text{No. of seeds germinated at 30 days after germination}}{\text{No. of seed control}} \times 100$$

$$\text{Survival \%} = \frac{\text{No. of seedlings survived}}{\text{No. of seeds germinated}} \times 100$$

### ***Effect of growth regulators on the growth of bean seeds after irradiation***

Seeds with eight doses of radiation, 0 (control) 5, 10, 15, 20, 25, 30, and 45 Krad, were cultured on MS medium added 30 g/L sucrose, 2.6 g/L phytigel and 3 mg/L meta-Topolin (*mT*). The pH of the medium was adjusted to 5.8 using 0.5 N NaCl, autoclaved at 121°C for 15 min. The cultures were incubated at 25 ± 1 °C under cool white fluorescent light (27 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) with a 16 h light, 8 h dark photoperiod, and measured LD<sub>50</sub> and GR<sub>50</sub> after 30 days.

### ***Data analyses***

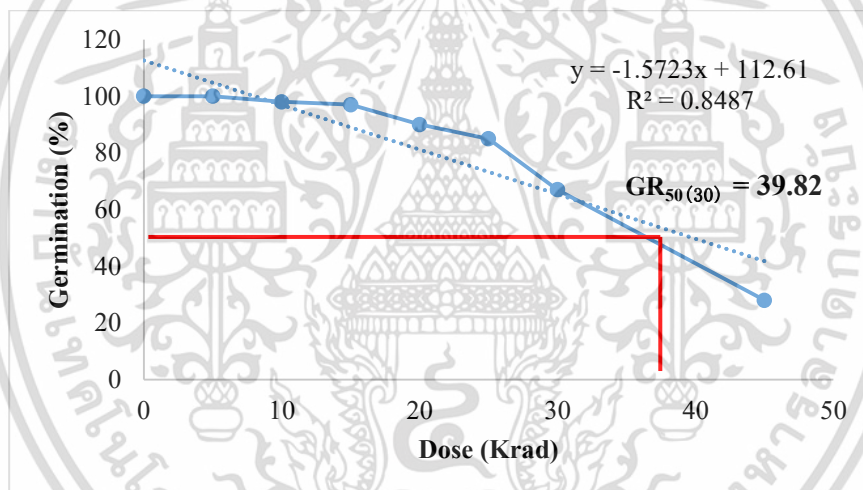
All treatments were repeated three times. ANOVA was computed using SPSS v17. The data for each stage of the experiment was analyzed

using one-way ANOVA and followed by Duncan's multiple range test (DMRT) for mean comparison at p-values 0.05.

## Results

### *Effects of gamma irradiation on germination*

The effect of gamma irradiation on Hamata seeds were irradiated with 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 40 Krad, surface sterilized seeds were cultured on MS agar without plant growth regulators. In general, increasing the gamma dose caused negative effect on plant development as it was indicated by the reduction height, shoot and root lengths at 30 days. The germination response of Hamata beans against irradiation doses were given the linear equations:  $y = -1.5723x + 112.61$  (Fig 1). The highest of  $GR_{50(30)}$  values based on the height of Hamata was 39.82 Krad.



**Figure 1.**  $GR_{50}$  at 30 days of *Stylosanthes hamata* cv. Verano plants treated with different dose of gamma rays

Seed germination, percentage of shoot initiation, percentage of survival, shoot and root lengths of 30 days seedlings was shown in Table 1. The percentage of seed germination gradually decreased as gamma doses increased to 45 Krad in 30 days. The highest percentage of seed germination was 60% at 5 Krad. The highest percentage of shoot initiation shoot and root length at 5 Krad gamma dose of 100%, which were 0.625 cm and 0.344 cm, respectively. The 45 Krad was lowest of 28 %, which shoot and root lengths were 0.114 cm and 0.050 cm, respectively. Roots were stopped growing and cotyledon wilted (Table 1, Fig 2).

**Table 1.** Total number of initial seeds, germination rate, survival rate, shoot and root lengths acutely exposed to different doses of gamma radiation on MS medium at 30 days

Gamma Dose (Krad)	The number of initial seeds	Germination (%) <sup>1/</sup>	Survival (%) <sup>2/</sup>	Shoot length (cm)	shoot response %	Root length (cm)	Root response %
Control	60	60(100)	60(100)	0.680±0.70 <sup>a</sup>	100	0.546±0.10 <sup>a</sup>	100
5	60	60(100)	60(100)	0.625±0.66 <sup>b</sup>	91.91	0.344±0.35 <sup>b</sup>	63.00
10	60	59(98)	56(93)	0.423±0.40 <sup>c</sup>	62.21	0.348±0.15 <sup>b</sup>	63.73
15	60	58(97)	48(80)	0.367±0.52 <sup>d</sup>	53.97	0.311±0.75 <sup>b</sup>	56.95
20	60	54(90)	44(73)	0.353±0.50 <sup>dc</sup>	51.91	0.257±1.27 <sup>c</sup>	47.07
25	60	51(85)	34(57)	0.310±1.10 <sup>c</sup>	45.58	0.114±0.65 <sup>d</sup>	20.88
30	60	40(67)	17(28)	0.214±1.45 <sup>f</sup>	31.47	0.112±0.64 <sup>d</sup>	20.51
45	60	17(28)	4(6)	0.114±0.57 <sup>g</sup>	16.76	0.050±0.56 <sup>c</sup>	9.15

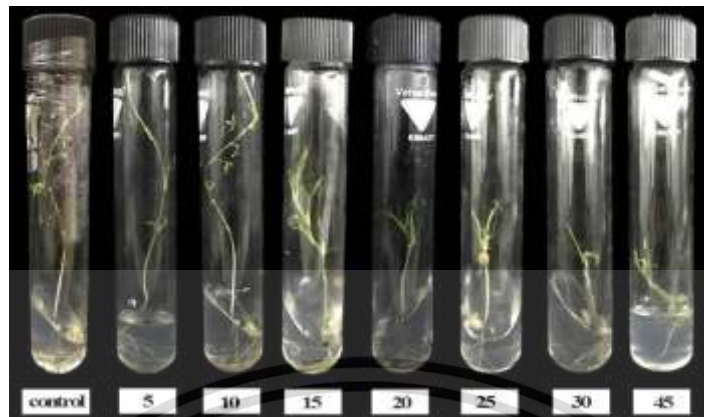
**Table 2.** Total number of initial seeds, germination rate, survival rate, shoot and root lengths acutely exposed to different doses of gamma radiation on MS medium with 3 mg/L of *mT*. The effects were investigated for 60 days

Dose (Krad)	The number of initial seeds	Germination (%) <sup>1/</sup>	Survival (%) <sup>2/</sup>	Shoot length (cm)	shoot response (%)	Root length (cm)	Root response (%)
<i>mT3</i> (control)	60	60(100)	60 (100)	0.880±1.44 <sup>a</sup>	100	0.351±1.15 <sup>a</sup>	100
5	60	60(100)	60(100)	0.829±0.05 <sup>a</sup>	94.20	0.206±0.35 <sup>b</sup>	58.68
10	60	59(98)	59(98)	0.695±0.60 <sup>b</sup>	78.97	0.225±1.12 <sup>b</sup>	64.10
15	60	58(97)	51(85)	0.555±1.27 <sup>c</sup>	63.06	0.243±0.75 <sup>b</sup>	69.23
20	60	59(98)	48(80)	0.414±1.25 <sup>d</sup>	47.04	0.236±1.52 <sup>b</sup>	67.23
25	60	55(92)	47(78)	0.464±0.70 <sup>d</sup>	52.72	0.232±0.11 <sup>b</sup>	66.09
30	60	49(81)	31(52)	0.595 ±0.50 <sup>c</sup>	57.38	0.326±0.30 <sup>a</sup>	92.87
45	60	34(57)	30(50)	0.552±0.26 <sup>c</sup>	62.72	0.321±0.35 <sup>b</sup>	65.81

<sup>a-d</sup> Means in same column with different letters are significantly different at  $P < 0.5$  according to DMRT using one-way ANOVA

<sup>1/</sup> Seed germination means germinated seeds out of total seed number.

<sup>2/</sup> Shoot growth initiation means developed shoots out of total seed number

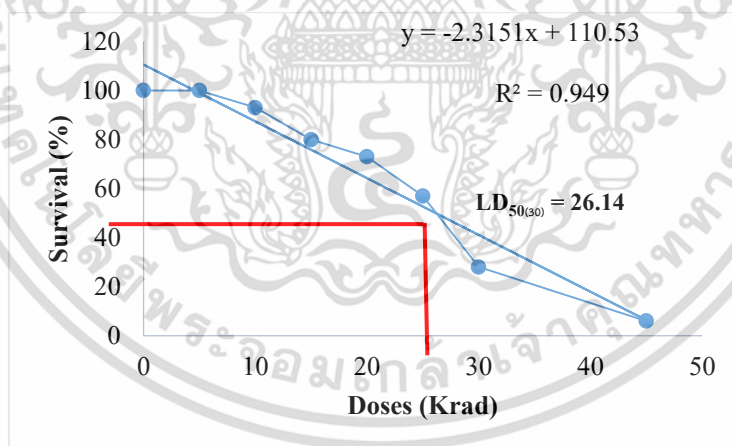


**Figure 2.** *In vitro* seed germination, shoot and root length of *Stylosanthes hamata* cv. Verano seeds irradiated with 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 40 Krad on MS medium at 30 days

The apical meristems were yellow, observed at 26 days death. The leaves cannot grow due to severe physical damage. The survival response of Hamata against irradiation doses was given the linear equations:

$$y = -2.3151x + 110.53 \text{ (Fig 3),}$$

while  $LD_{50(30)}$  was obtained at 26.14 Krad.

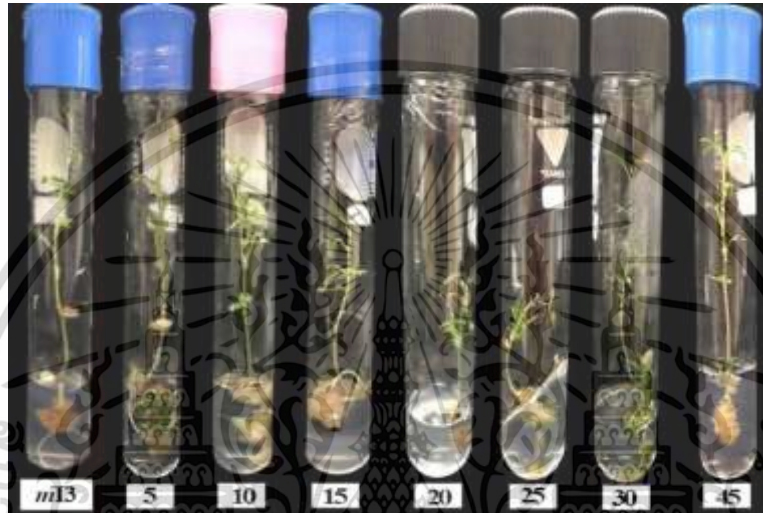


**Figure 3.**  $LD_{50}$  at 30 days of *Stylosanthes hamata* cv. Verano plants treated with different dose of gamma rays

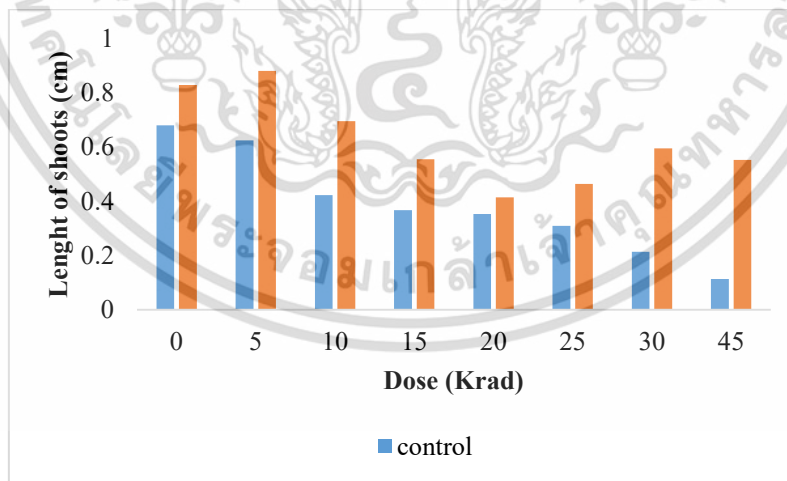
### ***Effect of gamma irradiation on meta-Topolin (mT)***

The irradiation activated in the MS medium added 3 mg/L meta-Topolin (mT) for 60 days. Hamata showed a growth rate over 50 percent in all treatments (Table 2). The treatments of 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 45 Krad were germinated at 100, 100, 98, 85, 80, 78, 52 and 50 percentage,

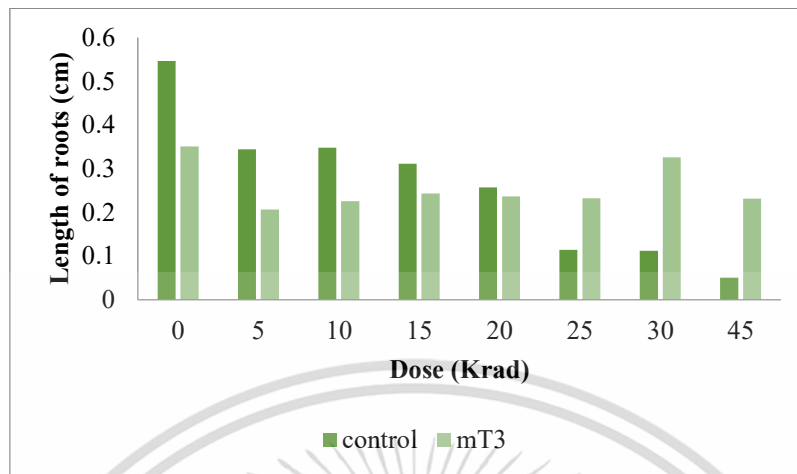
respectively. Seeds obtained gamma rays at 30 and 40 Krad with an average shoot length were 0.595 and 0.552 cm, respectively. The mean length was higher than seeds without hormone which cultured on same medium. Average root length of the control plants and the 30 Krad were 0.351 and 0.326 cm, respectively. All treatments caused calli around the roots (Fig 4). The results showed the survival percentages at 60 days after irradiation were higher than 50 % in all treatments.



**Figure 4.** In vitro of seed germination shoot and root length of *Stylosanthes hamata* cv. Verano seeds irradiated with 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 40 Krad on MS medium added 3 mg/l of mT at 30 days



**Figure 5.** Effects on the length of shoots of *Stylosanthes hamata* cv. Verano by gamma irradiation



**Figure 6.** Effects on the length of roots of *Stylosanthes hamata* cv. Verano by gamma irradiation

A morphological investigation was conducted for 30 days to compare the heights of seeds on MS medium with 3 mg/L of *mT* and free PGRs. In general, the results enhanced the degree of seeds on MS medium with 3 mg/L of *mT* from 0 to 45 Krad with increased in seedling height when compared with those culture on MS medium without hormone (Fig 5). The root length of the plantlets significantly increased in the second week of culture. Plantlets irradiated at 30 and 45 Krad changed in height in all doses when compared with those culture on MS media without hormone (Fig 6).

## Discussion

The effect of gamma irradiation on Hamata seeds were irradiated with 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 40 Krad. The higher of  $GR_{(50)30}$  values based on the plant height of Hamata were 39.82 Krad or around 400 Gy. These results are similar to Kimno and Chepkoech (2014) studied on the induction of mutation using gamma rays on *Sorghum bicolor* L. Seed beans were treated 200, 400 and 600 Gy. Dose of gamma rays at 406 Gy (40 Krad) decreased rate of germination. Ramazan *et al.* (2016) varied doses of  $^{60}\text{Co}$  irradiation at 0, 50 100 150 200 and 250 Gy on *Lathyrus chrysanthus* Boiss. After 14 days, 250 Gy (Krad) affected to seed germination of 14.3%, shoot and root length were 0.5 and 1.3 cm, respectively. Seed of Hamata beans irradiated at 45 Krad (450 Gy), seed germination was 28.0%, shoot and root length were 0.114 and 0.05 cm. From the result showed that low dose of irradiation had no effect on germination rate (IAEA, 1979). Survival, sprouting ability, height and the number of plant organs were affected by higher dose of gamma rays (Nwachukwu *et al.*, 2009; Devi and Mullainathan, 2012). In high dose of gamma irradiation, the growth of root was stopped, cotyledon was wilted, characteristics of seed changed both in

morphology and genetic. Survival plant can repair itself after irradiated with gamma rays and survive depending on dose of irradiation (Ahloowalia, 1998). These changes are the result of genetic was destroyed. It also creates free radicals that can change the structure of the plant cells, physiological and biochemical processes of the plant (Marcu *et al.*, 2013). Hamata beans after 26 days cultivated, apical meristems were changed green to yellow and eventually die. The Leaf stop growing caused by physical damage, which usually resulted in halting of apical meristem or root. The changes in external genes of the nucleus, it can not transfer to next generation (Vos *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2002).

The LD<sub>50</sub> value of Hamata beans with gamma irradiation on MS basal agar medium without PGRs at 26.14 Krad (260 Gy) was created. Rajarajan *et al.* (2016) reported on varied radiation doses of gamma rays at 150, 200, 250, 300 and 350 Gy in rice cultivar ADT (R) 47. The result showed LD<sub>50</sub> value after irradiated at 229 Gy. Gang *et al.* (2007) studied on *Narcissus tazetta* received the highest dose of radiation, survival rate of the plants was significantly reduced.

Seeds of *Stylosanthes hamata* cv. Verano were received 8 doses of radiation on MS medium with 3 mg/L, meta-topolin (*mT*). The results showed the percentages of survival after 60 days with radiation higher than 50 % in all treatments and GR<sub>50(60)</sub> higher than 50 %, while can not get the data of LD<sub>50</sub>. The reason for explaining that it was PRGs in medium, *mT* was a high performance for seed germination on *Stylosanthes hamata* cv. Verano. The other studies were supported in high performance of *mT* which can help the seed growing although there were got the high radiation doses. Pdungsil *et al.* (2015) reported the various radiation doses of 0, 50, 100, 100 and 200 Gy. The results showed that the survival percentages for 30 days after irradiation were higher than 50 % in all treatments. Letham (1971) reported to promote radish cotyledons using cytokinin and explained by the promotion of cell enlargement, *mT* as a most active aromatic cytokinin as reported by Strnad *et al.* (1997) and Chiancone *et al.* (2016) studied of the effect on caulogenesis by *mT* and BA, micro-cuttings were cultured with 3 concentrations of each types of cytokinin on *Citrus tristeza virus*. The *mT* showed the result better than BA, use a low concentration can be giving a comparable multiplication rate. Structure of *mT* is similar to BA, it has not been associated with hyperhydricity, heterogeneity of plant growth or rooting suppression (Amoo *et al.*, 2011; Bairu *et al.*, 2007). In future should study this part to find the answer of LD<sub>50</sub> using the media without PGRs, taken the higher radiation doses and culture.

It concluded that seeds of *Stylosanthes hamata* cv. Verano after 30 days cultivation found that 30 Krad decreased the percentage of shoot and root length of 31.7% and 20.51% respectively. The radiation dose was reduced GR<sub>50(30)</sub> at 39.82 Krad. LD<sub>50(30)</sub> at 26.14 Krad. The higher irradiation level increased the death rate. Seeds with irradiation on MS

medium with 3 mg/L of *mT* after 60 days cultivation, the LD<sub>50</sub> was higher than 50 % in all treatments and GR<sub>50</sub> higher than 50 %. In the future, the improvement of Hamata bean would possible encounter the new characteristic by gamma irradiation in combination with PGRs to improve the growth rate.

## Acknowledgement

The rhizome peanut *Stylosanthes hamata* cv. Verano. Hamata was provided by Feed and Forage Analysis Section. Animal Nutrition Division. Department of Livestock Development. Pathumthani Province, Thailand. Acknowledgements are due to Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL).

## References

- Ahloowalia, B. S. (1998). *In vitro* techniques and mutagenesis for the improvement of Vegetatively Propagated plants. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. 32:293-309.
- Amoo, S. O., Finnie, J. F. and Van Staden, J. (2011). The role of *meta*-Topolins in alleviating micropropagation problems. *Plant Growth Regul.* 63:197-206.
- Bairu, M. W., Stirk, W. A., Dolezal, K. and Van Staden, J. (2007). Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can *meta*-Topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 90:15-23.
- Bashir, S. (2012). Studies on the Induction of Mutations in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). (Master Thesis). University of the Kashmir, Hazratbal, India.
- Benslimani, N. and Khelif, L. (2009). Induction of dormancy in Spanish groundnut seeds (*Arachis hypogaea* L) using Cobalt-60 gamma irradiation. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. pp. 381-384.
- Bureau of Animal Nutrition Development (1982). Effects of cutting intervalstion the digestibility of Hamata stylo. Retrieved from <http://nutrition.dld.go.th/nutrition/index.php/2017-08-10-04-32-46/241-2522/882-stylosanthes-hamata>.
- Boonruang, R., Poeam, A., Pongtongkan, P. and Arananant, J. (2012). *In vitro* regeneration of Hamata (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) using seed explants. 9th Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus Conference, Thailand. pp. 2324-2329.
- Chiancone, B., Martorana, L., Casales, F. and Germana, M. A. (2016). The effects of benzyladenine and *meta*-Topolin on *in vitro* sprouting and regrowth after encapsulation of C35 citrange *Citrus sinensis* L. Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf microcuttings. *International Society for Horticultural Science*. 40:99-106.
- Dezfuli, P. M., Zadeh, F. S. and Janmohammadi, M. (2008). Influence of priming techniques on seed germination behavior of maize inbred lines (*Zea mays* L). *Journal of Agricultural and Biological Science*. 3:22-25.

- Devi, S. A. and Mullainathan, L. (2012). Effect of gamma rays and ethyl methane sulphonate (EMS) in M3 generation of blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper). African Journal of Biotechnology. 11:3548-3552.
- Gang, L., Xiaoying, Z. Yijing, Z., Qingcheng, Z., Xun, X. and Jiashu, C. (2007). Effect of radiation on regeneration of Chinese narcissus and analysis of genetic variation with AFLP and RAPD markers. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 88:319-327.
- Kimno, S. and Chepkoech, E. (2014). Application of mutation techniques to determine the optimum sensitivity dose for sorghum. Research Application Summary, Eldoret, Kenya. pp. 485-486.
- Horn, L. and Shimelis, H. (2013). Radio-sensitivity of selected cowpea (*Vigna unguiculata*) genotypes to varying gamma irradiation doses. Academic Journals. 8:1991-1997
- IAEA (1979). Manual on mutation breeding. Technical Report Series No. 119. Second Edition. Joint FAO/IAEA Division of Atomic Energy in Food and Agriculture. 288.
- Lee, Y. I., Lee, I. S. and Lim, Y. P. (2002). Variations in sweet potato regenerates from gamma ray irradiated embryonic callus. Journal Plant Biotechnology. 4:163-170.
- Letham, D. S. (1971). Regulators of cell division in plant tissues. XII. A cytokinin bioassay using excised radish cotyledons Physiol Plant. 25:391-396.
- Makthong, C. (2013). The Effects of Gamma Irradiation on Mutant Induction in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Master Thesis). University of Ramkhamhaeng, Thailand.
- Marcu, D., Damian, G., Cosma, C. and Cristea, V. (2013). Gamma Radiation Effects on Seed Germination, Growth and Pigment Content, and ESR Study of Induced Free Radicals in Maize (*Zea mays*). Journal of Biological Physics. 39:625-634.
- Mba, C., Afza, R. and Jain S. M. (2010). Induced mutagenesis in plants using physical and chemical agents. Plant Cell Culture. 22:111-130.
- Murashike, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Journal of Plant Physiology. 15:473-497
- Nwachukwu, E. C., Mbanaso, E. N. A. and Nwosu, K. I. (2009). The development of new genotypes of the white yam by mutation induction yam minitubers. International Symposium on Induced Mutations in Plants. 4:309-312.
- Pdungsil, N., Taechasinpitak, T., Wongchowchan, S. and Chanchula, S. (2015). Mutational Induction in *Catharanthus roseus* L. by Acute Gamma Irradiation. Thai Journal of Science and Technology. 4:96-103.
- Rajarajan, D., Saraswathi, R. and Sassikumar, D. (2016). Determination of lethal dose and effect of gamma ray on germination percentage and seedling parameters in ADT. International Journal of Advanced Biological Research. 6:328-332.
- Ramazan, B., Cansu Telic, K. and Cigdem, Y. (2016). The effect of gamma radiation on seed germination and seedling growth of *Lathyrus chrysanthus* Boiss. Under *in vitro* condition Journal of Environmental Radioactivity. 4:256-268.
- Thadsri, S. (1997). Tropical forage production and management. (Master Thesis). University of the Kasetsart, Thailand.
- Strnad, M., Hanus, J., Vanek, T., Kaminek, M., Ballantine, J. A., Fussell, B. and Hanke, D. E. (1997). Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus canadensis* Moench cv. Robusta). Phytochemistry. 45:213-218.

- Topark-Ngarm, A. (1979). Effects of seeding rate and cutting frequency on forage yields of four *Stylosanthes* spp. Khonkaen University Pasture Improvement Project. Annual Report. pp. 24-29.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zebeau M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprintings. *Nucleic Acids Research*. 23:4407-4414.
- 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.
- 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.

(Received: 20 November 2017, accepted: 30 December 2018)

---

## ***In vitro* effect of plant growth regulators (PGRs) for callus induction and plant regeneration from suspension of Hamata (*Stylosanthes hamata* cv. Verano)**

---

Ngoenggam, L.<sup>1</sup> Pongtongkam, P.<sup>2</sup> and Arananant, J.<sup>3</sup> Poeaim, S.<sup>1</sup> and Poeaim, A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand; <sup>2</sup>128/13 Moo5 Tambon Sano Loi, Bang Bua Thong, Nonthaburi, 11110, Thailand; <sup>3</sup>Feed and Forage Analysis Section, Animal Nutrition Division, Department of Livestock Development, Pathumthani Province, Thailand.

Ngoenggam, L., Pongtongkam, P., Arananant, J. Poeaim, S. and Poeaim, A. (2018). *In vitro* effect of plant growth regulators (PGRs) for callus induction and plant regeneration from suspension of Hamata (*Stylosanthes hamata* cv. Verano). International Journal of Agricultural Technology 14(7): 1515-1524.

**Abstract** The plant regeneration from seed of Hamata (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) was found. Seeds were induced on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) with different concentration of cytokinin were used 0.5, 1 and 3 mg/L 6-benzyladenine (BAP) *meta*-Topolin (*mT*) or Thidiazuron (TDZ), respectively. The result showed that the highest percentage of seed induction was 65% and average shoots 8.66 shoots per seed on MS medium with 3 mg/L *mT* for 12 weeks cultivation. For node of hamata were study on callus and shoot induction on MS medium with 0.5 mg/L IBA combined with 0.5, 1 and 3 mg/L TDZ. The highest percentage of callus and shoot induction was 100% gave average areas of callus at 11192.84 mm<sup>3</sup> and the number of shoots per callus was 13.50 shoots on MS medium with 0.5 mg/L IBA combined 3 mg/L TDZ for 8 weeks cultivation Cell suspension culture of callus that developed from node of hamata. The friable callus was transferred to liquid MS medium with 0.5 mg/L IBA combined with 3 mg/L TDZ for 4 weeks cultivation After that transferred to MS medium with 3 mg/L *mT* for shoots regeneration. The percentage of shoots generation from callus was shown on 90% and the number of shoots per callus was 14.00 shoots for 12 weeks cultivation. Transferred shoot to root medium containing of MS medium with Indole-3-butyric acid (IBA) Naphthaleneacetic acid (NAA) or Indole-3-acetic acid (IAA) at 0.1, 0.3 and 0.5 mg/L. The result showed that the highest percentage of root induction was 100% and gave averaged roots at 11.00±1.87 roots per shoot on MS medium with 0.3 mg/L NAA for 12 weeks cultivation.

**Keywords:** Node, Plant Growth Regulators suspension, *Stylosanthes hamata* cv. Verano

### **Introduction**

Legumes a large family of plants from the grass. It is important for human and animal food. The plants are high nutritious and protein. In addition

---

\* **Corresponding Author:** Poeaim, A., **Email:** [anurug@hotmail.com](mailto:anurug@hotmail.com)

to food, Fabaceae plant has significant to economic because Fabaceae plant are special from other crops. It can use nitrogen in the air to growth. *Rhizobium* causes root-knot obtain food and energy from plant. while Fabaceae plant obtain compounds product from rhizobium use to growth. So, legume plants are important role in maintaining soil fertility decrease soil erosion. In addition, legume used in "ley-farming" to increase the soil abundance. Some legume species play a role in forest and used in biofuel (Jones *et al.*, 1997).

Hamata (*Stylosanthes hamata* cv. Verano), a native bean from Venezuela in South America, was been studied by Khonkaen University since 1970 by Dr. Shelton and Dr. Humphreys, Queensland University, Australia. Hamata can be growth on normal weather in Northeast. High protein content and resistant to grazing animals. There are no reports that make beef cattle and dairy cattle flatulence like some beans. And high seed yield (Bureau of Animal Nutrition Development, 1982). In tests comparing varieties at KhonKaen University. Hamata produced the higher yield than forage variety. According to (Topark-Ngarm *et al.* (1979). Seed production has been tested to find the maximum yield of seed. For example, the optimal time which would release the beef cattle and dairy cattle before harvesting the seeds or harvest the seeds before cutting the bean (Wilaipon and Humphreys, 1976; Wilaipon *et al.*, 1979; Wilaipon and Humphreys, 1981).

The report is available on tissue culture of *Stylosanthes* spp. using cotyledon and hypocotyl induction callus on MS medium with BAP and NAA in different concentrations were used for callus induction and shoots regeneration. The percentage of cotyledon left and hypocotyl from callus of *Stylosanthes* spp. were 90.33% and 81.33%, respectively. on MS medium with 3.0 mg/L BAP and 1 mg/LNAA (Kumar and Chandra (2010) According to, (Boonrung *et al.*, 2012) studied of cell suspension of *Stylobates guianensis* CIAT 184 by using the callus derived from cotyledon callus induction on MS medium with 1 mg/L 2,4-D. The results showed fresh weight and dry weight of cell suspension with the best growth for 15 days of 0.6304 g/25mL and 0.0360 g/25mL, respectively.

The aims of this study were to investigated *in vitro* callus induction and cell suspension regeneration from node with optimum and concentration of plant growth regulators for *Stylosanthes hamata* cv. Verano.

## Materials and Methods

### *Plant material and plant regeneration*

The used seeds of hamata (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) were supported by Feed and Forage Analysis Section, Animal Nutrition Division,

Department of Livestock Development, Pathumthani Province, Thailand. Seeds of hamata were surface sterilized by 70% ethanol for 2 min and 15% sodium hypochlorite solution with few drops of tween 20 for 15 min and washed 3 times in sterilized water. The seeds were placed on 3 different Murashige and Skoog (1962) media with various concentrations at 0.5, 1, and 3 mg/L, 6-benzylaminopurine (BAP), Thiazine (TDZ) and *meta*-Topolin (*mT*) Medium containing 30 g/L sucrose and 2.6 g/L phytigel (pH 5.8). The culture was incubated at  $25 \pm 1$  °C under fluorescent light ( $27 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) for 16hrs and dark condition for 8 hrs.

### ***Callus induction***

Callus was derived from hamata node and obtained regeneration on MS medium containing combinations of 0.5 mg/L Indole-3-butyric acid (IBA) and TDZ (0.5, 1 and 5 mg/L). Callus was subculture on a new medium every 4 weeks cultivation. Callus composition and structure was observed under Field Emission Scanning Electron Microscope and Energy Dispersive X-ray Spectrometer (FESEM-EDS (7610F)).

### ***Suspension culture***

The friable callus was transferred into liquid MS medium of 0.5 mg/L IBA combined with 3 mg/L TDZ for 12 weeks cultivation. The culture was maintained at 120 rpm  $25 \pm 1$  °C. After suspension culture made shoots were on MS medium with 3 mg/L *mT*.

### ***Roots induction***

The shoots from 12 weeks cultivation regenerating callus were taken to the MS medium with Indole-3-butyric acid (IBA) Naphthaleneacetic acid (NAA) or Indole-3-acetic acid (IAA) at 0.1, 0.3 and 0.5 mg/L.

### ***Data analyses***

All treatments were repeated three replicates. ANOVA was involved using SPSS v25. The data was analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range Test (DMRT) for mean comparison at *p*-values 0.05

## **Results**

### ***Plant regeneration***

The seeds were regenerated to multiple shoots culture with 0.5, 1, and 3 mg/L BAP, TDZ and *mT*, respectively. The percentage of germination was 65%. The results for multiple shoots from cultured seeds with 3 mg/L *mT* were 8.66 shoots per seed. After 8 weeks cultured, shoots length was  $4.28 \pm 0.10$  cm. (Figure 1A) The lowest of shoots regenerated was 1.00 shoots per seed and shoots length was 0.47 cm was recorded in 0.5 mg/L BA (Table 1).

### ***Callus induction from node***

The formatted callus could be observed from the node after 4 weeks cultivation seeding responded with 0.5 mg/L IBA combined with 1, 3 and 5 mg/ml TDZ (Table 2). The formatted callus was compact, green (Figure 1B) and friable callus were yellow. (Figure 2A) However, the callus was friable on with 0.5 mg/L IBA combined with 3 mg/L TDZ. The maximum percentage of callus was 77% observed in 0.5 mg/L IBA combined with 3 mg/L were  $13.5 \pm 0.14$  shoots per callus and shoots length was  $1.30 \pm 0.14$  cm for 8 weeks cultivation. However, the callus percentage was 55% on 0.5 mg/L IBA combined with 5 mg/L TDZ. The highest compact callus per callus was  $19712.08 \text{ mm}^3$  (Table1). The callus structure from hamata node by SEM resolution 500 mm at 15 kv and magnification x15 (Figure 1C).

### ***Shoot regeneration from suspension***

The friable callus was transferred to liquid MS medium with 0.5 mg/L IBA combined with 3 mg/L TDZ. The callus was changed from yellow to green after 4 weeks cultivation (Figure 2B) The embryogenic callus initiated to multiple shoots for 8 weeks cultivation. (Figure 2C). After that transferred to MS medium with 3 mg/L *mT* for shoots regeneration. The percentage of shoots generation from callus was 90%. The shoots per callus was 14.00 shoots and shoots length were  $1.24 \pm 0.08$  cm for 8 weeks cultivation. (Figure 2D).

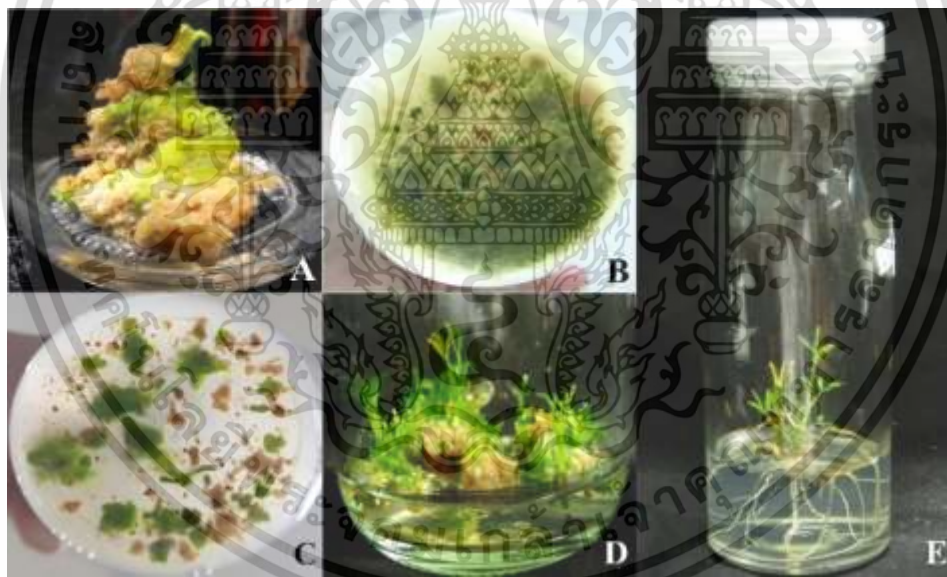
### ***Root induction from the regenerated shoots***

The roots were cultured with 0.1, 0.3, and 0.5 mg/L IBA, IAA and NAA, respectively (Table 3). The roots were initiated after 2 weeks cultivation. The roots per shoot, roots length was measured after 12 weeks cultivation. The maximum of roots formation in 0.3 mg/L NAA were  $11.00 \pm 1.87$  roots per root and roots length was  $2.84 \pm 1.63$  cm after 8 weeks cultivation (Figure 2E). The

lowest of regenerated roots were  $2.50 \pm 0.64$  roots and roots length was  $0.13 \pm 0.26$  cm with 0.1 mg/L IBA.



**Figure 1.** Induction of shoots in Hamata (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) culture (A) Multiple shoot induced from seed with 3 mg/L *mT* for 8 weeks (B) Compact callus induction from node with 0.5 mg/L IBA and combined with 5 mg/mL TDZ for 8 weeks (C) The callus structure from hamata node by SEM resolution 500 mm at 15 kv and magnification x15



**Figure 2.** Callus and suspension cultures of *S. hamata* cv. Verano (A) Friable callus induction from node with 0.5 mg/L IBA and combined with 3 mg/mL TDZ for 8 weeks (B-C) Cell suspension induction with 0.5 mg/L IBA and combined with 3 mg/mL for 4 and 8 weeks, respectively (D) Multiple shoots regenerated from suspension culture with 3 mg/L *mT* for 12 weeks (E) The roots induction with 0.3 mg/L NAA for 12 weeks



**Figure 3.** Step for shoots and roots induction of *S. hamata* cv. Verano (A) Multiple shoot induced from seed on MS medium with 3 mg/L *mT* for 8 weeks (B) The node with 2-3 cm (C) Callus induction from node with 0.5 mg/L IBA combined with 3 mg/mL TDZ for 8 weeks. (D-F) Cell suspension induction with 0.5 mg/L IBA and combined with 3 mg/mL for 4, 8 and 12 weeks, respectively. (G) Multiple shoots regenerated from suspension culture with 3 mg/L *mT* for 12 weeks (H) The roots induction with 0.3 mg/L NAA for 12 weeks

**Table 1.** Effects of different concentrations of BAP, TDZ and *mT* in MS medium on multiple shoots induction from seed of *Stylosanthes hamata* cv. Verano

Plant growth regulators (mg/L)			The number of initial seeds	Shoot formation (%) <sup>1/</sup>	Shoot/seed explants <sup>2/</sup>	Shoots length (cm)
BAP	TDZ	<i>mT</i>				
	control		80	0	0	0
0.5	0	0	80	60.00	1.00±0.0 <sup>f</sup>	0.0±47.23 <sup>b</sup>
1	0	0	80	57.50	4.±500.23 <sup>b</sup>	0.0±71.40 <sup>b</sup>
3	0	0	80	45.50	1.±530.01 <sup>c</sup>	0.0±47.06 <sup>b</sup>
0	0.5	0	80	56.25	1.33±0.01 <sup>c</sup>	0.0±31.01 <sup>b</sup>
0	1	0	80	60.00	1.41±0.26 <sup>c</sup>	0.0±48.15 <sup>b</sup>
0	3	0	80	51.25	4.±330.01 <sup>b</sup>	1.0±45.06 <sup>b</sup>
0	0	0.5	80	55.00	2.00±0.00 <sup>d</sup>	0.0±26.35 <sup>b</sup>
0	0	1	80	63.75	4.00±0.00 <sup>c</sup>	5.1±03.35 <sup>a</sup>
0	0	3	80	65.00	8.±660.04 <sup>a</sup>	4.0±28.10 <sup>a</sup>

<sup>a-f</sup> Means in same column with different letters are significantly different at  $P < 0.5$  depending on DMRT using one-way ANOVA

<sup>1/</sup> Seeds germination means germinated seeds out of total seeds number

<sup>2/</sup> Shoots growth initiation means developed shoots out of total seeds number

**Table 2.** Effects of different concentrations of IBA in combination with optimized concentrations of TDZ in MS medium on callus induction from node of *Stylosanthes hamata* cv. Verano

Plant growth regulators (mg/L)		The number of initial nodes	Callus formation (%) <sup>1/</sup>	Average callus number per node mm <sup>3</sup>	Shoot/node explants <sup>2/</sup>	Average length of shoot (cm)
IBA	TDZ					
0.5	1	40	77	8111.99	2.±250.19 <sup>c</sup>	0.610±.19 <sup>c</sup>
0.5	3	40	100	11192.84	13.5±0.14 <sup>a</sup>	1.300±.14 <sup>b</sup>
0.5	5	40	55	19712.08	6.50±0.06 <sup>b</sup>	0.0±76.06 <sup>a</sup>

<sup>a-b</sup> Means in same column with different letters are significantly different at P < 0.5 depending on DMRT using one-way ANOVA

<sup>1/</sup> Callus germination means germinated node out of total node number.

<sup>2/</sup> Shoot growth initiation means developed shoots out of total node number

**Table 3.** Effects of different concentrations of IBA, IAA and NAA in MS medium on roots induction from shoots of *Stylosanthes hamata* cv. Verano

Plant growth regulators (mg L <sup>-1</sup> )			The number of initial seeds	Root formation developed (%) <sup>1/</sup>	Roots/ explants <sup>2/</sup>	Roots length (cm)
IBA	IAA	NAA				
control	0	0	10	0	0	0 <sup>g</sup>
0.1	0	0	10	40	2.50±0.64 <sup>de</sup>	0.13±0.26 <sup>c</sup>
0.3	0	0	10	50	4.25±0.25 <sup>cd</sup>	0.15±0.33 <sup>c</sup>
0.5	0	0	10	80	10.25±2.13 <sup>a</sup>	2.26±0.50 <sup>b</sup>
0	0.1	0	10	50	6.50±0.86 <sup>bc</sup>	1.35±0.24 <sup>cd</sup>
0	0.3	0	10	70	5.50±0.86 <sup>cd</sup>	2.16±0.59 <sup>b</sup>
0	0.5	0	10	30	2.75±1.18 <sup>de</sup>	1.30±0.34 <sup>de</sup>
0	0	0.1	10	100	9.00±0.70 <sup>ab</sup>	1.15±0.90 <sup>ef</sup>
0	0	0.3	10	100	11.00±1.87 <sup>a</sup>	2.84±1.63 <sup>a</sup>
0	0	0.5	10	100	2.75±0.85 <sup>de</sup>	1.07±0.29 <sup>f</sup>

<sup>a-f</sup> Means in same column with different letters are significantly different at P < 0.5 depending on DMRT using one-way ANOVA

<sup>1/</sup> Roots germination means germinated shoots out of total node number.

<sup>2/</sup> Roots growth initiation means developed shoots out of total node number

## Discussion

Hamata seeds were induced with different concentration of cytokinin were 0.5, 1 and 3 mg/L BAP, *mT* and TDZ, respectively. The result showed the highest percentage of seed induction was 65% and shoots were 8.66 shoots per shoots with 3 mg/L *mT* after 12 weeks cultivation. The previous report of micropropagation from seeds (Boonruang *et al.*, 2011) explained that 1 mg/L

BAP shoots were 5.06 shoots per seed with 1 mg/L BAP for 8 weeks cultivation. In the present study, the best growth regulator was 3 mg/L. *mT* made seeds multiple induction were 8.66 shoots per seed and shoots length was 4.28 cm after 8 weeks cultivation. *mT* was a high performance for seeds germination on *Stylosanthes hamata* Amoo *et al.* (2010) reported that high concentration of *mT* had less toxic than higher concentrations of BA.

The callus was regenerated from node with 0.5 mg/L IBA combined with 3 mg/mL TDZ was the best regeneration. Similar to Movahedi *et al.* (2015) studied on plant growth regulators, cotyledon and epicotyl cultured with 0.5 mg/L IBA combined with 3 mg/L TDZ. The highest callus had fresh weight 3.15 g and TDZ combined with IBA was the best treatment for callus induction, the results are like Mustafa *et al.* (2017) callus induction of *Phaseolus vulgaris* L. with 2.5 mg/L 2,4-D combined with 0.5 mg/L BAP. The shoots per callus was 3.00 shoots and shoots length were 16 cm. In the other hand, Hussaini *et al.* (2015) suggested that the callus induction and plant regeneration in potato (Arnova) with 0.22 mg/L TDZ combined with 0.49 mg/L NAA The Shoot formation completely failed after second and third subculture The TDZ and NAA were better response for cell division when higher concentration of auxin and cytokinin applied together.

Cell suspension culture was friable callus and developed to compact callus. The result was agreed with Gruel *et al.* (2001) in resulted that TDZ stimulated a compact-green callus from node. Al-Juboory *et al.* (1998) and Murthy *et al.* (1998) suggested MS medium with 2.20 mg/L TDZ combined with 0.44 mg/L IAA was more effective for callus production from gardenia. The efficacy of TDZ was strongly supported callus induction from shrub plant. More recently, TDZ induced shoots regeneration better than BAP in *Arachis hypogaea* because TDZ had the morpho-regulatory potential of the chemical that led to tissue and organ culture application (Victor *et al.*, 1999).

For roots induction use auxin (IBA, IAA and NAA) in MS medium. The result showed the highest percentage of roots induction was 100% and roots formation at  $11.00 \pm 1.87$  roots per shoot with 0.3 mg/L NAA for 12 weeks cultivation. Similar to Rey *et al.* (2000) studied on microshoots of *Arachis pintoii*. The best roots induction used with 0.01 mg/L NAA. Moreover, Dolce *et al.* (2017) suggested that the root induction with 1 g/L of activated carbon (AC). In the field, *Arachis pintoii* was acclimatized and made 90% of roots induction. In the future of this study cell suspension of hamata can be new mutation by gamma irradiation for salt tolerant and drought tolerant.

It concluded that seeds of *Stylosanthes hamata* cv. Verano were induced 3 mg/L *mT*. The result showed the highest percentage of seed induction was 65% and average shoots 8.66 shoots per shoots at 12 weeks cultivation. The callus

induction with 0.5 mg/L IBA combined with 3 mg/L TDZ. The highest percentage of callus induction was 100% gave average areas of callus as 11192.84 mm<sup>3</sup>. The percentage of shoots generation by cell suspension from callus was 90% and the shoots per callus was 14.00 shoots at 12 weeks cultivation. The roots induction with NAA 0.3 mg/L. The result showed the highest percentage of root induction was 100% and average of roots were 11.00±1.87 roots per shoot.

### Acknowledgement

Hamata (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) were received from Feed and Forage Analysis Section. Animal Nutrition Division. Department of Livestock Development, Pathumthani Province, Thailand. This work supported by Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMUTL).

### References

- Al-Juboory, K. H., Skirvin R. M. and Williams, D. J. (1998). Callus induction and adventitious shoot of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) leaf explants. *Scientia Horticulturae*. 72:171-178.
- Amoo, S. O., Finnie, J. F. and Van Staden, J. (2010). The role of *meta*-topolins in alleviating micropropagation problems. *Plant Growth Regulation*. 6:197-206.
- Boonruang, R., Poeaim, A. Pongtongkan, P. and Arananant, J. (2011). Growth study of cell suspension cultures of callus from cotyledon forage pea (*Stylosanthes guianensis* CIAT 184) The 49th Kasetsart University Annual Conference, Thailand, 529-535.
- Boonruang, R., Poeaim, A. Pongtongkan, P. and Arananant, J. (2012). *In vitro* regeneration of Hamata (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) using seed explants. 9th Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus Conference, Thailand, pp.2324-2329 .
- Bureau of Animal Nutrition Development (1982). Effects of cutting intervalstion the Digestibility of Hamata stylo. Retrieved from <http://nutrition.dld.go.th/nutrition/index.php/2017-08-10-04-32-46/241-2522/882-stylosanthes-hamata>
- Dolce, N. R., Faloci, M. M. and Gonzalez, A. M. (2017). *In vitro* plant regeneration, and cryopreservation of *Arachis glabrata* (Fabaceae) using leaflet explants. *in vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 54:133-144.
- Gurel, S., Gurej, E. and Kaya, Z. (2001). Callus development and indirect shoot regeneration from seedling explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Cultured in vitro Turkish Journal of Botany*. 25:25-33.
- Hussaini, Z. A, Yousif, S. H. A. and Ajeely, S. A. (2015). Influence of silver and copper nanoparticles on physiological characteristics of *Phaseolus vulgaris* L. *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6:834-843.
- Jones, R. J, Mcivor, J. G. Middleton, C. H, Burrows, W. H, Orr, D. M. and Coates, D. B. (1997). Stability and productivity of *Stylosanthes* pastures in Australia. I. Long-term botanical changes and their implications in grazed *stylosanthes* pasture. *Tropical Grasslands*. 31:482-493.

- Kumar, S. and Chandra, A. (2010). *In vitro* plantlet regeneration in *Stylosanthes* spp via callus induction from cotyledonary and hypocotyl explants. National Academy Science Letters. 9:289-297.
- Movahedi, M., Ghasemi, O. V. O. and Torabi, S. (2015). The effect of different concentrations of TDZ and BA on *in vitro* regeneration of *Iranian cannabis* (Cannabis). Journal of Plant Molecular Breeding. 3:20-27.
- Murashike, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Journal of Plant Physiology. 15:473-497.
- Murtsy, B. N. S., Murch, S. J. and Sasena, P. (1998). Thidiazuron, A protein regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro* Cellular & Developmental Biology. 34:267-275.
- Mustafa, H. S., Oraibi, A. G., Ibrahim, K. M. and Ibrahim, N. K. (2017). Influence of silver and copper nanoparticles on physiological characteristics of *Phaseolus vulgaris* L. *in vitro* and *in vivo*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 6:834-843.
- Rey, H. Y., Scocchi, A. M., Gonzalez, A. M. and Mroginski, L. A. (2000). Plant regeneration in *Arachis pintoii* (Leguminosae) through leaf culture. Plant Cell Reports. 19:856-86.
- Topark-Ngarm, A. (1979). Effects of seeding rate and cutting frequency on forage yields of four *Stylosanthes* spp. Khonkaen University Pasture Improvement Project. Annual Report. 24-29.
- Victor, J. M. R., Murthy, B. N. S., Murch, S. J., Kishnaraj, S. and Saxend, P. K. (1999). Role of endogenous purine metabolism in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of peanut (*Arachis hypogaea* L.) Plant Growth Regulation. 28:41-47.
- 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.
- 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.
- Wialipon, 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.

(Received: 3 September 2018, accepted: 1 November 2018)

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาว ลีลาวดี เงินงาม  
วัน เดือน ปีเกิด 26 กันยายน 2534  
ที่อยู่ปัจจุบัน 55/2 หมู่ที่ 6 ต. บางใหญ่ อ.บางใหญ่ จ.นนทบุรี 11140  
ประวัติการศึกษา  
ปี 2559 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปี 2562 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### ผลงานทางวิชาการ

ปี 2561

Ngoengam, L. Poeaim, A. Pongtongkam, P. and Arananant, J. Poeaim, S. 2018.  
“*In Vitro* Effect of Plant Growth Regulators (PGRs) for Callus Induction and Plant Regeneration from Suspension of Hamata (*Stylosanthes hamata* cv. Verano).” *International Journal of Agricultural Technology*. 14(7) : 1515-1524.

ปี 2562

Ngoengam, L. Pongtongkam, P, Arananant, J. Poeaim, S. and Poeaim, A. 2019.  
“*In Vitro* Effect of Gamma Irradiation and Plant Growth Regulators (PGRs) for Induction and Development of *Stylosanthes hamata* cv. Verano.” *International Journal of Agricultural Technology*. 15(1) : 63-74.