การคัดเลือกถั่วเหลืองเพื่อให้ทนเค็มโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นางสาวสุภาวรัตน์ ชาญยุทธ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-533-184-8

IN VITRO SELECTION FOR SALT TOLERANCE IN SOYBEAN (*Glycine max* (L.) Merrill)

Miss Supavarat Chanyuth

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Crop Production Technology
Suranaree University of Technology
Academic Year 2002

ISBN 974-533-184-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การคัดเลือกถั่วเหลืองเพื่อให้ทนเค็มโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สภามหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....
(อาจารย์ ดร. โสภณ วงศ์แก้ว)
ประธานกรรมการ

....
(ศาสตราจารย์ ดร. อารีย์ วรัญญูวัฒก์)
อาจารย์ที่ปรึกษา

....
(ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล เหล่าสุวรรณ)
กรรมการ

....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ทวิช จิตรสมบูรณ์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

....
(รองศาสตราจารย์ ดร. กนก ผลารักษ์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

สุภาวรัตน์ ชาญยุทธ : การคัดเลือกถั่วเหลืองเพื่อให้ทนเค็มโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (*IN VITRO* SELECTION FOR SALT TOLERANCE IN SOYBEAN (*Glycine max* (L.)Merrill)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ศ. ดร.อารีย์ วรัญญูวัฒก์, 44 หน้า. ISBN 974-533-184-8

ทำการเพาะเลี้ยงใบอ่อนถั่วเหลือง 12 พันธุ์ บนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D อัตรา 20 มิลลิกรัมต่อลิตร วิตามิน B5 ของ Gamborg เพื่อศึกษาความสามารถในการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่าถั่วเหลือง 5 พันธุ์ที่ให้ปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอสูงเรียงตามลำดับคือ Jack, Prolina, KUSL 20004, สจ 5, และเชียงใหม่ 60 มีอัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเป็น 87.1, 85.7, 48.8, 28.0 และ21.4 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาในการชักนำ 28, 28, 36, 36 และ36 วันตามลำดับ นำโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลืองทั้ง 5 พันธุ์ เลี้ยงคัดเลือกในอาหารเหลวที่มีเกลือ NaCl 5 ระดับความเข้มข้นคือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมื่อมีเกลือ NaCl 0.5 ถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ Prolina เจริญเติบโตได้ดีที่สุด อาหารที่มีเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ KUSL 20004 เจริญเติบโตได้ดีที่สุด และเมื่อมีเกลือ 2.0 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ Jack เจริญเติบโตได้ดีที่สุด จากนั้นนำโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการคัดเลือกทนเค็มแล้วมาชักนำให้เกิดต้น ได้ต้นจำนวน 1 ต้นจากเนื้อเยื่อโซมาติกเอ็มบริโอพันธุ์ KUSL 20004 จากการคัดเลือกบนอาหารที่มีเกลือ 0.5 เปอร์เซ็นต์แต่พบว่ามีลักษณะผิดปกติและระบบรากไม่ค่อยพัฒนา ส่วนโซมาติกเอ็มบริโออีก 11 ชิ้นมีการพัฒนาเฉพาะระบบราก พันธุ์อื่นที่โซมาติกเอ็มบริโอสามารถทนเค็มได้ถึง 2.0 เปอร์เซ็นต์แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ ส่วนพันธุ์ สจ 5 และเชียงใหม่ 60 ไม่สามารถทนเค็มได้เลยในทุกระดับ อย่างไรก็ตามการทดลองนี้มีแนวโน้มว่าจะได้ต้นถั่วเหลืองทนเค็มแต่ไม่สามารถยืนยันผลได้เนื่องจากต้นที่ได้ตายไปก่อน

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา …………………..
ปีการศึกษา 2545	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม………………..
ลายมือชื่อนักศึกษา………………………..	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม………………..

SUPAVARAT CHANYUTH : *IN VITRO* SELECTION FOR SALT TOLERANCE IN SOYBEAN (*Glycine max* (L.)Merrill).THESIS ADVISOR : AREE WARANYUWAT , Ph.D. 44 PP. ISBN 974-533-184-8

Immature cotyledons of 12 soybean cultivars were cultured on somatic embryo induction medium containing MS salts supplemented with 20 mg/l 2,4-D and B5 vitamins. It was found that five cultivars were responsive to somatic embryo induction. Jack and Prolina gave the highest 87.1 and 85.7 percent of embryos, in 28 days, While KUSL 20004, SJ 5 and CM 60 gave 48.8, 28.0 and 21.4 percent, respectively, in 36 days. The somatic embryos were selected for salt tolerance in liquid culture that contained five concentrations of NaCl at 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 percent. In the 0.5-1.0 percent NaCl, somatic embryos of Prolina grew well, while KUSL 20004 and Jack grew better than others at 1.5 and 2.0 percent NaCl, respectively. SJ 5 and CM60 were sensitive to all NaCl concentrations. All selected somatic embryos were used for plant regeneration. Only one plantlet could be regenerated from 0.5 percent NaCl treatment. However, this plantlet was abnormal and had poor root system, while other 11 embryos developed only roots. At higher NaCl concentrations no plantlet could be regenerated. The obtained plantlet could not be verified for salt tolerance due to the premature death of this plantlet.

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
ปีการศึกษา 2545
ลายมือชื่อนักศึกษา.............................

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา........................
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..................
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษร่วม....................

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อารีย์ วรัญญูวัฒก์ อาจารย์ที่ปรึกษาซึ่งกรุณาให้ความเมตตา อบรมสั่งสอน ชี้แนะ ช่วยเหลือในการทำการศึกษาวิจัย ตลอดจนให้คำแนะนำในการเขียน และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล เหล่าสุวรรณ ดร. อัศจรรย์ สุขธำรง ดร. เรณู ขำเลิศ และคณาจารย์สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืชทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำในการเขียน การตรวจแก้ไขและเป็นกำลังใจให้ลูกศิษย์เสมอมา

ขอขอบคุณ คุณเอกวัฒน์ จันทรวงษ์ที่อำนวยความสะดวกในการทำการทดลองในห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช อาคารศูนย์เครื่องมือ 3 จนเสร็จสิ้นการทดลอง และขอขอบคุณพี่ ๆ ที่ห้อง EM ศูนย์เครื่องมือ 1 ทุกท่าน ที่ให้กำลังใจด้วยดีเสมอมา

ขอบคุณ เพื่อน พี่ น้องที่ร่วมเรียนปริญญาโทและปริญญาเอก และขอบคุณเป็นพิเศษสำหรับคุณบัณฑิต ทองพิมาย คุณพิจิกา ทิมสุกใส ที่ให้ความช่วยเหลือ อยู่เคียงข้าง และให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ คุณตา คุณยาย คุณแม่ คุณพ่อ และญาติพี่น้องทุก ๆ คนที่ให้การสนับสนุนและให้กำลังใจจนสำเร็จการศึกษา

สุภาวรัตน์ ชาญยุทธ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)……………………………………………………………………ง
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)……………………………………………………………...จ
กิตติกรรมประกาศ………………………………………………………………………ฉ
สารบัญ.…………………………………………………………………………………ช
สารบัญตาราง……………………………………………………………………………ฌ
สารบัญรูปภาพ….………………………………………………………………………ญ

บทที่

1 บทนำ………………………………………………………………………1
2 วรรณกรรมและงานที่เกี่ยวข้อง…………………………………………………3
1. ความหมายของดินเค็ม……………………………………………….……..…3
2. การเกิดดินเค็ม……………………………………………………………………3
3. ความสามารถในการทนเค็มของพืช……………………………………...……4
4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองเพื่อชักนำให้เกิดต้น……………………………....5
5. ผลของ genotype ที่มีต่อการชักนำให้เกิดต้นถั่วเหลือง……………………….…..7
6. การคัดเลือกพันธุ์พืชทนเค็ม……………………………….………………...8
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ……………………………………..…….………...11
1. วัสดุ อุปกรณ์……………………………………………………….……….…11
1. วิธีการทดลอง……………………………………………………….………..12
1.1 ขั้นตอนการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ……………..…………………12
1.2 ขั้นตอนการคัดเลือกเพื่อให้ทนเค็ม…………………….…………………..12
1.3 ขั้นตอนการชักนำให้เกิดต้น…………………………….……………………12
2. วิธีการบันทึกผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง…………………….…………….13
2.1 การบันทึกผลและให้คะแนน……………………..……….…..…………...13
2.2 การวิเคราะห์ผลการทดลอง……………………………….……………….14
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง…………………………………..……..……..…15
4.1 ผลการทดลองที่ 1ทดสอบศักยภาพการให้โซมาติกเอ็มบริโอ….…………15
4.2 ผลการทดลองที่ 2 การคัดเลือกโซมาติกเอ็มบริโอเพื่อให้ทนเค็ม…………17

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5 สรุปผลการทดลอง……………………………………………………………24

ภาคผนวก………………………………………………………………………………..25

รายการอ้างอิง……………………………………………………………………………40

ประวัติผู้เขียน……………………………………………………………………………44

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

แสดงผลการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอจากใบเลี้ยงอ่อนถั่วเหลือง และลักษณะการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลือง 12 พันธุ์……………………...16

2 แสดงผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์น้ำหนักสดโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลือง ทั้ง 5 พันธุ์…..……………………………………………………………..20

3 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด (กรัม) ของโซมาติกเอ็มบริโอถั่วเหลือง 5 สายพันธุ์ กับระยะเวลาการ sub culture และ เกลือ NaCl ความเข้มข้นต่างๆ…………………21

4 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของโซมาติกเอ็มบริโอถั่วเหลือง 5 พันธุ์ในอาหาร คัดเลือกกับระยะเวลาในการ sub culture……………………………………………22

5 แสดงค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดโซมาติกเอ็มบริโอถั่วเหลือง 5 พันธุ์กับ เกลือNaClความเข้มข้นระดับต่างๆ……………………………….………………22

6 แสดงจำนวนชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่รอดชีวิตจากการคัดเลือกทนเค็ม ของถั่วเหลือง 5 สายพันธุ์…………………………………………………..……23

ตารางผนวกที่

1 แสดงสูตรการเตรียม stock อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลือง…………………..……..38

2 แสดงสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลือง……………………………39

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ **หน้า**

1.1-1.9 การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลือง……………………..………..…26-28

2.1-2.10 การคัดเลือกทนเค็ม ……………………………………………………..29-33

2.11-2.20 การชักนำให้เกิดต้นถั่วเหลืองหลังจากการคัดเลือก…………………33-36

3 แสดงน้ำหนักสดเฉลี่ยโซมาติกเอ็มบริโอถั่วเหลือง 5 สายพันธุ์ กับความเข้มข้นเกลือ 5 ระดับ………………………………………..……37

บทที่ 1
บทนำ

ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง เนื่องจากให้น้ำมันและโปรตีนในปริมาณสูง ใช้เป็นวัตถุดิบสำคัญสำหรับอุตสาหกรรมต่าง ๆ หลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมน้ำมันพืช อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมแปรรูปจากถั่วเหลืองมากมาย เช่น น้ำนมถั่วเหลือง ซีอิ๊ว เต้าหู้ เต้าเจี้ยว และซอสปรุงรส เป็นต้น ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะมีการใช้เทคโนโลยีในการผลิตที่ทันสมัย ทำให้ผลผลิตเฉลี่ยโดยรวมเพิ่มขึ้นถึง 224 กิโลกรัมต่อไร่ แต่ก็ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการในประเทศ จากตัวเลขสถิติการนำเข้าปี 2540 – 2541 สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พบว่า ประเทศไทยนำเข้าถั่วเหลืองมีมูลค่าถึง 16,049 ล้านบาท (กรมวิชาการเกษตร, 2543) ถั่วเหลืองจึงเป็นพืชที่รัฐบาลให้ความสำคัญมาก แหล่งผลิตถั่วเหลืองที่สำคัญของประเทศอยู่ในภาคเหนือตอนล่างเป็นส่วนใหญ่และภาคตะวันออกเฉียงเหนือบางพื้นที่

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นภาคที่ครอบคลุมพื้นที่ 17 จังหวัดของประเทศ มีเนื้อที่รวมกันประมาณ 106 ล้านไร่หรือหนึ่งในสามของพื้นที่ทั้งประเทศ (321 ล้านไร่) ปัจจุบันภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ดินเค็ม 17.8 ล้านไร่และพื้นที่มีศักยภาพในการแพร่กระจายเกลืออีก 19.4 ล้านไร่ รวมพื้นที่มีปัญหาดินเค็มถึง 37.2 ล้านไร่หรือประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ทั้งหมดของภาค ซึ่งมีผลกระทบโดยตรงต่อสภาพเศรษฐกิจและสังคม ดินเค็มระดับเค็มน้อย 12.6 ล้านไร่แม้จะไม่สามารถสังเกตเห็นคราบเกลือบนผิวดิน แต่ก็ทำให้การเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชลดลง พื้นที่ดินเค็มปานกลาง 3.7 ล้านไร่สามารถสังเกตเห็นคราบเกลือขึ้นประปรายบนผิวดิน ทำให้ผลผลิตพืชลดลงกว่าครึ่งหนึ่ง ไม่คุ้มการลงทุนของเกษตรกร ดินเค็มจัด 1.5 ล้านไร่ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรได้ ประชากรจะอพยพไปทำมาหากินในพื้นที่อื่น ส่วนพื้นที่มีศักยภาพในการแพร่กระจายเกลือ 19.4 ล้านไร่ พบบริเวณเนินผิวดินซึ่งไม่มีปัญหาดินเค็ม แต่มีแหล่งเกลืออยู่ไม่ลึกจากชั้นดินบนพร้อมจะกลายเป็นดินเค็มได้ทุกเมื่อ ถ้าหากการจัดการพื้นที่ทำไม่ถูกวิธี (สมศรี อรุณินท์, 2532) อุปสรรคของการปลูกถั่วเหลืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่สำคัญประการหนึ่งคือ การปลูกถั่วเหลืองในสภาพดินเค็มส่งผลให้ถั่วเหลืองมีการเจริญเติบโตช้า เกิดอาการเหี่ยวแห้ง บนใบ ลำต้นเหี่ยวเฉา ผลผลิตลดต่ำลงหรือเก็บเกี่ยวผลผลิตไม่ได้เลย ทั้งนี้เพราะในสภาพพื้นที่ดินเค็ม จะมีทั้งความเป็นกรดและเป็นด่างสูง ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณธาตุอาหารในดิน มีรายงานว่าถั่วเหลืองที่ปลูกในดินเค็มชุดที่เป็นด่าง (calcareous soil) แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก (Chen and Barak, 1982 อ้างโดย ชาญวิทย์ ม่วงมิตร, 2537) ถั่วเหลืองจะมีอาการตอบสนองต่อดินเค็มไม่เท่ากัน และคุณสมบัติดังกล่าวเป็นลักษณะประจำของแต่ละพันธุ์ การปรับปรุงดินเพื่อลดความเค็มลงปฏิบัติได้ยากและต้องใช้

เงินทุนสูง เพราะดินชั้นล่างของภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีวัตถุต้นกำเนิดเกลืออยู่ในปริมาณมาก ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความสามารถทนทานต่อสภาพดินเค็มจึงเป็นวิธีการแก้ปัญหาที่ยั่งยืน ซึ่งจะช่วยให้เกษตรกรสามารถนำถั่วเหลืองทนเค็มไปปลูกในบริเวณที่เป็นดินเค็มได้

จุดประสงค์ของการวิจัยเรื่องนี้ คือการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการคัดเลือกเพื่อสร้างสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่สามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้ในดินที่เป็นดินเค็ม

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีศักยภาพสูงในการให้โซมาติกเอ็มบริโอปริมาณมากในระยะเวลาสั้น เพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองทนเค็ม หรือเพื่อการทดลองอื่น ๆ ต่อไป
2. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่สามารถทนเค็มได้ ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ความหมายของดินเค็ม

ดินเค็ม หมายถึง ดินที่มีเกลือซึ่งละลายน้ำได้ดีอยู่หลายชนิด เช่น แคลเซียม โซเดียมคลอไรด์ ซัลเฟตและไบคาร์บอเนต เป็นต้น ในปริมาณมากจนเป็นอันตรายต่อพืชปลูก โดยใช้มาตรฐานว่ามีเกลือมากพอที่จะทำให้ผลผลิตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (อ้างโดย ชาญวิทย์ ม่วงมิตร, 2537) และกำหนดปริมาณประจุบวกของเกลือโซเดียม (exchangeable Na) ที่เกาะรอบเม็ดดินเป็นหลัก คือถ้ามากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นดินเค็ม (saline soil) เมื่อเทียบกับ cation exchange capacity (CEC) จะพบว่าดินพวกนี้มี pH ค่อนข้างสูง คือประมาณ 7.1 - 8.5 (กรมพัฒนาที่ดิน, 2527 อ้างโดย ชาญวิทย์ ม่วงมิตร, 2537) วิธีการตรวจสอบความเค็มของดินที่เร็วที่สุดคือ การวัดค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity, EC) ของสารละลายที่สกัดจากดินที่อิ่มตัวในน้ำ (saturation extract) ถ้ามีค่าสูงกว่า 2 มิลลิโมห์ต่อเซ็นติเมตร (ยงยุทธ โอสถสภา, 2524) หรือมีค่าการนำไฟฟ้ามากกว่า 4 มิลลิโมห์ต่อเซ็นติเมตร (กรมพัฒนาที่ดิน, 2527 อ้างโดย ชาญวิทย์ ม่วงมิตร, 2537)ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จัดว่าเป็นดินเค็ม

2. การเกิดดินเค็ม

สาเหตุของการเกิดดินเค็มเกิดจาก 2 สาเหตุใหญ่ คือ

1. ธรรมชาติ ได้แก่ หินหรือแร่สลายตัวผุพัง และเปลี่ยนคุณสมบัติไปโดยกระบวนการทางเคมีและกายภาพ ทำให้มีเกลือขึ้นมาด้วย หรือบางพื้นที่เป็นที่ต่ำ เป็นเหตุให้น้ำไหลไปรวมกัน น้ำแหล่งนี้ส่วนมากจะมีเกลือละลายอยู่ด้วย เมื่อน้ำระเหยไปก็จะมีเกลือสะสมอยู่

2. มนุษย์ ได้แก่ การทำนาเกลือ การสร้างอ่างเก็บน้ำบนดินเค็ม หรือมีน้ำใต้ดินเค็ม จะทำให้อ่างเก็บน้ำและพื้นที่รอบ ๆ อ่างกลายเป็นดินเค็ม เนื่องจากยกระดับของน้ำใต้ดินที่เค็มขึ้นมาใกล้เคียงกับระดับน้ำในอ่าง หรือใกล้ผิวดิน การตัดไม้ทำลายป่า และการใช้น้ำชลประทานซึ่งน้ำชลประทานจากแหล่งต่างๆ ย่อมมีเกลือละลายอยู่เป็นจำนวนมากน้อยต่างกัน (อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์, 2534 อ้างโดย ชาญวิทย์ ม่วงมิตร, 2537) การจัดการพื้นที่ดินเค็มมีหลายมาตรการคือ

2.1 การป้องกันไม่ให้เกิดดินเค็มแพร่กระจายมากขึ้น ซึ่งอาจจะรวมทั้งวิธีการทางชีววิทยาโดยการปลูกพืชเพื่อใช้ลดระดับความเค็มของน้ำใต้ดิน

2.2 การปรับพื้นที่เพื่อลดระดับความเค็มลงจนปลูกพืชได้ วิธีการนี้ต้องลงทุนสูง รัฐบาลต้องช่วยสนับสนุนเรื่องเงินทุน แต่มาตรการหนึ่งที่นำมาใช้เพื่อทำให้พื้นที่ดินเค็มเกิดประโยชน์

สูงสุดคือ การปลูกพืชทนเค็ม (สมศรี อรุณินท์, 2531 อ้างโดย ชาญวิทย์ ม่วงมิตร, 2537) ซึ่งเป็นวิธีการที่ไม่ต้องจัดการมาก ลงทุนน้อย เกษตรกรสามารถนำไปปฏิบัติได้

3. ความสามารถในการทนเค็มของพืช

ความเค็มมีผลกระทบต่อกระบวนการเมตาโบลิซึมของพืชในหลายๆลักษณะ และยังมีผลให้พืชมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายวิภาคและลักษณะทางสัญฐานวิทยา อย่างไรก็ตามพืชชนิดต่างๆมีความสามารถในการทนเค็มแตกต่างกันไป แม้แต่พืชชนิดเดียวกันแต่ต่างพันธุ์กันรวมถึงในพันธุ์เดียวกันก็มีความทนเค็มแตกต่างกันไปตามระยะการเจริญเติบโต จากความสามารถทนเค็มของพืชจึงอาจแบ่งพืชเป็น 2 กลุ่ม (Flowers และคณะ, 1997 อ้างโดย ชาญวิทย์ ม่วงมิตร, 2537) ดังนี้

1. พืชทนเค็ม (halophyte) หมายถึง พืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในที่ที่มีเกลือในปริมาณสูง พืชเหล่านี้สามารถปรับตัวได้อย่างรวดเร็วตลอดช่วงการเจริญเติบโต

2. พืชไม่ทนเค็ม (glycophyte หรือ non - halophyte) หมายถึง พืชที่เจริญเติบโตได้ดีในแหล่งที่อยู่ที่ไม่มีเกลือ (non saline habitat) แต่สามารถปรับตัวได้บ้างในบางสภาพดินเค็ม

การที่พืชดำรงชีวิตอยู่จนครบวงจรในสภาพความเค็มได้นั้น (สมศรี อรุณินท์, 2531; สมศรี อรุณินท์, 2534 อ้างโดย ชาญวิทย์ ม่วงมิตร, 2537) เชื่อว่าพืชมีกลไกในการบรรเทาความเป็นพิษของเกลือในลักษณะต่างๆ เช่น กลไกการหลีกเลี่ยง (avoidance mechanism) โดยหลีกเลี่ยงการสะสมเกลือในไซโตพลาสซึมจนถึงระดับที่เป็นพิษ พืชจะมีต่อมเกลือ (salt gland) หรือ vesiculated hair เป็นแหล่งสะสมเกลือ หรือโดยการที่พืชเคลื่อนย้ายเกลือไปสะสมในแวคคิวโอล (Mozafar และ Gooding, 1970; Thompson, 1975 อ้างโดย ชาญวิทย์ ม่วงมิตร, 2537) กลไกการทนทาน (tolerance mechanism) ซึ่งเป็นไปได้ว่าพืชที่ทนเค็มสามารถป้องกัน หรือสร้างระบบเอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของเกลือสูง โดยการที่เอนไซม์บางชนิดยังคงมีกิจกรรมได้เป็นปกติ แม้จะได้รับอิทธิพลจากความเค็ม (Greenway และ Osmond, 1972; Flowers, 1972; Hall และ Flowers, 1973; Ahand และคณะ, 1979 อ้างโดย ชาญวิทย์ ม่วงมิตร, 2537) การดูดซึมและการเคลื่อนย้าย (absorption and translocation) โดยดูดเกลือเข้ามาสะสมในบริเวณราก หรือลำต้นเพื่อป้องกันไม่ให้เกลือไปสะสมที่ใบหรือยอด (Nassery และ Baker, 1794 อ้างโดย ชาญวิทย์ ม่งมิตร, 2537)

กลไกการอวบน้ำ (succulence) โดยการเพิ่มปริมาณน้ำภายในเซลล์ ทำให้ความเข้มข้นของเกลือภายในเซลล์ลดลง (Jennings, 1968; Greenway และ Osmond, 1972 อ้างโดย ชาญวิทย์ ม่วงมิตร, 2537) เพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำโดยการที่พืชลดความต้านทานของเซลล์ชั้น mesophyll ต่อคาร์บอนไดออกไซด์หรือเพิ่มความต้านทานของปากใบ อย่างไรก็ตามในพืชทนเค็มบางชนิด เช่น *Atriplex halimus* ไม่ปรากฏว่ามีการเพิ่มประสิทธิภาพการใช้น้ำในตัวเอง (Gale และ Poljakoff - Mayber, 1970 อ้างโดย ชาญวิทย์ ม่วงมิตร, 2537) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเซลล์ชนิดต่าง ๆ ภายในพืช เพื่อปรับตัวให้เหมาะสมกับแหล่งที่อยู่ที่มีเกลือ (ชาญวิทย์ ม่วงมิตร, 2537) โดยรากพืชสามารถ

ดูดเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำ ไปใช้ได้โดยไม่ดูด (exclude) ส่วนที่เป็นเกลือ หรือสร้างสารเคลือบใบ โดยสร้างใบให้หนาขึ้นเพื่อเก็บน้ำไว้ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2527 อ้างโดยชาญวิทย์ ม่งมิตร, 2537)

4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองเพื่อชักนำให้เกิดต้น

การพัฒนาของเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อเกิดเป็นต้นพืช มี 2 กระบวนการ คือ

1. ออร์แกนโนเจเนซิส (organogenesis) การพัฒนาเพื่อเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ มีการพัฒนาของต้นและรากที่เป็นอิสระจากกัน โดยเมื่อเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดยอดแล้ว ต้องนำยอดมาเลี้ยงในอาหารเพื่อชักนำให้เกิดรากอีกด้วย จึงจะได้ต้นที่สมบูรณ์

2. เอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) มีการพัฒนาคล้ายกับการพัฒนาของเอ็มบริโอที่เกิดจากการผสมระหว่างแกมมีทในขบวนการปฏิสนธิ (zygotic embryo) แต่การเกิดเอ็มบริโอนี้เกิดมาจากการพัฒนาของเซลล์ร่างกาย โดยส่วนที่เป็นต้นและรากมีการพัฒนาพร้อมกัน เกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ เรียกเอ็มบริโอที่เกิดจากเซลล์ร่างกายนี้ว่า somatic embryo หรือเอ็มบริออยด์ (embryoids)

Bawale และคณะ (1986) ชักนำแคลลัสของถั่วเหลืองพันธุ์ Williams 82 ที่ได้จากเอ็มบริโอที่ยังเจริญไม่เต็มที่ให้เกิดต้น พบว่าสามารถทำให้เกิดผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส หรือออร์แกนโนเจเนซิสได้ ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหาร ถ้าอาหารมีสาร NAA จะเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส และถ้าเติม thiamine HCl หรือ nicotinic acid จะช่วยให้เกิดเอ็มบริออยด์เพิ่มขึ้น ส่วนกระบวนการออร์แกนโนเจเนซิสเกิดขึ้นเมื่อเติม BAP กับ NAA และเพิ่มความเข้มข้นของธาตุอาหารรองเป็น 4 เท่า Christianson และคณะ (1983) เลี้ยง embryonic axis ของถั่วเหลืองพันธุ์ Michell ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ ในอาหารสูตร MS และมี 2,4-D เป็นสารชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ ได้กล่าวถึงลักษณะของเซลล์ที่มีประสิทธิภาพว่า เซลล์นั้นต้องเป็นพวก friable และมีลักษณะคล้ายเอ็มบริโอ นอกจากนี้ถ้าใช้ ammonium nitrate 20 mM เป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้เอ็มบริออยด์พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ ลักษณะนี้เป็นกระบวนการ embryogenesis ที่พัฒนาผ่านแคลลัส หรือ indirect embryogenesis Lippmann และ Lippmann (1984) เลี้ยงเนื้อเยื่อใบเลี้ยงถั่วเหลืองที่ยังเจริญไม่เต็มที่ในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ 2,4-D, MCPA, 2,4,5–T, NAA, IAA และ IBA พบว่าการเกิดแคลลัสมีความสัมพันธ์กับชนิดและความเข้มข้นของออกซินในอาหาร โดยที่ 2,4-D และ MCPA ชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ ส่วน 2,4,5-T, NAA และ IBA ชักนำให้เกิดเฉพาะแคลลัสเท่านั้น เมื่อเติมสารไซโตไคนินร่วมกับ 2,4-D หรือเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลจะเกิดการยับยั้งการสร้างเนื้อเยื่อเจริญและเอ็มบริออยด์

Li และคณะ (1985) นำฝักถั่วเหลืองพันธุ์ TGM 119 แช่ในไนโตรเจนเหลวนาน 20 นาที แล้วตัดเอาเอ็มบริโอที่ยังเจริญไม่เต็มที่เลี้ยงในอาหารเหลว จากนั้นนำเซลล์เดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงโดยวิธี hanging drop technique เป็นเวลา 1 เดือน เซลล์ที่เลี้ยงนี้จะอยู่ในสภาพ proembryoid ซึ่งเมื่อย้ายลงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมสารออกซิน 2,4-D, NAA, IAA และสารไซโตไคนิน BA จะสังเกตเห็นเซลล์รูปร่าง globular และรูปหัวใจในอาหารที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IAA 0.1

มิลลิกรัมต่อลิตร เอ็มบริออยด์ที่ได้สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ในอาหารเหลวโดยเลี้ยงในสภาพความเข้มแสงต่ำในเวลา 6 เดือน

Lazzeri และคณะ (1985) ได้ศึกษาและเสนอขั้นตอนการชักนำให้เกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง ในอาหาร MS ที่มีวิตามินตามสูตร B5 น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์และวุ้น 0.65 เปอร์เซ็นต์ pH 5.9 เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือ NAA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสัปดาห์แรกจะเกิดรอยบวมของเนื้อเยื่อเจริญบนผิวของใบเลี้ยง และพัฒนาเป็นเอ็มบริออยด์ใน 2 ถึง 3 สัปดาห์ แล้วย้ายเอ็มบริออยด์ลงในอาหารสูตรเดิมที่เติม NAA 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม BAP kinetin และ zeatin อย่างละ 0.33 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 3 ถึง 4 สัปดาห์จะสังเกตเห็นยอดของต้นอ่อน จึงย้ายลงในอาหารครึ่งสูตร MS ที่เติม IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้ต้นอ่อนที่สมบูรณ์ Ghazi และคณะ (1986) ศึกษาการเกิดเอ็มบริออยด์และการชักนำให้เกิดต้นจาก embryogenic callus สามารถแบ่ง embryogenic callus ได้เป็น 2 ชนิดคือ smooth shiny และ rough โดยพบว่า แคลลัสชนิด smooth shiny เท่านั้น ที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

Lazzeri และคณะ (1987) ศึกษาผลของธาตุอาหาร คุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีที่มีผลต่อการเกิด somatic embryogenesis ของถั่วเหลือง จากการนำเอ็มบริโออ่อนหรือใบเลี้ยงอ่อนที่แยกเอาส่วนของเอ็มบริโอออกไปแล้ว เลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง MS เติมวิตามินสูตร B5 และ NAA 50 μM สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้ และพบว่าประสิทธิภาพของการเกิดเอ็มบริออยด์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลลดลงจาก 12 เปอร์เซ็นต์เป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์ การใช้น้ำตาลกลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลใกล้เคียงกัน และ pH ในช่วง 5.0 ถึง 7.0 ให้ผลคล้ายคลึงกัน แต่อัตราการเกิดเอ็มบริโอที่ปกติจะสูงเมื่ออยู่ในช่วง pH ต่ำ ส่วนฮอร์โมนในอาหารมีอิทธิพลเพียงเล็กน้อยต่อการเกิดเอ็มบริออยด์ ในการทดสอบสูตรอาหารต่าง ๆ ที่จำเป็นในการเกิดเอ็มบริโอประกอบด้วยอาหาร MS สารสกัดจากยีสต์ และวุ้น Difco-bacto พบว่าการเจริญของต้นดีมาก

Parrot และคณะ (1988) ทำการทดลองชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์พบว่าใช้เวลาสั้นที่สุดเพียง 3 วัน และการเกิดเอ็มบริออยด์จะไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี NAA นานกว่า 1 สัปดาห์ ส่วนการงอกของเอ็มบริออยด์มีความสัมพันธ์กับออกซิน กล่าวคือ ถ้าได้รับออกซินมากเกินไป ความงอกจะลดลง ซึ่งอาหารสูตรพื้นฐานที่ใช้ในปัจจุบัน คือสูตร MS ประกอบด้วยเกลืออนินทรีย์ตามสูตร MS วิตามินตามสูตร B5 น้ำตาล 1.5 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น gelrite 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปรับอาหารให้ได้ pH 5.8 เติมฮอร์โมนตามขั้นตอน Finer (1988) เพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลืองบนอาหารที่ประกอบด้วยเกลืออนินทรีย์จากสูตร MS วิตามินจากสูตร B5 น้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์ 2,4-D 40 มิลลิกรัมต่อลิตร และวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเพาะเลี้ยงประมาณ 4 สัปดาห์ เริ่มเห็นเอ็มบริออยด์และจากการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเอ็มบริออยด์ที่เกิดมีจุดกำเนิดจากส่วนผิวด้านบน และผิวด้านล่างที่สัมผัสกับอาหาร

สิรนุช ลามศรีจันทร์ และวราภรณ์ โรจนศิริวงศ์ (2532) นำใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลืองพันธุ์ดอยคำและพันธุ์เชียงใหม่ 60 มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 5 และ 10

มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้ภายใน 3 ถึง 4 สัปดาห์ เมื่อนำเอ็มบริออยด์มาเลี้ยงต่อในสูตร MS เติมน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เอ็มบริออยด์มีขนาดใหญ่ขึ้น แล้วย้ายเลี้ยงต่อในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ และถ่าน 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์เพื่อช่วยในการสุกแก่ของเอ็มบริออยด์ จากนั้นย้ายลงเลี้ยงต่อในอาหารสูตร SH เพื่อให้เอ็มบริออยด์ได้พัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นต้นได้เฉพาะพันธุ์ดอยคำเท่านั้น

5. ผลของ genotype ที่มีต่อการชักนำให้เกิดต้นถั่วเหลือง

Ranch และคณะ (1985) ทำการทดสอบความแตกต่างของ genotype ที่มีผลต่อการเกิดเอ็มบริออยด์ โดยการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของถั่วเหลือง 14 สายพันธุ์ พบว่าขนาดของใบเลี้ยงยาว 0.5 ถึง 4.0 มิลลิเมตรสามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้มาก ไม่พบสหสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเกิดเอ็มบริออยด์กับ maturity group และพบว่าเปอร์เซ็นต์ของการเกิดเอ็มบริออยด์ของแต่ละพันธุ์ไม่เท่ากัน และระยะเวลาในการชักนำก็ต่างกันด้วย Komatsuda และ Ohyama (1988) เพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง 26 พันธุ์ บนอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยเกลืออนินทรีย์ตามสูตร MS วิตามินตามสูตร B5 น้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ และสารเร่งการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA, 2,4-D, IBA และ BA พบว่าเอ็มบริออยด์เกิดได้ดีเมื่อใช้ NAA หรือ 2,4-D ในระดับสูง ๆ และพบว่า genotype มีอิทธิพลอย่างมากต่อความสามารถในการเกิด และการงอกของเอ็มบริออยด์ ส่วนการชักนำให้เอ็มบริออยด์งอก จะต้องย้ายลงเลี้ยงในอาหารอีก 3 สูตร คือ สูตรชักนำให้เกิดตาและราก สูตรที่เลี้ยงเพื่อให้เอ็มบริออยด์พัฒนา และสูตรที่ทำให้เอ็มบริออยด์งอก ตามลำดับ

Buchheium และคณะ (1989) เลี้ยงเอ็มบริออยด์ในอาหารสูตร MS ที่เติม activated charcoal และน้ำตาลซูโครส 0.28 M ประมาณ 8 สัปดาห์ เอ็มบริออยด์จะสุกแก่และมีลักษณะที่เห็นได้คือ มีความแข็งแรงและความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นได้สูง นอกจากนี้ยังพบว่าระยะการสุกแก่มีผลต่อการงอกของเอ็มบริออยด์ และการพัฒนาเป็นต้น การชักนำให้เกิดต้นไม่จำเป็นต้องใส่สารเร่งการเจริญเติบโตในอาหาร ความผิดปกติทางสรีระของเอ็มบริออยด์มีผลกระทบน้อย ต่อระยะเวลาการชักนำให้เกิดต้น genotype มีผลน้อยต่ออัตราการเกิดหรือความเร็วในการชักนำให้เกิดต้น

Parrot และคณะ (1989) ศึกษาอิทธิพลของ genotype ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนของถั่วเหลือง พบว่า genotype มีผลต่อความสามารถในการชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์อย่างมาก จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง 33 สายพันธุ์ สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้ดีบนอาหารสูตร N10 (เกลืออนินทรีย์สูตร MS วิตามินสูตร B5 น้ำตาล 1.5 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อศึกษาถึง pedigree ของสายพันธุ์เหล่านี้ พบว่ามีบรรพบุรุษที่สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้ดี คือพันธุ์ Manchu หรือพันธุ์ A.K. Harrow และเมื่อผสมข้ามพันธุ์ Manchu กับพันธุ์ Shiro ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้น้อย พบว่าลูกผสมชั่วที่ 1 มีความสามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์อยู่กึ่งกลางระหว่างพันธุ์ทั้งสอง แสดงให้เห็นเบื้องต้นว่า ยีนแบบผลบวกมีความสำคัญในการควบคุมความสามารถในการเกิดเอ็มบริออยด์

พีรนุช การีรส (2536) ได้ศึกษาพันธุกรรมของการถ่ายทอดลักษณะการเกิดเอ็มบริออยด์ในถั่วเหลือง ซึ่งเป็นพันธุ์แนะนำของไทย 3 พันธุ์ คือ เชียงใหม่ 60, สุโขทัย 1 และ นครสวรรค์ 1 นำมาผสมพันธุ์กันได้ 4 คู่ผสม แล้วทดสอบการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่าลักษณะการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอในถั่วเหลืองชุดนี้เป็นลักษณะปริมาณถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ และปฏิกิริยาของยีนแบบบวกมีความสำคัญที่สุดในการควบคุมความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลักษณะนี้

Sellars และคณะ (1990) ศึกษาการเกิดเอ็มบริออยด์จากเซลล์เนื้อเยื่อของ zygotic embryo ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ ในถั่วลิสงและถั่วเหลืองเปรียบเทียบกัน พบว่าเมื่อครบระยะเวลาในการทดลอง (150วันหลังการเพาะเลี้ยง) ถั่วลิสงสามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้เฉลี่ย 29 เอ็มบริออยด์ต่อ explant และในถั่วเหลืองเฉลี่ย 16 เอ็มบริออยด์ต่อ explant ซึ่งแสดงให้เห็นว่าถั่วเหลืองชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้ยากกว่า Komatsuda และ Ko (1990) ทำการทดลองในถั่วเหลือง 36 สายพันธุ์ โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร พบว่า 21 สายพันธุ์ไม่เกิดเอ็มบริออยด์เลย ส่วนอีก 15 สายพันธุ์ที่เหลือสามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้ แต่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 5 กรัมต่อลิตร กลับพบว่าพันธุ์ที่นำมาทดสอบทุกพันธุ์สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้ แต่ประสิทธิภาพในการเกิดเอ็มบริออยด์ในแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมาก

6. การคัดเลือกพันธุ์พืชทนเค็ม

Hanning และ Nabors (1984) เพาะเลี้ยงข้าวพันธุ์ IR 36 โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แล้วคัดเลือกแคลลัสที่ทนเค็มมาเลี้ยงจนเป็นต้น จากนั้นปลูกทดสอบในดินเค็มพบว่า ทนได้ดีในที่มีความเค็มระดับต่ำ Vajrabhaya และ คณะ (1989) ทำการคัดเลือกข้าวทนเค็มจากข้าวสายพันธุ์ indica 2 สายพันธุ์ คือ ขาวดอกมะลิ 105 และเหลืองประทิว โดยคัดเลือกจากแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าข้าวพันธุ์เหลืองประทิวสามารถทนเค็มได้ดีกว่าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในความเค็มระดับต่ำเท่านั้น Lin และ Kao (1995) พบว่าผลของโซเดียมคลอไรด์ทำให้การเจริญเติบโตของรากหยุดชะงัก ขณะเดียวกันก็พบว่ามีการสะสมของปริมาณ proline เพิ่มขึ้นในรากด้วย ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่างการชะงักการเจริญเติบโตของรากเป็นผลมาจากการสะสมของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งไปมีความสัมพันธ์กับระดับของ proline ในรากพืชเช่นกัน Winicov (1995) ศึกษาถึงลักษณะและความสามารถในการชักนำให้เกิดต้นจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสข้าวที่ทนเค็ม พันธุ์ Pokkali, L-202, M-202, IR 28 และ IR 42 ซึ่งเลี้ยงคัดเลือกบนอาหารมีเกลือเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (0.171 M) พบว่าการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของต้นข้าวที่ชักนำได้ลดลงมาก แต่ยังสามารถออกดอกและติดเมล็ดได้ เมื่อนำเมล็ดจากต้นข้าวพันธุ์ L-202 ที่คัดเลือกได้มาปลูกทดสอบ พบว่ารุ่นลูก R2 ไม่ทนเค็ม

Kumar และ Sharma (1988) คัดเลือกแคลลัสของถั่วเขียวในสภาพทนเค็มจากเกลือโซเดียมคลอไรด์โดยเพาะเลี้ยงแคลลัสถั่วเขียวจากชิ้นส่วนราก บนอาหารสูตรดัดแปลง PC-L2 พบว่าแคลลัสจากสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้สามารถทนเค็มได้ดีกว่าแคลลัสจากพันธุ์ดั้งเดิม Gulati และ Jaiwal (1993) ทำการทดลองถั่วเขียวทนเค็มโดยใช้แคลลัส เลี้ยงในอาหารที่มี proline ผสมอยู่เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างการทนเค็มของพืชกับระดับของ proline พบว่าปริมาณ proline ภายในที่สูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับการทนเค็มของพืช แต่ยังไม่อาจสรุปแน่นอนได้

Watad และคณะ (1991) ศึกษาความสามารถในการชักนำต้นของเซลล์ยาสูบที่ผ่านการคัดเลือกทนเค็มแล้ว พบว่าเซลล์ยาสูบสามารถชักนำให้เป็นต้นได้ ทั้งเซลล์ที่ผ่านการคัดเลือกทนเค็มและที่ไม่ได้ผ่านการคัดเลือก แต่ต้นที่ได้จากการคัดเลือกทนเค็มมีลักษณะที่ไม่แข็งแรง คือ ข้อสั้น ใบเล็ก และโตช้า ซึ่งต่างจากต้นที่ได้จากเซลล์ที่ไม่ได้คัดเลือกจะมีลักษณะปกติ นอกจากนั้นยังพบว่าเมื่อปริมาณเกลือเพิ่มสูงขึ้น มีผลทำให้น้ำหนักสดและแห้งของเซลล์ยาสูบลดลง 50 เปอร์เซ็นต์

Garcia-Agustin และ Primo-Millo (1995) คัดเลือกส้มที่สามารถทนน้ำที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณมากกว่าปกติได้ โดยใช้ nucellar cell มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้ embryo จากนั้นจึงนำ embryo ที่ได้ไปคัดเลือก พบว่า embryo ที่คัดเลือกสามารถทนเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งต้นส้มจะมีกลไกการสะสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ไว้ที่ยอดและราก

Chaudhary และคณะ (1996) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบของพืชอาหารสัตว์ lucerne (หรือ alfalfa) ในอาหารที่มีความเค็มของเกลือในระดับต่างๆ กัน และ subculture ทุกครั้งในอาหารที่มีความเค็มสูงขึ้น เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ทนเค็ม พบว่าได้พืชอาหารสัตว์ที่มีความสามารถทนเค็มได้มากกว่าพืชสายพันธุ์ดั้งเดิม

อังคณา ศีตะโกเศศ (2528) ทดลองทนเค็มในข้าวโพดโดยใช้เนื้อเยื่อของส่วนปลายราก ส่วน mesocotyl ส่วนข้อ ใบอ่อนของต้นกล้า และคัพภะของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 มาเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0 ถึง 2.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าชิ้นส่วนต่างๆสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ในอาหารทุกความเข้มข้น แต่สามารถชักนำให้เป็นต้นได้เฉพาะส่วนคัพภะและความเข้มข้นเกลือ 0.5 ถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

สุภัทรา ศุภเมธี (2533) ทำการชักนำให้กล้วยหอมพันธุ์ Williams เกิดการกลายพันธุ์เพื่อให้ทนเค็มได้ โดยนำเนื้อเยื่อไปฉายรังสีแกมม่า 2 กิโลแรด 2 ครั้งก่อนนำไปคัดเลือกทนเค็ม พบว่าเกลือโซเดียมคลอไรด์มีผลทำให้กล้วยชะงักการเจริญเติบโต เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือขึ้น พบว่ากล้วยที่คัดเลือกได้สามารถทนเค็มได้ที่ระดับ 0.4 เปอร์เซ็นต์

เยาวพา จิระเกียรติกุล (2536) ทดลองใช้ตาข้างของหม่อนน้อยและหม่อนคุณไพมาฉายรังสีแกมม่า ในปริมาณ 0 และ 80 เกรย์ก่อนนำไปคัดเลือกทนเค็ม โดยเพิ่มความเข้มข้นเกลือขึ้นทุกเดือน พบว่าทั้งหม่อนน้อยและหม่อนคุณไพสามารถทนเค็มได้ถึง 2.0 เปอร์เซ็นต์

สิรนุช ลามศรีจันทร์ และคณะ (2540) ศึกษาผลของรังสีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง โดยนำฝักอ่อนถั่วเหลืองพันธุ์ดอยคำ มาฉายรังสีแกมมาปริมาณต่างๆกัน 5 ระดับ พบว่าการฉายรังสีช่วยให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงขึ้นกว่าพวกที่ไม่ได้ฉายรังสี แต่พบว่าสามารถชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ ออกดอก และติดฝักได้เพียง 1 ต้นเท่านั้น

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. วัสดุ อุปกรณ์

1.1 การเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลืองเพื่อชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ โดยใช้ถั่วเหลือง 12 พันธุ์ คือ พันธุ์ สจ 2, สจ 4, สจ 5, เชียงใหม่ 60, ดอยคำ, นครสวรรค์ 1, สุโขทัย 2, ราชมงคล, KUSL 20004, AGS 292, Jack และ Prolina โดยเลือกเมล็ดที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร หรือเมล็ดขนาดโตประมาณ 1/3 ของช่องว่างในฝัก

1.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ เพื่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ คือ MS (Murashige and Skoog, 1962) โดยใช้วิตามิน SBIII ของ Gamborg และ Finer’s growth medium อาหารสำหรับการคัดเลือก คือ FG ที่ใส่เกลือ NaCl ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ อาหารสำหรับชักนำให้เกิดต้น คือ FRCG และ FRSC (ตารางภาคผนวกที่1)

1.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับฟอกทำความสะอาดเนื้อเยื่อก่อนที่จะนำมาเพาะเลี้ยง ได้แก่ เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 % คลอรอกซ์ 20 % และสารจับใบ ทวีน-20

1.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตที่จำเป็นเพื่อชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ คือ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

1.5 เครื่องมือสำหรับการเตรียมอาหารสังเคราะห์ชนิดต่างๆ เช่น เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ขวดแก้วสำหรับใส่ stock สารละลายความเข้มข้นต่างๆ เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง เตาไฟฟ้า เครื่องไมโครเวฟ หม้อนึ่งความดัน เครื่องแก้วสำหรับชั่งตวงสารเคมี

1.6 เครื่องมือสำหรับตัดและถ่ายย้ายเนื้อเยื่อ เช่น ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 11 พร้อมด้าม ปากคีบขนาดต่างๆ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ตู้ปลอดเชื้อ

1.7 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์ แสงสลัว 23-24 ชั่วโมง/วัน และ ตู้เพาะเลี้ยง

1.8 อุปกรณ์ถ่ายภาพและนับปริมาณ เช่น กล้องถ่ายรูป และกล้องจุลทรรศน์

2. วิธีการทดลอง แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน

2.1 ขั้นตอนการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอจากใบเลี้ยงของถั่วเหลืองใช้วิธีของ Finer และ Nagasawa (1988) โดยนำถั่วเหลืองฝักอ่อน มีขนาดเมล็ดภายในฝักประมาณ 1/3 ของช่องว่างในฝัก (อารีย์ วรัญญูวัฒก์, 2540) มาล้างให้สะอาดโดยใช้น้ำไหลผ่าน แช่ฝักถั่วเหลืองลงในเอทธิล แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที แล้วนำฝักถั่วเหลืองลงฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งในสารละลายที่มีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรต์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ใช้คลอรอกซ์ หรือไฮเตอร์ 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร/ปริมาตร หยด Tween-20 ปริมาณ 1-2 หยด ต่อสารฟอก 100 มิลลิลิตร) ตั้งกวนไว้บนเครื่องกวนนาน 15 นาที ยกภาชนะใส่ฝักถั่วเข้าไปล้างน้ำกลั่นต่ออีก 2 ครั้งในตู้ปลอดเชื้อ ใช้ปากคีบฝักลงในจานแก้วสะอาดที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ตัดตามรอยตะเข็บด้วยมีดผ่าตัดเบอร์ 11 แล้วคีบเอาเมล็ดที่อยู่ภายในฝักใส่จานแก้วใบใหม่ ทำการตัดเอาส่วนเอ็มบริโอ (embryo axis) ทิ้งไป ใช้ปลายมีดและปากคีบเขี่ยเอาเยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) ออก นำปลายมีดช้อนเอาใบเลี้ยงแต่ละซีกลงวางหงาย โดยให้ด้านที่มีลักษณะโค้งสัมผัสกับอาหาร MS ซึ่งเป็นสูตรที่ใช้ในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ วางเลี้ยง 25 ชิ้นต่อ 1 จานแก้วจำนวน 50-150 ชิ้นต่อพันธุ์ นำโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากแต่ละพันธุ์ โดยเลือกพันธุ์ที่ให้ปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอมากพอจำนวน 5 พันธุ์ นำลงเลี้ยงในอาหารเหลว FG บนเครื่องเขย่าตลอดเวลา ด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ประมาณอีก 4 สัปดาห์เพื่อเพิ่มปริมาณให้เพียงพอสำหรับการคัดเลือกทนเค็ม

2.2 ขั้นตอนการคัดเลือกโซมาติกเอ็มบริโอให้ทนเค็ม โดยใช้โซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการชักนำของถั่วเหลือง 5 พันธุ์ คือ Prolina, Jack, KUSL 20004, สจ 5 และ เชียงใหม่ 60 โดยชั่งน้ำหนักสดประมาณ 0.25 กรัม ต่อขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร 1 ใบ นำโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้ลงเลี้ยงคัดเลือกในอาหารเหลว FG ที่มีเกลือ NaCl ผสมอยู่ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละพันธุ์มี 5 ระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl และในแต่ละความเข้มข้นเกลือทำการทดลอง 3 ซ้ำ/ซ้ำละ 1 ขวด sub culture และชั่งน้ำหนักสดสังเกตการเจริญเติบโตของโซมาติกเอ็มบริโอทุก 7 14 และ 21 วัน จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อที่ผ่านการคัดเลือกแล้วไปขยายเพิ่มปริมาณต่อ ในอาหาร FG ที่ปราศจากเกลือ NaCl ประมาณ 3-4 สัปดาห์ ย้ายลงชักนำต้นต่อไป ตลอดระยะเวลาคัดเลือกในอาหารเหลวต้องวางภาชนะบนเครื่องเขย่าตลอดเวลา ด้วยความเร็วประมาณ 120 รอบต่อนาที

2.3 ขั้นตอนการชักนำให้เกิดต้น โดยย้ายโซมาติกเอ็มบริโอจากอาหารเหลว FG ที่ปราศจากเกลือลงเลี้ยงบนอาหารแข็ง FRCG (คืออาหาร FG ที่ใส่น้ำตาลมอลโทส แทนซูโครส และวุ้น Gelrite + activated charcoal) เลี้ยงอยู่นานประมาณ 4-6 สัปดาห์ โซมาติกเอ็มบริโอจะมีขนาดใหญ่และยืดยาวขึ้น ย้ายโซมาติกเอ็มบริโอลงบนจานแก้วเปล่าที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อเร่งอายุของโซมาติกเอ็มบริโอ โดยวางจานแก้วลงในกล่องที่มีสารละลาย NaCl อิ่มตัวนาน 2-3 วัน เมื่อโซมาติกเอ็มบริโอเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวอมเหลืองเป็นสีขาวซีด แสดงว่าพร้อมที่จะนำไปชักนำให้เกิดรากบนอาหาร FRSG (เหมือนอาหาร FRCG แต่ใส่น้ำตาลซูโครส แทนมอลโทส) ย้ายต้นอ่อนถั่วเหลืองที่ได้มาเลี้ยงชักนำ

ให้เกิดรากบน FRSG ในหลอดทดลองขนาดใหญ่ เพื่อให้ระบบรากสมบูรณ์ เมื่อได้ต้นถั่วเหลืองที่มีทั้งยอดและรากสมบูรณ์แล้ว นำย้ายลงปลูกในดินอบ วางเลี้ยงอนุบาลไว้ในตู้เพาะเลี้ยง ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 75±5 เปอร์เซ็นต์ ได้รับแสงสว่างประมาณ 14 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 180 μE จนกระทั่งต้นถั่วแข็งแรงพอที่จะย้ายออกเลี้ยงในสภาพภายนอกได้

3. วิธีการบันทึกผลการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยแบ่งเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้

3.1 การทดลองเพื่อชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลือง 12 สายพันธุ์ เพื่อหาสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการให้โซมาติกเอ็มบริโอจำนวนมากที่สุด โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของแต่ละสายพันธุ์ และระยะเวลาในการชักนำ บันทึกลักษณะของการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยให้เป็นระดับคะแนน ซึ่งมีเกณฑ์การให้คะแนนดังนี้

ระดับคะแนน 0 หมายถึง ไม่พบว่าเกิดเป็นโซมาติกเอ็มบริโอและไม่พบแคลลัส พบเพียงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพเล็กน้อยเท่านั้น เช่น เกิดเป็นสีน้ำตาลบริเวณรอยตัด หรือบนแผ่นใบเลี้ยงมีรอยแตกปริเพียงเล็กน้อย

ระดับคะแนน 1 หมายถึง เกิดโซมาติกเอ็มบริโอปริมาณน้อยมาก (ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนชิ้นส่วนทั้งหมดที่นำมาชักนำ)

ระดับคะแนน 2 หมายถึง เกิดโซมาติกเอ็มบริโอเพียงเล็กน้อย (10-20 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนชิ้นส่วนทั้งหมดที่นำมาชักนำ)

ระดับคะแนน 3 หมายถึง เกิดโซมาติกเอ็มบริโอปานกลาง (21-30 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนชิ้นส่วนทั้งหมดที่นำมาชักนำ)

ระดับคะแนน 4 หมายถึง เกิดโซมาติกเอ็มบริโอปริมาณมากแต่ไม่หนาแน่น (31-50 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนชิ้นส่วนทั้งหมดที่นำมาชักนำ)

ระดับคะแนน 5 หมายถึง เกิดโซมาติกเอ็มบริโอปริมาณมากและหนาแน่นที่สุด (51 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปของจำนวนชิ้นส่วนทั้งหมดที่นำมาชักนำ)

การคิดสัดส่วนเปอร์เซ็นต์จากจำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ

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

3.2 การคัดเลือกโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลือง 5 พันธุ์ ได้แก่ Jack, Prolina, KUSL 20004, สจ 5 และ เชียงใหม่ 60 เพื่อให้ทนต่อเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ โดยบันทึกผลการทดลองจากน้ำหนักสดตั้งแต่เริ่มต้นคัดเลือก ชั่งทุก ๆ 7 วัน 14 วัน และ 21 วัน ซึ่งเป็นการเสร็จสิ้นการคัดเลือก จากนั้นนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติและหาความสัมพันธ์ โดยใช้โปรแกรม IRRI STAT Version 3/39 วางแผนการทดลองแบบ Split-Split Plot Designs มีแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ, 2540) ดังนี้

$$X_{ijkl} = \mu + B_i + \alpha_j + \delta_{ij} + \beta_k + \alpha\beta_{jk} + \rho_{ijk} + \gamma_l + \alpha\gamma_{jl} + \beta\gamma_{kl} + \alpha\beta\gamma_{jkl} + \varepsilon_{ijkl}$$

โดยกำหนดให้

$i = 1,2 \ldots\ldots a$

$j = 1,2 \ldots\ldots b$

$k = 1,2 \ldots., c$

μ คือ ค่าเฉลี่ยทั้งหมดในการทดลอง

B_i คือ ผลของบลอก

α_j คือ ผลของเมนพลอต

δ_{ij} คือ ความคลาดเคลื่อนในเมนพลอต

β_k คือ ผลของซับพลอต

$\alpha\beta_{jk}$ คือ ปฏิกิริยาระหว่างเมนพลอตและซับพลอต

ρ_{ijk} คือ ความคลาดเคลื่อนในซับพลอต

γ_l คือ ผลของซับ-ซับพลอต

$\alpha\gamma_{jl}$ คือ ปฏิกิริยาระหว่างเมนพลอตและซับ-ซับพลอต

$\beta\gamma_{kl}$ คือ ปฏิกิริยาระหว่างซับพลอตและซับ-ซับพลอต

$\alpha\beta\gamma_{jkl}$ คือ ปฏิกิริยาระหว่างเมนพลอต ซับพลอตและซับ-ซับพลอต

ε_{ijkl} คือ ความคลาดเคลื่อนในซับ-ซับพลอต

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์

1. การทดลองที่ 1 การทดสอบศักยภาพในการให้โซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลือง 12 สายพันธุ์

จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง 12 พันธุ์ ดังตารางที่ 1 พบว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ที่มีศักยภาพในการให้โซมาติกเอ็มบริโอมากที่สุด คือ พันธุ์ Jack ใช้เวลาในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ 28 วัน คิดเป็น 87.1 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะการเกิดพบว่าเกิดโดยตรงจากเนื้อใบ ซึ่งจะค่อย ๆ นูนขึ้นบนแผ่นใบ พันธุ์ที่มีศักยภาพรองลงมา คือ Prolina ใช้เวลา 28 วันในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ คิดเป็น 85.7 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะการเกิดเช่นเดียวกับพันธุ์ Jack เมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองสายพันธุ์ของประเทศไทย พบว่าพันธุ์ Prolina และ Jack มีความสามารถในการให้โซมาติกเอ็มบริโอปริมาณมากกว่าหลายเท่า ส่วนพันธุ์ที่มีอันดับรองลงมาแต่น้อยกว่า 2 พันธุ์แรกเกือบ 3 เท่า คือ AGS 292 และ KUSL 20004 ให้ปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอคิดเป็น 28.8 และ 28.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่พันธุ์ AGS 292 ใช้เวลาในการชักนำมากกว่า คือ 41 วัน ส่วน KUSL 20004 ใช้เวลาเพียง 36 วัน

ส่วนกลุ่มถั่วเหลืองพันธุ์ไทยมีอันดับรองลงมา ได้แก่ สจ 5, เชียงใหม่ 60, ดอยคำ, นครสวรรค์ 1, สจ 4, สุโขทัย 2, ราชมงคล และ สจ 2 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเท่ากับ 28.0, 21.4, 21.1, 18.7, 18.7, 12.5, 10.7 และ 1.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยพันธุ์นครสวรรค์ 1 และ สจ 4 ให้ปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอเท่ากัน 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 โดยใบเลี้ยงจะค่อย ๆ นูนขึ้นมาเช่นเดียวกับในพันธุ์ Prolina และ Jack ส่วนพันธุ์นครสวรรค์ 1, ดอยคำ, เชียงใหม่ 60 และ สจ 4 เกิดโซมาติกเอ็มบริโอทั้งบนเนื้อใบเลี้ยงโดยตรงและบนแคลลัส พันธุ์ สจ 5 และ KUSL 20004 มีการเกิดบนแคลลัสเท่านั้น จากการสังเกตพบว่าทั้ง 2 พันธุ์นี้เนื้อเยื่อจะมีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสก่อนจึงจะเกิดโซมาติกเอ็มบริโอบนแคลลัส ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1.1 ถึง 1.9

ตารางที่ 1 แสดงผลการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอจากใบเลี้ยงอ่อนถั่วเหลือง และลักษณะการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลือง 12 พันธุ์

	1/					
พันธุ์	จำนวนชิ้นใบทั้งหมด	จำนวนชิ้นที่เกิด SE	เปอร์เซ็นต์เกิด SE 2/	จำนวนวันชักนำ SE	คะแนน	ลักษณะการเกิด SE บนชิ้นส่วนใบเลี้ยง
ราชมงคล	56	6	10.7	41	2	เกิดจากเนื้อใบนูนขึ้นมา
สุโขทัย 2	80	10	12.5	41	2	เกิดจากเนื้อใบนูนขึ้นมา
นครสวรรค์ 1	80	15	18.7	41	2	เกิดบนแคลลัสและเนื้อใบ
ดอยคำ	52	11	21.1	41	3	เกิดบนแคลลัสและเนื้อใบ
เชียงใหม่ 60	70	15	21.4	36	3	เกิดบนแคลลัสและเนื้อใบ
สจ 2	60	1	1.6	41	1	เกิดจากเนื้อใบนูนขึ้นมา
สจ 4	80	15	18.7	41	2	เกิดบนแคลลัสและเนื้อใบ
สจ 5	50	14	28.0	36	3	เกิดบนแคลลัส
KUSL 20004	126	59	48.8	36	4	เกิดบนแคลลัส
AGS 292	59	17	28.8	41	3	เกิดจากเนื้อใบนูนขึ้นมา
Prolina	70	60	85.7	28	5	เกิดจากเนื้อใบนูนขึ้นมา
Jack	70	61	87.1	28	5	เกิดจากเนื้อใบนูนขึ้นมา

1/ เกณฑ์การให้คะแนนปริมาณการเกิด somatic embryo

2/ SE หมายถึง somatic embryo

0 หมายถึง ไม่เกิดแคลลัสและไม่พบ SE มีเพียงการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพเล็กน้อย เช่น เกิดสีน้ำตาลตรงรอยแผลตัด หรือบนชิ้นส่วนใบมีรอยแตกแยกเพียงเล็กน้อย

1 หมายถึง เกิด SE ปริมาณน้อยมาก (ต่ำกว่า 10% ของจำนวนชิ้นส่วนทั้งหมด)

2 หมายถึง เกิด SE เล็กน้อย (10-20% ของจำนวนชิ้นส่วนทั้งหมด)

3 หมายถึง เกิด SE ปานกลาง (21-30% ของจำนวนชิ้นส่วนทั้งหมด)

4 หมายถึง เกิด SE ปริมาณมากแต่ไม่หนาแน่น (31-50% ของจำนวนชิ้นส่วนทั้งหมด)

5 หมายถึง เกิด SE ปริมาณมากและหนาแน่นที่สุด (51% ขึ้นไปของจำนวนชิ้นส่วนทั้งหมด)

2. ผลการทดลองที่ 2 การคัดเลือกโซมาติกเอ็มบริโอถั่วเหลือง เพื่อให้ทนเกลือ NaCl

จากผลการทดลองที่ 1 จึงได้คัดเลือกถั่วเหลือง 5 พันธุ์ที่มีศักยภาพในการให้โซมาติกเอ็มบริโอสูงในระยะเวลาสั้น มาทำการคัดเลือกให้ทนเค็ม โดยเลือกพันธุ์ Prolina, KUSL 20004, Jack, สจ 5 และเชียงใหม่ 60 ทำการคัดเลือกในอาหารเหลวที่ผสมเกลือ NaCl 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ คัดเลือกนาน 21 วัน โดยทำการ sub culture ทุก ๆ 7 วัน และทำการชั่งน้ำหนักสดของโซมาติกเอ็มบริโอ เพื่อบันทึกการเจริญเติบโตและสังเกตการเปลี่ยนแปลงของโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลืองพันธุ์ต่าง ๆ

จากการทดลองดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 พบว่า นับจากวันคัดเลือกจนครบวันที่ 7 น้ำหนักสดเฉลี่ยของถั่วเหลืองทั้ง 5 พันธุ์มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจาก 0.25 กรัม เป็นน้ำหนักสดตั้งแต่ 4 กรัมถึง 8 กรัม โดยพันธุ์ KUSL 20004 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเมื่อครบ 7 วันสูงสุดคือ 8.53 กรัม และพันธุ์เชียงใหม่ 60 มีการเพิ่มของน้ำหนักน้อยที่สุดคือ 4.65 กรัม เมื่อคัดเลือกครบ 14 วันพบว่าน้ำหนักสดเริ่มมีความแตกต่างทางสถิติกับพันธุ์ไทย 2 พันธุ์ คือ สจ 5 และเชียงใหม่ 60 โดยพบว่ามีความแตกต่างทางสถิติกับพันธุ์ Prolina, KUSL 20004 และ Jack อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 โดยวิธี DMRT ซึ่งพบว่าน้ำหนักสดของถั่วเหลืองทั้ง 5 พันธุ์ มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นจาก 7 วัน โดยพันธุ์ Prolina มีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุดคือ 18.49 กรัม ซึ่งใกล้เคียงกันกับ KUSL 20004 คือ 18.01 กรัม พันธุ์เชียงใหม่ 60 มีน้ำหนักสดน้อยที่สุดคือ 9.77 กรัม และเมื่อเลี้ยงคัดเลือกในอาหารที่มีเกลือเป็นเวลา 21 วันก่อนที่จะย้ายเนื้อเยื่อลงขยายปริมาณในอาหารที่ปราศจากเกลือพบว่าถั่วเหลืองพันธุ์ Prolina มีน้ำหนักสดสูงสุดคือ 31.52 กรัม และมีความแตกต่างทางสถิติกับพันธุ์อื่น ๆ อีก 4 พันธุ์อย่างเห็นได้ชัด รองลงมาคือพันธุ์ KUSL 20004 และ Jack มีน้ำหนักสดเท่ากับ 27.22 และ 24.97 กรัมตามลำดับ ซึ่งทั้ง 2 พันธุ์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่มีความแตกต่างจากพันธุ์ Prolina สำหรับพันธุ์ สจ 5 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 17.88 กรัม และ 14.86 กรัม ตามลำดับ โดยพบว่าพันธุ์เชียงใหม่ 60 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยต่ำที่สุด

จากการชั่งน้ำหนักสดเฉลี่ยของโซ-มาติกเอ็มบริโอถั่วเหลืองทั้ง 5 พันธุ์ ตลอดระยะเวลาที่ใช้คัดเลือกเป็นระยะ ๆ โดยแบ่งเป็น 3 ช่วง ๆ ละ 7 วัน พบว่าโดยเฉลี่ยแล้วทุกพันธุ์มีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นนับจากเริ่มต้นคัดเลือก (จากน้ำหนัก 0.25 กรัม) เมื่อครบ 21 วัน พบว่ามีน้ำหนักสูงสุดประมาณ 31 กรัม และต่ำสุดประมาณ 14 กรัม แต่พันธุ์ สจ 5 และเชียงใหม่ 60 มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นน้อยกว่าพันธุ์ Prolina, KUSL 20004 และ Jack ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าความเค็มยับยั้งการเจริญเติบโตในแต่ละพันธุ์แตกต่างกัน

จากตารางที่ 3 เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลืองทั้ง 5 พันธุ์กับความเค็มในระดับต่าง ๆ 5 ระดับ ที่ระดับความเค็ม 0 เปอร์เซ็นต์ (คืออาหารที่ปราศจากเกลือ ซึ่งเป็นอาหารสูตรเปรียบเทียบ) พบว่าพันธุ์ KUSL 20004 มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดโดยมีน้ำหนัก 38.67 กรัม พันธุ์ Prolina มีการเจริญเติบโตต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองอีก 4 พันธุ์ (โดยมีน้ำหนัก

เฉลี่ย 26.38 กรัม) เมื่อความเข้มข้นเกลือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ Prolina มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 19.83 กรัม ส่วนพันธุ์เชียงใหม่ 60 มีการเจริญเติบโตต่ำที่สุด (0.61 กรัม) ที่ระดับความเค็มเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ถั่วเหลืองทั้ง 5 พันธุ์เริ่มมีการเจริญเติบโตน้อยลงมากเมื่อเทียบกับ control โดยพบว่าพันธุ์ Prolina มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ คือมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 5.78 กรัม พันธุ์เชียงใหม่ 60 มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้น้อยที่สุดมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเพียง 0.38 กรัม เมื่อความเข้มเกลือสูงขึ้นอีกเป็น 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าพันธุ์ KUSL 20004 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงกว่าพันธุ์อื่น ๆ อีก 4 พันธุ์ คือ 4.20 กรัม พันธุ์เชียงใหม่ 60 ก็ยังเจริญเติบโตได้ไม่ดีเท่ากับพันธุ์อื่น คือมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเพียง 0.41 กรัม ที่ความเข้มข้นเกลือเป็น 2.0 เปอร์เซ็นต์ (ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดของการทดลอง) พบว่า พันธุ์ Jack มีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงที่สุด (3.12 กรัม) ซึ่งสูงกว่าพันธุ์ Prolina (มีน้ำหนัก 2.64 กรัม) และพันธุ์ KUSL 20004 (มีน้ำหนัก 2.43 กรัม) พันธุ์ สจ 5 เป็นพันธุ์ที่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 0.35 กรัม ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2.1 ถึง 2.19

จากรูปที่ 3 และตารางที่ 3 เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการเจริญเติบโตในอาหารที่มีเกลือของถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ พันธุ์ Prolina ที่ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการเจริญเติบโตน้อยกว่าพันธุ์อื่น ๆ คือมีน้ำหนักสด 26.38 กรัม ซึ่งน้อยที่สุด แต่เมื่อเลี้ยงคัดเลือกในอาหารที่มีเกลือ พบว่า มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีใกล้เคียงกับพันธุ์ KUSL 20004 และพันธุ์ Jack โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นเกลือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการเจริญเติบโตสูงสุดและแตกต่างจากอีก 4 พันธุ์อย่างมาก คือมีน้ำหนักถึง 19.83 กรัม โดยที่พันธุ์อื่นๆมีน้ำหนักประมาณ 0.6 - 5 กรัมเท่านั้น ที่ความเข้มข้นเกลือ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ก็ยังพบว่ามีน้ำหนักสดมากกว่าพันธุ์อื่น ๆ คือ 5.78 กรัม พันธุ์อื่น ๆ อีก 4 พันธุ์มีน้ำหนักระหว่าง 0.38 - 2.59 กรัม เมื่อความเข้มข้นเกลือ 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ การเจริญเติบโต ไม่มีความแตกต่างทางสถิติคือมีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 2 กรัม

พันธุ์ KUSL 20004 ที่เลี้ยงในอาหารไม่มีเกลือมีการเจริญเติบโตสูงที่สุดคือ 38.67 กรัม เมื่อมีเกลือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ การเจริญเติบโตเป็นอันดับที่สองรองจากพันธุ์ Prolina คือมีน้ำหนัก 5.86 กรัม อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตของพันธุ์ KUSL 20004 ที่เลี้ยงในอาหารมีเกลือ 0.5 - 2.0 เปอร์เซ็นต์ไม่มีความแตกต่างกัน

พันธุ์ Jack มีการเจริญเติบโตเป็นอันดับสองรองจากพันธุ์ KUSL 20004 คือมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 36.13 กรัมเมื่อเลี้ยงในอาหารไม่มีเกลือ แต่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อทำการเลี้ยงคัดเลือกในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือต่างกัน ในระดับความเข้มข้นเกลือ 0.5 - 2.0 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักสดเฉลี่ยประมาณ 2 - 4 กรัม แต่ที่ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเกลือเข้มข้นสูงที่สุด พันธุ์ Jack มีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่น ๆ คือมีน้ำหนักเท่ากับ 3.12 กรัม

พันธุ์ สจ 5 (SJ5) ในสภาพที่ไม่มีเกลือ มีการเจริญเติบโตอยู่อันดับสามรองจาก KUSL 20004 และ Jack โดยมีน้ำหนักเท่ากับ 31.37 กรัมเมื่อ ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเกลือเมื่อมีเกลือ 0.5 - 2.0 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักสดระหว่าง 0.35 - 1.39 กรัม ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ

พันธุ์เชียงใหม่ 60 (CM 60) ที่เลี้ยงในอาหารไม่มีเกลือ มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 27.44 กรัม และแตกต่างจากพวกที่เลี้ยงในอาหารมีเกลือ โดยมีน้ำหนักสดระหว่าง 0.38 - 0.61 กรัม ซึ่งกลุ่มหลังนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

หลังจากการเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอในอาหารคัดเลือกที่มีเกลือระดับต่างกันเป็นเวลา 21 วัน จึงทำการย้ายเนื้อเยื่อมาเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเหลว FG ที่ปราศจากเกลือเป็นเวลา 60 วัน จากนั้นนำมาชักนำให้ได้ต้นถั่วที่สมบูรณ์บนอาหารสูตรชักนำยอดและราก จากตารางที่ 4 พบว่า พันธุ์ Prolina และ Jack ซึ่งมีปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอเจริญเติบโตได้ดี หลังการคัดเลือกคือ ที่ 0 เปอร์เซ็นต์ได้เนื้อเยื่อที่รอดจากการคัดเลือกจำนวน 10 และ 12 ชิ้น ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ได้เนื้อเยื่อจำนวน 13 และ 6 ชิ้นตามลำดับ ที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ได้เนื้อเยื่อ 4 และ 3 ชิ้น ที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์ได้เนื้อเยื่อ 2 และ 5 ชิ้น ส่วนที่ระดับ 2.0 เปอร์เซ็นต์ได้เนื้อเยื่อจำนวน 2 และ 7 ชิ้นตามลำดับ แต่ไม่สามารถชักนำให้เป็นต้นถั่วเหลืองที่สมบูรณ์ได้ ยกเว้น control ได้ต้นถั่วเพียงพันธุ์ละ 1 ต้นเท่านั้น ส่วนพันธุ์ สจ 5 และเชียงใหม่ 60 ไม่ได้เนื้อเยื่อเหลือจากการคัดเลือกเลย จึงไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ ยกเว้นที่ 0 เปอร์เซ็นต์พบว่ามีเนื้อเยื่อรอดชีวิตเพียง 2 และ 3 ชิ้นส่วน แต่ก็ไม่สามารถชักนำให้เป็นต้นได้เช่นกัน พันธุ์ KUSL 20004 ที่ความเข้มข้นเกลือ 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีชิ้นส่วนรอดชีวิตจำนวน 4, 7 และ1 ชิ้นตามลำดับความเข้มข้นของเกลือแต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ แต่โซมาติกเอ็มบริโอที่รอดจากการคัดเลือกที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้จำนวน 1 ต้น จาก 11 ชิ้นที่พัฒนาให้เห็นเฉพาะรากแต่ไม่สามารถเกิดเป็นยอดได้ จากนั้นย้ายต้นที่ได้จำนวน 1 ต้นของพันธุ์ KUSL20004 ซึ่งมีลักษณะอาการอวบน้ำผิดปกติ ลงปลูกในดินที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วปลูกอนุบาลในตู้เพาะเลี้ยง ประมาณ 2 อาทิตย์ ต้นพืชเริ่มแสดงอาการเหี่ยวจากปลายยอดลงมาจนถึงโคนต้น และตายในที่สุด จึงยังไม่สามารถกล่าวได้ว่าต้นที่ได้นั้นมีความทนเกลือจริง(ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2.18 และ 2.20)

ตารางที่ 2 **แสดงผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์น้ำหนักสดของโซมาติกเอมบริโอในถั่วเหลือง 5 พันธุ์**

Sources of Variation	df	Mean Squares
Replication (R)	2	0.59
Main Plot (M = พันธุ์)	4	29.04**
Error (a)	8	1.67
Sub Plot (S = ระยะเวลาชั่งน้ำหนัก)	2	199.53**
M x S	8	3.77**
Error (b)	20	0.04
Sub Sub Plot (B = ความเข้มข้น NaCl)	4	848.63**
M x B	16	17.23**
S x B	8	89.94**
M x S x B	32	2.82**
Error (c)	120	0.58

CV (a) = 43.4%　CV (b) = 6.3%　CV (c) = 25.6%

** = ความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

ตารางที่ 3 **แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด (กรัม) ของโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลือง 5 สายพันธุ์ ในอาหารที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 5 ระดับ ที่ระยะเวลา 7 14 และ 21 วัน ขณะคัดเลือกโซมาติกเอ็มบริโอทนเค็ม**

			พันธุ์		
ระดับความเข้มข้น	PROLINA	KUSL 20004	JACK	SJ 5	CM 60
ของ NaCl					
(%)			(กรัม)		
น้ำหนักสด 7 วัน					
0 2/	3.66 a	6.13a	5.17 a	4.68 a	4.13 a1/
0.5	2.59 a	0.98 b	0.98 b	0.29 b	0.17 b
1.0	0.84 b	0.39 b	0.35 b	0.22 b	0.12 b
1.5	0.32 b	0.54 b	0.47 b	0.19 b	0.11 b
2.0	0.50 b	0.50 b	0.62 b	0.12 b	0.12 b
น้ำหนักสด 14 วัน					
0 2/	8.90 a	12.84 a	12.08 a	10.14 a	9.11 a
0.5	5.35 b	1.99 b	1.42 b	0.55 b	0.22 b
1.0	2.20 c	0.84 b	0.81 b	0.39 b	0.13 b
1.5	0.98 c	1.50 b	0.93 b	0.29 b	0.15 b
2.0	1.06 c	0.84 b	1.04 b	0.14 b	0.16 b
น้ำหนักสด 21 วัน					
0 2/	13.83 a	19.70 a	18.88 a	16.55 a	14.20 a
0.5	11.89 b	2.90 b	2.15 b	0.55 b	0.22 b
1.0	2.74 c	1.36 c	1.28 b	0.40 b	0.13 b
1.5	0.99 d	2.17 bc	1.21 b	0.29 b	0.15 b
2.0	1.07 d	1.09 c	1.46 b	0.10 b	0.16 b
ค่าเฉลี่ย	3.8	3.58	3.24	2.33	1.95

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบ โดยวิธี DMRT (Duncan 's New Multiple Range Test)

2/ ความเข้มข้น 0 % NaCl เป็นทรีตเมนท์เปรียบเทียบ

ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลือง 5 พันธุ์โดยชั่งน้ำหนักทุก 7, 14 และ 21 วัน ขณะคัดเลือกทนเค็ม

	วัน			
พันธุ์	7 วัน	14 วัน	21 วัน	เฉลี่ย
			(กรัม)	
Prolina	7.91 a1/	18.49 a	31.52 a	19.31
KUSL 20004	8.54 a	18.01 a	27.22 b	17.92
Jack	7.31 a	16.29 a	24.97 b	16.19
SJ 5	5.49 a	11.51 b	17.88 c	11.63
CM 60	4.65 a	9.77 b	14.86 c	9.76
เฉลี่ย	6.78	14.81	23.29	14.96

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ0.05
จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดโซมาติกเอ็มบริโอถั่วเหลือง 5 พันธุ์ซึ่งเลี้ยงคัดเลือกในอาหารที่เติมเกลือ NaCl ระดับต่าง ๆ

	พันธุ์					
NaCl	Prolina	KUSL 20004	Jack	SJ 5	CM 60	เฉลี่ย
(%)			(กรัม)			
0.00	26.38 a1/	38.67 a	36.13 a	31.37 a	27.44 a	32.00
0.50	19.83 b	5.86 b	4.27 b	1.39 b	0.61 b	6.39
1.00	5.78 c	2.60 b	2.44 b	1.01 b	0.38 b	2.44
1.50	2.29 c	4.20 b	2.61 b	0.76 b	0.41 b	2.05
2.00	2.64 c	2.43 b	3.12 b	0.35 b	0.44 b	1.80
เฉลี่ย	11.39	10.75	9.71	6.98	5.85	8.94

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ0.05
จากการเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)

ตารางที่ 6	แสดงจำนวนชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอที่รอดชีวิตของถั่วเหลือง 5 พันธุ์ที่ความ								
	เข้มข้นเกลือระดับต่าง ๆ และจำนวนที่สามารถชักนำให้เป็นต้นได้								
			ความเข้มข้นเกลือ(เปอร์เซ็นต์)						
พันธุ์	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	-
SJ 5	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CM 60	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-

บทที่ 5

สรุป

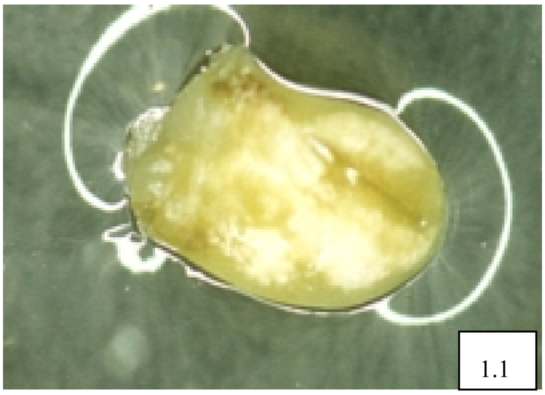
1. พันธุ์ถั่วเหลืองที่มีศักยภาพสูงในการให้โซมาติกเอ็มบริโอปริมาณมากได้แก่พันธุ์ Jack ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุดคือ 87.1 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 28 วัน โดยลักษณะการเกิดของโซมาติกเอ็มบริโอจะเกิดจากเนื้อใบโดยตรง อันดับสองคือพันธุ์ Prolina เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 85.7 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 28 วัน ซึ่งทั้ง 2 พันธุ์เป็นพันธุ์ที่นำมาจากสหรัฐอเมริกา ส่วนพันธุ์ไทยพบว่าสายพันธุ์ KUSL20004 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุดเพียง 48.8 เปอร์เซ็นต์และใช้เวลาชักนำถึง 36 วัน พันธุ์ที่ให้โซมาติกเอ็มบริโอน้อยที่สุดคือพันธุ์ สจ 2 ซึ่งเกิดเพียง 1.6 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาในการชักนำนานถึง 41 วัน

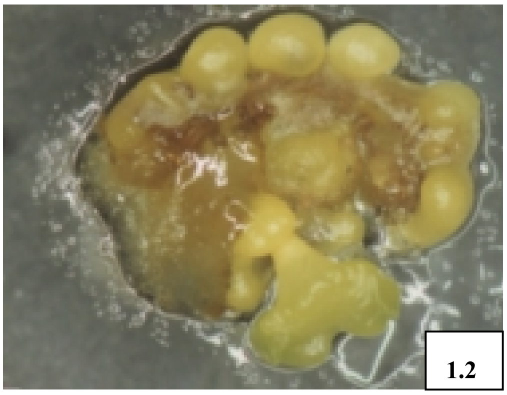
2. การคัดเลือกโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลือง 5 พันธุ์เพื่อให้ทนเค็ม พบว่าเมื่อมีเกลือ NaCl 0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ Prolina เจริญเติบโตดีที่สุด อาหารที่มีเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์พันธุ์ KUSL 20004 เจริญเติบโตได้ดีที่สุดและเมื่อมีเกลือ 2.0 เปอร์เซ็นต์พันธุ์ Jack เจริญเติบโตได้ดีที่สุด

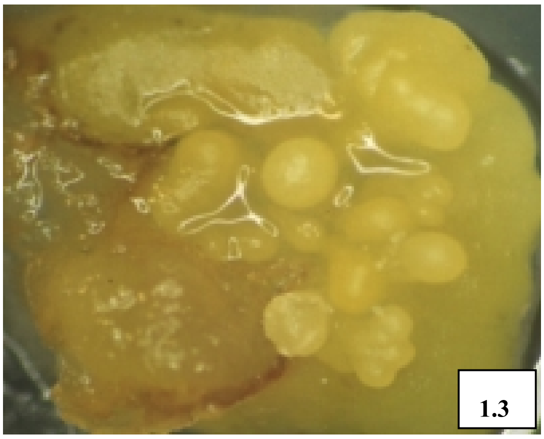
3. การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอซึ่งผ่านการคัดเลือกทนเค็มแล้วให้เป็นต้น พบว่า ที่ความเข้มข้นต่ำ 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำต้นถั่วเหลืองพันธุ์ KUSL 20004 ได้ 1 ต้นจาก 11 ชิ้นส่วน ซึ่งชิ้นส่วนที่เหลือมีการพัฒนาเฉพาะส่วนรากไม่มีการพัฒนาเป็นยอด ส่วนพันธุ์อื่น ๆ ที่โซมาติกเอ็มบริโอสามารถทนเค็มได้ถึงระดับ 2.0 เปอร์เซ็นต์แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ ส่วนพันธุ์ สจ 5 และ เชียงใหม่ 60 ไม่สามารถทนเค็มได้

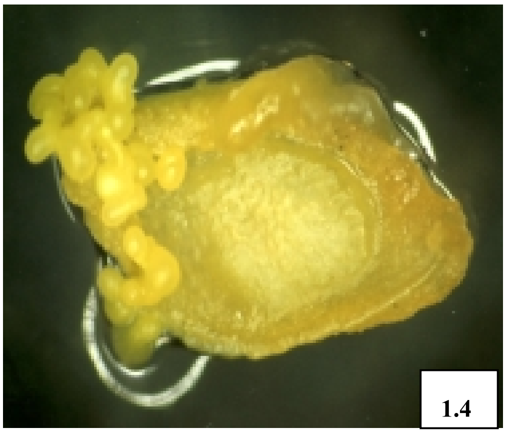
4. ต้นถั่วเหลืองพันธุ์ KUSL 20004 ที่ได้จากการคัดเลือกทนเค็มที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์มีลักษณะต้นผิดปกติ ระบบรากไม่ค่อยพัฒนา เมื่อย้ายปลูกลงดินและเพาะเลี้ยงอนุบาลในตู้เพาะเลี้ยงจนใบจริงใบที่ 2 เริ่มคลี่ ต้นถั่วมีอาการเหี่ยวเฉาจากยอดลงมาและตายในที่สุด นับเวลาจากย้ายปลูกลงดินจนเหี่ยวตายรวมประมาณ 20 วัน จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าต้นที่ได้นี้มีความทนเค็ม เพราะจะต้องทดสอบต่ออีก

ภาคผนวก


1.1

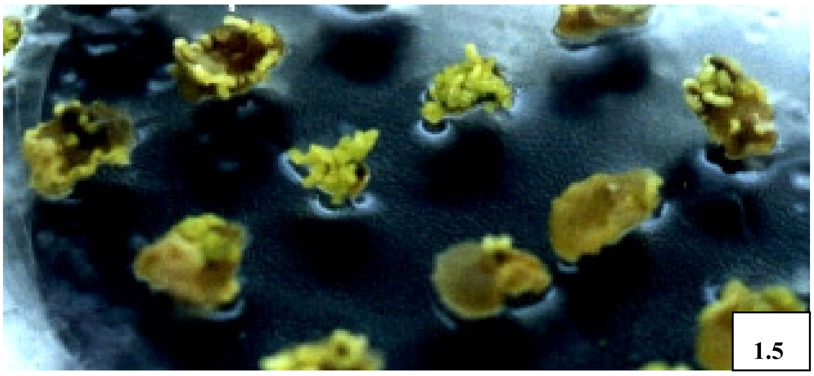

1.2

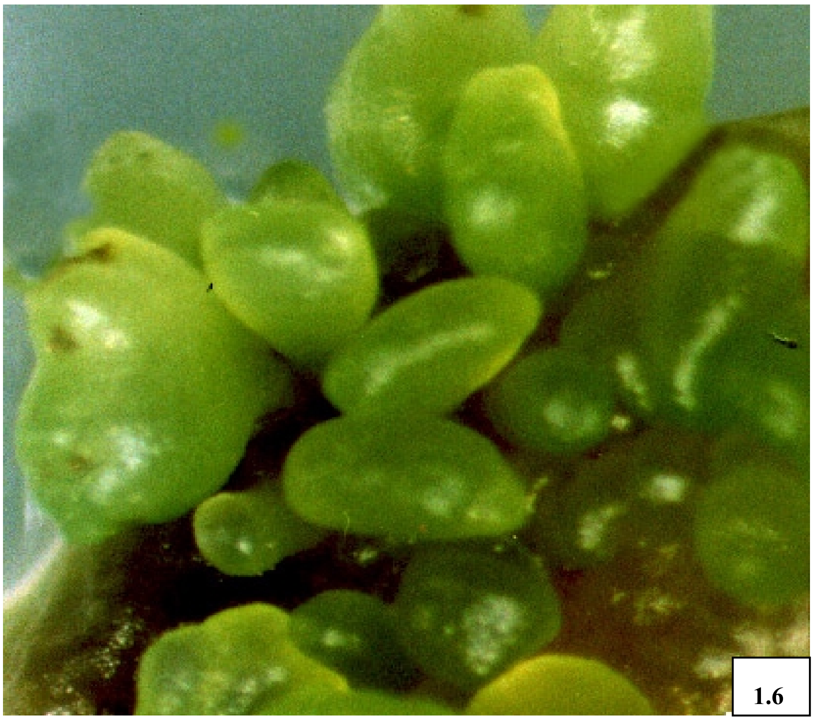

1.3


1.4

รูปที่ 1.1 แสดงใบเลี้ยงอ่อนถั่วเหลืองหลังจากวางเลี้ยงบนอาหารชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ ได้ 1 สัปดาห์

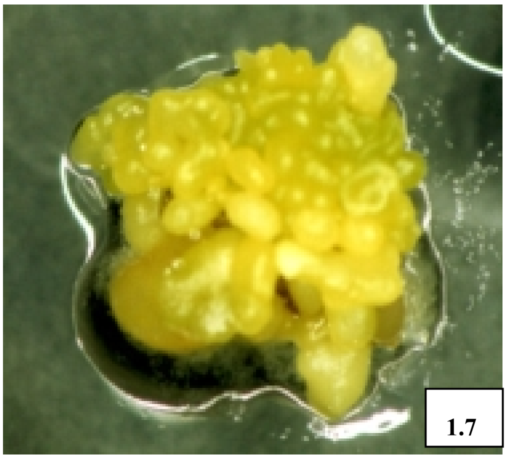
รูปที่ 1.2 – 1.4 แสดงลักษณะการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรงจากแผ่นใบ ของถั่วเหลือง พันธุ์ AGS 292 Prolina และ Jack ตามลำดับ

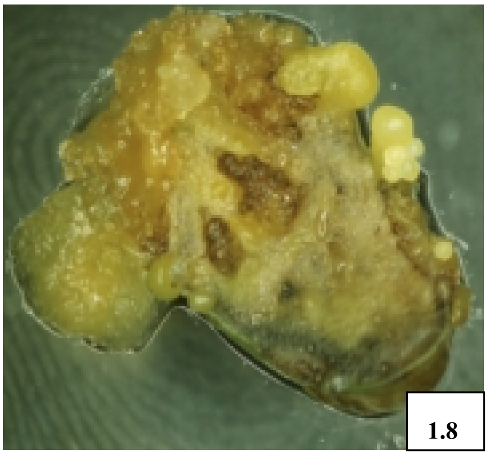

1.5

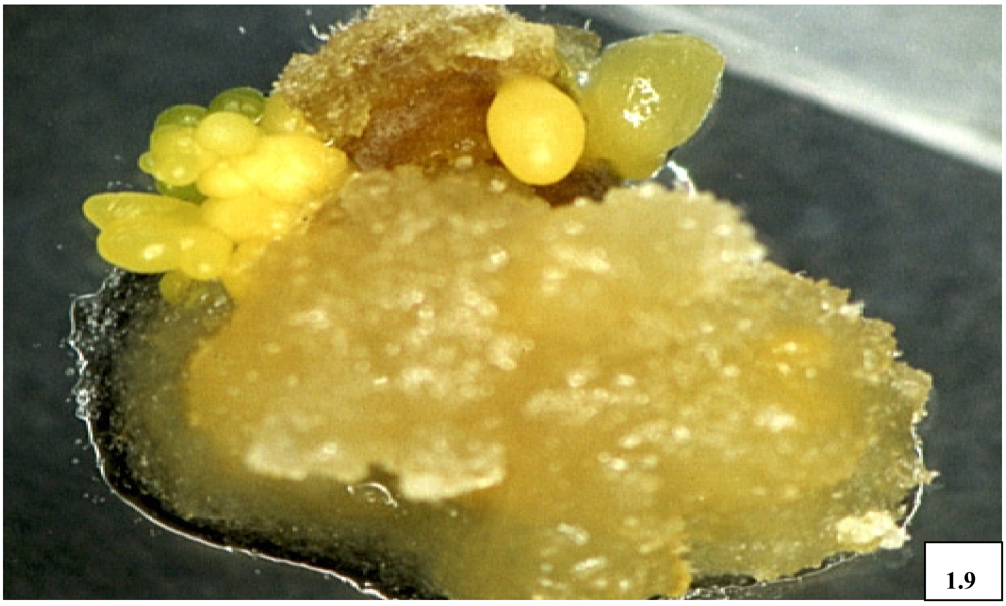

1.6

รูปที่ 1.5 แสดงลักษณะการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลืองพันธุ์ Jack

รูปที่ 1.6 แสดงระยะ heart shape (รูปหัวใจ) ของถั่วเหลืองพันธุ์ Jack



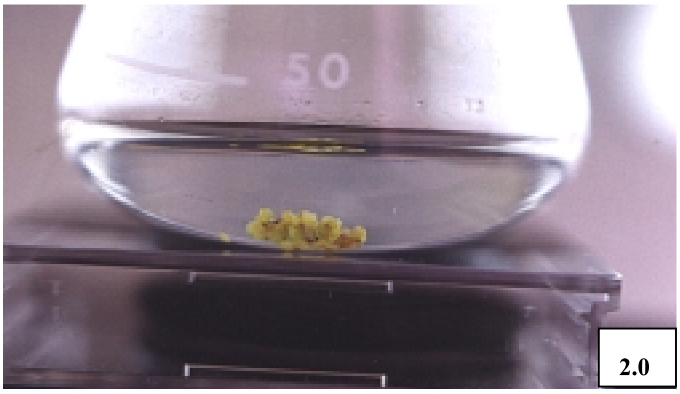




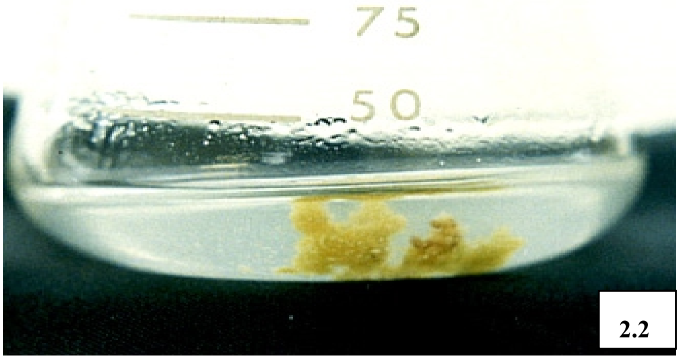
รูปที่ 1.7 แสดงการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอจากแผ่นใบโดยตรงของพันธุ์ Prolina

รูปที่ 1.8 แสดงการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของพันธุ์ สจ 2 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เกิดโซมาติกน้อยที่สุด

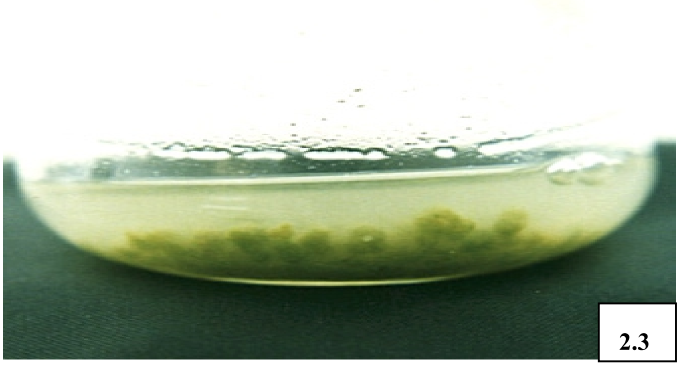
รูปที่ 1.9 แสดงการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของพันธุ์ KUSL 20004 โซมาติกเอ็มบริโอจะเกิดทั้งบนแคลลัสและบนแผ่นใบ



2.0



2.2

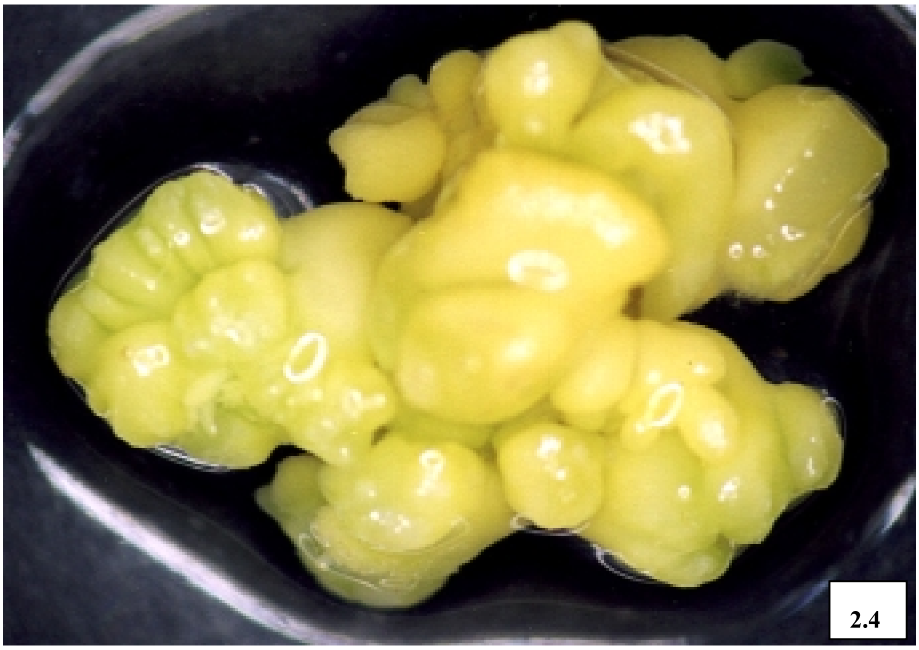


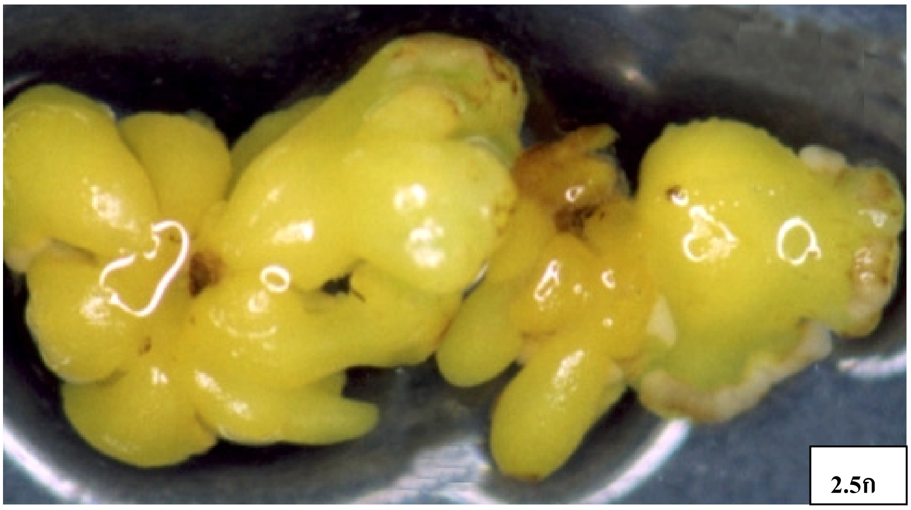
2.3

รูปที่ 2.1 แสดงโซมาติกเอ็มบริโอขณะคัดเลือกทนเค็มเมื่อคัดเลือกได้ 3 วัน

รูปที่ 2.2 แสดงโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ 5 เมื่อคัดเลือกทนเค็มได้ 1 สัปดาห์ โซมาติกเอ็มบริโอมีสีเหลืองมากและพบบางส่วนเริ่มตายเป็นสีน้ำตาล

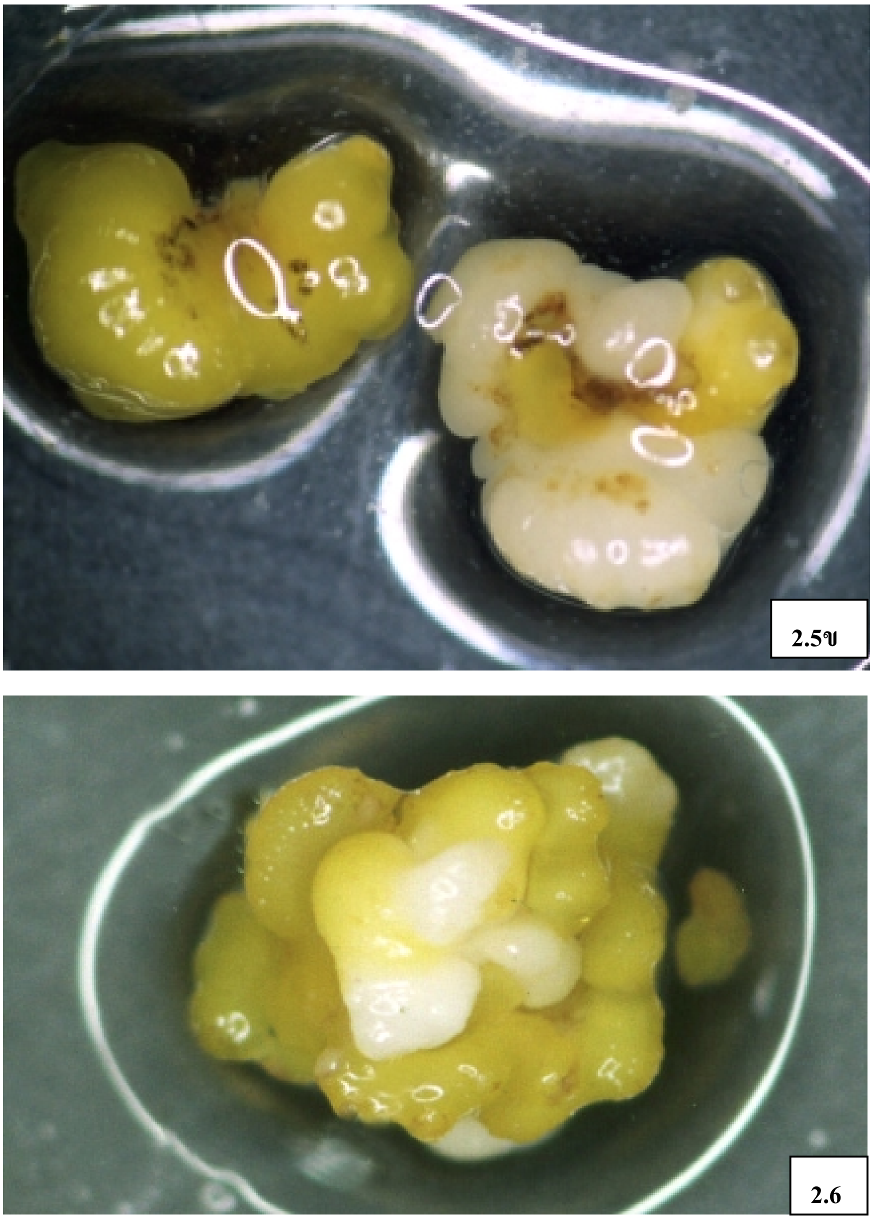
รูปที่ 2.3 แสดงโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลืองพันธุ์ Prolina เมื่อคัดเลือกทนเค็มได้ 1 สัปดาห์ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์มีการเจริญเติบโตดีกว่าพันธุ์อื่น


2.4

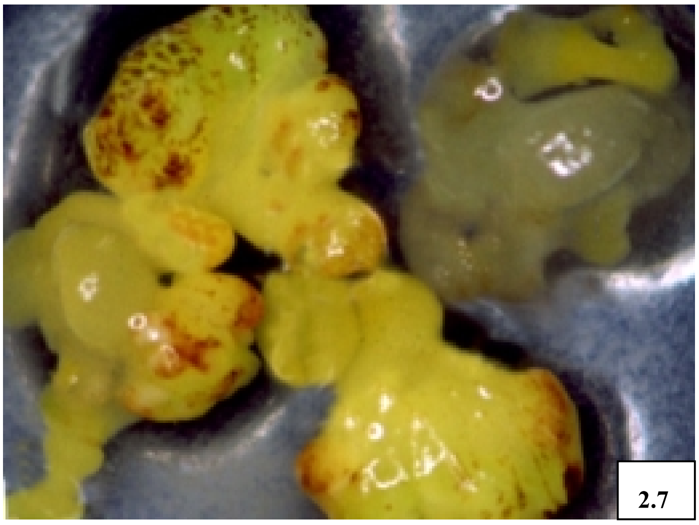

2.5ก

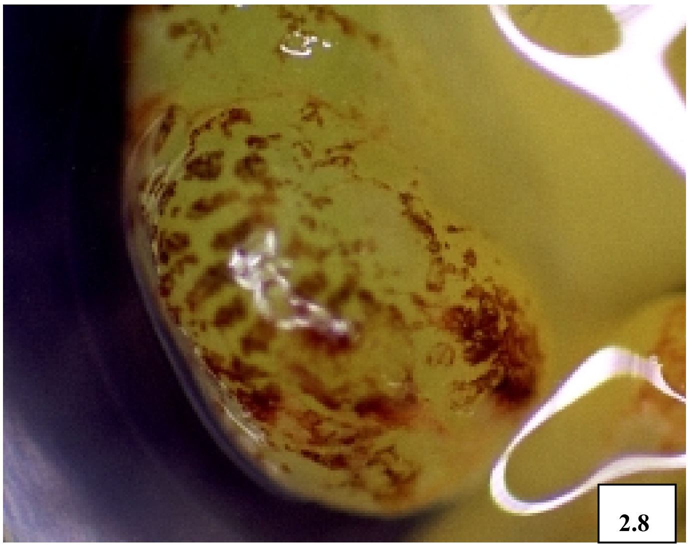
รูปที่ 2.4 แสดงโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลืองพันธุ์ KUSL 20004ในอาหารที่ไม่มีเกลือ หลังจากคัดเลือกทนเค็มได้ 2 สัปดาห์

รูปที่ 2.5ก แสดงโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลืองพันธุ์ KUSL 20004ในอาหารคัดเลือกที่มีเกลือ 0.50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากคัดเลือกทนเค็มได้ 2 สัปดาห์



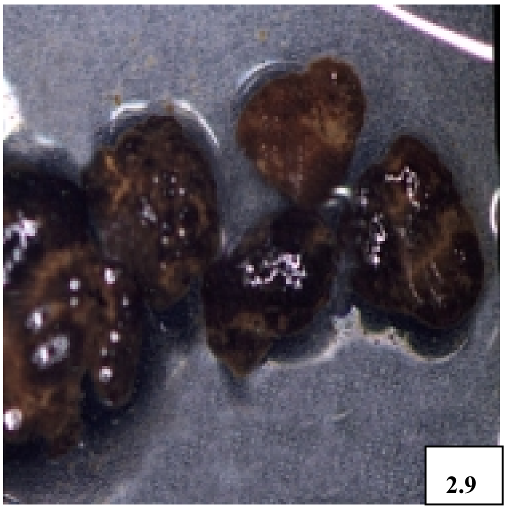
รูปที่ 2.5ข และ 2.6 แสดงลักษณะการถูกทำลายของเนื้อเยื่อโดยเกลือ $NaCl$ ที่ผสมอยู่ในอาหาร จะสังเกตพบว่าชิ้นเนื้อเยื่อส่วนที่ตายจะเปลี่ยนเป็นสีขาวซีด แต่ในชิ้นเดียวกันบางส่วนอาจรอดชีวิตคือยังมีสีเขียวอยู่ ซึ่งอาจพัฒนาต่อไปเป็นกลุ่มเซลล์ที่ทนเค็มได้


2.7

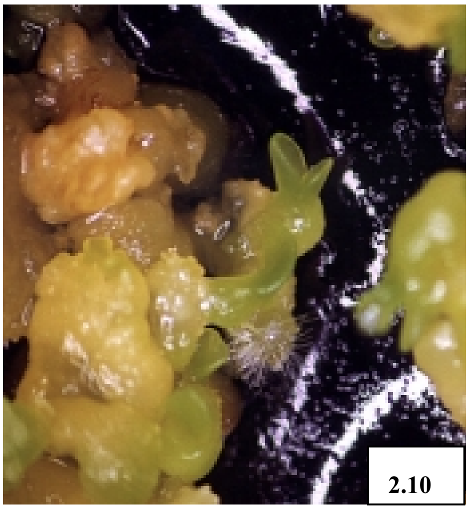

2.8

รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะการถูกทำลายของเนื้อเยื่อถั่วเหลืองโดยเกลือ NaCl ซึ่งจะสังเกตพบได้อย่างชัดเจนเมื่อเปอร์เซ็นต์เกลือสูงขึ้น

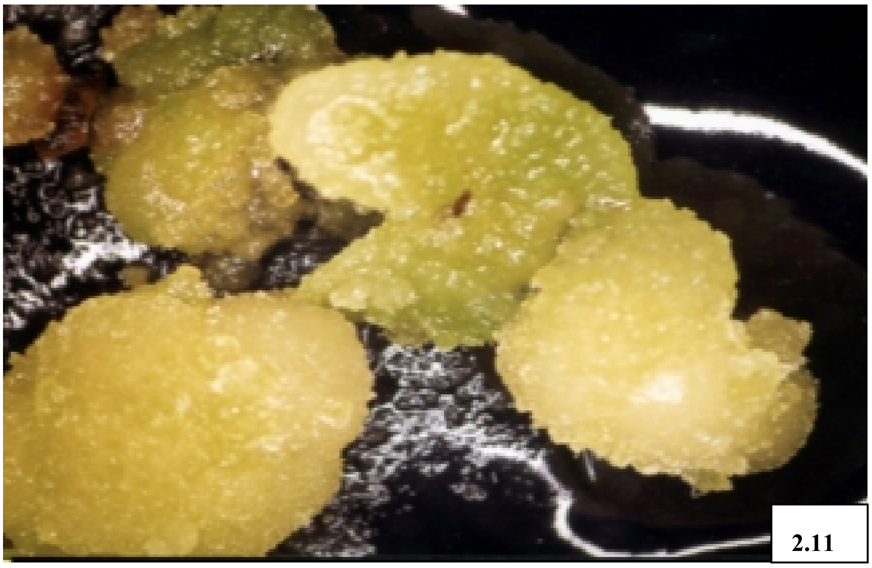
รูปที่ 2.8 แสดงภาพขยายรอยที่เกิดจากการถูกทำลายโดยเกลือ NaCl



2.9



2.10

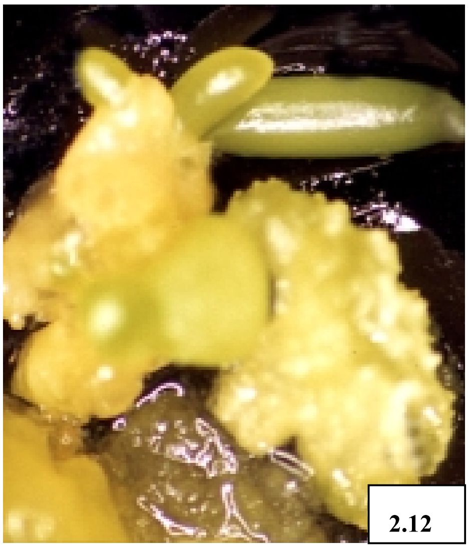


2.11

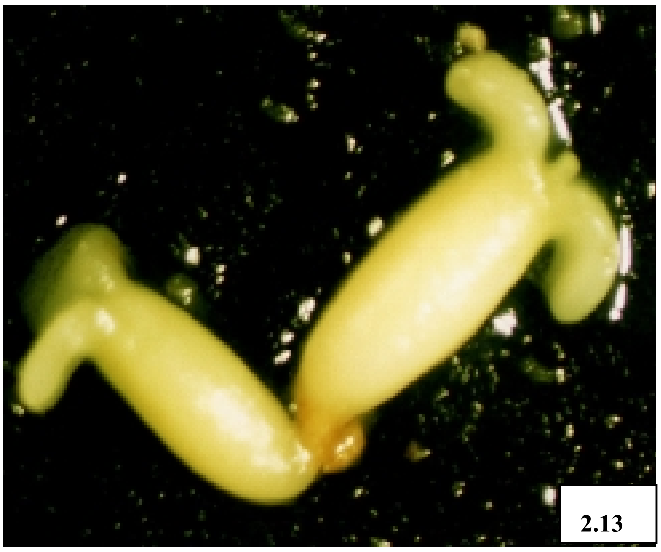
รูปที่ 2.9 แสดงลักษณะชิ้นเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายโดยเกลือ NaCl ในความเข้มข้น 2.00 เปอร์เซ็นต์

รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะชิ้นเนื้อเยื่อที่รอดจากการคัดเลือกทนเค็มแล้วนำมาชักนำให้เกิดเป็นต้น

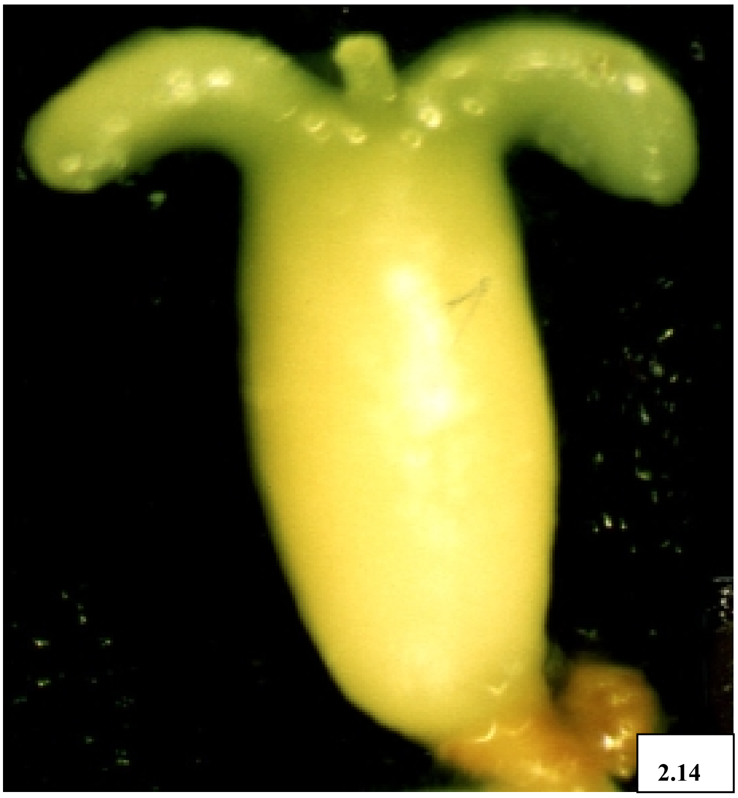
รูปที่ 2.11 แสดงชิ้นเนื้อเยื่อที่รอดจากการคัดเลือกทนเค็ม แต่ไม่สามารถชักนำให้เป็นต้นได้



2.12



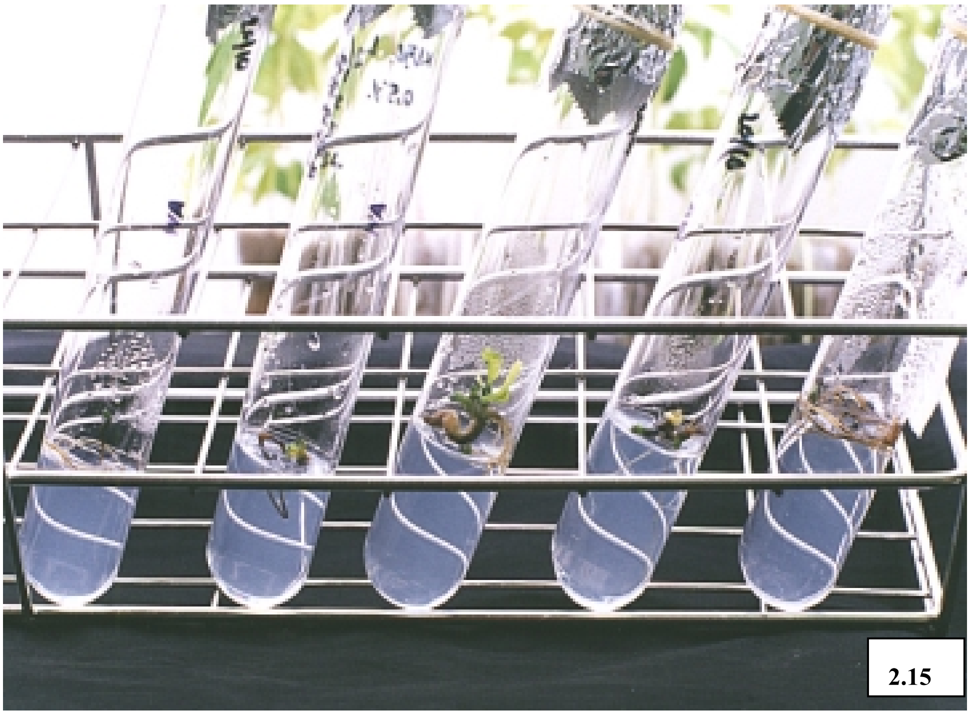
2.13



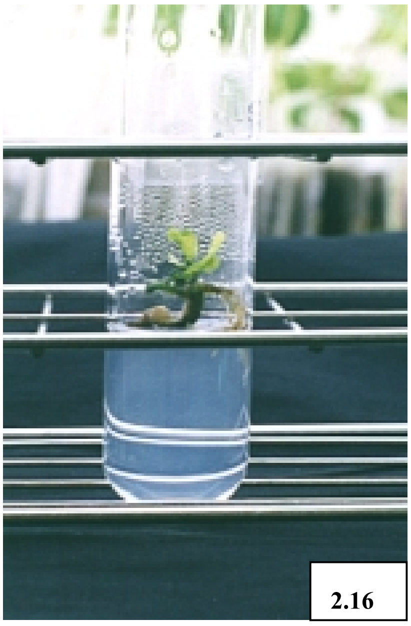
2.14

รูปที่ 2.12 แสดงการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอหลังจากชักนำบนอาหาชักนำต้น

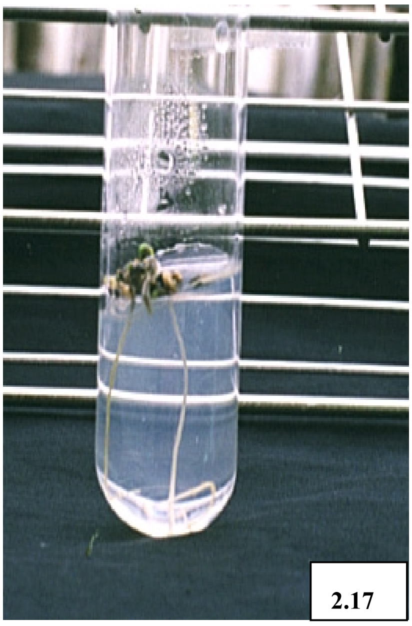
รูปที่ 2.13 และ2.14 แสดงให้เห็นถึงส่วนที่จะพัฒนาไปเป็นยอดทางด้านบนและส่วนที่จะไปเป็นรากทางด้านล่าง



2.15

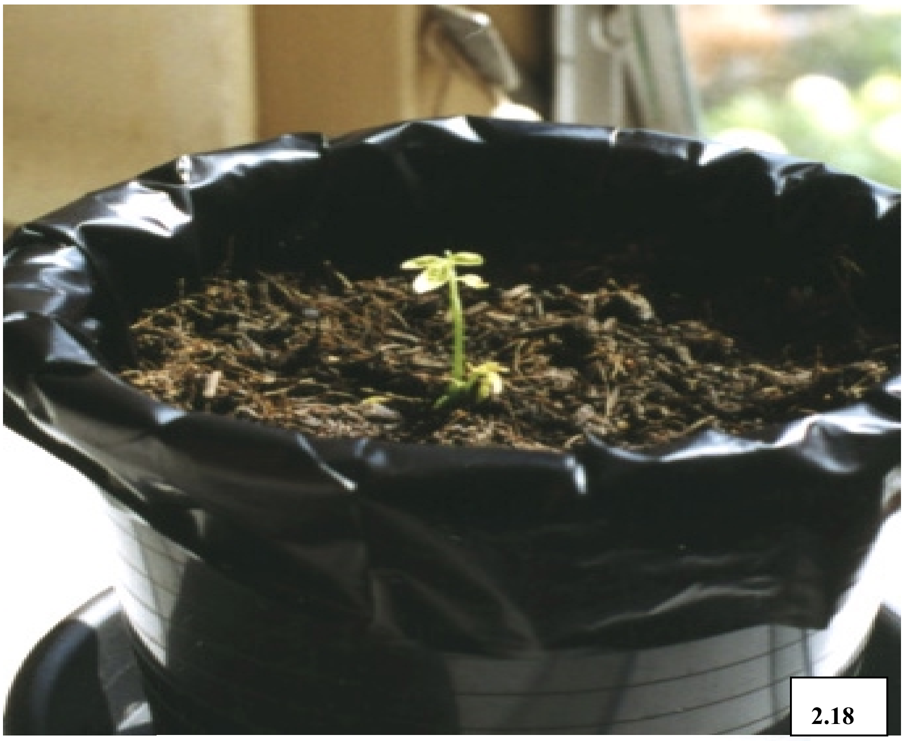


2.16

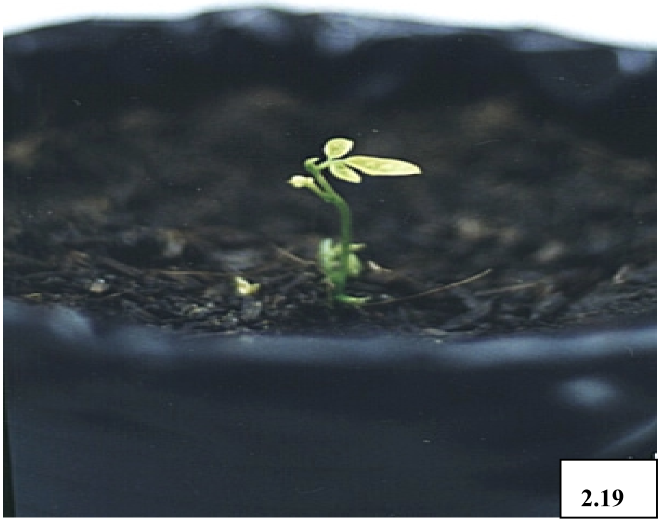


2.17

รูปที่ 2.15 2.16 และ 2.17 แสดงต้นถั่วเหลืองพันธุ์ KUSL 20004 ที่
สามารถชักนำเป็นต้นได้จากการคัดเลือกทนเค็มที่ระดับ 0.50
เปอร์เซ็นต์ ซึ่งชิ้นส่วนอื่นๆมีการพัฒนาเป็นเฉพาะราก

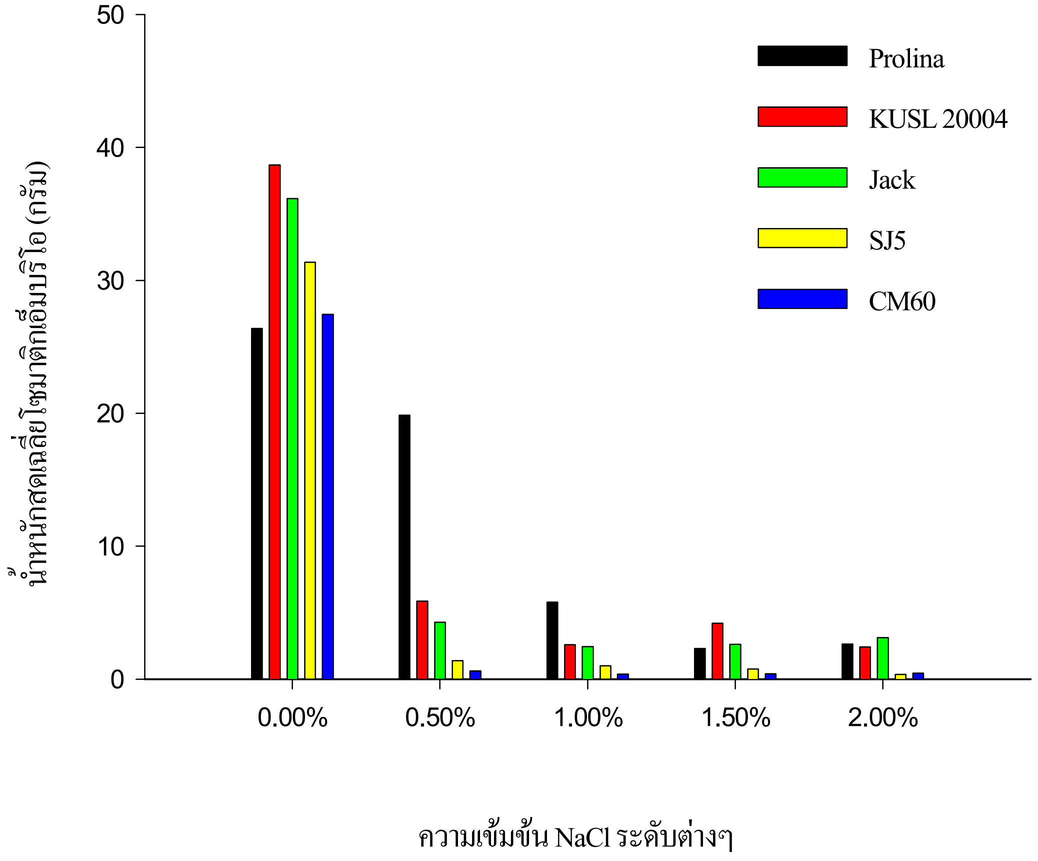


2.18



2.19

รูปที่ 2.18 และ 2.19 แสดงต้นถั่วเหลืองพันธุ์ KUSL 20004 ที่คัดเลือกได้จากความเข้มข้น 0.50 เปอร์เซ็นต์ แต่พบว่ามีลักษณะต้นอวบน้ำผิดปกติ



รูปที่ 3 แสดงน้ำหนักสดเฉลี่ยโซมาติกเอ็มบริโอของถั่วเหลือง 5 สายพันธุ์ ขณะคัดเลือกทนเค็มที่ความเค็มเกลือNaCl 5 ระดับ

หมายเหตุ ข้อมูลจากตารางที่ 5

ตารางผนวกที่ 1 แสดงสูตรการเตรียม stock อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลือง

1. Macronutrient (ปริมาณเป็นกรัมต่อลิตร)

	MS I	**B5II**
NH_4NO_3	16.50	6.00
KNO_3	19.00	19.00
$CaCl_2 . 2H_2O$	4.40	6.00
$MgSO_4.7H_2O$	3.70	3.00
KH_2PO_4	1.70	1.70
KCI	-	3.00

2. Micronutrient (ปริมาณเป็นกรัมต่อลิตร) ให้ปรับปริมาตรใน volumetric flask

	MS I	**B5II**
H_3BO_3	0.6200	0.3000
$MnSO_4.H_2O$	1.6900	1.0000
$ZnSO_4 .7H_2O$	0.8600	0.2000
KI	0.0830	0.0750
$Na_2MoO_4 .2H_2O$	0.0250	0.0250
$CuSO_4 .5H_2O$	0.0025	0.0025
$CoCl_2 .6H_2O$	0.0025	0.0025

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) แสดงสูตรการเตรียม stock อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลือง

3. Vitamin stock (ปริมาณเป็นกรัมต่อลิตร) ให้ปรับปริมาตรใน volumetric flask

	MS I	**SBIII**
Glycine	0.2000	-
Thiamine. HCl	0.0100	1.0000
Nicotinic acid	0.0500	0.1000
Pyridoxine.HCl	0.0500	0.1000
Myo-inositol	10.0000	10.0000

ตารางผนวกที่ 2 แสดงสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงถั่วเหลืองที่เกิดจาก embryogenesis และ organogenesis (ปริมาณเป็นกรัมหรือมิลลิลิตรต่อลิตร)

	MX20	FG	FRCG	FRSG
Sucrose	30	60	-	30
Maltose	-	-	60	-
Glutamine	-	2.192	-	-
MSI	100	100	100	100
MSII	10	10	10	10
SBIII	10	10	10	10
NaFeEDTA	1	1	1	1
2,4-D	200 ml.[1/]	50ml.[1/]	-	-
Agar	2[2/]	-	2[2/]	2[2/]
pH	7	5.7	5.7	5.7

หมายเหตุ 1/ ใช้ 2,4-D stock เข้มข้น 0.1 mg /ml จำนวน 200 ml ต่ออาหาร 1 ลิตร

2/ ใช้ Gelrite 2 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร

รายการอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. (2527). ความรู้เรื่องดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. ฝ่ายเผยแพร่และประชาสัมพันธ์. สำนักงานเลขานุการกรมพัฒนาที่ดิน. กรุงเทพฯ.

กรมวิชาการเกษตร. (2543). รายงานประจำปี 2542 , สถาบันวิจัยพืชไร่.

กรมวิชาการเกษตร. (2544). ผลงานวิชาการประจำปี 2543. เล่ม 2.

ฉันทนา นวนคร. (2536). ความแปรปรวนของถั่วเหลืองพันธุ์ไทยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสในสภาพแขวนลอย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชาญวิทย์ ม่วงมิตร. (2537). การชักนำให้เกิดพันธุ์อ้อยทนเค็มโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พีรนุช การีรส. (2536). การศึกษาพันธุกรรมของการถ่ายทอดลักษณะการเกิดเอ็มบริออยด์ในถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. (2540). สถิติเพื่อการวิจัยและวางแผนการทดลอง. สำนักเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา. 286 น.

ยงยุทธ โอสถสภา. (2524). ดินเค็มและดินโซดิก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

เยาวพา จิระเกียรติกุล. (2536). การชักนำให้หม่อนเกิดการกลายพันธุ์และคัดพันธุ์ทนเค็มโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศศิธร เชื้อกุณะ. (2536). การเพาะเลี้ยงคัพภะของถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมศรี อรุณินท์. (2532). ดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. โครงการพัฒนาพื้นที่ดินเค็ม. กรมพัฒนาที่ดิน. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สิรนุช ลามศรีจันทร์ และวราภรณ์ โรจนศิริวงศ์. (2532). การเกิดต้นถั่วเหลืองในพันธุ์ดอยคำจากโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 22(4): 248-255.

สิรนุช ลามศรีจันทร์, อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์ และ สุมินทร์ สมุทคุปติ์. (2540). ผลของรังสีต่อการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ .

สุภัทรา ศุภเมธี. (2533). การชักนำให้กล้วยเกิดการกลายพันธุ์เพื่อทนเค็มโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อังคณา ศีตะโกเศศ. (2528). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพดเพื่อเพิ่มระดับความเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. (2540). บทปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา. 63 น.

Barwale, U.B., Kern, H.R., and Widholm, J.M. (1986). Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and oganogenesis. **Planta** 167: 473-481.

Buchheium, J.A., Culburn, S.M., and Ranch, J.P. (1989). Mutation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. **Plant Physiol.** 89: 768-775.

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

Christianson, M.L., Warnick, D.A., and Carlson, P.S. (1983). A morphogenetically competent soybean suspension culture. **Science.** 222: 632-634.

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.

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

Ghazi, T.D., Cheema, H.V., and Nabors, M.W. (1986). Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic callus of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Plant Cell Reports** 5: 452-456.

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(5): 699-705.

Hanning, G., and Nabors, M.W. (1989). *In vitro* tissue culture selection for sodium chloride (NaCl) tolerance in rice and the performance of the regenerants under saline condition. Tissue culture for crop project (TCCP) Colorado State University. Fort Collins. Colorado. USA.

Komatsuda, T., and Ko, S.W. (1990). Screening of soybean *Glycine max* (L.) Merrill genotypes for somatic embryo production from immature embryo. **JPN. J. Breed.** 40: 429-452.

Komatsuda, T., and Ohyama, K. (1988). Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Theor. Appl. Genet.** 75: 695-700.

Kumar, V. and Sharma, D.R. (1988). Isolation and characterization of sodium chloride resistant callus culture in *Vigna radiata* (L.) Wilczek *var. radiata.* **J. Exp. Bot.** 40: 143-147.

Lazzeri, P.A., Hildebrand, D.F., and Collins, G.B. (1985). A procedere for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. **Plant Mol. Biol. Reporter** 3: 160-167.

Lazzeri, P.A., Hildebrand, D.F., and Collins, G.B. (1987a). Soybean somatic embryogenesis: effect of hormones and culture manipulations. **Plant Cell. Tiss. Org. Cult .** 10: 197-208.

Lazzeri, P.A., Hildebrand, D.F., and Collins, G.B. (1987b). Soybean somatic embryogenesis: effect of nutritional, physical and chemical factors. **Plant Cell. Tiss. Org. Cult.** 10: 209-220.

Li, B.J., Langridge, W.H.R., and Szalay, A.A. (1985). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill. **Plant Cell Reports** 4: 344-347.

Lin, C.C., and Kao, C.H. (1995). Proline accumulation is associated with inhibition of rice seedling root growth caused by NaCl. **Plant Science.** 114: 121-128.

Lippmann, B. and Lippmann, G. (1984). Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean *Glycine max.* (L.) Merrill **Plant Cell Reports** 3: 215-218.

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., Dryden, G., Vogt, S., Hildebrand, D.F., Collins, G.B., and Williams, E.G. (1988) Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. ***In vitro*** **Cell. Dev. Biol.** 24: 817-820.

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.

Ranch, J.P., Oglesby, L., and Zielinski, A.C. (1985). Plant regeneration from embryo derived tissue cultures of soybeans. ***In vitro*** **Cell. Dev. Biol.** 21: 653-658.

Sellars, R.M., Soutward, G.M., and Phillips, G.C. (1990). Adventitious somatic embryogenesis from cultured immature zygotic embryos of peanut and soybean. **Crop Sci.** 30: 408-411.

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.

Watad, A.A., Swartzberg, D., Bressan, R.A., Izher, S., and Hasegawa, P.M. (1991). Stability of salt tolerance at the cell level after regeneration of plants from a salt tolerant tobacco cell line. **Physiol. Plant.** 83: 307-313.

Winicov, I. (1995). Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated from salt tolerant cell lines. **Plant Science.** 113: 105-111.

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุภาวรัตน์ ชาญยุทธ เกิดเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม พ.ศ. 2517 ที่อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา เริ่มเข้าศึกษาระดับปริญญาตรี ที่สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เมื่อปี พ.ศ. 2536 และ สำเร็จการศึกษาเมื่อปี พ.ศ. 2540 ภายหลังสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี จึงเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโทที่สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี