รหัสโครงการ SU-302-41-36-11

รายงานการวิจัย

โครงการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนต่อสภาพแวดล้อม

(Crop Improvement for Stress Tolerance)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร. อารีย์ วรัญญูวัฒก์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

นางสาวสุภาวรัตน์ ชาญยุทธ

นางสาวพิจิกา ทิมสุกใส

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ ๒๕๔๑–๒๕๔๓

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม ๒๕๔๕

คำชี้แจง

รายงานวิจัยโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนต่อสภาพแวดล้อม ฉบับนี้ไม่ได้ครอบคลุมส่วนงานที่คาดว่าจะดำเนินการต่อ ตามแบบเสนอโครงการตั้งแต่เริ่มต้น จากงบประมาณที่ได้รับจัดสรรจึงได้ลดขอบเขตของการวิจัยลง และมีพืชที่เกี่ยวข้องเพียง 3 ชนิด คือ ถั่วเหลือง ข้าว และ อ้อย ซึ่งได้เริ่มดำเนินการมาตั้งแต่ปี 2541 เมื่อสิ้นสุดเวลาตามโครงการ 3 ปี ไม่สามารถสำเร็จผลได้ จึงล่วงเลยมาจนถึงปี 2545 ซึ่งก็ไม่บรรลุผลตามจุดประสงค์ที่ตั้งไว้ ข้อมูลที่ปรากฏในรายงานนี้ โดยเฉพาะเรื่องข้าวยังไม่เสร็จสิ้นสมบูรณ์ และผู้วิจัยก็กำลังดำเนินการต่อ เพื่อรวบรวมผลเพิ่มเติม แม้ว่าได้สิ้นสุดเวลาแล้วก็ตาม

หัวหน้าโครงการ

บทคัดย่อ

การคัดเลือกเนื้อเยื่อทนเค็มของข้าว ถั่วเหลือง และอ้อย สามารถได้เนื้อเยื่อที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ การชักนำให้เกิดต้นพืชได้ต้นข้าวและถั่วเหลือง แต่ไม่สามารถชี้ชัดได้ว่า มีความทนเค็ม ต้นถั่วเหลืองได้ตายไปก่อน ส่วนต้นข้าวที่ออกเมล็ดจะต้องทดสอบต่อไป ส่วนอ้อยนั้น จะต้องชักนำแคลลัสทนเค็มปริมาณมาก เพื่อให้ได้ต้นสำหรับการทดสอบ อย่างไรก็ตาม ต้นอ้อยที่ได้จากแคลลัสปกติ จำนวน 42 ต้น มี 1 สายพันธุ์ที่แตกต่างจากพันธุ์เดิม

Abstract

Tissue culture selection for salt tolerance in soybean, rice and sugarcane resulted in tissues capable of growing on sodium chloride-containing medium. Plant regeneration could be obtained in rice and soybean. However, the confirmation for salt tolerance could not be accomplished due to the premature death of soybean and further study of the resulting seeds of rice is needed. A large amount of salt-tolerant calli of sugarcane must be regenerated in order to obtain plantlets for evaluation. However, one out of 42 plantlets was obviously different from the original cultivar.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญตาราง	ค
สารบัญภาพ	ง
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีดำเนินการ	3
บทที่ 3 ผลการดำเนินการ	7
ก. ถั่วเหลือง	7
ข. ข้าว	10
ค. อ้อย	16
บทที่ 4 บทสรุป	19
บรรณานุกรม	21
ภาคผนวก	23
ประวัติผู้วิจัย	30

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ ได้รับงบประมาณจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ผู้วิจัยขอขอบคุณในความอนุเคราะห์ รวมทั้งศูนย์วิจัยข้าวพิมาย ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี และศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ที่ให้ตัวอย่างพันธุ์พืชที่ใช้ในงานวิจัย

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ศักยภาพการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลือง 12 พันธุ์	9
ตารางที่ 2	แสดงค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดโซมาติกเอ็มบริโอถั่วเหลือง 5 พันธุ์ ซึ่งเลี้ยงคัดเลือกในอาหารที่เติมเกลือ NaCl ระดับต่าง ๆ	9
ตารางที่ 3	แสดงจำนวนชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่รอดชีวิตของถั่วเหลือง 5 พันธุ์ ที่ความเข้มข้นเกลือระดับต่าง ๆ และจำนวนที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้	10
ตารางที่ 4	จำนวนก้อนแคลลัสทั้งหมดและเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ชักนำในอาหารสูตรต่าง ๆ ในสภาพมีและไม่มีแสง	12
ตารางที่ 5	ปฏิกิริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและสูตรอาหารต่อปริมาณการเกิดแคลลัสข้าว	13
ตารางที่ 6	ปฏิกิริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและสภาพแสงที่มีต่อปริมาณการเกิดแคลลัสข้าว	13
ตารางที่ 7	ปฏิกิริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและความเข้มข้นเกลือที่มีต่อจำนวนแคลลัสข้าวบนอาหารคัดเลือก	14
ตารางที่ 8	ปฏิกิริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและจำนวนวันที่ใช้คัดเลือกที่มีผลต่อจำนวนแคลลัสข้าวบนอาหารคัดเลือก	14
ตารางที่ 9	ปริมาณโซเดียม โปแตสเซียม แคลเซียม และคลอไรด์(เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง) ในใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	15
ตารางที่ 10	ผลของอาหารต่อการเกิดแคลลัสอ้อยพันธุ์อู่ทอง 1	16
ตารางที่ 11	อัตราการเกิดแคลลัสของอ้อย 3 พันธุ์ ด้วยอาหารสูตร 1	16
ตารางที่ 12	ผลของ NaCl ต่อความมีชีวิตรอดของอ้อยพันธุ์อู่ทอง 1	18
ตารางผนวกที่ 1	สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงถั่วเหลือง	23
ตารางผนวกที่ 2	สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่ใช้เพาะเลี้ยงข้าว	23
ตารางผนวกที่ 3	สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่ใช้เพาะเลี้ยงอ้อย	24
ตารางผนวกที่ 4	การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของจำนวนและขนาดของแคลลัสข้าวอายุ 2 และ 4 สัปดาห์ ที่ชักนำในอาหารสูตรต่าง ๆ ในสภาพที่มีและไม่มีแสง	24
ตารางผนวกที่ 5	การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของจำนวนแคลลัสข้าวที่คัดเลือกบนอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือ 5 ระดับ และวางเลี้ยงเป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 วัน	25

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ภาพแสดงขั้นตอนการคัดเลือกถั่วเหลืองทนเค็ม	26
ภาพที่ 2	ภาพแสดงขั้นตอนการคัดเลือกข้าวทนเค็ม	27
ภาพที่ 3	ภาพแสดงขั้นตอนการคัดเลือกอ้อยทนเค็ม	28
ภาพที่ 4	ความปรวนแปรที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย	29

บทที่ ๑
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

พื้นที่เพาะปลูกพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย มีแนวโน้มที่จะลดลง เนื่องจากที่ดินที่เคยใช้เพาะปลูกถูกนำมาใช้ก่อสร้างบ้านเรือน อาคาร ถนน และแหล่งอุตสาหกรรมต่าง ๆ เพิ่มขึ้นทุกวัน การจะขยายพื้นที่ปลูกเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตพืชให้พอเพียง และเหลือส่งออกต่างประเทศเพื่อเป็นรายได้เข้าประเทศนั้น อาจจะเป็นไปได้ยาก จึงจำเป็นจะต้องเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่หรือปลูกพืชในพื้นที่ที่มีปัญหา เช่น ดินมีความเค็ม แห้งแล้ง ขาดความอุดมสมบูรณ์ ดินเปรี้ยว และมีปัญหาสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ เป็นต้น

ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย การเพาะปลูกพืชมักได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมปรวนแปรและไม่เหมาะสม โดยเฉพาะปัญหาดินเค็มจะเพิ่มความรุนแรงขึ้นกว่าปัจจุบัน ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีพื้นที่ที่จัดว่าเป็นดินเค็มประมาณ 17.8 ล้านไร่ (สมศรี อรุณินท์, 2539) การพัฒนาพันธุ์พืชให้เหมาะกับสภาวะแวดล้อม จึงมีความจำเป็นทั้งปัจจุบันและในอนาคต ประกอบกับกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพกำลังมีบทบาทสำคัญที่นักวิจัยสามารถนำมาเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของพืชได้สำเร็จ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบางชนิดทำให้เกิดกลายพันธุ์ และเป็นลักษณะที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม (Barwale and Widholm, 1987; Zhang et al., 1995) และสามารถคัดเลือกพืชให้ทนทานต่อความเค็ม (ชาญวิทย์ ม่วงมิตร, 2536; Chaudhary et al., 1996; Garcia-Agustin and Primo Millo, 1995; Gulati and Jaiwal, 1993; Vajrabhaya et al., 1989) แสดงให้เห็นว่า เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็สามารถได้พืชที่มีลักษณะตามต้องการ ดังนั้น งานวิจัยนี้ได้เน้นการใช้วิธีการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชในอาหารคัดเลือก เพื่อให้ได้พืชทนเค็ม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าว ถั่วเหลือง และอ้อยให้ทนทานต่อสภาวะดินเค็ม โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชในอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ จนได้ต้นพืชแล้วนำไปปลูกทดสอบในภาคสนามในสารละลายที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ รวมทั้งวิเคราะห์เนื้อเยื่อ ดูความแตกต่างในปริมาณธาตุโซเดียม โปแตสเซียม คลอรีน และโปรลีน เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ปกติ

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

จะได้สายพันธุ์ข้าว ถั่วเหลือง และอ้อย ที่ทนทานต่อสภาวะดินเค็ม ซึ่งสามารถใช้ปลูกในดินที่มีปัญหาเรื่องความเค็มอันเกิดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ถ้าหากเป็นลักษณะที่ถ่ายทอดได้ทางพันธุกรรม ก็จะเป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

บทที่ ๒

วิธีดำเนินการ

ก. วัสดุ

พันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้สำหรับการวิจัยนี้คือ สจ 2, สจ4, สจ 5, เชียงใหม่ 60, ดอยคำ, สุโขทัย 2, นครสวรรค์ 1, ราชมงคล, AGS292 และ KUSL 20004 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร. พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และพันธุ์ต่างประเทศ ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีคือ Jack และ Prolina

เมล็ดพันธุ์ข้าวซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวพิมาย อ.พิมาย จังหวัดนครราชสีมา คือพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, เหลืองประทิว 123, น้ำสะกุย 19, ปทุมธานี 50, สุพรรณบุรี 2, สุพรรณบุรี 90, ชัยนาท 1, กข 15 และ กข 27

ท่อนพันธุ์อ้อยได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น คือพันธุ์อู่ทอง 1 และอู่ทอง 2

วัสดุอื่นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการ เช่น สารเคมี เครื่องแก้ว และอื่น ๆ

ข. อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมอาหารการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เครื่องเขย่า ตู้ปลอดเชื้อ ห้องเพาะเลี้ยง และอื่น ๆ

ค. วิธีการ

ถั่วเหลือง

นำฝักอ่อนถั่วเหลือง 12 พันธุ์ ที่มีเมล็ดขนาดประมาณ 1 ใน 3 ของช่องว่างภายในฝัก มาล้างน้ำเอาเศษฝุ่นออก แล้วแช่ฝักในแอลกอฮอล์ 70% นานประมาณ 1 นาที ฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (ชื่อการค้า เช่น คลอรอกซ์ หรือไฮเตอร์) เข้มข้น 20% (ใช้สารละลาย 20 ส่วน ผสมน้ำ 80 ส่วน) ที่ใส่สารลดแรงตึงผิว Tween 20 จำนวน 2 หยดต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร กวนฝักตลอดเวลา 15 นาที จากนั้นนำฝักไปล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วภายในตู้ปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ใช้มีดผ่าตัดเบอร์ 11 ตัดตะเข็บฝัก เพื่อนำเมล็ดออกวางไว้ในจานแก้วที่สะอาด หลังจากเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออกและตัดส่วนที่เป็นยอดอ่อนออกทิ้ง จึงนำใบเลี้ยงอ่อน 2 ซีก ไปวางหงายบนอาหาร MX20 (คืออาหารสูตร Murashige and Skoog, 1962, ที่ดัดแปลง ดังตารางผนวกที่ 1) ใส่จานแก้วละ 20 ชิ้น ผนึกภาชนะเพาะเลี้ยงด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปวางให้ได้รับแสงสลัวในห้องเพาะเลี้ยงที่ตั้งอุณหภูมิประมาณ 26 $^{\circ}$ซ และเปิดไฟวันละ 14 ชั่วโมง (เป็นสภาพห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั่ว ๆ ไป ซึ่งใช้ร่วมกับพืชชนิดอื่น)

จำนวนชิ้นส่วนที่เลี้ยงของแต่ละพันธุ์ไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับปริมาณที่มี หลังจากวางเลี้ยงได้ประมาณ 4-6 สัปดาห์ ทำการตรวจนับจำนวนชิ้นส่วนที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ แล้วให้ระดับการเกิดเนื้อเยื่อของพันธุ์ต่าง ๆ

หลังจากได้โซมาติกเอ็มบริโอแล้ว ก็นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว โดยใช้พันธุ์ที่มีโซมาติกเอ็มบริโอที่มีลักษณะดี 5 พันธุ์เท่านั้น คือ KUSL 20004, Jack, Prolina, สจ. 5 และ เชียงใหม่ 60 เพื่อเพิ่มปริมาณให้มาก ก่อนจะนำมาคัดเลือกในอาหารเหลว FG (Finer and Nagasawa, 1987) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 5 อัตรา คือ 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยใส่เนื้อเยื่อในฟลาสก์ (Erlenmyer flask) ขนาด 50 มล. ที่มีอาหารเหลว 20 มล. จำนวนประมาณฟลาสก์ละ 0.25 กรัม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ subculture และชั่งน้ำหนักสดสังเกตการเจริญเติบโตของโซมาติกเอ็มบริโอทุก 7, 14 และ 21 วัน ตลอดระยะเวลาคัดเลือกในอาหารเหลวต้องวางภาชนะบนเครื่องเขย่าตลอดเวลา ด้วยความเร็วประมาณ 120 รอบต่อนาที ให้ได้รับแสงสลัว ในห้องเพาะเลี้ยงที่มีแสง 14 ชั่วโมง อุณหภูมิ 26 °ซ

ทำการเปลี่ยนอาหารเก่าทิ้งทุก 1 สัปดาห์ โดยใช้ไปเปตดูดออก แล้วเติมอาหารใหม่สูตรเดิมจำนวน 20 มล. ถ่ายอาหาร 2 ครั้ง รวมทำการคัดเลือก 3 รอบ หลังจากนั้นดูดอาหารทิ้ง ทำการตรวจดูจำนวนชิ้นส่วนที่รอดตายในแต่ละฟลาสก์ แล้วแยกให้แต่ละชิ้นเป็นแต่ละสายพันธุ์ แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารปกติที่ไม่มีเกลือในฟลาสก์ขนาดเล็ก เพื่อเพิ่มปริมาณ ก่อนนำไปชักนำให้เกิดเป็นต้น

ขั้นตอนการชักนำให้เกิดต้น โดยย้ายโซมาติกเอ็มบริโอจากอาหารเหลว FG ที่ปราศจากเกลือลงเลี้ยงบนอาหารแข็ง FRCG (คืออาหาร FG ที่ใส่น้ำตาล maltose แทน sucrose และ activated charcoal + Gelrite) เลี้ยงอยู่นานประมาณ 4-6 สัปดาห์ โซมาติกเอ็มบริโอจะมีขนาดใหญ่และยืดยาวขึ้น ย้ายโซมาติกเอ็มบริโอลงบนจานแก้วเปล่าที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อเร่งอายุของโซมาติกเอ็มบริโอ โดยวางจานแก้วลงในกล่องที่มีสารละลาย NaCl อิ่มตัวนาน 2-3 วัน เมื่อโซมาติกเอ็มบริโอเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวอมเหลืองเป็นสีขาวซีด แสดงว่าพร้อมที่จะนำไปชักนำให้เกิดรากบนอาหาร FRSG (เหมือนอาหาร FRCG แต่ใส่น้ำตาล sucrose แทน maltose) ย้ายต้นอ่อนถั่วเหลืองที่ได้มาเลี้ยงชักนำให้เกิดรากบน FRSG ในหลอดเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ เพื่อให้ระบบรากสมบูรณ์ เมื่อได้ต้นถั่วเหลืองที่มีทั้งยอดและรากสมบูรณ์แล้ว นำย้ายลงปลูกในดินอบฆ่าเชื้อ วางเลี้ยงอนุบาลไว้ในตู้เพาะเลี้ยง ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 75±5 เปอร์เซ็นต์ ได้รับแสงสว่างประมาณ 14 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 180 μE จนกระทั่งต้นถั่วแข็งแรงพอที่จะย้ายออกเลี้ยงในสภาพภายนอกได้

บันทึกผลการทดลองการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลือง 12 สายพันธุ์ เพื่อหาสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการให้โซมาติกเอ็มบริโอ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของแต่ละสายพันธุ์ จากสมการดังนี้

$$\text{อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ(\%)} = \frac{\text{จำนวนชิ้นที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ}}{\text{จำนวนชิ้นทั้งหมดที่เริ่มต้นเพาะเลี้ยง}} \times 100$$

ข้าว

นำเมล็ดข้าวเปลือกมาแกะเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออก แช่ด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 1 นาที แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายฟอกฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรต์เข้มข้น 20% ที่ใส่ Tween 20 จำนวน 2 หยด ต่อสารละลาย 100 มล. กวนบนเครื่องกวนตลอดเวลา 30 นาที แล้วฟอกต่อด้วยสารฟอกเข้มข้น 10% นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ ซับเมล็ดด้วยกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้เมล็ดแห้ง ก่อนนำวางเลี้ยงบนอาหาร MS สูตรดัดแปลง (ตารางผนวกที่ 2) ในจานแก้ว จานละ 25 เมล็ด ผนึกจานแก้วด้วยพาราฟิล์ม นำไปวางเลี้ยงให้ได้รับแสง 14 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 $^{\circ}$ซ

วางแผนการทดลองแบบ split-split plot ใน randomized complete block (RCB) มี 5 ซ้ำ โดยใช้พันธุ์ข้าวเป็น main plot สภาพการเพาะเลี้ยง(มีและไม่มีแสง) เป็น subplot และอาหาร 6 สูตรเป็น sub subplot บันทึกการเกิดแคลลัสของข้าวที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ วิเคราะห์ผลโดยใช้ IRRISTAT Version 3/93 เปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ทำการแยกแคลลัสที่เกิดขึ้นออกจากยอดอ่อนและเมล็ด เพื่อเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตร MS ที่ใส่ 2, 4-D 2 มก. NAA 1 มก. CH 0.1 มก. โปรลีน 1 ก. และน้ำตาล 20 ก./ลิตร หลังจากเริ่มเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์ จนแคลลัสใหญ่ ก็แบ่งเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเพื่อให้ได้ปริมาณมากขึ้น ก่อนนำไปเลี้ยงคัดเลือกบนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ระดับ 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยวางแผนการทดลองแบบ split plot ใน RCB มี 5 ซ้ำ ให้พันธุ์ข้าว 5 พันธุ์ เป็น main plot และระดับเกลือ 5 อัตรา เป็น subplot บันทึกจำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตหลังจากคัดเลือก วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับที่กล่าวแล้ว

เปลี่ยนอาหารคัดเลือกทุก 2 สัปดาห์ จำนวน 3 ครั้ง รวมคัดเลือก 4 รอบ แต่ละครั้งที่เปลี่ยนอาหาร ก็เลือกย้ายเฉพาะที่มีสีเหลืองสด และมีการเจริญเติบโต สำหรับแคลลัสที่ทำการคัดเลือกบนอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่ำ ซึ่งเจริญได้ดีในระยะแรก ๆ ของการคัดเลือก ก็ทำการแบ่งย้ายเฉพาะบริเวณที่มีสีสดใสเพียงบางส่วน ส่วนพวกที่อยู่บนอาหารที่มีเกลือมาก แคลลัสจะตายไปส่วนมาก จึงแบ่งย้ายเฉพาะที่เจริญและมีสีเหลืองสดและถือว่าเป็นสายพันธุ์

หลังจากคัดเลือกครบรอบตามที่กำหนด ก็ย้ายลงเลี้ยงบนอาหารปกติที่ไม่มีเกลือ เพื่อเพิ่มปริมาณให้พอที่จะใช้เนื้อเยื่อบางส่วนไปวิเคราะห์หาปริมาณธาตุโซเดียม โปแตสเซียมและคลอรีน ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้ในพืชบางชนิดว่ามีความทนเค็ม (Chaudhary et al., 1996; Garcia-Agustin and Primo-

Millo,1995) แคลลัสส่วนที่เหลือก็นำไปชักนำให้เกิดเป็นต้นพืช เพื่อปลูกทดสอบความทนเค็มในสารละลาย และ/หรือให้ได้เมล็ดเพื่อจะนำไปปลูกทดสอบความทนเค็มต่อไป

การชักนำแคลลัสให้เกิดต้น ทำโดยแบ่งแคลลัสเป็นชิ้นเล็ก แล้วนำไปทำให้แห้งในจานแก้วเปล่า นาน 24 ชั่วโมงในตู้ปลอดเชื้อ หลังจากนั้นก็ย้ายลงเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่ใส่ BA 1 มก. และ IAA 0.01 มก./ลิตร ในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อเกิดต้นแล้วก็ย้ายลงเลี้ยงในอาหาร MS ครึ่งสูตร แต่ไม่มีฮอร์โมน ก่อนย้ายออกปลูกในกระถาง

ปลูกต้นข้าวในกระถางพลาสติกสีดำขนาดบรรจุ 20 ลิตร ใส่ดินเหนียวกระถางละเท่า ๆ กัน ปลูกกระถางละ 1 ต้น ดูแลให้น้ำ ใส่ปุ๋ย เมื่อต้นข้าวแตกกอและโตอายุประมาณ 2 เดือน บังคับให้ออกดอกด้วยการคลุมต้นด้วยถุงพลาสติกสีดำจนออกดอกและติดเมล็ด เก็บเมล็ดไว้ปลูกทดสอบต่อไป

อ้อย

นำหน่ออ่อนที่มีความยาว 10 – 15 ซม. จากแปลงมาล้างด้วยน้ำ เพื่อล้างสิ่งสกปรกออก ก่อนลอกกาบใบออก จนกระทั่งมองเห็นตาบริเวณโคนหน่อ แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายไฮเตอร์ 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่มี Tween 20 จำนวน 2 หยด ต่อสารละลาย 100 มล. เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นฟอกอีกด้วยสารละลายเข้มข้น 10% นาน 20 นาที ล้างชิ้นส่วนด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง แล้วลอกกาบใบอ่อนออกอีก 2-3 ชั้น ก่อนตัดกาบใบอ่อนบริเวณใกล้ยอดตามขวางให้มีขนาดกว้าง 2-3 มิลลิเมตร ใช้ปากคีบนำไปวางไว้บนอาหาร MS (ตารางผนวกที่ 3) ให้ด้านตัดแตะอาหารใส่จานละ 9 ชิ้น แต่ละสูตรมี 3 ซ้ำ ผนึกจานแก้วด้วยพาราฟิล์ม นำไปวางไว้ในที่มืดในห้องเพาะเลี้ยงอุณหภูมิประมาณ 26 $^{\circ}$ซ และตรวจผลในเวลา 3 และ 6 สัปดาห์

เปลี่ยนอาหารทุก 3 สัปดาห์ โดยย้ายชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัสไปวางบนอาหารจานใหม่ ทำการแบ่งย้ายแคลลัสเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.25 ซม. เพื่อเพิ่มขยายปริมาณสำหรับใช้เลี้ยงคัดเลือกบนอาหารสูตร 1 (ตารางผนวกที่ 3) แต่ใส่เกลือระดับ 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เปลี่ยนอาหารทุก 3 สัปดาห์ ทำการคัดเลือก 4 รอบ ในที่สุดเพิ่มปริมาณแคลลัสที่ทนเค็มที่คัดได้จากแต่ละความเข้มข้น เพื่อนำไปชักนำให้เกิดเป็นต้นสำหรับใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

บทที่ ๓

ผลการดำเนินการ

ถั่วเหลือง

1. การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

จากผลการทดลองเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อน (immature cotyledons) ของถั่วเหลืองพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า พันธุ์ Jack และพันธุ์ Prolina เกิดโซมาติกเอ็มบริโอดีที่สุด คือ 87.1 และ 85.7 % ตามลำดับ และเริ่มเกิดภายใน 28 วันหลังเพาะเลี้ยง รองลงมาคือสายพันธุ์ KUSL 20004 สามารถเกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ 48.8% และเกิดในเวลา 36 วัน (ตารางที่ 1) มีข้อสังเกตคือ การเกิดจะเกิดบนแคลลัสอีกทีหนึ่ง ไม่ใช่เกิดบนแผ่นใบเลี้ยงโดยตรงเหมือน 2 พันธุ์แรก มีสีเขียวอ่อน (รูปที่ 1) พันธุ์ที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอรองลงมาอีกคือ AGS 292 สจ 5 เชียงใหม่ 60 ดอยคำ นครสวรรค์ 1 และ สจ 4 เท่ากับ 28.8, 28.0, 21.4, 21.1, 18.7 และ 18.7 ตามลำดับ การเกิดมีทั้งเกิดบนแผ่นใบเลี้ยงโดยตรง และเกิดบนแคลลัส สีของโซมาติกเอ็มบริโอเป็นสีเหลืองอ่อน พันธุ์ส่วนใหญ่ใช้เวลานานถึง 41 วัน ยกเว้น พันธุ์ สจ 5 และเชียงใหม่ 60 ซึ่งเกิดได้เร็วเท่ากับสายพันธุ์ KUSL 20004 คือ 36 วัน ส่วนถั่วเหลืองพันธุ์ไทยอีก 3 พันธุ์ คือ สุโขทัย 2 ราชมงคล และ สจ 2 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอน้อยเพียง 12.5, 10.7 และ 1.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมักเกิดบนแผ่นใบเลี้ยงโดยตรง การทดลองนี้ได้ผลคล้ายคลึงกับรายงานที่ว่า พันธุ์มีความแตกต่างกันในการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (Parrot et al., 1989; Komutsuda and Ko, 1990) ซึ่งเป็นลักษณะทางพันธุกรรม

พันธุ์ที่ใช้เวลาในการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 36 วัน ได้แก่ สจ 5 และเชียงใหม่ 60 ส่วนพันธุ์ดอยคำ นครสวรรค์ 1 สจ 4 สุโขทัย 2 ราชมงคล และ สจ 2 ใช้เวลาในการชักนำ 41 วัน ลักษณะการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของพันธุ์ AGS 292 ราชมงคล สุโขทัย 2 และ สจ 2 พบว่าเกิดบนเนื้อใบเลี้ยง โดยใบเลี้ยงจะค่อยๆนูนขึ้นมาเช่นเดียวกับในพันธุ์ Prolina และ Jack ส่วนพันธุ์นครสวรรค์ 1 ดอยคำ เชียงใหม่ 60 และ สจ 4 เกิดโซมาติกเอ็มบริโอทั้งบนเนื้อใบเลี้ยงโดยตรงและบนแคลลัส พันธุ์ สจ 5 และ KUSL 20004 มีการเกิดบนแคลลัสเท่านั้น จากการสังเกตพบว่าทั้ง 2 พันธุ์นี้ เนื้อเยื่อจะมีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสก่อนจึงจะเกิดโซมาติกเอ็มบริโอบนแคลลัส ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1 ก

อนึ่ง เนื่องจากถั่วเหลืองพันธุ์ KUSL 20004, Jack และ Prolina เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ดี จึงได้นำมาคัดเลือกในอาหารที่มีเกลือ

2. การคัดเลือก

เนื่องจากจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอของพันธุ์ต่าง ๆ มีไม่เท่ากัน ดังนั้น จึงนำเฉพาะพันธุ์ที่มีปริมาณมากมาทำการคัดเลือกก่อน หลังจากครบรอบคัดเลือกและเพิ่มปริมาณ เพื่อจะชักนำให้เกิดต้นและจะนำส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์ตัวอย่าง แต่ไม่สามารถทำได้ เพราะมีปัญหาเกิดการปนเปื้อน การตายของเนื้อเยื่ออันเกิดจากไฟฟ้าดับ จึงทำให้ต้องดำเนินการคัดเลือกใหม่

ผลการคัดเลือกเนื้อเยื่อในอาหารมีเกลือระดับต่างๆ พบว่า การเจริญเติบโตต่างกันตามพันธุ์ (ตารางที่ 2) พันธุ์ Prolina มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าพันธุ์ KUSL 20004 และ Jack จนถึงมีเกลือระดับ 1 % แต่ที่ระดับเกลือสูงกว่านี้ ทั้ง 3 พันธุ์ มีการเจริญใกล้เคียงกัน ส่วนพันธุ์ สจ 5 และเชียงใหม่ 60 ได้รับผลกระทบอย่างมาก แม้มีเกลือระดับต่ำเพียง 0.5 %

3. การชักนำให้เกิดต้น

ได้นำโซมาติกเอ็มบริโอที่เหลือรอดจากการคัดเลือก มาชักนำให้เกิดต้น ปรากฏว่าไม่สามารถเกิดต้นได้ ยกเว้น มีโซมาติกเอ็มบริโอจำนวนหนึ่งที่ได้จากพันธุ์ KUSL 20004 ที่ได้จากการคัดเลือกที่ระดับความเค็ม 0.5 % หลังจากผ่านขั้นตอนการชักนำให้เกิดต้น ปรากฏว่า ได้ต้นอ่อนจำนวนน้อยมากคือ 5 ต้น ซึ่งอาจเป็นเพราะเนื้อเยื่อมีการผิดปกติ อันเกิดจากการถูกคัดเลือกในสภาพเค็มเป็นเวลานาน จึงทำให้เกิดต้นได้น้อย ต้นที่ได้ก็มีอาการผิดปกติ ไม่ค่อยพัฒนา มีเพียง 1 ต้น ที่เกิดใบปกติ แต่หลังจากนำออกปลูก (ตารางที่ 3 และรูปที่ 1) ในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต ก็ไม่เจริญต่อเท่าที่ควร ในที่สุดก็ตายไป โซมาติกเอ็มบริโอของพันธุ์อื่นซึ่งเหลือรอดจากการคัดเลือกที่ระดับความเค็มอื่น ๆ ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้เลย

ตารางที่ 1 ศักยภาพการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลือง 12 พันธุ์

พันธุ์	จำนวนชิ้นที่เพาะเลี้ยง	จำนวนชิ้นที่เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ	% การเกิด	จำนวนวันเริ่มเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ	ลักษณะของการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ
ราชมงคล	56	6	10.7	41	บนแผ่นใบ
สุโขทัย 2	80	10	12.5	41	บนแผ่นใบ
สจ 4	80	15	18.7	41	บนแคลลัสและแผ่นใบ
KUSL 20004	126	59	48.8	36	บนแคลลัส
สจ 2	60	1	1.6	41	บนแผ่นใบ
นครสวรรค์ 1	80	15	18.7	41	บนแคลลัสและแผ่นใบ
AGS 292	59	17	28.8	41	บนแผ่นใบ
ดอยคำ	52	11	21.1	41	บนแคลลัสและแผ่นใบ
สจ 5	50	14	28.0	36	บนแคลลัส
เชียงใหม่ 60	70	15	21.4	36	บนแคลลัสและแผ่นใบ
Prolina	70	60	85.7	28	บนแผ่นใบ
Jack	70	61	87.1	28	บนแผ่นใบ

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดโซมาติกเอ็มบริโอถั่วเหลือง 5 พันธุ์ ซึ่งเลี้ยงคัดเลือกในอาหารที่เติม NaCl ระดับต่าง ๆ

NaCl % / พันธุ์	น้ำหนักสดโซมาติกเอ็มบริโอ (กรัม)[1]				
	Prolina	KUSL 20004	Jack	SJ 5	CM 60
0.00	26.3839 a	38.6722 a	36.1303 a	31.3706 a	27.4376 a
0.50	19.8318 b	5.8645 b	4.2664 b	1.3881 b	0.6065 b
1.00	5.7788 c	2.5975 b	2.4391 b	1.0111 b	0.3771 b
1.50	2.2886 c	4.1966 b	2.6056 b	0.7624 b	0.4059 b
2.00	2.6423 c	2.4268 b	3.1239 b	0.3526 b	0.4429 b

[1] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่รอดชีวิตของถั่วเหลือง 5 พันธุ์ที่ความเข้มข้นเกลือระดับต่างๆและจำนวนที่สามารถชักนำให้เป็นต้นได้

พันธุ์	ความเข้มข้นเกลือ (เปอร์เซ็นต์)									
	0		0.5		1.0		1.5		2.0	
	จำนวนชิ้น	จำนวนต้น	จำนวนชิ้น	จำนวนต้น	จำนวนชิ้น	จำนวนต้น	จำนวนชิ้น	จำนวนต้น	จำนวนชิ้น	จำนวนต้น
Prolina	10	1	13	-	4	-	2	-	2	-
KUSL20004	15	3	11	1	4	-	7	-	1	-
Jack	12	1	6	-	3	-	5	-	7	-
SJ5	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CM60	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ข้าว

1. การเกิดแคลลัส

หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 4-5 วัน เริ่มเกิดแคลลัส ได้ทำการตรวจนับผลนับจากเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ ซึ่งปรากฏผลดังตารางที่ 4 ข้าวทั้ง 5 พันธุ์สามารถสร้างแคลลัสได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีแสง พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เกิดแคลลัสมากที่สุด (58 %) รองลงมาคือ เหลืองประทิว 123 (55 %) และ กข 27 (53 %) และน้ำสะกุย 19 (30 %) พันธุ์หอมคลองหลวงเกิดแคลลัสน้อยที่สุด (13 %) ส่วนพันธุ์หอมสุพรรณบุรี ไม่เกิดแคลลัสเลย ซึ่งไม่ทราบสาเหตุ อาจเป็นพันธุ์ที่ไม่ตอบสนองต่ออาหารทุกสูตรที่ใช้ หรือเมล็ดอาจจะเก่า จึงไม่เกิดแคลลัส สาเหตุนี้ได้สังเกตพบกับพันธุ์อื่น ที่เคยใช้เมล็ดเก่าซึ่งเกิดแคลลัสไม่ค่อยดี แต่ไม่ได้ลองใช้เมล็ดใหม่ เพราะต้องรออีกหนึ่งปีจึงจะมีเมล็ด

จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 4) พบปฏิกิริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและสูตรอาหาร ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่า พันธุ์ข้าวเกิดแคลลัสต่างกันเมื่อใช้อาหารต่างกัน (ตารางที่ 4) ข้าวส่วนใหญ่เกิดแคลลัสได้ดีเมื่อเลี้ยงในสภาพมีแสง บางพันธุ์เมื่อเลี้ยงในที่มืดเกิดแคลลัสได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงให้ได้แสง (ตารางที่ 6) อย่างไรก็ตาม อิทธิพลของแสงต่อขนาดของแคลลัสไม่ค่อยชัดเจนนัก เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยที่ได้ (ไม่แสดงผล)

2. การคัดเลือก

หลังจากเลี้ยงแคลลัสคัดเลือกบนอาหารที่มีเกลือระดับต่าง ๆ และวัดการเจริญเติบโตของแคลลัสทุก 15 วัน พบว่าแคลลัสข้าว 2 พันธุ์ คือขาวดอกมะลิ 105 และน้ำสะกุย 19 ที่เลี้ยงบนอาหารมีเกลือ

ระดับสูงๆ จะตายไปเป็นส่วนมาก พันธุ์เหลืองประทิว 123 และ กข 27 ไม่มีแคลลัสเหลือรอดเลย แม้ในอาหารมีเกลือระดับต่ำ (0.5 %) ซึ่งแสดงว่า 2 พันธุ์นี้ไม่สามารถปรับตัวให้ทนเกลือได้แม้ในระดับต่ำ ตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105 สามารถทนเค็มได้ที่ระดับ 1 ถึง 2 % ใกล้เคียงกัน ส่วนพันธุ์น้ำสะกุย 19 ทนเค็มได้ค่อนข้างดีถึงระดับ 1.5 % แต่เมื่อมีเกลือ 2 % จำนวนแคลลัสที่เหลือรอดลดน้อยลงมาก ข้าวทั้ง 2 พันธุ์นี้มีความทนเค็มไม่เท่ากัน พันธุ์น้ำสะกุย 19 ค่อนข้างทนเค็มได้ดีกว่าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทำการเลี้ยงบนอาหารมีเกลือนาน 45-60 วัน (ตารางที่ 8)

3. การชักนำให้เกิดต้น

จากการศึกษานี้พบว่าอัตราการเกิดต้นต่ำมาก จากเนื้อเยื่อที่เหลือจากการคัดเลือกได้ต้นข้าวจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 15 ต้น และน้ำสะกุย 19 จำนวน 2 ต้น (ไม่แสดงผล) ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากผลของเกลือ ที่ทำให้เนื้อเยื่อเปลี่ยนไป ซึ่งมีลักษณะฟู ก้อนแคลลัสเกาะกันอย่างหลวมๆ (friable) แทนที่จะแข็งเหมือนก่อนการคัดเลือก ซึ่งหลายงานทดลองก็พบปัญหาอัตราการเกิดต้นพืชลดน้อยลงเมื่อเพาะเลี้ยงนานๆ (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และคณะ, 2537; สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล และคณะ, 2537)

ต้นข้าวที่ปลูกในกระถางออกดอกและติดเมล็ด ขณะที่รายงานผลนี้ ได้เก็บเมล็ดเพื่อนำไปปลูกทดสอบความทนเค็มต่อไป ดังนั้น จึงยังไม่สามารถบอกได้ว่าต้นเหล่านี้ทนเค็ม อย่างไรก็ตาม ได้นำตัวอย่างใบข้าวของพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ไปวิเคราะห์หาปริมาณธาตุโซเดียม โปแตสเซียม แคลเซียม และคลอไรด์ เพื่อดูความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ กับพันธุ์เดิม ซึ่งพบว่า ต้นข้าวหลายต้นมีการสะสมธาตุโซเดียมมากกว่าโปแตสเซียม (ตารางที่ 9) และหลายต้นสะสมธาตุโปแตสเซียมมาก ซึ่งจะเห็นได้จากค่าวิเคราะห์ใบข้าวต้นที่ 1 เมื่อปลูกในสารละลายที่มีเกลือ จะสะสมธาตุโซเดียมน้อยลง (มีอัตราส่วนระหว่างโซเดียม/โปแตสเซียม 0.88 คือข้าวต้นที่ S ในตารางที่ 9) อันอาจเป็นกลไกในการต้านทานความเค็มของพืช คือพืชดูดธาตุโซเดียมน้อย ซึ่งมีการรายงานไว้โดย Gregorio and Senadhira (1993) และ Yeo and Flowers (1986) อย่างไรก็ตาม จะต้องทดสอบความทนเค็มด้วยการปลูกข้าวเหล่านี้ในสารละลายเกลือต่อไป

ตารางที่ 4. จำนวนก้อนแคลลัสทั้งหมดและเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส(ตัวเลขในวงเล็บ) ที่ชักนำในอาหารสูตรต่าง ๆ ในสภาพที่มีและไม่มีแสง

พันธุ์ข้าว	สภาพแสง	จำนวนเมล็ดเริ่มต้น	สูตรอาหาร						ค่าเฉลี่ยของพันธุ์(%)
			2D	1D1N	1D1K	2.5D	0.5D	MCH	
KDML	มืด	250	148 (59.2)	177 (70.8)	187 (74.8)	137 (54.8)	100 (40.0)	107 (42.8)	57.07
	สว่าง	250	182 (72.8)	185 (74.0)	174 (69.6)	141 (56.4)	111 (44.4)	102 (40.8)	59.67
LPT	มืด	250	145 (58.0)	167 (66.8)	143 (57.2)	130 (52.0)	93 (37.2)	69 (27.6)	49.80
	สว่าง	250	172 (68.8)	200 (80.0)	167 (66.8)	166 (66.4)	87 (34.8)	100 (40.0)	59.47
RD	มืด	250	125 (50.0)	174 (69.6)	133 (53.2)	130 (52.0)	75 (30.0)	73 (29.2)	47.33
	สว่าง	250	149 (59.6)	199 (79.6)	189 (75.6)	167 (66.8)	86 (34.4)	81 (32.4)	58.07
NSK	มืด	250	57 (22.8)	53 (21.2)	83 (33.2)	59 (23.6)	92 (36.8)	93 (37.2)	29.13
	สว่าง	250	86 (34.4)	69 (27.6)	61 (24.4)	61 (24.4)	106 (42.4)	97 (38.8)	32.00
HKL	มืด	250	44 (17.6)	34 (13.6)	32 (12.8)	22 (8.8)	74 (29.6)	27 (10.8)	15.53
	สว่าง	250	20 (8.0)	19 (7.6)	21 (8.4)	18 (7.2)	43 (17.2)	27 (10.8)	9.87

สูตรอาหาร 2D = MS + 2,4-D 2 mg/l + casein hydrolysate 0.3 g/l + sucrose 3%

1D1N = MS + 2,4-D 1 mg/l + NAA 1 mg/l + kinetin 0.1 mg/l + sucrose 3%

1D1K = MS + 2,4-D 1 mg/l + NAA 1 mg/l + kinetin 1 mg/l + sucrose 3%

2.5D = MS + 2,4-D 2.5 mg/l + sucrose 3%

0.5D = MS + 2,4-D 0.5 mg/l + NAA 2.5 mg/l + kinetin 0.5 mg/l + sucrose 3%

MCH = MS + 2,4-D 2 mg/l + myo-inositol 0.9 g/l + casein hydrolysate 0.03 g/l + maltose 3%

พันธุ์ข้าว KDML = ขาวดอกมะลิ 105

LPT = เหลืองประทิว 123

RD = กข 27

NSK = น้ำสะกุย 19

HKL = หอมคลองหลวง 1

ตารางที่ 5. ปฏิกิริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและสูตรอาหารต่อปริมาณการเกิดแคลลัสข้าว(เปอร์เซ็นต์)

สูตรอาหาร	พันธุ์ข้าว[2]				
	KDML	LPT	RD	NSK	HKL
2D	66.00 a [1/]	63.40 b	54.80 c	28.60 b	12.80 b
1D1N	72.40 a	73.40 a	74.60 a	24.40 b	10.60 b
1D1K	72.20 a	62.00 b	64.40 b	28.80 b	10.60 b
2.5D	55.60 b	59.20 b	59.40 bc	24.00 b	8.00 b
0.5D	42.20 c	36.00 c	32.20 d	39.60 a	23.40 a
MCH	41.80 c	33.80 c	30.80 d	38.00 a	10.80 b
เฉลี่ย	58.37	54.63	52.70	30.57	12.70

[1/] เปอร์เซ็นต์แคลลัสเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ที่ชักนำจากเมล็ดข้าวเริ่มต้น 500 เมล็ด

[2] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)

ตารางที่ 6. ปฏิกิริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและสภาพแสงที่มีต่อปริมาณการเกิดแคลลัสข้าว(ชิ้น) (ตัวเลขในวงเล็บเป็นเปอร์เซ็นต์)

พันธุ์ข้าว	สภาพแสง[2]		เฉลี่ย
	มืด	สว่าง	
KDML	171.20 a [1/] (57.07)	179.00 a (59.67)	175.10 (58.37)
LPT	149.40 b (49.80)	178.40 a (59.47)	163.90 (54.63)
RD	142.00 b (47.33)	174.20 a (58.07)	158.10 (52.70)
NSK	87.40 c (29.13)	96.00 b (32.00)	91.70 (30.57)
HKL	46.60 d (15.53)	29.60 c (9.87)	38.10 (12.70)
เฉลี่ย	119.32 (39.77)	131.44 (43.81)	125.38 (41.79)

[1/] ค่าเฉลี่ยจำนวนแคลลัสจาก 4 ซ้ำ ที่ชักนำจากเมล็ดข้าวเริ่มต้น 1,500 เมล็ด

[2] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 7. ปฏิกิริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและความเข้มข้นเกลือ (%) ที่มีต่อจำนวนแคลลัสข้าว (ชิ้น) บนอาหารคัดเลือก (ค่าในวงเล็บเป็นเปอร์เซ็นต์)

ความเข้มข้นเกลือ (%)	พันธุ์ข้าว [2]		เฉลี่ย
	KDML	NSK	
0.0	96.50a[1/] (48.25)	103.50a (51.75)	100.00a (50.0)
0.5	95.00a (47.50)	96.75ab (48.38)	95.88a (47.9)
1.0	73.50b (36.75)	91.75ab (45.88)	82.63b (41.3)
1.5	68.75b (34.38)	82.75b (41.38)	75.75bc (37.9)
2.0	73.00b (36.50)	60.50c (30.25)	66.75c (33.4)
เฉลี่ย	81.35	87.05	84.20

[1/] จำนวนแคลลัสที่เหลือรอดการคัดเลือก เฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ จากจำนวนเริ่มต้น 800 ชิ้น

[2] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 8. ปฏิกิริยาระหว่างพันธุ์ข้าวและจำนวนวันที่ใช้คัดเลือกที่มีผลต่อจำนวนแคลลัสข้าว (ชิ้น)บนอาหารคัดเลือก (ค่าในวงเล็บเป็นเปอร์เซ็นต์)

จำนวนวัน	พันธุ์ข้าว [2]		เฉลี่ย
	KDML	NSK	
15	135.25a[1/](54.10)	136.00a (54.40)	135.63a (54.2)
30	114.50b (45.80)	122.50b (49.00)	118.50b (47.4)
45	88.00c (35.20)	95.75c (38.30)	91.88c (41.5)
60	69.75d (27.90)	81.00d (32.40)	75.38d (33.6)
เฉลี่ย	101.88	108.81	105.34

[1/] จำนวนแคลลัสที่เหลือจากการคัดเลือกเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ จากแคลลัสเริ่มต้น 1,000 ชิ้น

[2] ค่าเฉลี่ในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 9 ปริมาณโซเดียม โปแตสเซียม แคลเซียม และคลอไรด์ (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง) ในใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ต้นที่	โซเดียม	โปแตสเซียม	แคลเซียม	คลอไรด์	โซเดียม/โปแตสเซียม
1	3.05	2.40	0.347	0.123	1.27
2	1.29	2.73	0.124	0.148	0.47
3	2.13	2.77	0.132	0.133	0.77
4	2.04	2.67	0.124	0.140	0.76
5	3.76	2.49	0.184	0.112	1.51
6	3.15	1.95	0.026	0.111	1.61
7	3.28	2.68	0.065	0.107	1.22
8	4.29	2.32	0.054	0.147	1.85
9	1.25	2.01	0.090	0.133	0.62
10	4.30	2.10	0.372	0.112	2.05
11	1.21	2.45	0.363	0.107	0.49
12	3.27	1.78	0.019	0.133	1.84
13	1.34	2.57	0.061	0.149	0.52
14	3.55	2.34	0.060	0.154	1.52
15	1.89	2.22	0.102	0.158	0.85
16	0.71	1.55	0.021	0.088	0.46
17	2.53	1.94	0.116	0.089	1.30
N	2.65	2.04	0.027	0.112	1.30
C	0.57	1.45	0.078	0.073	0.39
S	1.68	1.89	0.323	0.140	0.88

หมายเหตุ ต้นที่ 1-15 เป็นต้นจากแคลลัสทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์

ต้นที่ 16-17 เป็นต้นจากแคลลัสทนเค็ม 0.5 เปอร์เซ็นต์

ต้น N เป็นต้นที่เพาะจากเมล็ด

ต้น C เป็นต้นจากแคลลัสไม่ทนเค็ม

ต้น S เป็นต้นจากแคลลัสทนเค็ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ต้นที่ 1 ที่ปลูกในสารละลายเกลือ

อ้อย

1. การเกิดแคลลัส

ผลการทดลองใช้อ้อยพันธุ์อู่ทอง 1 เลี้ยงบนอาหาร 3 สูตรพบว่า สูตรที่ 1 (อาหาร MS ที่ใส่ casein hydrolysate 500 มก. และน้ำมะพร้าว 100 มล.ต่อลิตร) ชักนำให้ใบอ่อนของอ้อยเกิดแคลลัสได้เร็วภายใน 5-7 วัน ส่วนอีก 2 สูตร จะเกิดในเวลา 10-14 วัน โดยแคลลัสจะเกิดบนผิวใบและรอยตัด มีสีขาวหรือเหลืองอ่อน แม้ว่าการเกิดแคลลัสจะมากกว่า (ตารางที่ 10) แต่หลังจากแบ่งย้ายเลี้ยงในอาหารจานใหม่ สูตร 1 ทำให้แคลลัสเจริญได้ดีกว่าสูตรอื่น ดังนั้นจึงเลือกใช้สูตร 1 สำหรับการคัดเลือกเพื่อให้ได้สายพันธุ์ทนเค็ม โดยการใส่เกลือโซเดียมคลอไรด์ อย่างไรก็ตาม พันธุ์อ้อยที่ต่างกันก็ให้แคลลัสแตกต่างกัน ดังตารางที่ 11 ซึ่งพบว่า อ้อยพันธุ์ Philippine 28560 เกิดแคลลัสดีที่สุดด้วยอาหารสูตร 1 เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อู่ทอง 1 และอู่ทอง 2

ตารางที่ 10 ผลของอาหารต่อการเกิดแคลลัสอ้อยพันธุ์อู่ทอง 1

สูตรอาหาร	% การเกิดแคลลัส			เฉลี่ย
	ซ้ำ 1	2	3	
1	88.7	90.7	86.4	89.3
2	100.0	91.7	100.0	97.2
3	88.9	88.9	100.0	92.6

ตารางที่ 11 อัตราการเกิดแคลลัสของอ้อย 3 พันธุ์ ด้วยอาหารสูตร 1

พันธุ์อ้อย	% การเกิดแคลลัส			เฉลี่ย
	ซ้ำ 1	2	3	
อู่ทอง 1	88.7	90.7	86.4	88.6
อู่ทอง 2	90.5	90.2	87.2	89.5
Phil. 28560	100.0	100.0	92.9	97.6

2. การคัดเลือก

ได้นำแคลลัสของอ้อยพันธุ์อู่ทอง 1 มาคัดเลือกบนอาหารที่มีเกลือระดับต่าง ๆ พบว่า แคลลัสเริ่มเปลี่ยนสีในเวลา 10- 14 วัน อาหารที่มีเกลือมากทำให้แคลลัสกลายเป็นสีน้ำตาลเร็วกว่าอาหารที่มีเกลือน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่มีเกลือเลย แคลลัสเจริญเป็นปกติ การเจริญเติบโตของแคลลัสสัมพันธ์กับอัตราความเค็ม ขนาดและสีของแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่มีเกลือมากมีขนาดเล็ก และมีสีเหลืองหรือสีน้ำตาล เมื่อย้ายแคลลัสที่รอดตายลงเลี้ยงต่อไปอีกบนอาหารชนิดเดิมเป็นเวลานาน 4 เดือน

พบว่า มีแคลลัสที่เจริญได้แม้กระทั่งมีความเค็มถึง 2% (ตารางที่ 12) ซึ่งเห็นได้ว่า ที่ระดับความเค็ม 1 และ 1.5% แคลลัสที่เลี้ยง 3 และ 4 เดือน สามารถรอดชีวิตได้ 100% แสดงว่า แคลลัสเหล่านี้ อาจเกิดมาจากเซลล์ที่ทนต่อความเค็มจริง เพราะสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีเกลือ ซึ่งจะเห็นได้จากการเปรียบเทียบกับการเจริญของแคลลัสที่ไม่ผ่านการคัดเลือกมาก่อน เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารมีเกลือ ก็ชะงักการเจริญเติบโต (ดังรูปที่ 3 ค) ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงคัดเลือกด้วยเกลือระดับ 2% ก็ยังมีพวกที่เจริญเติบโตได้ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า การเจริญเติบโตและลักษณะของแคลลัสไม่ค่อยดี และมีสีคล้ำ

3. การชักนำให้เกิดต้น

เนื่องจากว่าแคลลัสที่ได้จากแต่ละระดับของเกลือมีปริมาณน้อย ประกอบกับอายุของแคลลัสมากขึ้น เกรงว่าจะยากแก่การชักนำให้เกิดต้น จึงไม่เพิ่มปริมาณมากพอที่จะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุโซเดียม โปแตสเซียม และคลอรีน ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้อย่างหนึ่งของความทนเค็มในพืช แต่นำเนื้อเยื่อมาชักนำให้เกิดต้นด้วยอาหาร MS ที่ไม่มีเกลือ และพบว่า เนื้อเยื่อที่ไม่ได้ผ่านการคัดเลือกเท่านั้นที่สามารถเกิดต้นอ่อนบนอาหาร MS ที่ใส่ NAA และ kinetin อย่างละ 1 มก./ลิตร ส่วนพวกที่ผ่านการคัดเลือกไม่สามารถเกิดต้นเลย ซึ่งอาจเป็นเพราะว่า เนื้อเยื่อเปลี่ยนสภาพ เพราะได้รับผลจากเกลือ แม้แต่เนื้อเยื่อปกติของอ้อยในการศึกษานี้ ก็เกิดต้นเพียง 35% เท่านั้น (ไม่ได้แสดงผล) ขณะนี้ได้นำต้นที่ได้จำนวนทั้งหมด 42 ต้นไปปลูกในแปลงในเดือนธันวาคม 2543 เพื่อศึกษาต่อไป (ดังรูปที่ 4)

ตารางที่ 12 ผลของ NaCl ต่อความมีชีวิตรอดของอ้อยพันธุ์อู่ทอง 1

ระยะเวลาที่เลี้ยง เดือน	ความเข้มข้นของ NaCl (%)	จำนวนแคลลัสที่เลี้ยง	จำนวนแคลลัสที่รอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต
1	0	207	192	92.75
	0.5	252	236	93.65
	1.0	279	247	88.53
	1.5	297	177	59.59
	2.0	143	114	46.91
2	0	300	298	99.33
	0.5	228	219	96.05
	1.0	171	171	100.00
	1.5	261	216	82.76
	2.0	108	33	30.55
3	0	352	352	100.00
	0.5	*	*	*
	1.0	320	320	100.00
	1.5	320	320	100.00
	2.0	64	24	37.5
4	0	96	96	100.00
	0.5	*	*	*
	1.0	80	80	100.00
	1.5	80	80	100.00
	2.0	36	32	88.89

* ในเดือนที่ 3 แคลลัสเกิดการปนเปื้อนเชื้อรา จึงไม่มีผลในเดือนที่ 3 และ 4

บทที่ ๔
บทสรุป

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. ถั่วเหลือง

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้ทนต่อสภาพแวดล้อม เช่น ทนเค็ม จากการวิจัยพอสรุปได้ว่า มีโอกาสได้สายพันธุ์ที่ทนความเค็มได้ระดับหนึ่งคือ ระดับความเค็มจากการคัดเลือก 0.5 เปอร์เซ็นต์ ถ้าหากต้นที่ได้ไม่ตาย ก็จะได้เมล็ดสำหรับปลูกทดสอบในสารละลายที่มีเกลือ ซึ่งจะทราบว่าทนเค็มจริงหรือไม่

ข้อเสนอแนะในเรื่องนี้คือ ควรทำการคัดเลือกจำนวนมากกว่านี้ เพราะโอกาสจะได้สายพันธุ์กลายก็จะมีมากขึ้นด้วย จากการศึกษาเบื้องต้นนี้ได้ชี้ว่า ควรมีการศึกษาหาพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีความสามารถให้โซมาติกเอ็มบริโอจำนวนมาก ๆ และมีคุณลักษณะที่ดี เพื่อจะได้มีปริมาณมากสำหรับงานคัดเลือก และมีโอกาสที่จะชักนำให้เกิดต้นได้มากด้วย ซึ่งเป็นจุดประสงค์สุดท้ายของการคัดเลือกพันธุ์ คือได้ต้นพืชหลังจากการคัดเลือกได้เนื้อเยื่อทนเค็ม

อุปสรรคสำคัญอย่างหนึ่งของการวิจัยคือ ความพร้อมของอุปกรณ์และห้องปฏิบัติการ ถ้าหากมีปัญหาก็มีผลถึงงานวิจัย ทำให้ความก้าวหน้าและความสำเร็จไม่เป็นไปตามที่คาดไว้ ดังที่เกิดกับโครงการวิจัยนี้คือ การเกิดขัดข้องของกระแสไฟฟ้าเป็นเวลานาน และเกิดบ่อย จนทำให้ต้องเริ่มการทดลองใหม่ เป็นต้น

2. ข้าว

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ทนเค็มได้ใช้วิธีเดียวกับที่ใช้กับถั่วเหลือง ถึงแม้ว่าจนถึงขณะที่รายงานนี้ ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่า ได้สายพันธุ์ข้าวทนเค็ม แต่ก็ได้ต้นข้าวที่ได้จากสายพันธุ์แคลลัสที่รอดจากการคัดเลือกบนอาหารที่มีเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ ได้ต้นข้าว 17 ต้น ซึ่งได้ปลูกจนเก็บเกี่ยวเมล็ด เพื่อนำไปปลูกทดสอบต่อไป

ขณะที่ทำรายงานนี้ ได้นำเมล็ดข้าวที่ได้จากทุกต้น ปลูกในกระถางที่รดด้วยสารละลายเกลือ เพื่อทดสอบความทนเค็ม และจะวิเคราะห์เนื้อเยื่อใบ หาปริมาณธาตุโซเดียม โปแตสเซียมและคลอรีน ซึ่งอาจจะเป็นดัชนีบ่งชี้ถึงความทนเค็มด้วย

3. อ้อย

การคัดเลือกแคลลัสอ้อย สามารถได้สายพันธุ์แคลลัสที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีเกลือสูงถึง 2 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้เลย อาจจะเป็นเพราะว่าใช้ประชากรน้อย ทำให้โอกาสการเกิดต้นพืชต่ำ อย่างไรก็ตาม การกลายพันธุ์ในอ้อยจากการเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อมีอัตราค่อนข้างสูง บางพันธุ์สูงถึง 34 เปอร์เซ็นต์ (Liu and Chen, 1976; Burner and Grisham, 1995) ในการทดลองนี้ ได้สายพันธุ์กลาย 1 สายพันธุ์ จากเนื้อเยื่อปกติ ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากอีก 41 สายพันธุ์ ที่เกิดจากแคลลัส ขณะนี้กำลังขยายท่อนพันธุ์ให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับปลูกศึกษาต่อไป เช่น ข้อมูลทางด้านการแตกกอ ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความหวาน และลักษณะอื่น ๆ

ข้อเสนอแนะในการวิจัยอ้อยโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ น่าจะมีโอกาสได้สายพันธุ์กลายให้มีลักษณะบางอย่างได้ตามต้องการ เพราะมีความปรวนแปรในธรรมชาติของพืชเองค่อนข้างสูง การคัดเลือกให้ทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ น่าจะเป็นไปได้ ถ้าหากอุปกรณ์ในการวิจัยค่อนข้างสมบูรณ์

บรรณานุกรม

ชาญวิทย์ ม่วงมิตร. 2537. การชักนำให้เกิดพันธุ์อ้อยทนเค็มโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 69 หน้า

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เผดิม ระติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, สุรินทร์ ปียะโชคณากุล, เลิศลักษณ์ เงินศิริ, เบ็ญจมาศ ศิลาย้อย, พรรณณี รอดแรงบุญ, กาญจนา กล้าแข็ง และรังสิต เสิงหพันธุ์. (2537). การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในข้าวโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตอนที่ 1. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 28:381-389.

สุรินทร์ ปียะโชคณากุล, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เผดิม ระติสุนทร, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, เลิศลักษณ์ เงินศิริ, เบ็ญจมาศ ศิลาย้อย, และพรรณณี รอดแรงบุญ. (2537). การเพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในสภาพปลอดเชื้อ. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 28:92-98.

สมศรี อรุณินท์. 2539. ดินเค็ม. กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. น.19-29.

Barwale, U.B. and Widholm, J.M. (1987). Somaclonal variation in plants regenerated from cultures of soybean. **Plant Cell Reports** 6:365-368.

Burner, D.M. and Grisham, M.P. (1995). Induction and stability of phenotypic variation in sugarcane as affected by propagation procedure. **Crop Sci.**35:875-880.

Chaudhary, M.T., Wainwright, S.J., and Merrett, M.J. (1996). Comparative NaCl tolerance of lucerne plants regenerated from salt-selected suspension culture. **Plant Sci.**114:221-232.

Finer, J.J. and Nagasawa, A. (1988). Development of an embryogenic suspension culture of soybean *(Glycine max* (L.) Merrill*)*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 15:125-136.

Gamborg, O.L. (1970). The effect of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. **Plant Physiol.** 45:372-375.

Garcia-Agustin, P. and Primo-Millo, E. (1995). Selection of a NaCl-tolerance *Citrus* plant. **Plant Cell Reports.** 14:314-318.

Gregorio, G.B. and Senadhira, D. (1993). Genetic analysis of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet**. 86:333-318.

Gulati, A. and Jaiwal, P.K. (1993). *In vitro* selection and characterization of trans-4-hydroxy L-proline resistant callus lines of *Vigna radiata* :Tolerance to NaCl. **Plant Physiol. Biochem.** 31:699-705.

Komatsuda, T., and Ko, S.W. (1990). Screening of soybean *(Glycine max* (L.) Merrill*)* genotypes

for somatic embryo production from immature embryo. **Jap. J. Breed.** 40:429-452.

Liu, M-C and Chen, W-H. (1976). Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding.I. Creation of genetic variation through callus culture. **Euphytica** 25:393-403.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15:473-497.

Parrott, W.A., Williams, E.G., Hildebrand, D.F., and Collins, G.B. (1989). Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 16:15-21.

Vajrabhaya, M.T., Thanapaisal, T., and Vajrabhaya, T. (1989). Development of salt tolerant lines of KDML and LPT rice cultivars through tissue culture. **Plant Cell Reports.** 8:411-414.

Yeo, A.R. and Flowers, T.J. (1986). Salinity resistance in rice (*Oryza sativa* L.) and a pyramiding approach to breeding varieties for saline soils. **Aust. J. Plant Physiol.** 13:161-173.

Zhang, G-Y, Guo,Y., Chen, S-L, and Chen, S-Y. (1995). RFLP tagging of salt tolerance gene in rice. **Plant Sci.** 110:227-234.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงถั่วเหลือง (ปริมาณเป็นกรัมหรือมิลลิลิตรต่อลิตร)

	MX20	FG	FRG	FRSG
Sucrose	30	60	-	30
Maltose	-	-	60	-
Glutamine	-	2.192	-	-
MSI (Stock)	100	100	100	100
MSII (Stock)	10	10	10	10
SBIII (Stock)	-	10	10	10
MB^{+} (Stock)	10	-	-	-
NaFeEDTA (Stock)	1	1	1	1
2, 4-D (Stock)	200	50	-	-
Agar (Gelrite)	2	-	2	2
pH	7	5.7	5.7	5.7

ตารางผนวกที่ 2 สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่ใช้เพาะเลี้ยงข้าว

สูตร	องค์ประกอบต่อลิตร
1	MS + 2,4-D 2 มก.+ CH (casein hydrolysate) 300 มก.
2	MS + 2, 4-D 1 มก. + NAA 1 มก. + kinetin 0.1 มก.
3	สูตร 1 + activated charcoal 0.5 ก.
4	สูตร 1 + PVP (polyvinylpyrolidone) 5 ก.
5	สูตร 1 + ascorbic acid 150 มก. + citric acid 150 มก.
6	MS + 2, 4-D 2 มก. + NAA 1 มก. + CH 100 มก. + proline 1 ก.
7	N+ + 2, 4-D 2 มก. + CH 300 มก. + yeast extract 300 มก.
8	MS + 2, 4-D 0.5 มก. + NAA 1 มก. + BAP 0.5 มก. + น้ำมะพร้าว 5%
9	MS + 2, 4-D 0.5 มก. + NAA 1 มก. + BAP 1 มก. + น้ำมะพร้าว 5%

หมายเหตุ อาหารแข็งใช้วุ้น Gelrite 2 กรัมต่อลิตร

ตารางผนวกที่ 3 สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่ใช้เพาะเลี้ยงอ้อย

สูตร	องค์ประกอบต่อลิตร
1	MS + 2,4-D 3 มก. CH 500 มก. + น้ำมะพร้าว 10% + น้ำตาล 20 ก. + Bacto agar 8
2	เหมือนสูตร 1 แต่ไม่มี CH
3	เหมือนสูตร 1 แต่มีน้ำมะพร้าวเพียง 5%

หมายเหตุ CH = casein hydrolysate

ตารางผนวกที่ 4 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของจำนวนและขนาดแคลลัสข้าวอายุ 2 และ 4 สัปดาห์ ที่ชักนำในอาหารสูตรต่าง ๆ ในสภาพที่มีและไม่มีแสง

Source of variation	df	Mean Squares		
		จำนวนแคลลัส	ขนาดแคลลัส อายุ 2 สัปดาห์	ขนาดแคลลัส อายุ 4 สัปดาห์
พันธุ์ข้าว (V)	4	5741.09**	1.28**	1.52**
Error a	16	18.31	0.00	0.00
สภาพแสง (L)	1	306.03**	0.10**	0.08**
V x L	4	163.25**	0.00<1	0.01^{ns}
Error b	20	36.35	0.00	0.00
สูตรอาหาร (M)	5	743.92**	0.06**	0.09**
V x M	20	340.91**	0.01**	0.01**
L x M	5	22.05^{ns}	0.01^{ns}	0.01^{ns}
V x L x M	20	25.66^{ns}	0.01*	0.00<1
Error c	200	20.73	0.00	0.00
CV (%) a		20.5	8.0	5.5
CV (%) b		28.8	11.1	9.3
CV (%) c		21.8	11.4	8.2

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01% * = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05% ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

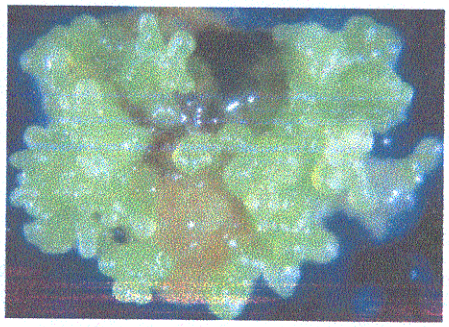
ตารางผนวกที่ 5 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของจำนวนแคลลัสข้าวที่คัดเลือกบนอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือ 5 ระดับ และวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 30 45 และ 60 วัน

Source of variation	df	Mean square
จำนวนซ้ำ (R)	3	70.77^{-}
พันธุ์ข้าว (V)	1	77.01^{-}
Error a	3	30.42
ระยะเวลาคัดเลือก (D)	3	1157.11**
V x D	3	7.82^{ns}
Error b	18	5.20
ความเข้มข้นเกลือ (C)	4	386.60**
V x C	4	72.66**
D x C	12	25.39*
V x D x C	12	8.63<1
Error c	96	11.23
CV (%) b		10.8
CV (%) c		15.9

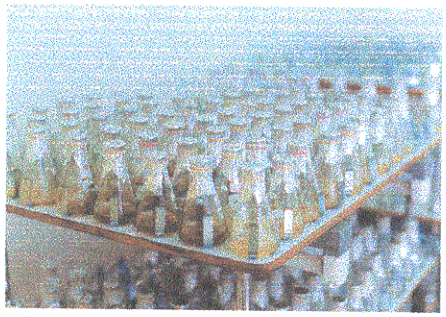
** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01% * = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05%

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ - = insufficient error df

การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอบนแคลลัส ของสายพันธุ์ KUSL 20004



การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอบนแผ่นใบ ของพันธุ์ Jack



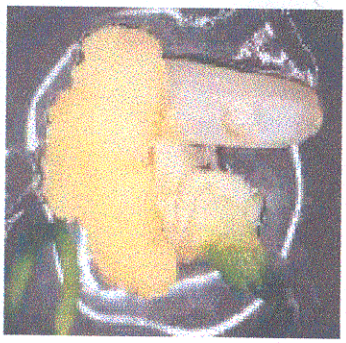
คัดเลือกในอาหารมีเกลือบนเครื่องเขย่า

ชักนำโซมาติกเอ็มบริโอทนเค็มให้เกิดต้น

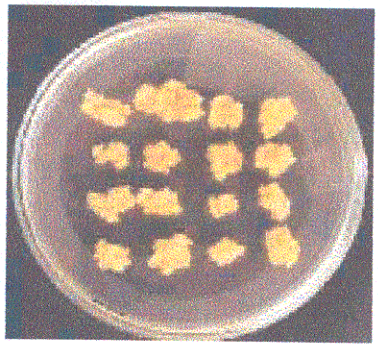
โซมาติกเอ็มบริโอพัฒนาเป็นต้นอ่อน

ได้ต้นถั่วเหลืองสมบูรณ์

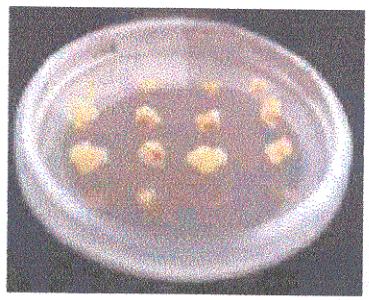
รูปที่ 1 ภาพแสดงขั้นตอนการคัดเลือกถั่วเหลืองทนเค็ม



ชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดแคลลัส

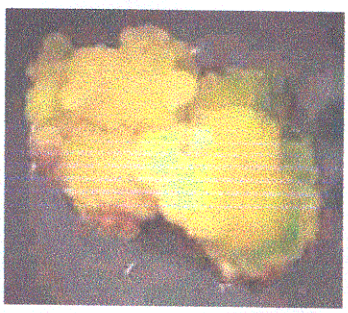


ขยายปริมาณเพื่อใช้คัดเลือก



คัดเลือกบนอาหารมีเกลือ

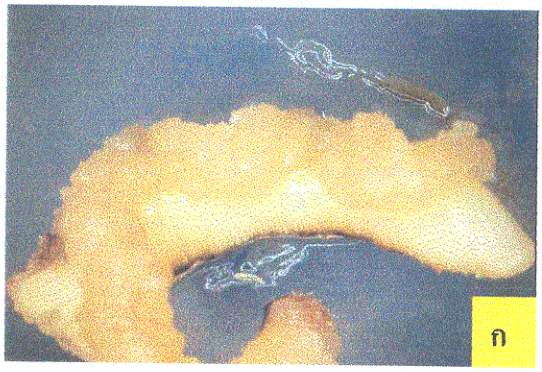
เซลล์ที่ทนเค็มสามารถเจริญเติบโต



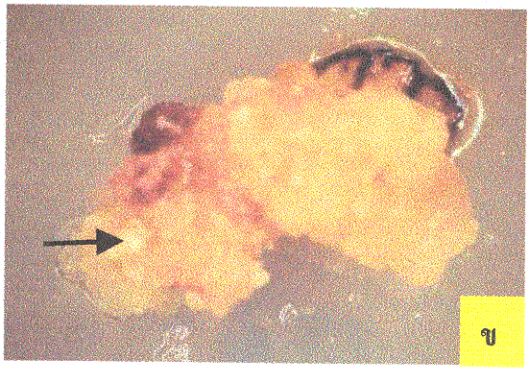
ชักนำแคลลัสให้เกิดยอด

ต้นข้าวที่เกิดจากแคลลัสทนเค็ม

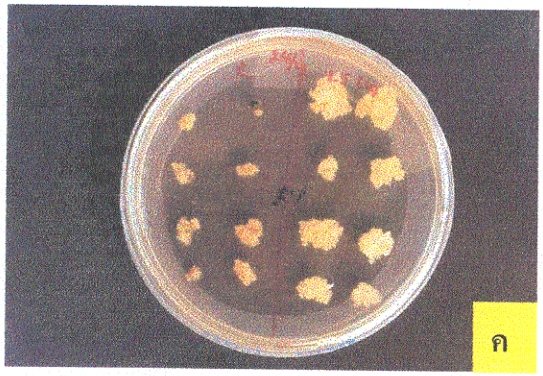
ภาพที่ 2 ภาพแสดงขั้นตอนการคัดเลือกข้าวทนเค็ม



ชักนำใบอ่อนอ้อยให้เกิดแคลลัส



แคลลัสทนเค็ม (จุดเหลืองศรชี้) และไม่ทนเค็ม (สีน้ำตาลและดำ) บนอาหารคัดเลือกที่มีเกลือ

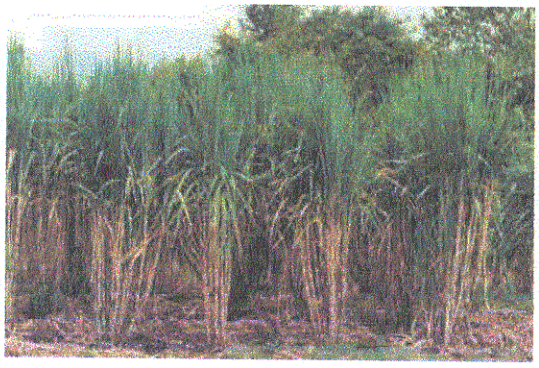


แคลลัสปกติ (ซ้าย) และแคลลัสทนเค็ม (ขวา) บนอาหารมีเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์

ชักนำให้เกิดต้นอ่อน

ต้นอ่อน (จากแคลลัสปกติ)

รูปที่ 3 ภาพแสดงขั้นตอนการคัดเลือกอ้อยทนเค็ม



อ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวน ๔๒ สายพันธุ์

สองแถวซ้ายเป็นสายพันธุ์กลาย มีลักษณะแตกต่างจากพันธุ์อู่ทอง ๑ (๒ แถวขวา)

รูปที่ 4 ความปรวนแปรที่เกิดจาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย ทำให้เกิดสายพันธุ์กลาย ดังภาพนี้ที่แสดงความแตกต่างจากพันธุ์เดิม อู่ทอง ๑

สายพันธุ์กลาย อู่ทอง ๑

ภาพถ่ายใกล้ของภาพบน

ประวัติบุคคล

ชื่อ นายอารีย์ วรัญญูวัฒก์ (AREE WARANYUWAT)

สถานที่เกิด จังหวัดนครราชสีมา

ที่อยู่ (ทำงาน) ศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
111 ถนน มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทร. (044)22-4204 , 22-4272 แฟกซ์ (044)22-4150
Email : aree@ccs.sut.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ปริญญา	อักษรย่อ	วิชาเอก	สถาบัน	ประเทศ
2508	ตรี	กส.บ.	พืชไร่	ม.เกษตรศาสตร์	ไทย
2513	โท	M.S.	Agronomy	Univ. of Kentucky	USA
2519	เอก	Ph.D	Plant Breeding	Univ. of Illinois	USA

สาขาวิชาการที่ชำนาญพิเศษ

มีความชำนาญทางด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีนเข้าพืช สอนและวิจัยทางการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพ

งานวิจัย

1. "การปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนต่อสภาพแวดล้อม" ทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (3 ปี 2541-2543) หัวหน้าโครงการ
2. "การวิจัยเพื่อพัฒนาการผลิตกล้วยไม้เชิงการค้า" ทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (3 ปี 2542 – 2544) หัวหน้าโครงการ
3. "การถ่ายยีนและการแสดงออกของยีนโคเลสเตอรอลออกซิเดสในถั่วเขียว" ทุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก) 3 ปี 2541-42 หัวหน้าโครงการ
4. "การถ่ายยีนโคเลสเตอรอลออกซิเดสเพื่อการต้านทานด้วงเจาะเมล็ด" ทุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก) 3 ปี 2542-44 หัวหน้าโครงการ

5. "ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Vigna* ของประเทศไทย" ทุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก) 5 ปี 2543-47 หัวหน้าโครงการ

ผลงานตีพิมพ์

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. โรงพิมพ์อักษรสรรค์ กรุงเทพฯ 133 หน้า

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2544. ถั่วเหลือง ถั่วลิสง และละหุ่ง. โรงพิมพ์โชติวงศ์ กรุงเทพฯ 177 หน้า

Chanyuth, S. and A. Waranyuwat. 2001. A medium for mass production of African violet. Suranaree J. Sci. Technol. 8:149-153. (in Thai)

Cooper, R.L. and A. Waranyuwat. 1985. Effect of three genes on plant height, lodging, and seed yield in indeterminate and determinate lines of soybeans. Crop Sci. 25:90-92.

Lozovaya, V., T. Corshkova, E. Yoblokova, O. Zabotina, M. Ageeva, N. Ramyantzeva, E. Kolesnichenko, A. Waranyuwat, and J.M. Widholm. 1996. Callus cell wall phenolics and plant regeneration ability. J. Plant Physiol. 148:711-717.

Lozovaya, V., A. Waranyuwat, and J.M. Widholm. 1998. β-1,3-glucanase and resistance to *Aspergillus flavus* infection in maize. Crop Sci. 38:1255-1260.

Suraninpong,P., S. Chanyuth, and A. Waranyuwat. 2000. Sugarcane improvement for salt tolerance. Suranaree J. Sci. Technol. 7:217-223 (in Thai)