ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

เรื่อง

การเพาะเลี้ยงเอมบริโอของถั่วลิสงที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9×ขอนแก่น 60-3

Embryo Culture of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.)

Hybridization between Tinan 9 × Khonkaen 60-3

โดย

นางสาวนาราอร สว่างวงศ์

นางสาววิไลวรรณ เหล็กคงสันเทียะ

ได้รับความเห็นชอบโดย

.....

(อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ.ดร. สมยศ เดชภิรัตนมงคล)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

วันที่ 13 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

การเพาะเลี้ยงเอมบริโอของถั่วลิสงที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9×ขอนแก่น 60-3

Embryo Culture of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.)

Hybridization between Tinan 9×Khonkaen 60-3

T109081

โดย

นางสาวนาราอร สว่างวงศ์

นางสาววิไลวรรณ เหล็กคงสันเทียะ

สาขาวิชาพืชไร่

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปก.
ม.4847
2544

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 109081
วัน,เดือน,ปี -4 ต.ค. 2553

b 12230480
i.....

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พุทธศักราช 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

การทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี คณะผู้จัดทำต้องขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำช่วยเหลือทั้งในด้านความรู้ หนังสือสำหรับค้นคว้า อุปกรณ์ต่างๆรวมทั้งสถานที่ทำการศึกษาทดลองและยังช่วยแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการทดลองตลอดเวลา

กราบขอบพระคุณพ่อแม่ที่ให้การสนับสนุนในทุกๆด้านไม่ว่าจะเป็นค่าใช้จ่ายหรือความสะดวกในการเดินทางไปศึกษาหาข้อมูลหรือวัสดุนอกสถานที่

ขอบพระคุณ อาจารย์สมจินตนา ทุมเสน จากศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นที่กรุณาเอื้อเฟื้อเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงทั้งสองสายพันธุ์และเอกสารวิชาการต่างๆที่เกี่ยวกับถั่วลิสง

ขอบพระคุณ พี่อู๊ด ที่ช่วยเหลือเรื่องทุกอย่างตั้งแต่เตรียมการปลูกไปจนถึงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ขอขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่มาอยู่เป็นเพื่อนทำ lab ดึกๆหลายครั้งและยังซื้อข้าวซื้อน้ำมาส่งอีกด้วย

นาราอร สว่างวงศ์

วิไลวรรณ เหล็กคงสันเทียะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง: การเพาะเลี้ยงเอมบริโอของถั่วลิสงที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 × ขอนแก่น 60-3

Embryo Culture of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Hybridization between Tinan 9 × Khonkaen 60-3

โดย: นางสาวนาราอร สว่างวงศ์
นางสาววิไลวรรณ เหล็กดงสันเทียะ
สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษา: อาจารย์วิชัย ลิ้มกาญจนพงศ

บทคัดย่อ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของถั่วลิสงที่ได้จากการผสมข้าม ระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 × ขอนแก่น 60-3 โดยดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระหว่างเดือนสิงหาคม ถึง พฤศจิกายน พ.ศ.2544 การทดลองนี้ใช้เอมบริโอที่มีอายุ 10, 15, 20, 25, และ 30 วัน หลังการผสมข้าม เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ใส่ macronutrient เพียง ½ อัตราส่วนเป็นเวลา 14 วัน

ผลปรากฏว่าเอมบริโอทุกช่วงอายุสามารถเจริญพัฒนาได้ ในอาหารสังเคราะห์สูตรMS ที่ใส่ macronutrient ½อัตราส่วน โดยเอมบริโอที่อายุ 30 วัน หลังการผสมข้ามสามารถเจริญพัฒนาเป็นต้นที่สมบรูณ์ได้ดีที่สุด เอมบริโอที่อายุ 25 และ 20 วัน พัฒนาเป็นต้นได้ดีรองลงมาตามลำดับ ส่วนเอมบริโอที่มีอายุ 10 และ 15 วัน เจริญพัฒนาเป็นแคลลัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

The embryo culture of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) which was hybridized between Tinan 9 x Khonkaen 60-3 was tested at tissue culture laboratory, The Major of Agronomy, Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang between August and November 2001. The experiment was tested by using the embryos which their ages were 10, 15, 20, 25 and 30 days after hybridization. These embryos were cultured in Murashige and Skoog medium (MS) which containing macronutrient at ½ ratio only for 14 days.

The result was showed that all embryos could be developed in MS medium which containing ½ ratio macronutrient. The 30 days embryo was the best development to be a plant. The ability of plant development of 25 days embryo and 20 days embryo was reduced, respectively. For the 10 days embryo and 15 days embryo, they could developed to be callus only.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ก
สารบัญภาพ	ข
คำนำ	ค
วัตถุประสงค์	ง
ตรวจเอกสาร	1
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	14
ระยะเวลาและสถานที่ทำการทดลอง	17
ผลการทดลอง	18
วิจารณ์ผลการทดลอง	25
สรุปผลการทดลอง	26
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะบางประการของพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9
และพันธุ์ขอนแก่น 60-3 5

ตารางที่ 2 ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืช
ปริมาณในเนื้อเยื่อและหน้าที่สำคัญของธาตุ 7

ตารางที่ 3 ตัวอย่างความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงคัพภะลูกผสมของพืชบางชนิด 13

ตารางที่ 4 แสดงผลของการเพาะเลี้ยงเอมบริโอถั่วลิสงที่ได้จากการผสมข้ามระหว่าง
ถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 × ขอนแก่น 60-3 18

ตารางที่ 5 แสดงผลของการเพาะเลี้ยงเอมบริโอถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 20

ตารางที่ 6 แสดงผลของการเพาะเลี้ยงเอมบริโอถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 60-3 22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

รูปภาพที่ 1 เอมบริโออายุ 10 วันหลังการผสมข้ามในอาหารสูตร MS 24

รูปภาพที่ 2 เอมบริโออายุ 15 วันหลังการผสมข้ามในอาหารสูตร MS 24

รูปภาพที่ 3 เอมบริโออายุ 20 วันหลังการผสมข้ามในอาหารสูตร MS 24

รูปภาพที่ 4 เอมบริโออายุ 25 วันหลังการผสมข้ามในอาหารสูตร MS 24

รูปภาพที่ 5 เอมบริโออายุ 30 วันหลังการผสมข้ามในอาหารสูตร MS 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ถั่วลิสงเป็นพืชชนิดหนึ่งที่เกษตรนิยมปลูกกันแพร่หลายทั่วไป มีการปลูกกระจายอยู่ทุกภูมิภาคของประเทศไทย แหล่งผลิตที่สำคัญ ได้แก่ ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง มีผลผลิตเฉลี่ย 240 กิโลกรัมต่อไร่ (ปี 2542) ผลผลิตถั่วลิสงที่ได้ส่วนใหญ่จะใช้บริโภคภายในประเทศ ส่วนการส่งออกถั่วลิสงมีน้อยมากเนื่องจากผลผลิตยังมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอกับความต้องการบริโภคและการผลิตถั่วลิสงของประเทศไทยมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลง ทั้งเนื่องจากความไม่แน่นอนของดินฟ้าอากาศ การระบาดของโรค แมลง และราคา ซึ่งข้อจำกัดในการเพิ่มพื้นที่ปลูกถั่วลิสง คือ ต้นทุนการผลิตที่ค่อนข้างสูงกว่าพืชอื่นๆ โดยเฉพาะค่าเมล็ดพันธุ์และค่าแรงเก็บเกี่ยว ซึ่งสิ่งเหล่านี้ส่งผลให้ผลผลิตไม่เพียงพอกับความต้องการ ดังนั้นจึงต้องมีการแก้ไข มีการศึกษาและวิจัยงานทางด้านปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงให้มากขึ้น โดยควรมุ่งไปในด้านการปรับปรุงผลผลิตให้ดีขึ้น มีความต้านทานต่อโรคและแมลง ให้ผลตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยสูง อายุเก็บเกี่ยวสั้น มีการพักตัวของเมล็ดและคุณภาพของเมล็ดเป็นที่ต้องการของตลาด ตลอดจนปรับปรุงให้เหมาะสมกับการใช้เครื่องมือทุนแรงต่างๆ

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะเอื้อประโยชน์ในงานปรับปรุงพันธุ์ได้มาก เนื่องจากพืชที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สามารถติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงต่างๆได้ง่ายชัดเจนและถูกต้องแม่นยำ ทั้งในระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะและพืชทั้งต้น เช่น การศึกษาการตอบสนองของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่เกิดจากการกลายพันธุ์ เนื่องจากการควบคุมตัวแปรต่างๆทำได้ดีกว่าในสภาพปลูกปกติ (รังสฤษดิ์ , 2541) จึงนำมาใช้ศึกษากับเอมบริโอของถั่วลิสงที่มีอายุต่างๆกัน ภายหลังจากที่ได้รับการผสมข้าม ระหว่างพันธุ์ไทนาน 9 × ขอนแก่น 60-3 โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นข้อมูลและเป็นแนวทางในการพัฒนาขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาอายุของเอมบริโอ (หลังการผสมข้าม) ที่สามารถนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์จนเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ดีที่สุด ของถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9×ขอนแก่น 60-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

ถั่วลิสงที่ปลูกในประเทศไทยมีแหล่งปลูกที่สำคัญ คือ ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง ผลผลิตที่ผลิตได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ นำมาใช้ภายในประเทศจึงมีการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศน้อยมาก ทั้งนี้เนื่องจากความต้องการถั่วลิสงภายในประเทศเพิ่มสูงขึ้น โดยใช้บริโภคในรูปถั่วต้ม ถั่วคั่ว ถั่วต้มอบ เป็นส่วนประกอบของอาหารคาวหวานต่างๆ ใช้ทำขนม และทำผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป เพื่อจำหน่ายทั้งในประเทศและต่างประเทศ บางส่วนใช้ในการสกัดน้ำมันและกากถั่วลิสงใช้ในอุตสาหกรรมทำอาหารสัตว์ จึงไม่เหลือพอที่จะส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศและยิ่งไปกว่านั้นประเทศไทยเรายังนำถั่วลิสงเข้ามาเพื่อใช้บริโภคอีกด้วย (ภูวนาถ , 2531 , ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น , 2542)

<u>ประวัติและถิ่นกำเนิด</u>

ถั่วลิสงมีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ เชื่อกันจากหลักฐานทางธรณีว่า ชาวพื้นเมืองในเปรูเคยรู้จักพืชนี้มานานประมาณ 1,200 ถึง 1,000 ปีก่อนคริสตกาล แต่ถิ่นกำเนิดที่แน่นอนยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าจะเป็นประเทศใด แม้ว่า Krapovickas ได้รายงานถึงความเป็นศูนย์กลางความแปรปรวนของสกุล Arachis อยู่ในประเทศบราซิลแต่ชนิดที่ใช้ปลูกอยู่ในปัจจุบันอาจมีถิ่นกำเนิดในบริเวณตอนใต้ของประเทศโบลิเวียจนถึงทิศตะวันตกเฉียงเหนือของอาร์เจนตินา

ถั่วลิสงเข้ามาสู่ประเทศไทยเมื่อใดไม่มีหลักฐานที่แน่ชัดแต่เป็นที่เชื่อว่าพ่อค้าและนักเดินเรือจากโพ้นทะเลได้นำเข้ามาตั้งแต่สมัยกรุงศรีอยุธยาในรัชสมัยสมเด็จพระนารายณ์มหาราชหรือประมาณ 300-400 ปีมาแล้ว (Na Lampang , 1993)

<u>ลักษณะทางพฤกษศาสตร์</u> (ไสว , 2534)

ถั่วลิสงมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Arachis hypogaea* (L.) เป็นพืชในวงศ์หรือตระกูล (family) Papilionaceae สกุล (genus) Arachis ชนิด (species) hypogaea มีชื่อสามัญเรียกกันหลายชื่อ เช่น groundnut , peanut , earthnut และ monkey nut

1. ราก ถั่วลิสงมีระบบรากแบบ tap root system รากอันแรกที่เกิดจาก radicle เรียกว่ารากแก้ว (tap root) มีการแตกแขนงมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อปลูกในดินร่วน รากแขนงที่แตกออกมาจากรากแก้วนี้เรียกว่า lateral root ถั่วลิสงมีรากขนอ่อน (root hair) น้อยมาก บางพันธุ์อาจไม่มีเลย ที่รากแก้วและรากแขนงจะพบปม (nodule) ขนาดเล็กสีน้ำตาลอยู่ทั่วไป ปมเหล่านี้เกิดจากแบคทีเรียไรโซเบียมเข้าไปอาศัยอยู่
2. ลำต้น ถั่วลิสงเป็นพืชล้มลุกพวกไม้เนื้ออ่อน มีความสูงประมาณ 15-70 เซนติเมตร การเจริญเติบโตของลำต้นแบ่งออกเป็น 2 พวก คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 ลำต้นตั้ง (erect type) มีการแตกกิ่งก้านสาขามาก กิ่งก้านเหล่านี้มักจะเจริญไปในแนวตั้งทำให้ต้นถั่วมีลักษณะเป็นพุ่ม ฝักจะเกิดเป็นกลุ่มที่บริเวณโคนต้น

2.2 ลำต้นเลื้อย (runner type) มีลำต้นสั้น กิ่งก้านที่แตกออกมามักเจริญไปในแนวนอนทอดไปตามผิวดิน ฝักเกิดกระจัดกระจายอยู่ตามกิ่งก้านที่เลื้อยไปตามผิวดิน

3. ใบ ใบของถั่วลิสงเกิดสลับกัน (alternate) บนข้อของลำต้น ใบเป็นใบประกอบแบบ even-pinnate ใบประกอบหนึ่งๆ จะมีใบย่อย 2 คู่ รูปร่างแบบ obovate หรือ oblong-ovate ขอบใบเรียบ มีก้านใบยาว ที่โคนก้านใบมีหูใบ 2 อัน ซึ่งมีลักษณะแหลมและยาวประมาณ 2 เซนติเมตร

4. ดอก ถั่วลิสงมีดอกสีเหลือง มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.9-1.4 เซนติเมตร ดอกเกิดตามมุมใบ อาจเกิดเดี่ยวๆ หรือเกิดเป็นกลุ่มๆหนึ่งๆ ประมาณ 2-5 ดอก ดอกส่วนมากเกิดที่บริเวณส่วนโคนของลำต้นซึ่งอาจอยู่เหนือผิวดินหรือใต้ผิวดินก็ได้ ก้านดอกสั้น

5. ผลและเมล็ด ผลหรือฝักอาจเกิดเดี่ยวๆ หรือเกิดเป็นกลุ่มตามมุมใบ เมื่อฝักแก่เปลือกของฝักจะแข็งและเปราะ มีลายเส้นที่เปลือกปรากฏชัดเจน ฝักมีสีขาวนวล หรือน้ำตาลอ่อน ฝักหนึ่งๆ จะมี 1-4 เมล็ด

เมล็ดถั่วลิสงมีเปลือกบาง (seed coat หรือ testa) สีม่วงแดง แดง และขาวนวล ขึ้นอยู่กับพันธุ์ ถัดจากส่วนของเปลือกเข้าไปจะพบใบเลี้ยงที่มีลักษณะหนา 2 อันเชื่อมติดกัน ใบเลี้ยงนี้เป็นที่เก็บสะสมอาหารจำพวกไขมัน โปรตีน และอื่นๆ ที่ฐานตรงรอยต่อของใบเลี้ยงซึ่งอยู่ด้านในจะพบส่วนของเอมบริโอ ซึ่งมีขนาดเล็กมากเมื่อเปรียบเทียบกับใบเลี้ยง เอมบริโอ ประกอบด้วย radicle และ embryo leave 3-5 ใบ

<u>ชนิดและพันธุ์</u> (ไสว , 2534)

พืชในสกุล Arachis ที่ได้ทำการศึกษาและจำแนกแล้วมีประมาณ 20 ชนิด แต่ที่ยังไม่ได้จำแนกอีกประมาณ 40 ชนิด หรือกว่านั้น ชนิดที่เป็นพันธุ์ปลูกในปัจจุบันสามารถจำแนกออกได้เป็น 2 subspecies คือ

1. subspecies hypogaea ซึ่งประกอบด้วย 2 varieties คือ var. hypogaea และ var. hirsuta แต่ชนิดหลังไม่ค่อยแพร่หลาย ดังนั้นจึงเหลือชนิดเดียว ซึ่งมีลำต้นเลื้อย (runner) และอายุยาว เป็นที่รู้จักกันทั่วไปว่า พวกเวอร์จิเนีย (Virginia type)

พวกเวอร์จิเนีย มีลักษณะเป็นต้นเลื้อยหรือแผ่ราบมีอายุยาวประมาณ 120-150 วัน มีใบขนาดเล็กสีเขียวเข้ม ฝักมักมี 2 เมล็ด ผิวเมล็ดสีเข้ม เมล็ดมีระยะพักตัวตั้งแต่ 1-12 เดือน โดยทั่วๆไปจะมีความต้านทานต่อโรคใบจุด เมล็ดมีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าพวกอื่นและมีน้ำมันชนิดไม่อิ่มตัวสูงกว่า ผลผลิตของเมล็ดก็มักสูงกว่า ขนาดและเมล็ดใหญ่กว่าพวกอื่น ส่วนใหญ่ใช้บริโภค เช่น ถั่วอบ หรือ ถั่วต้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. subspecies fastigiata ประกอบด้วย 2 varieties คือ var. fastigiata และ var. vulgaris ซึ่งรู้จักกันทั่วไปว่า พวกวาเล็นเซีย (Valencia) และ สแปนิช (Spanish) ตามลำดับ

<u>พวกวาเล็นเซีย</u> กิ่งแขนงที่แตกออกจากต้นหลัก (main stem) ไม่มีการแตกกิ่งหรือถ้ามีก็แตกบริเวณปลายกิ่ง ช่อดอกมีดอกน้อย ฝักมักมีเมล็ด 2-3 หรือ 4 เมล็ด

<u>พวกสแปนิช</u> กิ่งแขนงที่แตกออกจากต้นหลักมีการแตกกิ่งอีก ช่อดอกมีดอกมาก ฝักมักมี 2 เมล็ด

ถั่วลิสงทั้ง 2 พวกนี้ มีลักษณะของการเจริญเติบโตค่อนข้างตั้ง ต้นหลักมีการออกดอก ซึ่งผิดกับพวกวาเล็นเซีย ซึ่งต้นหลักไม่มีดอกเลย เนื่องจากความคล้ายคลึงกันมากของพวกวาเล็นเซีย และสแปนิชนี้เอง จึงมักจะเรียกรวมกันว่าเป็นพวก วาเล็นเซีย–สแปนิช อายุสั้นกว่าพวกเวอร์จิเนีย คือ ประมาณ 90-120 วัน เมล็ดมักไม่มีระยะพักตัว มักอ่อนแอต่อโรคใบจุด เมล็ดมีปริมาณโปรตีนสูงกว่า และน้ำมันมีปริมาณของกรดไขมันชนิดอิ่มตัวสูงกว่าพวกเวอร์จิเนีย

<u>การใช้ประโยชน์จากถั่วลิสง</u>

การใช้ประโยชน์จากถั่วลิสงมีหลายประเภทและมากชนิด ซึ่งอาจใช้โดยตรงเป็นอาหารของมนุษย์ เช่น ถั่วต้ม ถั่วทอด ถั่วชุบแป้งทอด ถั่วตัด ถั่วเคลือบ ถั่วป่นและอาจใช้ทางอ้อมในรูปน้ำมันพืช ผลิตภัณฑ์จากน้ำมันพืช กากถั่วลิสงนิยมใช้เป็นอาหารสัตว์และทำเป็นปุ๋ย ในสภาพปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากถั่วลิสงมีมากขึ้นในตลาดระดับบน เช่น ถั่วลิสงเคลือบรสต่างๆ ถั่วลิสงเคลือบน้ำผึ้ง ถั่วทอดคลุกเนยและเนยถั่วลิสง ส่วนตลาดระดับกลางและระดับล่าง ยังเป็นผลิตภัณฑ์อาหารพื้นบ้าน เช่น ถั่วต้ม ถั่วชุบแป้งทอด ถั่วตุ๊บตั๊บ และถั่วกระจก นอกจากนี้ยังมีการใช้ประโยชน์จากถั่วลิสงเป็นส่วนประกอบอาหารก็มีมากชนิด เช่น ถั่วลิสงต้มกระดูกหมู ถั่วลิสงนึ่งข้าวเหนียวผัดไส้หมู น้ำจิ้มหมูสะเต๊ะ และไส้ขนมชนิดต่างๆ (วิชัย , 2540)

นอกจากเมล็ดจะใช้เป็นอาหารแล้ว ลำต้น ใบ เปลือก ฝัก ยังใช้เลี้ยงสัตว์และใช้ทำปุ๋ยบำรุงดิน ส่วนรากมีปมไรโซเบียมทำให้ดินร่วนซุยและเพิ่มอาหารในดิน (วุฒิศักดิ์ , 2539)

<u>การแบ่งระยะการเจริญเติบโตของถั่วลิสง</u> (สถาบันวิจัยพืชไร่ , 2537)

การกำหนดระยะการเจริญเติบโตของพืชตามลักษณะของการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาทำให้สื่อความหมายได้ว่าพืชนั้นมีการเจริญเติบโตอยู่ขั้นไหนได้ดีกว่าการใช้อายุพืช เพราะว่าแต่ละพันธุ์มีอายุแตกต่างกัน Boote (1982) แบ่งระยะการเจริญเติบโตของถั่วลิสงออกเป็น

การเจริญทางลำต้น

VE = ใบเลี้ยงพ้นดิน

VO = ใบเลี้ยงแผ่ออกเต็มที่

V_1 = ใบจริง ใบที่ 1 แผ่เต็มที่

V_2-V_n = ใบจริง ใบที่ 2-ใบที่ n บนต้นหลักคลี่เต็มที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญทาง Reproductive

R_1 = ดอกแรกบาน (1^{st} flowering)

R_2 = เข็มแรกปรากฏให้เห็น (beginning peg)

R_3 = เข็มพองตัวเป็นฝัก ซึ่งมีขนาดอย่างน้อยเป็น 2 เท่าของเข็ม (beginning pod)

R_4 = ฝักขยายตัวเต็มที่ (full pod)

R_5 = ฝักเริ่มมีเมล็ดที่มีใบเลี้ยงแล้ว (beginning seed)

R_6 = เมล็ดขยายตัวเต็มที่ (full seed)

R_7 = ฝักเริ่มแก่ (beginning mature)

R_8 = แก่พร้อมเก็บเกี่ยว 2 ใน 3 หรือ 4 ของฝักทั้งหมด (field mature)

<u>วิธีการผสมพันธุ์ถั่วลิสง</u> (สถาบันวิจัยพืชไร่ , 2527)

ถั่วลิสงเป็นพืชผสมตัวเอง (self-pollination) เกือบร้อยเปอร์เซ็นต์ ออกดอกเป็นช่อตรงโคนกาบใบ ประกอบด้วยดอกเล็กๆ หลายดอก ดอกในช่อหนึ่งๆจะบานไม่พร้อมกัน ช่อหนึ่งจะบานเพียงดอกเดียวในวันหนึ่ง ส่วนดอกอื่นจะบานในวันต่อมา

เมื่อถั่วลิสงเริ่มออกดอกตอนแรกให้เด็ดดอกที่บานและมิได้ผสมออกทุกวันจนกว่าถั่วลิสงจะมีปริมาณดอกมากพอที่จะเริ่มผสมได้ จึงเริ่มทำหมันเกสรตัวผู้บนต้นแม่ซึ่งปลูกไว้ในกระถางในตอนเย็นตั้งแต่เวลา 16.30 น. เป็นต้นไป

การถ่ายละอองเกสร (pollination) จากต้นพ่อไปยังต้นแม่ที่เลือกและทำหมันเกสรตัวผู้ออกแล้วนั้น ปกติจะทำระหว่างช่วงเวลา 7.00-9.00 น. ของวันถัดจากวันที่ทำลายเกสรตัวผู้ อย่างช้าไม่ควรเกิน 10.00 น. โดยเลือกเด็ดดอกที่แข็งแรงและสมบูรณ์จากต้นพ่อ แล้วใช้ปากคีบปลายแหลมบีบกระเปาะเกสรให้แตก แล้วแตะปลายปากคีบที่มีเกสรอยู่เป็นจำนวนมากลงบนยอดเกสรตัวเมียของต้นแม่ ระวังอย่าให้ยอดเกสรตัวเมียบอบช้ำ ทำความสะอาดปากคีบและเช็ดมือด้วยแอลกอฮอล์ทุกครั้งที่เปลี่ยนคู่ผสม ส่วนดอกต้นแม่ที่มิได้ทำลายเกสรตัวผู้ออกให้ใช้ปลายปากคีบเด็ดออกให้หมดทุกวัน ดอกที่ได้รับการผสมแล้วก้านของรังไข่จะยืดออกมีลักษณะเป็นก้านเล็กๆ แหลมเหมือนราก เรียกว่าเข็ม (peg , gynophore) ตรงปลายจะเป็นรังไข่ที่ได้รับการผสมแล้ว เข็มจะโผล่ให้เห็นภายในเวลา 7-10 วัน แล้วจะแทงลงดินเจริญเป็นฝักและเมล็ดต่อไป

<u>ลักษณะประจำพันธุ์ของถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 และพันธุ์ขอนแก่น 60-3</u> (สถาบันวิจัยพืชไร่ , 2537)

พันธุ์ไทนาน 9 เป็นถั่วลิสงประเภท Spanish พันธุ์สำหรับต้มอบ ลักษณะต้นเป็นพุ่มตั้ง ได้รับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตร เมื่อ พ.ศ. 2519

พันธุ์ขอนแก่น 60-3 เป็นถั่วลิสงประเภท Virginia พันธุ์เมล็ดโต เป็นถั่วที่มีขนาดฝักและเมล็ดโต ทรงต้นค่อนข้างแผ่กว่าพันธุ์อื่นๆ ใบเล็กและมีสีเขียวเข้มกว่าพันธุ์อื่นๆ ได้รับการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตร เมื่อ พ.ศ.2531

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะบางประการของพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 และ พันธุ์ขอนแก่น 60-3 (สถาบันวิจัยพืชไร่ , 2537)

ลักษณะ	พันธุ์	
	ไทนาน 9	ขอนแก่น 60-3
1. อายุออกดอก (วัน)	27-30	35
2. อายุเก็บเกี่ยว (วัน)	110-120	110-120
3. ฝักสด	-	-
4. ฝักแห้ง (ฝัก)	95-110	110-120
5. จำนวนเมล็ด/ฝัก	2	2
6. สีเยื่อหุ้มเมล็ด	ชมพู	ชมพู
7. น้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม)	42.4	76.2
8. เปอร์เซ็นต์กะเทาะ	70.7	60
9. ผลผลิตฝักสด (กก./ไร่)	-	-
10. ผลผลิตฝักแห้ง (กก./ไร่)	260	378
11. เปอร์เซ็นต์น้ำมัน	50.7	49.3
12. เปอร์เซ็นต์โปรตีน	28.1	24.8

สถาบันวิจัยพืชไร่ได้ศึกษาถั่วลิสงกลุ่มเมล็ดโต โดยสายพันธุ์ที่มีความก้าวหน้ามากที่สุด คือ พันธุ์ที่เกิดจากการผสมข้ามและเปรียบเทียบมาตรฐานพันธุ์(ขอนแก่น 60-3 × ไทนาน 9)-23 ซึ่งให้ผลผลิตเฉลี่ย 245 กก./ไร่ สูงกว่าพันธุ์ขอนแก่น 60-3 ร้อยละ 8 และมีขนาดเมล็ดโตกว่าพันธุ์ขอนแก่น 60-3 อีกด้วย (สถาบันวิจัยพืชไร่ , 2538)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (รังสฤษดิ์ , 2541)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเริ่มมาจากการที่ Gottieb Haberlandt นักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมัน ในปี ค.ศ. 1902 ประสบผลสำเร็จในการแยกเซลล์พืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ ในปี ค.ศ. 1930 ได้มีการเลี้ยงเซลล์ที่แยกมาจากรากของพืชหลายชนิดในสภาพปลอดเชื้อจนกระทั่งในปี ค.ศ. 1938 สามารถเลี้ยงอวัยวะพืชได้หลายชนิด นับตั้งแต่นั้นเป็นต้นมาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีการพัฒนาไปอย่างกว้างขวาง ปัจจุบันสามารถเลี้ยงเซลล์เดี่ยวและโปรโตพลาสหรือเซลล์ไร้ผนังของพืชหลายชนิด รวมทั้งการใช้เทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การแยก เลี้ยง ตัดต่อ และถ่ายยีนเข้ามาร่วมด้วยเพื่อประโยชน์ในด้านการศึกษาทางชีวเคมีพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช ทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงพืชก้าวหน้าไปอย่างมากและมีบทบาทสำคัญต่อวิทยาการแขนงอื่นๆ เช่น ชีวเคมี พันธุศาสตร์ การปรับปรุงพันธุ์พืช โรคพืช พฤกษศาสตร์ เภสัชศาสตร์และอุตสาหกรรม เป็นต้น

<u>แหล่งพืชพันธุ์</u> (คำนูณ , 2542)

พืชที่นำมาใช้ทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้มาจาก 2 แหล่ง คือ พืชที่ปลูกภายใต้สภาวะควบคุมในเรือนต้นไม้ และพืชที่ปลูกข้างนอก หรือ open field ในทางปฏิบัติพืชที่ปลูกข้างนอกมีโอกาสเกิดการติดเชื้อมาก แต่ถ้าเอาส่วนข้างในของพืช เช่น บริเวณแคมเบียม (cambium zone) มาเพาะเลี้ยง อาจลดเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนได้ นอกจากนี้ควรเลือกพืชที่แข็งแรงไม่เป็นโรค ตลอดจนลักษณะต่างๆ เช่น รูปร่างลักษณะดอกในลำต้นและตำหนิต่างๆ ควรนำมาพิจารณาด้วย ถ้าทำได้ควรเลือกพืชกลุ่มเดียวกันมีระยะพัฒนาการเดียวกัน เช่น พืชที่ปลูกในเรือนต้นไม้ เพราะพืชเหล่านี้ถูกควบคุมการเจริญเติบโตเหมือนกัน

<u>อาหารวิทยาศาสตร์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช</u> (อรดี , 2539)

1. ธาตุอาหารอนินทรีย์ (inorganic element) ประกอบด้วย

ธาตุอาหารหลัก (macroelement) เป็นสารอนินทรีย์ที่พืชต้องการใช้ในปริมาณมาก ได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โปแตสเซียม (K) ซัลเฟอร์ (S) แคลเซียม (Ca) และแมกนีเซียม (Mg) ซึ่งอาจจะใช้ในรูปของแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) โปแตสเซียมไดไฮโดเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) เป็นต้น

ธาตุอาหารรอง (microelement) เป็นสารอนินทรีย์ที่พืชต้องการเพียงเล็กน้อยแต่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ได้แก่ เหล็ก (Fe) คลอรีน (Cl) แมงกานีส (Mn) ทองแดง (Cu) สังกะสี (Zn) โบรอน (B) และโมลิบดินัม (Mo)

2. สารประกอบพวกคาร์บอนที่ให้พลังงาน ได้แก่ น้ำตาลซูโครสในปริมาณ 2.4%

3. วิตามิน และสารอื่นๆ ได้แก่ thiamine , nicotinic acid , pyridoxine , inositol , pantothenic acid และ biotin

4. สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) ได้แก่

Auxin ที่ใช้มาก คือ IAA (indole-3-acetic acid)
IBA (indole butyric acid)
NAA (naphthalene acetic acid)
2 ,4-D (2 ,4-dichlorophenoxy acetic acid)

Cytokinin ที่ใช้มาก kinetin (6-furfurylamino purine)
BA (6-benzylamino purine)
2-iP (r-r dimethylally lamino purine)
zeatin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. สารอนินทรีย์ที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ น้ำมะพร้าว น้ำมะเขือเทศ น้ำสกัดจากหัวมันฝรั่ง กล้วยบด yeast extract และ casein hydrolysate เป็นต้น

ตารางที่ 2 ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืช ปริมาณในเนื้อเยื่อและหน้าที่สำคัญของธาตุ (Glass , 1989 อ้างโดย อารีย์ , 2541)

ธาตุ	ปริมาณเป็น % ของน้ำหนักแห้ง	หน้าที่สำคัญ
Group I : Structural and intermediates of metabolism		
Carbon (C)	44	organic compounds
Hydrogen (H)	6	organic compounds
Oxygen (O)	44	organic compounds
Nitrogen (N)	2	amino acids , proteins , co- enzyme
Sulfur (S)	0.5	amino acids , proteins
Phosphorus (P)	0.4	ATP, NADP (i.e., energy system)
Group II : Enzyme activators		
Potassium (K)	2.0	activates about 60 enzyme ; essential for protein synthesis ; responsible for turgor and stomatal movement
Calcium (Ca)	1.5	activates enzymes ; essential for membrane permeability
Manganese (Mn)	0.4	activates ATP ; component of chlorophyll
Magnesium (Mg)	0.4	activates enzymes ; essential for photolysis of H_2O
Group III : Redox reagents ; elements that ungergo reduction/oxidation (redox) by virtue of multiple valency		
Iron (Fe)	0.015	$Fe^{+3} + e^- \leftrightarrow Fe^{+2}$
Copper (Cu)	0.002	$Cu^{+2} + e^- \leftrightarrow Cu^{+}$
Molybdenum (Mo)	0.002	reduction of nitrate (NO_3^-) by nitrate reductase and reduction of N_2 by nitrogenase of free living and nodule bacteria in legumes : $Mo^{+6} + e^- \leftrightarrow Mo^{+5}$
Group IV : Elements of uncertain function		
Boron (B)	0.003	membrane activity function

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chlorine (Cl)	0.01-2.0	osmosis , charge balance , photolysis of H_2O?
Silicon (Si)	?	may reduce transpiration
Zinc (Zn)	?	proteins synthesis , growth hormones , may be important in reproduction
Sodium (Na)	0.05-10.0	may be essential for C_4 photosynthesis

<u>ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ</u> (อารีย์ , 2541)

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอาจแยกออกได้ดังนี้

1. การขยายพันธุ์ (propagation) เป็นการนำชิ้นส่วนใดๆ ของพืชมาเพาะเลี้ยงในอาหารเทียมในสภาพปลอดเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณ
2. การผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ในปัจจุบันมีการผลิตสารทุติยภูมิหลายชนิดโดยอาศัยกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งสามารถผลิตได้ปริมาณมากและรวดเร็ว ตัวอย่าง เช่น สารเคมี ชื่อ Taxol มีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง ได้จากพืชชนิดหนึ่งชื่อ pacific yew (*Taxus brevifolia*)
3. การแปรปรวนทางพันธุกรรม (somaclonal variation) ในขั้นตอนของการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเทียม อาจมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ได้สายพันธุ์เซลล์ที่กลายไป บางครั้งจะเป็นลักษณะที่มีประโยชน์
4. การคัดเลือกสายพันธุ์กลาย (mutant selection) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อของพืชในอาหารจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในระดับเซลล์ใดเซลล์หนึ่ง เมื่อใส่สภาวะต่างๆ ลงในอาหารก็จะสามารถคัดเลือกได้สายพันธุ์กลาย
5. การผลิตสายพันธุ์แท้ (inbred production) การนำเอาละอองเรณูหรืออับเรณูของพืชมาเลี้ยงในอาหาร จนเกิดเป็นเนื้อเยื่อที่มีจำนวนโครโมโซมครึ่งหนึ่งของโครโมโซมปกติ เมื่อทำการเพิ่มชุดโครโมโซมให้เป็น 2n ก็จะได้สายพันธุ์แท้ทันที จึงเป็นวิธีการผลิตสายพันธุ์แท้ที่รวดเร็ว
6. การศึกษาทางชีวเคมี (biochemical study) เนื่องจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารก็ทำหน้าที่เช่นเดียวกับเซลล์ในต้นพืชจริงๆ จึงทำให้การศึกษาถึงกระบวนการต่างๆทางชีวเคมี มีประสิทธิภาพดี เพราะเซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน ได้รับอาหารเหมือนกันและปราศจากเชื้อโรค เป็นต้น

? ความต้องการธาตุนี้และบทบาทของธาตุยังไม่เป็นที่ยอมรับกันทั่วไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. การผสมเซลล์ (cell fusion) เมื่อย่อยผนังเซลล์ด้วยเอ็นไซม์จะได้เซลล์ไร้ผนังสามารถนำเซลล์ของพืชต่างพันธุ์หรือแม้แต่ต่างชนิดกันมาผสมกันได้ ซึ่งจะได้สายพันธุ์เซลล์ใหม่ เป็นการผสมพันธุ์พืชวิธีหนึ่งโดยใช้เทคโนโลยีขั้นสูง
8. การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม (genetic transformation) เป็นขั้นตอนของการถ่ายทอดยีนที่ต้องการโดยอาศัยวิธีทางพันธุวิศวกรรม
9. การชักนำให้เกิดต้น (plant regeneration) การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชให้เป็นแคลลัส แล้วเลี้ยงในอาหาร เพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นเป็นเป้าหมายสุดท้ายที่จะได้มาซึ่งพืชที่ต้องการ
10. การเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง (cryopreservation) เป็นกระบวนการหนึ่งที่ใช้สำหรับเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมไว้ในระยะยาว โดยการเก็บเนื้อเยื่อแช่เย็นจัด เพื่อหยุดยั้ง กระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ เมื่อนำมาชักนำให้เกิดเป็นต้น ก็จะได้พืชพันธุ์นั้นกลับคืนมา
11. การผลิตพืชให้ปลอดเชื้อไวรัส (virus-free plant propagation) การใช้ meristem ซึ่งยังไม่มีท่อน้ำท่ออาหารจะปลอดจากไวรัส ดังนั้นจึงนิยมนำเนื้อเยื่อส่วนนี้ของพืชมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตท่อนพันธุ์ให้ปราศจากเชื้อโรค
12. การช่วยเหลือการแท้ง (embryo rescue) ในการผสมข้ามพืชต่างชนิดกันมาก เช่น พันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่า เพื่อประโยชน์ในการถ่ายทอดลักษณะดีเด่นบางอย่างจากพันธุ์ป่า ซึ่งลูกผสมดังกล่าวมักจะไม่พัฒนาต่อไปจนเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ถ้าหากปล่อยไว้ในรังไข่ ดังนั้นสามารถนำไข่อ่อนที่ผสมติด มาเพาะเลี้ยงในอาหารก่อนที่จะเกิดการแท้ง

การเพาะเลี้ยงเอมบริโอ (embryo culture) เอมบริโอ มีต้นกำเนิดมาจากการที่ไข่ปฏิสนธิกับสเปิร์ม ได้เป็นไซโกต ซึ่งจะเจริญไปเป็นเอมบริโอและตัวโตเต็มวัยตามลำดับ การเพาะเลี้ยงเอมบริโอเป็นวิถีทางที่จะได้พืชจาก (1) ลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดหรือสกุลซึ่งไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้จนถึงระยะที่เป็นต้นพืช (2) เมล็ดที่ไม่งอกภายใต้สภาพปกติ และ (3) เมล็ดที่ต้องการระยะพักตัวยาวนาน นอกจากนี้อาจใช้กับเมล็ดของพืชบางชนิดที่ต้องการสภาพการงอกที่แตกต่างไปจากปกติ เช่น มีแสงและอุณหภูมิสูง เพื่อช่วยทำลายระยะพักตัว จากที่กล่าวมานี้สามารถใช้การเพาะเลี้ยงเอมบริโอเข้าช่วย ทำให้สามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่ต้องการได้ (นิตย์ศรี , 2541)

บุคคลแรกที่สามารถเพาะเลี้ยงคัพภะของพืชได้สำเร็จ คือ Hannig เมื่อปี 1904 ในการเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนของพืชนั้นมีวัตถุประสงค์หลักก็เพื่อการช่วยเหลือไม่ให้เกิดการแท้ง (abortion) เมื่อทำการผสมพันธุ์ระหว่างพืชต่างชนิดกัน ดังนั้นเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชจึงมีการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อช่วยเหลือคัพภะอ่อน (embryo rescue) หลังจากปี 1933-1934 มีการใช้วิธีเพาะเลี้ยงคัพภะอ่อนของพืชหลายชนิด เช่น ท้อ แอปเปิ้ล รวมทั้งลูกผสม intergeneric ของธัญพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น *Hordeum jubatum* × *Secale cereale* , *Triticum durum* × *Elymus arenarius* และ *Triticum* sp. × *Aegilops squarrosa* เป็นต้น (Williams et al.,1978 อ้างโดย อารีย์ , 2541)

<u>งานทดลองเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วลิสงและการเพาะเลี้ยงคัพภะโดยเทคนิคการกู้ชีวิต (embryo rescue)</u>

Atreya และคณะ (1984) ได้ทดลองนำเอา embryo axer และ cotyledon segments ของถั่วลิสง มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS , Gamborg B5 , potato-extract และ Linsmaier and Skoog พบว่าสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ โดยที่อาหารสูตร MS ให้ผลผลิตดีที่สุด เมื่อนำ cotyledon segments มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดรากได้จำนวนมากที่สุด อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 mg/1 สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด แล้วจึงย้ายยอดที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารสูตร basal MS เพื่อชักนำให้เกิดรากต่อไป การใช้ NAA 1 mg/1 ร่วมกับ BA 0.5-2 mg/l ในอาหารเลี้ยงสูตร MS สามารถทำให้ cotyledon segments พัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ทั้งต้น แต่การใช้ BA เพียงอย่างเดียวจะให้ผลดีกว่า การชักนำให้เกิดยอดไม่ว่าจะใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเป็น embryo axer หรือ cotyledon segments ก็ให้ผลใกล้เคียงกัน

วิมลรัตน์และไพศาล (2534) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 โดยใช้เนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยง ใบอ่อนตา ลำต้นและราก มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำมะพร้าว 15% ร่วมกับการใช้สารเร่งการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0.5 , 1.0 , 5.0 และ 10.0 ไมโครโมลต่อลิตร BAP 3 ระดับ คือ 1.0 , 5.0 และ 10.0 ไมโครโมลต่อลิตร และ 2 ,4-D 3 ระดับ คือ 1.0 , 5.0 และ 10.0 ไมโครโมลต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าเนื้อเยื่อทุกส่วนสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาให้เกิดแคลลัสได้ มีสีและขนาดต่างๆกัน 6-8 วันหลังเลี้ยง และสามารถพัฒนาให้เกิดรากได้ประมาณ 15-20 วัน ในทุกความเข้มข้น ระหว่าง BAP : NAA และ 2 ,4-D เนื้อเยื่อ ตา ใบอ่อนสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้ สูตรอาหารที่มี BAP : NAA 1.0-5.0 : 5.0 ไมโครโมลต่อลิตร ส่วน 2 ,4-D : NAA ทุกความเข้มข้นทำให้เกิดแคลลัสขนาดใหญ่กว่าการใช้ BAP แคลลัสมีลักษณะร่วนฟูและมีสีขาว เนื้อเยื่อทุกส่วนสามารถพัฒนาให้เกิดแคลลัสและรากได้ แต่เนื้อเยื่อใบเลี้ยง รากและลำต้น ก็สามารถทำให้เกิดแคลลัสได้ แต่ยังไม่สามารพัฒนาต่อไปให้เป็นต้นได้ เนื้อเยื่อตาและใบอ่อนเจริญเติบโตเป็นต้นได้แต่ช้ากว่าการใช้ BAP : NAA

ในปี 2535 วิมลรัตน์และไพศาล ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วลิสงจากส่วนต่างๆ เช่น ลำต้น ยอด ใบอ่อน ใบเลี้ยงและราก ช่วงแรกเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร NAA 1.0-5.0 ไมโครโมลต่อลิตร และ BAP 1.0-6.0 ไมโครโมลต่อลิตร ทุกส่วนของเนื้อเยื่อสามารถพัฒนาให้เกิดแคลลัสสีเขียวอ่อนใสได้ หลังเลี้ยง 24 วัน ย้ายลงในอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซูโครส 5 กรัมต่อลิตร NAA 5.0-8.0 ไมโครโมลต่อลิตร และ BAP 6.0-8.0 ไมโครโมลต่อลิตร พบว่าแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยง ใบอ่อนและยอดมีแนวโน้มในการพัฒนาให้เกิดตายอดได้

ปี 2536 วิมลรัตน์และไพศาลได้ทำการทดลองซ้ำ โดยใช้เนื้อเยื่อส่วนต่างๆ และใบเลี้ยงที่มีอายุต่างๆกัน ในช่วงแรกพบว่าสามารถพัฒนาให้เกิดแคลลัสได้ และ 20 วันหลังเลี้ยงย้ายลงในอาหารที่มีความเข้มข้นลดลง แต่เพิ่มความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโต NAA 3.0-5.0 ไมโครโมลต่อลิตร และ BAP 6.0-8.0 ไมโครโมลต่อลิตร ทำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะแน่น สีเขียว หลังเลี้ยง 15 วัน แคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอด (shoot meristem) ใบเลี้ยงและใบอ่อน สามารถพัฒนาให้เกิดตายอด (shoot bud) ได้ ใบเลี้ยงที่เจริญเติบโตเต็มที่สามารถพัฒนาให้เกิดตายอดได้ ส่วนใบเลี้ยงที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ ลำต้นและราก สามารถพัฒนาให้เกิดแคลลัสแต่ยังไม่สามารถพัฒนาต่อให้เกิดตายอดได้

ในปี 1978 Stewart และ Hsu ได้รายงานความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงไข่อายุ 3 วัน ที่ได้จากการผสมระหว่าง *Gossypium hursutum* ซึ่งมีโครโมโซม 2n=52 เส้นใยยาวคุณภาพดี ต้านทานโรค Fusarium wilt กับ *Gossypium arboreum* ซึ่งมีโครโมโซม 2n=26 ทนต่อสภาพแวดล้อมวิกฤติและแมลงศัตรูหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีผู้เพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากการผสมระหว่าง *Gossypium arboreum* กับ *Gossypium stockii* , *Gossypium anomalum* และ *Gossypium herbacium* กับ *Gossypium stockii* ด้วย (นพพร , 2543)

ต่อมาในปี 1979 Schaeffer และคณะก็ได้รับความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนข้าวสาลีลูกผสมเช่นกัน (นพพร , 2543)

ชวนพิศ และคณะ (2535) ได้ดำเนินการชักนำให้ผักสกุลกะหล่ำออกดอก ด้วยอุณหภูมิต่ำ 5° ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 85 % ให้แสงตลอด 24 ชม. เป็นเวลานาน 1 เดือน สำหรับ *Brassica campestris* และ *B. juncea* ตั้งแต่ระยะเมล็ดที่กำลังดูดซับน้ำ ส่วน *B. oleracea* ชักนำที่ระยะต้นอายุประมาณ 1 เดือน เป็นเวลา 1 เดือน ย้ายต้นกะหล่ำมาปลูกในห้องควบคุมการเจริญเติบโตที่ควบคุมอุณหภูมิ 23-25 °ซ แสงตลอด 24 ชั่วโมง ดำเนินการผสมข้ามชนิด ระหว่างผักสกุลกะหล่ำ 3 ชนิด พบว่าหลังผสมข้ามชนิดแล้ว 20 วัน ตัพภะลูกผสมระหว่าง *B. juncea* กับ *B. oleracea* , *B. campestris* กับ *B. juncea* , *B. campestris* กับ *B. oleracea* และ *B. oleracea* กับ *B. campestris* สามารถพัฒนาเป็นต้นได้หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม casein hydrolysate NAA และ BA ในสภาพหลอดทดลอง 30 วัน และสามารถย้ายปลูกในถุงพลาสติกภายใต้สภาพควบคุมอุณหภูมิและแสงสลับ การตรวจสอบเพื่อบอกความแตกต่างของคู่ผสมด้วยการย้อมสี acetocarmine และนับความสมบูรณ์ของเรณู นอกจากนั้นการใช้เทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสสามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดของผักในสกุลนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กาญจนาและคณะ (2537) ทำการผสมข้าวต่างชนิด (interspecific hybridization) ระหว่างข้าวพันธุ์ป่า (*Oryza minuta*) ซึ่งมีชุดโครโมโซมเป็น BBCC กับข้าวพันธุ์ปลูก (*O. sativa*) 2 พันธุ์ คือ IR70 และ IR72 ซึ่งมีชุดโครโมโซมเป็น AA จะมีการติดเมล็ดอยู่ในช่วง 9.33-20.28% คัพภะอ่อนของเมล็ดที่มีอายุ 9-14 วัน ของแต่ละคู่ผสมสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ในอาหารสังเคราะห์ สูตร MS ดัดแปลงที่เติม yeast extract 1 กรัม/ลิตร และ BAP 2-3 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อนำลูกผสมของสองคู่ผสมออกปลูกในสภาพธรรมชาติ จะมีลักษณะทรงต้นเหมือนกับข้าวพันธุ์ปลูก แต่ลักษณะรวงและรูปร่างเมล็ดเหมือนกับข้าวพันธุ์ป่าและเมล็ดจะลีบทั้งหมด ทำการชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยสารละลาย colchicine 0.01% เป็นเวลา 3 , 5 และ 7 วัน สามารถแก้ความเป็นหมันและให้ต้นที่ติดเมล็ดสมบูรณ์ได้ หลังจากนำมาปลูกอีก 2 ชั่ว คือในรุ่น F_4 จะแสดงลักษณะที่ค่อนข้างสม่ำเสมอและมีลักษณะทางการเกษตรมาทางพันธุ์ปลูก แต่มีอายุการเก็บเกี่ยวยาวนานกว่าพันธุ์ปลูกเดิมเล็กน้อย ซึ่งจากการตรวจสอบทางเซลล์พันธุศาสตร์พบว่าข้าวสายพันธุ์ใหม่ที่ได้เป็น allopolyploid คือ มีจำนวนของโครโมโซม 6X=72 ซึ่งข้าวสายพันธุ์ใหม่ที่เป็น polyploids นี้ มีความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล มี 5 สายพันธุ์ คือ PTT-KU-91-9 , PTT-KU-91-11 , PTT-KU-91-12 , PTT-KU-91-14 และ PTT-KU-91-27

สุมนาและคณะ (2538) ได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการผสมข้ามชนิดระหว่างถั่วในgenus vigna , subgenus ceratotropis และการเจริญเติบโตของต้นลูกผสมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะผลการนำมาเลี้ยงและชักนำให้งอกในอาหารสูตร White'agar ประสบความสำเร็จในคู่ผสมที่ใช้ *Vigna glabrescens* และ *V. radiata* เป็นพันธุ์แม่ คู่ผสมชนิดระหว่าง *V. radiata* กับ *V. glabrescens* , *V. glabrescens* กับ *V. radiata* , *V. glabrescens* กับ *V. angularis* ไม่สามารถผสมข้ามชนิดกันได้โดยวิธีปกติ ฝักที่ได้รับการผสมจะเหี่ยวและร่วงหลังจากผสมไปแล้วประมาณ 2 สัปดาห์ ผลของการเพาะเลี้ยงคัพภะเพื่อชักนำให้เป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์และได้ต้นที่อยู่รอดได้ในธรรมชาติจากคู่ผสมระหว่าง *V. radiata* กับ *V. mungo* , *V. radiata* กับ *V. glabrescens* และ *V. glabrescens* กับ *V. radiata* จำนวน 1 , 2 และ 3 ต้น ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างพืชที่ประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงคัพภะลูกผสมดังตาราง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ตัวอย่างความสำเร็จในการเพาะคัพภะลูกผสมของพืชบางชนิด (รังสฤษดิ์ , 2541)

การผสมข้ามชนิด (Interspecific cross)	การผสมข้ามสกุล (Intergeneric cross)
Arachis hypogaea × *Arachis villosa* (ถั่วลิสง)	*Fesruca rubra* × *Dactylis glomerata*
Hordeum vulgare × *Hordeum jubatum* (ข้าวบาร์เลย์)	*Hordeum vulgare* × *Seale cereale* (ข้าวบาร์เลย์) (หญ้าไรย์)
Gossypium hirsutum × *Gossypium arboreum* (ฝ้าย)	*H. vulgare* × *Triticum aestivum* (ข้าวสาลี)
Glycine max × *Glycine wightii* (ถั่วเหลือง)	*H. vulgare* × *Triticum crassum*
Lolium multiflorum × *Lolium perense* (หญ้าไรน์)	*H. vulgare* × *Triticum monococoum*
Trifolium pratense × *Trifolium repens* (red clover) (ladino clover)	*H. vulgare* × *Triticum turgidum*
Vigna radiata × *Vigna mungo* (ถั่วเขียวผิวมัน) (ถั่วเขียวผิวดำ)	*Saccharum officinarum* × *Zea mays* (อ้อย) (ข้าวโพด)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. พืชทดลอง ได้แก่ เอมบริโอของถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 พันธุ์ขอนแก่น 60-3 และเอมบริโอที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ไทนาน 9×ขอนแก่น 60-3 โดยใช้เอมบริโอที่มีอายุต่างๆกัน ดังนี้

- อายุ 10 วันหลังการผสม (ซึ่งมีลักษณะเป็น peg) อยู่ในระยะ R_2
- อายุ 15 วันหลังการผสม (กลายเป็นฝักอ่อนแล้ว) อยู่ในระยะ R_3- R_4
- อายุ 20 วันหลังการผสม (เป็นฝักซึ่งภายในมีเมล็ดโต) อยู่ในระยะ R_5
- อายุ 25 วันหลังการผสม (ฝักเริ่มแก่) อยู่ในระยะ R_6
- อายุ 30 วันหลังการผสม (ฝักแก่กว่าที่อายุ 25 วัน) อยู่ในระยะ $R_7 - R_8$

2. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog ,1962) โดยใส่ macronutrient ½อัตราส่วน

2.2 น้ำตาลทราย

2.3 วุ้นผง (agar)

2.4 น้ำกลั่น

3. เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 1000 ml
- แท่งแก้วคนสาร
- ช้อนตักสาร (spatule)
- เครื่องชั่ง (balance)
- กระบอกตวงขนาด 1000 ml
- ปิเปต (pipette)
- ขวดแก้ว (bottle) สำหรับใส่อาหารพร้อมฝาปิด
- หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)
- เตาอุ่นความร้อนและเครื่องคน (hot plate and magnetic stirrer)
- กระดาษฟลอยด์

4. สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอรอกซ์ (clorox) และสารจับใบ (teepol)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. เครื่องมือที่ใช้ในการย้ายชิ้นส่วนของพืชประกอบด้วย ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air-flow cabinet) และเครื่องมือที่ใช้ในตู้ปลอดเชื้อ ได้แก่ มีดผ่าตัด (knives and scalpels) ปากคีบ (forceps) ตะเกียง (turnel) จานแก้ว (petri dish) และขวดใส่แอลกอฮอล์ 95%
6. เครื่องเขย่า (shaker)
7. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture room) ที่ควบคุมอุณหภูมิ 28±3 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสงประมาณ 3,000 ลักซ์ (lux) นาน 16 ชั่วโมงและไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง ควบคุมการปิด-เปิดด้วยเครื่องตั้งเวลา (timer)
8. ชั้นสำหรับวางขวดเนื้อเยื่อ
9. อุปกรณ์ถ่ายภาพ กล้อง กระดาษสี

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. การเตรียมอาหารสูตร MS

ขั้นตอนการเตรียมอาหาร (ปริมาตร 1000 ml)

1.1 เตรียมบีกเกอร์ ชั่งน้ำตาลจำนวน 30 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์

1.2 เติมน้ำกลั่นประมาณ 500 ml คนน้ำตาลให้ละลาย

1.3 ดูดสารละลายจาก stock solutions ต่างๆ มารวมกัน โดยใช้ปริมาตรในแต่ละ stock ดังนี้

stock ที่ 1	10 ml*
stock ที่ 2	5 ml**
stock ที่ 3	10 ml
stock ที่ 4	10 ml
stock ที่ 5	10 ml

1.4 ปรับปริมาตรสารละลายอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยการเติมน้ำกลั่นให้ได้ครบ 1000 ml

1.5 ปรับค่าความเป็นกรดหรือด่าง (pH) ด้วย กรดเกลือ (HCl) และโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ให้อยู่ในช่วง 5.6-5.8

1.6 เติมวุ้นผงปริมาณ 11 กรัม หลอมให้ละลายด้วยเตาอุ่นความร้อน (hot plate) โดยใช้ กระดาษฟลอยด์ปิดปากบีกเกอร์

---

* ใส่เพียง ½ อัตราส่วน โดยจากเดิมใช้ 20 ml/l

** ใส่เพียง ½ อัตราส่วน โดยจากเดิมใช้ 10 ml/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.7 เทอาหารใส่ขวดแก้ว แล้วปิดฝาให้แน่น

1.8 นำอาหารที่เทลงขวดเรียบร้อยแล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (atoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) เป็นเวลา 20 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น

2. การเตรียมน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อ

2.1 clorox 10% ได้จากการใช้น้ำกลั่น 90 ml นึ่งฆ่าเชื้อไว้ก่อน เมื่อจะใช้ก็เติม clorox 10 ml และ teepol 1-2 หยด

2.2 clorox 5% ได้จากการใช้น้ำกลั่น 95 ml นึ่งฆ่าเชื้อไว้ก่อน เมื่อจะใช้ก็เติม clorox 5 ml และ teepol 1-2 หยด

3. การเตรียมชิ้นส่วนพืชและการทำความสะอาด

3.1 นำเอมบริโอของถั่วลิสง มาล้างน้ำไหล (running) โดยใช้ผ้าขาวบางปิดปากบีกเกอร์ที่ใส่ชิ้นส่วนถั่วลิสงโดยเติม teepol 2-3 หยด แล้วเปิดน้ำไหลผ่านนานประมาณ 30 นาที

3.2 นำเอมบริโอของถั่วลิสงมาฟอกฆ่าเชื้อในตู้ปลอดเชื้อโดย

- เอมบริโอที่มีอายุ 10 วันและ 15 วันหลังผสม เขย่าใน clorox 10% + teepol 1-2 หยด นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น (ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 5 นาที
- เอมบริโอที่มีอายุ 20 วัน , 25 วันและ 30 วันหลังผสม เขย่าใน clorox 5% + teepol 1-2 หยด นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น (ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 5 นาที

4. การเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

นำชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกแล้วมาตัดเอาส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญโดยในกรณีที่เป็น peg จะตัดเอาส่วนปลายไม่เกิน 1 เซนติเมตรในส่วนที่เป็นเมล็ดจะตัดเอาส่วนของเอมบริโอที่อยู่ภายใน และส่วนเมล็ดอ่อนที่มีขนาดเล็กมากให้ใช้ทั้งเมล็ด นำมาเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เตรียมไว้ โดยใช้ 1 ชิ้นส่วน/1 ขวด เป็นเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะเวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาในการทดลอง

- การปลูก

ปลูกถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 และพันธุ์ขอนแก่น 60-3 พันธุ์ละ 10 กระถาง แบบ hybridizing block จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 5 วัน โดยเริ่มปลูก พันธุ์ขอนแก่น 60-3 ก่อน เพื่อให้ถั่วลิสงทั้งสองพันธุ์ออกดอกพร้อมกันและมีดอกมากพอที่จะทำการผสมข้าม

ปลูกพันธุ์ขอนแก่น 60-3 ครั้งแรก	วันที่ 5 สิงหาคม 2544
ปลูกพันธุ์ขอนแก่น 60-3 ครั้งที่ 2	วันที่ 10 สิงหาคม 2544
ปลูกพันธุ์ขอนแก่น 60-3 ครั้งที่ 3	วันที่ 15 สิงหาคม 2544
ปลูกพันธุ์ไทนาน 9 ครั้งแรก	วันที่ 10 สิงหาคม 2544
ปลูกพันธุ์ไทนาน 9 ครั้งที่ 2	วันที่ 15 สิงหาคม 2544
ปลูกพันธุ์ไทนาน 9 ครั้งที่ 3	วันที่ 20 สิงหาคม 2544
พันธุ์ขอนแก่น 60-3 เริ่มออกดอก	วันที่ 9 กันยายน 2544
พันธุ์ไทนาน 9 เริ่มออกดอก	วันที่ 8 กันยายน 2544

- การผสมข้าม

เริ่มทำการผสมข้าม	วันที่ 10 กันยายน 2544
สิ้นสุดการผสมข้าม	วันที่ 10 ตุลาคม 2544

- การเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

เริ่มทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์	วันที่ 19 ตุลาคม 2544
สิ้นสุดการทดลอง (เก็บผลการทดลองครั้งสุดท้าย)	วันที่ 2 พฤศจิกายน 2544

สถานที่ทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

109081

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเอมบริโอของถั่วลิสงที่มีอายุต่างๆกันภายหลังการผสมเกสรในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าเอมบริโอมีการเจริญเปลี่ยนแปลงดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 – 6 และรูปภาพที่ 1-5

ตารางที่ 4 แสดงผลของการเพาะเลี้ยงเอมบริโอถั่วลิสงที่ได้จากการผสมข้าม ระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 × ขอนแก่น 60-3

อายุหลังทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS	เอมบริโอถั่วลิสงที่อายุต่างๆ (หลังผสม)	การเปลี่ยนแปลงที่สังเกตพบ
อายุ 3 วัน	อายุ 10 วัน	peg มีการบวมและยืดยาวขึ้นเล็กน้อย ส่วนปลายของ peg มีสีเหลือง
	อายุ 15 วัน	เมล็ดอ่อนมีการบวมขึ้นเล็กน้อย
	อายุ 20 วัน	ส่วนยอดของเอมบริโอมีการคลี่ออกเล็กน้อย ปลายยอดมีสีเหลืองและส่วนของ hypocotyl ยืดยาวขึ้นอย่างเห็นได้ชัด
	อายุ 25 วัน	ส่วนยอดของเอมบริโอมีการคลี่ออกเล็กน้อย ปลายยอดมีสีเขียวอ่อนๆและส่วนของ hypocotyl ยืดยาวขึ้นอย่างเห็นได้ชัด
	อายุ 30 วัน	เอมบริโอมีการยืดยาวของ hypocotyl มากที่สุด ส่วนปลายยอดคลี่ออกมีสีเขียวอ่อนๆ
อายุ 7 วัน	อายุ 10 วัน	เริ่มเกิดแคลลัสสีขาวใสบริเวณปลายของ peg
	อายุ 15 วัน	เมล็ดอ่อนเกิดแคลลัสสีขาวใสล้อมรอบ
	อายุ 20 วัน	ใบเปลี่ยนเป็นสีเขียวคลี่ออกมากกว่าเดิมส่วนของ hypocotyl มีการยืดยาวเพิ่มขึ้นและสังเกตเห็นปุ่มรากเกิดขึ้น
	อายุ 25 วัน	ใบเปลี่ยนเป็นสีเขียวคลี่ออกมากกว่าเดิม ส่วนของ hypocotyl มีการยืดยาวเพิ่มขึ้น มีการงอกของรากยืดยาวกว่าที่อายุ 20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	อายุ 30 วัน	มีการเจริญมากที่สุดในชิ้นส่วนถั่วลิสงที่อายุต่างๆ (หลังผสม) เนื่องจากมีการยืดยาวของ hypocotyl และรากมากที่สุด ส่วนใบมีขนาดใหญ่ขึ้น
อายุ 10 วัน	อายุ 10 วัน	แคลลัส มีขนาดใหญ่ขึ้นจากเดิม
	อายุ 15 วัน	แคลลัส ที่ล้อมรอบเมล็ดอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น
	อายุ 20 วัน	ใบคลี่ออกหมด มีการงอกของรากยืดยาวออกมาเล็กน้อย ส่วนของ hypocotyl มีการยืดยาวเพิ่มขึ้นจากเดิม
	อายุ 25 วัน	ใบคลี่ออกหมดมีการงอกของรากยืดยาวกว่าที่อายุ 20 วัน ส่วนของ hypocotyl มีการยืดยาวเพิ่มขึ้นจากเดิม
	อายุ 30 วัน	มีการเจริญมากที่สุดมองเห็นเป็นต้นชัดเจน เนื่องจากมีการยืดยาวของราก hypocotyl และใบก็มีขนาดใหญ่ขึ้น (ต้นโตกว่าที่อายุ 7 วันหลังการเพาะเลี้ยง)
อายุ 14 วัน	อายุ 10 วัน	แคลลัสล้อมรอบ peg จนหมดและมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างเห็นได้ชัด
	อายุ 15 วัน	แคลลัสล้อมรอบเมล็ดจนหมดและมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างเห็นได้ชัด
	อายุ 20 วัน	รากงอกยาวขึ้นมีการยืดยาวของ hypocotyl มากขึ้น ใบมีขนาดใหญ่ขึ้นทำให้มองเห็นเป็นต้นชัดเจน
	อายุ 25 วัน	รากงอกยาวขึ้นมีการยืดยาวของ hypocotyl มากขึ้น ใบมีขนาดใหญ่ขึ้นทำให้มองเห็นเป็นต้นชัดเจน โตกว่าที่อายุ 20 วัน (หลังผสม)
	อายุ 30 วัน	ต้นมีขนาดใหญ่ที่สุด และมีขนาดใหญ่กว่าที่อายุ 10 วันหลังการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงผลของการเพาะเลี้ยงเอมบริโอถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9

อายุหลังทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS	เอมบริโอถั่วลิสงที่อายุต่างๆ (หลังผสม)	การเปลี่ยนแปลงที่สังเกตพบ
อายุ 3 วัน	อายุ 10 วัน	peg มีการบวมและยืดยาวขึ้นเล็กน้อย ส่วนปลายของ peg มีสีเหลือง
	อายุ 15 วัน	เมล็ดอ่อนมีการบวมขึ้นเล็กน้อย
	อายุ 20 วัน	ส่วนยอดของเอมบริโอมีการคลี่ยอกเล็กน้อย ปลายยอดมีสีเหลืองและส่วนของ hypocotyl ยืดยาวขึ้นอย่างเห็นได้ชัด
	อายุ 25 วัน	ส่วนยอดของเอมบริโอมีการคลี่ออกเล็กน้อย ปลายยอดมีสีเขียวอ่อนๆและส่วนของ hypocotyl ยืดยาวขึ้นอย่างเห็นได้ชัด
	อายุ 30 วัน	เอมบริโอมีการยืดยาวของ hypocotyl มากที่สุด ส่วนปลายยอดคลี่ออกมีสีเขียวอ่อนๆ
อายุ 7 วัน	อายุ 10 วัน	เริ่มเกิดแคลลัสสีขาวใส บริเวณปลายของ peg
	อายุ 15 วัน	เมล็ดอ่อนเกิดแคลลัสสีขาวใส ล้อมรอบ
	อายุ 20 วัน	ใบเปลี่ยนเป็นสีเขียวคลี่ออกมากกว่าเดิม ส่วนของ hypocotyl มีการยืดยาวเพิ่มขึ้นและสังเกตเห็นปุ่มรากเกิดขึ้น
	อายุ 25 วัน	ใบเปลี่ยนเป็นสีเขียวคลี่ออกมากกว่าเดิม ส่วนของ hypocotyl มีการยืดยาวเพิ่มขึ้น มีการงอกของราก ยืดยาวกว่าที่อายุ 20 วัน
	อายุ 30 วัน	มีการเจริญมากที่สุดในชิ้นส่วนถั่วลิสงที่อายุต่างๆ (หลังผสม) เนื่องจากมีการยืดยาวของ hypocotyl และรากมากที่สุด ส่วนใบมีขนาดใหญ่ขึ้น
อายุ 10 วัน	อายุ 10 วัน	แคลลัส มีขนาดใหญ่ขึ้นจากเดิม
	อายุ 15 วัน	แคลลัสที่ล้อมรอบเมล็ดอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	อายุ 20 วัน	ใบคลี่ออกหมดมีการงอกของรากยืดยาวออกมาเล็กน้อย ส่วนของ hypocotyl มีการยืดยาวเพิ่มขึ้นจากเดิม
	อายุ 25 วัน	ใบคลี่ออกหมดมีการงอกของรากยืดยาวกว่าที่อายุ 20 วัน ส่วนของ hypocotyl มีการยืดยาวเพิ่มขึ้นจากเดิม
	อายุ 30 วัน	มีการเจริญมากที่สุด มองเห็นเป็นต้นชัดเจน เนื่องจากมีการยืดยาวของราก hypocotyl และใบก็มีขนาดใหญ่ขึ้น (ต้นโตกว่าที่อายุ 7 วันหลังการเพาะเลี้ยง)
อายุ 14 วัน	อายุ 10 วัน	แคลลัสล้อมรอบ peg จนหมดและมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างเห็นได้ชัด
	อายุ 15 วัน	แคลลัสล้อมรอบเมล็ดจนหมดและมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างเห็นได้ชัด
	อายุ 20 วัน	รากงอกยาวขึ้นมีการยืดยาวของ hypocotyl มากขึ้น ใบมีขนาดใหญ่ขึ้นทำให้มองเห็นเป็นต้นชัดเจน
	อายุ 25 วัน	รากงอกยาวขึ้นมีการยืดยาวของ hypocotyl มากขึ้น ใบมีขนาดใหญ่ขึ้นทำให้มองเห็นเป็นต้นชัดเจน โตกว่าที่อายุ 20 วัน (หลังผสม)
	อายุ 30 วัน	ต้นมีขนาดใหญ่ที่สุดและมีขนาดใหญ่กว่าที่อายุ 10 วันหลังการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงผลของการเพาะเลี้ยงเอมบริโอถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 60-3

อายุหลังทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS	เอมบริโอถั่วลิสงที่อายุต่างๆ (หลังผสม)	การเปลี่ยนแปลงที่สังเกตพบ
อายุ 3 วัน	อายุ 10 วัน	peg มีการบวมและยืดยาวขึ้นเล็กน้อย ส่วนปลายของ peg มีสีเหลือง
	อายุ 15 วัน	เมล็ดอ่อนมีการบวมขึ้นเล็กน้อย
	อายุ 20 วัน	ส่วนยอดของเอมบริโอ มีการคลี่ออกเล็กน้อยปลายยอดมีสีเหลืองและส่วนของ hypocotyl ยืดยาวขึ้นอย่างเห็นได้ชัด
	อายุ 25 วัน	ส่วนยอดของเอมบริโอ มีการคลี่ออกเล็กน้อยปลายยอดมีสีเขียวอ่อนๆและส่วนของ hypocotyl ยืดยาวขึ้นอย่างเห็นได้ชัด
	อายุ 30 วัน	เอมบริโอมีการยืดยาวของ hypocotyl มากที่สุด ส่วนปลายยอดคลี่ออกมีสีเขียวอ่อนๆ
อายุ 7 วัน	อายุ 10 วัน	เริ่มเกิดแคลลัสสีขาวใส บริเวณปลายของ peg
	อายุ 15 วัน	เมล็ดอ่อนเกิดแคลลัสสีขาวใส ล้อมรอบ
	อายุ 20 วัน	ใบเปลี่ยนเป็นสีเขียวคลี่ออกมากกว่าเดิมส่วนของ hypocotyl มีการยืดยาวเพิ่มขึ้นและสังเกตเห็นปุ่มรากเกิดขึ้น
	อายุ 25 วัน	ใบเปลี่ยนเป็นสีเขียวคลี่ออกมากกว่าเดิมส่วนของ hypocotyl มีการยืดยาวเพิ่มขึ้น มีการงอกของรากยืดยาวกว่าที่อายุ 20 วัน
	อายุ 30 วัน	มีการเจริญมากที่สุดในชิ้นส่วนถั่วลิสงที่อายุต่างๆ (หลังผสม) เนื่องจากมีการยืดยาวของ hypocotyl และรากมากที่สุด ส่วนใบมีขนาดใหญ่ขึ้น
อายุ 10 วัน	อายุ 10 วัน	แคลลัส มีขนาดใหญ่ขึ้นจากเดิม
	อายุ 15 วัน	แคลลัสที่ล้อมรอบเมล็ดอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	อายุ 20 วัน	ใบคลี่ออกหมดมีการงอกของรากยืดยาวออกมาเล็กน้อย ส่วนของ hypocotyl มีการยืดยาวเพิ่มขึ้นจากเดิม
	อายุ 25 วัน	ใบคลี่ออกหมดมีการงอกของรากยืดยาวกว่าที่อายุ 20 วัน ส่วนของ hypocotyl มีการยืดยาวเพิ่มขึ้นจากเดิม
	อายุ 30 วัน	มีการเจริญมากที่สุด มองเห็นเป็นต้นชัดเจนเนื่องจากมีการยืดยาวของราก hypocotyl และใบก็มีขนาดใหญ่ขึ้น (ต้นโตกว่าที่อายุ 7 วันหลังการเพาะเลี้ยง)
อายุ 14 วัน	อายุ 10 วัน	แคลลัสล้อมรอบ peg จนหมดและมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างเห็นได้ชัด
	อายุ 15 วัน	แคลลัสล้อมรอบเมล็ดจนหมดและมีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างเห็นได้ชัด
	อายุ 20 วัน	รากงอกยาวขึ้นมีการยืดยาวของ hypocotyl มากขึ้น ใบมีขนาดใหญ่ขึ้นทำให้มองเห็นเป็นต้นชัดเจน
	อายุ 25 วัน	รากงอกยาวขึ้นมีการยืดยาวของ hypocotyl มากขึ้น ใบมีขนาดใหญ่ขึ้นทำให้มองเห็นเป็นต้นชัดเจน โตกว่าที่อายุ 20 วัน (หลังผสม)
	อายุ 30 วัน	ต้นมีขนาดใหญ่ที่สุด และมีขนาดใหญ่กว่าที่อายุ 10 วันหลังการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะของเอมบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เป็นเวลา 14 วัน

รูปภาพที่ 1 เอมบริโออายุ 10 วัน
หลังการผสมข้าม ในอาหารสูตร MS

รูปภาพที่ 2 เอมบริโออายุ 15 วัน
หลังการผสมข้ามในอาหารสูตร MS

รูปภาพที่ 3 เอมบริโออายุ 20 วัน
หลังการผสมข้ามในอาหารสูตร MS

รูปภาพที่ 4 เอมบริโออายุ 25 วัน
หลังการผสมข้าม ในอาหารสูตร MS

รูปภาพที่ 5 เอมบริโออายุ 30 วัน
หลังการผสมข้าม ในอาหารสูตร MS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์ผล

ผลการทดลองเพาะเลี้ยงเอมบริโอของถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 พันธุ์ขอนแก่น 60-3 และพันธุ์ไทนาน 9×ขอนแก่น 60-3 ที่มีอายุ 10 , 15 , 20 , 25 และ 30 วัน หลังผสมเกสร ในอาหารสูตร MS ที่เติม macronutrient เพียง ½ อัตราส่วน ได้ผลการทดลองสอดคล้องกัน คือ เอมบริโอที่อายุ 10 วัน (ระยะ R_2) และเอมบริโอที่อายุ 15 วัน (ระยะ R_3- R_4) สามารถเจริญพัฒนาเป็นแคลลัสได้ ส่วนเอมบริโอที่มีอายุ 20 วัน (ระยะ R_5) , 25 วัน (ระยะ R_6) และ 30 วัน (ระยะ R_7-R_8) สามารถเจริญพัฒนาจนเป็นต้นสมบูรณ์ได้ แสดงให้เห็นว่าเอมบริโอที่ได้จากการผสมข้ามก็สามารถเจริญพัฒนาได้เช่นเดียวกับเอมบริโอของถั่วลิสงพันธุ์อื่น

จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของถั่วลิสง สาเหตุที่ทำให้การเจริญพัฒนาของเอมบริโอต่างกัน คือ อายุของเอมบริโอที่นำมาเพาะเลี้ยงโดยเอมบริโอที่มีอายุน้อยๆหลังผสมเกสร(ซึ่งยังมีองค์ประกอบภายในเมล็ดไม่สมบูรณ์) มักเจริญพัฒนาเป็นแคลลัส ดังนั้นหากต้องการชักนำให้เกิดต้นก็สามารถทำได้ โดยย้ายแคลลัสลงในอาหารที่มีความเข้มข้นลดลงและเติมสารเร่งการเจริญเติบโต แคลลัสก็น่าจะมีแนวโน้มในการพัฒนาเป็นตายอดหรือต้น ได้เช่นเดียวกับเอมบริโอที่มีอายุ 20 , 25 และ 30 วัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของวิมลรัตน์และไพศาล (2536) ที่ทำการใช้เนื้อเยื่อส่วนต่างๆและใบเลี้ยงที่มีอายุต่างๆกันของถั่วลิสงมาเพาะเลี้ยง โดยช่วงแรกพบว่าสามารถพัฒนาให้เกิดแคลลัส และ 20 วันหลังเลี้ยงย้ายแคลลัสลงในอาหารที่มีความเข้มข้นลดลงแต่เพิ่มความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโตสามารถพัฒนาให้เกิดตายอดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเอมบริโอของถั่วลิสงที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ไทนาน 9 × ขอนแก่น 60-3 พบว่าเอมบริโอที่มีอายุ 10 วัน (ระยะ R_2) และอายุ 15วัน (ระยะ R_3- R_4) หลังการผสมข้ามสามารถเจริญพัฒนาเป็นแคลลัสได้ ส่วนเอมบริโอที่มีอายุ 20 วัน (ระยะ R_5) , 25 วัน (ระยะ R_6) และ 30 วัน (ระยะ R_7-R_8) สามารถเจริญพัฒนาเป็นต้นถั่วที่สมบูรณ์หลังเพาะเลี้ยง 7 วัน ในอาหารสูตร MS ที่ใส่ macronutrient เพียง ½ อัตราส่วน โดยเอมบริโอที่อายุ 30 วันหลังการผสมข้ามมีการเจริญพัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดและเร็วที่สุด ส่วนเอมบริโอที่อายุ 25 วัน และ 20 วัน หลังการผสมข้าม มีการเจริญพัฒนาเป็นต้นได้ดีรองลงมาตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา กล้าแข็ง , ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ , สาธิต ทยาพัชร , เผดิม ระติสุนทร , พรรณณี รอดแรง บุญ , งามชื่น ดงเสรี , เครือวัลย์ อัตตะวิริยะสุขและกัมปนาท มุขดี . 2537 . การผลิตข้าว POLYPLOID และการทดสอบผลผลิตและคุณภาพ **ใน : เอกสารประกอบการบรรยายการสัมมนาทางวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืชครั้งที่ 4 เรื่องพันธุ์พืชใหม่และความปลอดภัยทางชีวภาพ** . กรมวิชาการเกษตรร่วมกับสมาคมปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชแห่งประเทศไทย . กรุงเทพฯ . หน้า 391.

คำนูณ กาญจนภูมิ . 2542 . **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช** . สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย . กรุงเทพฯ . 162 หน้า.

ชวนพิศ อรุณรังสิกุล , เกษม พิลึก , พรพันธุ์ ภู่พร้อมพันธุ์และศิริพร ชุมแสงโชติสกุล . 2535 . การเพาะเลี้ยงคัพภะของลูกผสมของพืชผักสกุล Brassica V. การศึกษาหาวิธีการตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดของผักสกุล Brassica **ใน : รายงานค้นคว้าวิจัยประจำปี 2535 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์** . อักษรสยามการพิมพ์ . กรุงเทพฯ . หน้า 235.

นพพร สายัมพล . 2543 . **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช** . สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . กรุงเทพฯ . 261 หน้า.

นิตย์ศรี แสงเดือน . 2541 . **พันธุศาสตร์พืช** . พิมพ์ครั้งที่ 2 . หจก. โรงพิมพ์ชวนพิมพ์ . กรุงเทพฯ . หน้า 244.

ภูวนาถ นนทรี . 2531 . **ถั่วลิสง** . เอดิสัน เพรส โปรดักส์ . กรุงเทพฯ . 72 หน้า.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ . 2541 . **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลักการและเทคนิค** . พิมพ์ครั้งที่ 2 . สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . กรุงเทพฯ . 219 หน้า.

วิชัย หฤทัยธนาสันติ์ . 2540 . การใช้ประโยชน์และการเก็บรักษาถั่วลิสง **ใน : คู่มือวิชาการเรื่องอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง** . บริษัท นิวธรรมดาการพิมพ์ (ประเทศไทย) จำกัด . กรุงเทพฯ . หน้า 170-177.

วิมลรัตน์ ศุภรินทร์และไพศาล ศุภางคเสน . 2534 . การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วลิสง **ใน : รายงานผลการวิจัยประจำปี 2534 ถั่วลิสง** . ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ . หน้า 226-227.

วิมลรัตน์ ศุภรินทร์และไพศาล ศุภางคเสน . 2536 . การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วลิสง **ใน : รายงานผลการวิจัยประจำปี 2536 ถั่วลิสง (เล่ม 1)** . ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร . กรุงเทพฯ . หน้า 226-227.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น . 2542 . **การผลิตถั่วลิสงอย่างถูกต้องและเหมาะสม** . สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร . 23 หน้า.

สถาบันวิจัยพืชไร่ . 2527 . **เทคนิคการผสมพันธุ์พืชไร่** . กรมวิชาการเกษตร . กรุงเทพฯ . หน้า 22-25.

สถาบันวิจัยพืชไร่ . 2529 . **พันธุ์พืชไร่ 2529**. . กรมวิชาการเกษตร . กรุงเทพฯ . 74 หน้า .

สถาบันวิจัยพืชไร่ . 2536 . **เอกสารพันธุ์พืชไร่ 2536** . หจก.ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง . กรุงเทพฯ . 147 หน้า.

สถาบันวิจัยพืชไร่ . 2537 . เอกสารวิชาการปลูกพืชไร่ . พิมพ์ครั้งที่ 2 . กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ . 287 หน้า .

สถาบันวิจัยพืชไร่ . 2538 . **รายงานประจำปี 2538 ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถานีทดลองพืชไร่มหาสารคาม สถานีทดลองพืชไร่ร้อยเอ็ด สถานีทดลองพืชไร่เลย** . กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ . หน้า 38.

สถาบันวิจัยพืชไร่ . 2542 . **เอกสารแนะนำพันธุ์ถั่วลิสง** . ฝ่ายถ่ายทอดเทคโนโลยี สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร . กรุงเทพฯ . 2 หน้า.

สมปอง เตชะโต . 2537 . **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเศรษฐกิจหลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ** . ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ . 120 หน้า.

สุมนา งามผ่องใส , สมยศ พิชิตพร , วิไลวรรณ พรหมคำ , พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์และ Yoshinobu Egawa . 2538 . การเพาะเลี้ยงคัพภะของลูกผสมข้ามชนิดระหว่าง Vigna Species ใน : **รายงานการสัมมนาเชิงปฏิบัติการงานวิจัยถั่วเขียวครั้งที่ 6 ปี 2538** . ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท. ชัยนาท . หน้า 91-97.

ไสว พงษ์เก่า . 2534 . **พืชเศรษฐกิจ** . ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . กรุงเทพฯ . 478 หน้า.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์ . 2541 . **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช** . โรงพิมพ์อัดิสรรค์ . กรุงเทพฯ . 133 หน้า.

อรดี สหวัชรินทร์ . 2526 . **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช** . หจก. ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง . กรุงเทพฯ . 17 หน้า.

อรดี สหวัชรินทร์ . 2539 . **เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช** . อักษรสยามการพิมพ์ . กรุงเทพฯ . 48 หน้า.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Atreya, C.D., J.P. Rao and N.C. Subrahmanyam . 1984 . *In vitro* regeneration of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) plantlets from embryo axes and cotyledon segments . **Plant Science Letters** . 34(3) :379-383.

Ellen, G.S. 1996 . General laboratory requirements , media and sterilization methods . In : Robert N. Trigino and Dennis J. Gray (ed.). **Plant tissue culture concept and laboratory exercises** . CRC Press , Inc . pp 11-25.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962 . A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures . **Physiol. Plant** . 15 : 473-479.

Na lampang, A . 1993 . Chronicle of Peanut Activities in Thailand . **เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาวิชาการ 50 ปี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และ 10 ปี โครงการ Peanut CRSP ในประเทศไทย** . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . กรุงเทพฯ . pp 9-14.

Nigem, S.N., M.J. Vasudevarao and R.W. Gibbons. 1990 . **Artificial Hybridization in Groundnut** . ICRISAT Center. India . 17 pp .

Roberta, H.S. 1992 . **Plant Tissue Culture : Techniques and Experiments** . Academic Press Limited . Lodon . pp 8-9.

Reddy, P.S. 1988 . **Groundnut** . Ajanta Offset and Packagings Ltd . New Delhi . 583 pp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 แสดงการเตรียมสารละลายเข้มข้นของอาหารสูตร MS ต่อปริมาตร 1 ลิตร (1000 ml)

Chemical	Concentration (g/liter stock)
Stock 1	
NH_4NO_3	82.5
$MgSO_4 . 7H_2O$	18.5
KH_2PO_4	8.5
KNO_3	95
Stock 2	
$CaCl_2 . 2H_2O$	44
Stock 3	
$MnSO_4 . H_2O$	0.69
$CoCl_2 . 6H_2O$	0.0025
KI	0.083
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0.025
$ZnSO_4 . 7H_2O$	0.614
$CuSO_4 . 5 H_2O$	0.0025
H_3BO_3	0.62
Stock 4	
Na_2EDTA	3.725
$FeSO_4 . 7H_2O$	2.785
Stock 5	
Myo-Inositol	10
Pyridoxine Hydrochloride	0.05
Thiamine Hydrochloride	0.01
Nicotinic acid	0.05
Glycine	0.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบของ inorganic macronutrient , micronutrient และ organic contituents ของสูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962) ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางผนวกที่ 1 , 2 และ 3 ตามลำดับ

ตารางผนวกที่ 2 Inorganic macronutrient (mg/l)

Contituents	Murashige and Skoog
$MgSO_4.7H_2O$	370
$CaCl_2.2H_2O$	440
KNO_3	1,900
NH_4NO_3	1,650
KH_2PO_4	170

ตารางผนวกที่ 3 Inorganic micronutrient (mg/l)

Contituents	Murashige and Skoog
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
KI	0.83
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$ZnSO_4.7H_2O$	0.6
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
H_3BO_3	6.2
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 4 Organic contituents (mg/l)

Contituents	Murashige and Skoog
Glycine	2
Myo-inositol	100
Vitamin B_1	0.1
Vitamin B_6	0.5
Nicotinic acid	0.5
Na_2EDTA	37.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้