การผลิตต้นถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ให้ทนเค็มในสภาพหลอดทดลอง

PRODUCTION OF SALT-TOLERANT SOYBEAN CV. SJ.4 THROUGH *In Vitro* CULTURE

ณพวัฒน์ ตั้งสุวงศ์ไท

NOPPAWAT TUNGSUWONGTAI

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2547

ISBN 974 - 15 - 1152 - 3

PRODUCTION OF SALT-TOLERANT SOYBEAN CV. SJ.4 THROUGH

***In Vitro* CULTURE**

NOPPAWAT TUNGSUWONGTAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2004

ISBN 974 – 15 – 1152 - 3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตต้นถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ให้ทนเค็มในสภาพหลอดทดลอง
นักศึกษา	นายณพวัฒน์ ตั้งสุวงศ์ไท
รหัสประจำตัว	42065216
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2547
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร.กนกพร สมพรไพลิน

บทคัดย่อ

การผลิตต้นถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ในสภาพหลอดทดลองโดยเพาะเมล็ดบนอาหารสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร ตัดชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยง และนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MB5 ที่เติม BA 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0 0.002 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่า อาหารสูตรที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้ชิ้นส่วนข้อเกิดยอดปริมาณมากที่สุดเฉลี่ย 6.4 ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ นำยอดจากสูตรอาหารดังกล่าวไปชักนำให้เกิดรากบนอาหารสูตร MB5 ที่เติม IBA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อตรวจสอบระดับความทนเค็มของถั่วเหลืองเมื่อได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับความเข้มข้น 0 - 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ต้นอ่อนถั่วเหลืองในสภาพหลอดทดลองมีค่า LD_{50} ของดัชนีการเจริญเติบโตใน NaCl ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดถั่วเหลืองมีค่า LD_{50} ของการงอกใน NaCl ความเข้มข้น 0.38 เปอร์เซ็นต์ ถั่วเหลืองที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อทนเค็มด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนต้นอ่อนสมบูรณ์เท่ากับ 100 63.83 และ 40.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อตัดชิ้นส่วนข้อจากต้นอ่อนที่มีลักษณะสมบูรณ์ไปชักนำให้เกิดยอด เป็นเวลา 30 วัน พบว่า มีการเกิดยอดเฉลี่ยเท่ากับ 3.47 2.33 และ 1.67 ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ จากนั้นนำยอดไปชักนำให้เกิดราก ส่วนการศึกษาการชักนำให้ถั่วเหลืองเกิดการกลายพันธุ์เพื่อทนเค็มโดยใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS พบว่า ค่าความเข้มข้นของ EMS ที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) เท่ากับ 0.49 เปอร์เซ็นต์ และที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนต้นอ่อนสมบูรณ์เท่ากับ 100 และ 22.88 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ไม่พบต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ด เมื่อตัดชิ้นส่วนข้อจากต้นอ่อนที่มีลักษณะสมบูรณ์ไปชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก เป็นเวลา 30 วัน มีการเกิดจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 3.70 และ 2.35 ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ จากนั้นนำยอดไปชักนำให้เกิดรากสำหรับการทดสอบความทนเค็มของต้นถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ที่ได้จากการทดลอง พบว่า เมื่อนำมา

ทดสอบความทนเค็มบนสูตรอาหาร MB5 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ต้นที่ผ่านการคัดเลือกต้นอ่อนบนอาหารที่เติม NaCl สามารถเจริญบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ได้เพิ่มขึ้นจากการทดลองควบคุม

Thesis Title	Production of Salt-Tolerant Soybean cv. SJ.4 through *In Vitro* Culture
Student	Mr. Noppawat Tungsuwongtai
Student ID	42065216
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2004
Thesis Advisor	Dr. Kanokporn Sompornpailin

ABSTRACT

Production of soybean plant through *in vitro* culture was studied from germinated seeds on MB5 medium supplemented with 11 mg/l BA. Cotyledonary nodes were excised and cultured on MB5 with 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mg/l BA in combination with 0, 0.002 and 0.005 mg/l IBA for 30 days. MB5 with 0.2 mg/l BA and 0.005 mg/l IBA could induce shoot with the highest 6.4 shoots per a piece of explant. The roots were induced from shoots on MB5 at 0.2 mg/l of IBA. The NaCl tolerance of soybean was examined at 0-1.0 % NaCl. The result indicated the maximum tolerant level of growth index at 0.25 % NaCl (LD_{50}). Seed germination indicated that the maximum tolerant level at 0.38% NaCl (LD_{50}). The NaCl tolerance of soybean was induced by imbibing seed in 0, 0.4, and 0.5 % NaCl solution. Seed were transferred on MB5 with 11 mg/l BA with the same concentration of NaCl. The result shown the percentage of normal seedling at 100, 63.83, and 40.43, respectively. Cotyledonary nodes were excised from normal seedling of 0, 0.4 and 0.5 % NaCl medium and cultured on shoot induction medium for 30 days. It was found that the shoot number per explant was 3.47, 2.33, and 1.67, respectively. Then shoots were transferred to root induction medium. The NaCl tolerance induction in soybean was done by soaking seeds in the difference EMS (ethyl methane sulfonate) concentration solution at 25°C for 5 hours and then were transferred on MB5 for 14 days. The results indicated that the maximum degree of 50 % growth reduction (LD_{50}) was 0.49 % EMS. Then NaCl tolerance seeds were imbibed in 0-0.5 % EMS solution at 25°C for 5 hours and then transferred on MB5 medium supplemented with 11 mg/l BA and 0.4 % NaCl for 14 days. The results showed that the number of normal seedlings 100 and 22.88 percent was obtained by imbibing seeds in 0 and 0.1 % EMS solution, respectively. Their cotyledonary nodes were excised and cultured on

shoot induction medium for 30 days. The number of shoots per explant were 3.7 and 2.35, respectively. For NaCl tolerance test, The plantlets obtained from the media with 0 and 0.4 % NaCl were cultured on the MB5 with 0.4 % NaCl. The results showed that the plantlets obtained from the medium with NaCl could have high capability to grow on that MB5 medium than that from NaCl-free medium.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ด้วยคำแนะนำ คำปรึกษา ข้อคิดเห็น และการแก้ไขให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น จากความกรุณาของอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ดร.กนกพร สมพรไพลิน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นวรัตน์ ปานแย้ม กรรมการวิทยานิพนธ์ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกภาควิชา รองศาสตราจารย์ มาลินี ตันติยาภรณ์ กรรมการวิทยานิพนธ์ผู้ทรงคุณวุฒิภายในภาควิชา ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการ และกรรมการในการสอบ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ พี่ ๆ น้อง ๆ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่น้อง ที่ให้กำลังใจ ช่วยเหลือสนับสนุน ในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์

ณพวัฒน์ ตั้งสุวงศ์ไท

สารบัญ

หน้า

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

สารบัญตาราง (ต่อ)

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

สารบัญรูป (ต่อ)

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

พื้นที่ดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีทั้งสิ้น 17.8 ล้านไร่ แบ่งเป็นดินเค็มจัด 1.5 ล้านไร่ดินเค็มปานกลาง 3.7 ล้านไร่ ดินเค็มน้อย 12.6 ล้านไร่ และยังมีพื้นที่ที่มีศักยภาพในการเกิดดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนืออีก 19.4 ล้านไร่ โดยเฉพาะพื้นที่นาข้าวประสบกับปัญหาดินเค็มเป็นผลมาจากการมีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) สูงเกินไป การป้องกันและการแก้ไขปัญหาดินเค็มนั้นทำได้หลายวิธี โดยวิธีการต่าง ๆ เช่น การชะล้างหน้าดินด้วยน้ำ การเพิ่มอินทรียวัตถุในดินโดยใช้ปุ๋ยคอก ปุ๋ยพืชสด และแกลบ เป็นต้น นอกจากนี้การไม่ปล่อยให้พื้นที่ว่างเปล่าโดยการปลูกพืชทนเค็มคลุมดินซึ่งเป็นวิธีทางชีววิทยา เนื่องจากพืชจะช่วยรักษาความชุ่มชื้นบริเวณผิวหน้าดินเพื่อไม่ให้น้ำที่มีเกลือละลายอยู่ใต้ดินระเหย และพาเกลือขึ้นมาตามช่องว่างระหว่างดินมาสะสมบนผิวหน้าดิน ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่ายต่อการจัดการ และต้นทุนการผลิตต่ำ การใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการคัดเลือกถั่วเหลืองที่มีความทนทานต่อดินเค็มโดยใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยแก้ไขปัญหาดินเค็มและพลิกฟื้นพื้นที่เสื่อมโทรมให้เป็นพื้นที่สีเขียว และคืนความชุ่มชื้นให้กับสภาพแวดล้อมได้เป็นอย่างดียิ่งวิธีหนึ่ง ถั่วเหลืองเป็นพืชตระกูลถั่วจึงบำรุงดินได้ค่อนข้างดีนอกจากนี้ยังมีอายุสั้น และมีระบบรากแผ่กระจายไปตามผิวดินและให้ความอุดมสมบูรณ์ต่อดิน เนื่องจากเชื้อไรโซเบียมกับพืชตระกูลถั่วสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ เมื่อส่วนต่าง ๆ ของต้นถั่ว เช่น ราก ลำต้น ใบ และฝักเน่าเปื่อยในดินจะทำให้ในดินมีปริมาณไนโตรเจนและอินทรียวัตถุเพิ่มขึ้นอันเป็นประโยชน์ต่อพืชที่ทำการปลูกร่วมหรือพืชที่ปลูกตามหลัง เมื่อใช้ถั่วเหลืองเป็นปุ๋ยพืชสดโดยการปลูกและไถกลบก่อนการปลูกข้าวบนพื้นที่ดินเค็มเพื่อเพิ่มผลผลิตข้าวตามมา นอกจากนี้ยังเหมาะที่จะปลูกเป็นพืชหมุนเวียนสลับกับปอและข้าวโพดก็ได้ ถั่วเหลืองยังเป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่ดี และเป็นการเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรอีกทางหนึ่ง

เนื่องจากมีรายงานการศึกษาในถั่วเหลือง *(Glycine max* [L.] Merrill) พบว่าต้นถั่วเหลืองจะเจริญเติบโตได้ดีในบริเวณที่ดินมีระดับความเค็มน้อย แต่ดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนั้นพบกระจายอยู่ในแทบทุกจังหวัดโดยมีระดับความเค็มแตกต่างกันจากสูงถึงต่ำ พืชบางชนิดสามารถเจริญได้ในดินที่มีความเค็มต่ำ แต่ในดินที่มีความเค็มมากจะไม่มีพืชขึ้นอยู่ ดังนั้นแนวทางหนึ่งสำหรับแก้ไขปัญหาดังกล่าว คือ การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีลักษณะทนเค็ม โดยชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี และคัดเลือกต้นถั่วเหลืองที่มีลักษณะทนเค็มบนอาหารสังเคราะห์ที่เติม

เกลือโซเดียมคลอไรด์ (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2541 ; พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2542 ; สมศรี อรุณินท์. 2542 ; อรุณศิริ กำลัง. 2525 ; อรุณี ยูวะนิยม. 2542)

วิธีการนี้น่าจะเป็นแนวทางที่ดีต่อการสร้างสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่เป็นประโยชน์สำหรับการเพาะปลูกบนพื้นที่ดินเค็มในส่วนต่าง ๆ ของประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนต้นถั่วเหลืองโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.2 เพื่อศึกษาแนวทางการผลิตต้นถั่วเหลืองที่ทนเค็มโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยสารเคมีร่วมกับการใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.3 เพื่อศึกษาลักษณะการทนเค็มของถั่วเหลืองในสภาพหลอดทดลอง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 การเพิ่มจำนวนต้นถั่วเหลืองโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.3.2 การศึกษาลักษณะการทนเค็มของถั่วเหลืองในสภาพหลอดทดลอง

1.3.3 การชักนำให้ถั่วเหลืองเกิดการกลายพันธุ์

1.3.4 การคัดเลือกต้นถั่วเหลืองที่มีลักษณะทนเค็ม

1.3.5 การทดสอบความทนเค็มของต้นถั่วเหลืองที่ผ่านการคัดเลือกในสภาพหลอดทดลอง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถขยายพันธุ์ และคัดเลือกต้นถั่วเหลืองที่ทนเค็มโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.4.2 สามารถผลิตต้นถั่วเหลืองที่ทนเค็ม

1.4.3 สามารถนำผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำไปเผยแพร่ ปรับปรุง และพัฒนาวิธีการต่อไป

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* [L.] Merrill ชื่อสามัญมีการเรียกต่าง ๆ กันไป เช่น Soya bean Soja bean Chinese pea Manchurian bean และ Soybean ซึ่งชื่อ Soybean เป็นที่รู้จักและยอมรับกันมากที่สุด (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2541) การจำแนกทางวิทยาศาสตร์ (พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2542) เป็นดังนี้

Order..Rosales
Suborder....................................Leguminosinae
Family.......................................Leguminosae
Subfamily..................................Papilionaceae, Fabaceae
Tribe...Phaseoleae
Subtribe....................................Phaseolinae (Glycininae)
Genus..*Glycine* (L.)
Species......................................*max* (Merr.)

ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ซึ่งเป็นถั่วเหลืองที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ เป็นพันธุ์ที่ได้จากการผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ Acadian กับ สายพันธุ์ Tainung 4 (64-104) (เป็นพันธุ์ที่นำมาจากประเทศไต้หวัน) ปลูกคัดเลือกพันธุ์แบบสืบประวัติที่ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงเจริญเติบโตดีติดฝักดก มีลักษณะที่ต้านทานต่อโรคราสนิม เป็นถั่วเหลืองพันธุ์ไม่ทอดยอด โคนต้นสีม่วง ทรงต้นแตกกิ่งปานกลาง ใบมีรูปร่างกว้าง ใบเล็กสั้น สีเขียว ขนที่ใบและลำต้นเป็นสีน้ำตาลอ่อน สูงประมาณ 58 เซนติเมตร เริ่มออกดอกเมื่ออายุ 49 วัน ดอกสีม่วง มีอายุวันเก็บเกี่ยว 99 วัน ขนที่ฝักเป็นสีน้ำตาลอ่อน เปลือกเมล็ดแห้งมีสีเหลืองค่อนข้างจะด้าน ตา (hilum) มีสีน้ำตาล ลักษณะเมล็ดค่อนข้างกลม น้ำหนัก 100 เมล็ด ประมาณ 14 - 15 กรัม เมล็ดมีน้ำมันประมาณ 17.6 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 39 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตเฉลี่ย 250 - 320 กิโลกรัมต่อไร่ (กรมวิชาการเกษตร. 2541)

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การขยายพันธุ์พืชแบบไม่ใช้เพศ เรียกว่า micropropagation คือ การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อเพิ่มจำนวนของพืชที่ยังคงลักษณะเดิมเอาไว้ (clonal propagation) โดยนำชิ้นส่วนของพืชมาขยายพันธุ์ เมื่อแต่ละชิ้นส่วนเจริญ และพัฒนาไปเป็นต้นแต่ละต้นเรียกว่า โคลน (clone) การขยายพันธุ์วิธีนี้มีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถคงพันธุกรรมที่ต้องการไว้ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งสภาพ heterozygous ของลูกผสมชั่วที่ 1 แก้ปัญหาในพืชที่มีการพักตัวเป็นระยะเวลานาน ลดปัญหา juvenile phase ที่ไม่เหมาะสมได้ สามารถเริ่มต้นจากพืชเพียงต้นเดียวได้ ใช้เวลาในการขยายพันธุ์สั้น ลดพื้นที่ แรงงาน และค่าใช้จ่าย (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540 ; Bhojwani and Razdan. 1983) การขยายพันธุ์พืชโดยวิธีนี้แบ่งออกเป็น 2 ขบวนการ ได้แก่ ขบวนการพัฒนาไปเป็นอวัยวะของชิ้นส่วนพืชที่เรียกว่า ออร์แกนโนเจนเนซิส (organogenesis) ซึ่งมี 2 วิธี คือ ไดเรคออร์แกโนเจเนซิส (direct organogenesis) เป็นการเกิดอวัยวะจากชิ้นส่วนพืชนั้นโดยตรง และอินไดเรคออร์แกโนเจเนซิส (indirect organogenesis) เป็นการพัฒนาแคลลัสจากชิ้นส่วนพืชก่อนแล้วจึงจะมีการพัฒนาไปเป็นอวัยวะ (รูปที่ 2.1) (Dixon. 1987) ขบวนการที่ 2 เรียกว่า โซมาติกเอมบริโอเจนเนซิส (somatic embryogenesis) คือ การที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลง และพัฒนาเหมือนการพัฒนาของไข่หลังได้รับการผสม กล่าวคือ เซลล์จะแบ่งตัว และเจริญเป็น เซลล์เดี่ยว (single cell) รูปกลม (globular shape) รูปหัวใจ (heart shape) รูปตอร์ปิโด (torpedo shape) จนกระทั่งเป็น เอ็มบริโอ (embryo) ซึ่งจะเจริญไปเป็นยอด และรากพร้อมกัน โดยปลายข้างหนึ่งของเอ็มบริโอจะเจริญเป็นยอด ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งเจริญไปเป็นราก (รูปที่ 2.2) (ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524) มีปัจจัยหลายประการที่มีอิทธิพลต่อการพัฒนาไปเป็นอวัยวะของชิ้นส่วนพืช เช่น อายุพืช (physiological age) ชนิดของชิ้นส่วนพืช สารควบคุมการเจริญเติบโต แสง อุณหภูมิ สภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งพืชแต่ละชนิดต้องการปัจจัยแตกต่างกันออกไป (Sachs. 1991) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะประสบความสำเร็จได้ นอกจากจะเกี่ยวข้องกับสูตรอาหาร ปัจจัยภายในชิ้นส่วนพืช ปัจจัยภายนอกแล้วยังเกี่ยวข้องกับความสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 กลุ่ม คือ ออกซิน และไซโตไคนินในอาหาร ถ้าอัตราส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินมีอยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสมเนื้อเยื่อจะเจริญเป็นต้น และรากที่สมบูรณ์ แต่ถ้าอัตราส่วนของออกซินสูง ไซโตไคนินต่ำส่งเสริมการเกิดเป็นก้อนแคลลัส และราก ในทางตรงข้ามถ้าอัตราส่วนของออกซินต่ำ ไซโตไคนินสูงส่งเสริมการเกิดยอด (Skoog and Miller. 1957)

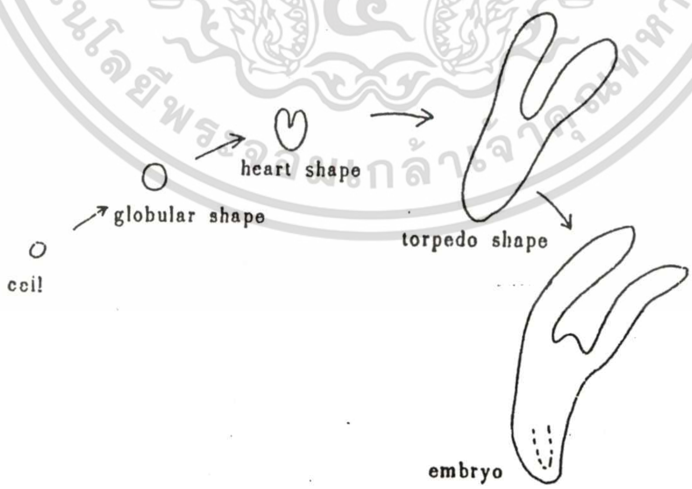
1. ไดเรคออร์แกโนเจเนซิส

Explants ⟶ adventive buds ⟶ regenerated plants

2. อินไดเรคออร์แกโนเจเนซิส

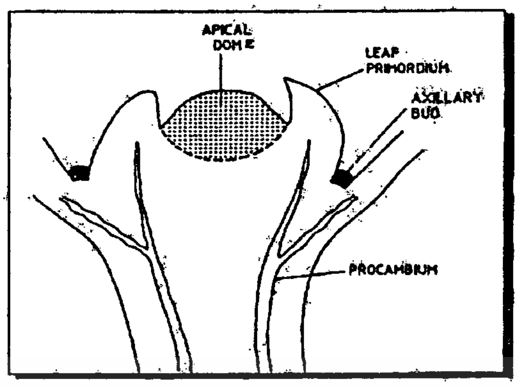
Explants ⟶ callus ⟶ shoots ⟶ rooting ⟶ regenerated plants

รูปที่ 2.1 ไดอะแกรมแสดงกระบวนการออร์แกโนเจเนซิส
ที่มา : สิรนุช ลามศรีจันทร์ (2540)



รูปที่ 2.2 แสดงพัฒนาการของกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส
ที่มา : ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา (2524)

ได้มีการศึกษาวิธีการขยายพันธุ์ของพืชตระกูลถั่วในสภาพปลอดเชื้อ โดยการกระตุ้นให้ชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยง (cotyledonary node) พัฒนาไปเป็นยอดจำนวนมาก สาเหตุที่เลือกชิ้นส่วนนี้ในการขยายพันธุ์เนื่องมาจากยอดที่เจริญมาจากตายอด (apical dome) และตาข้าง (axillary bud) (รูปที่ 2.3) ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อเป็นชนิด adventitious shoot โดยมีการเจริญมาจากเซลล์ชั้น subepidermal parenchyma และยอดที่เกิดใหม่ดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะเกิดความผันแปรทางพันธุกรรมได้ง่าย ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถคัดเลือกลักษณะต่าง ๆ จากความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นได้ (McClean and Grafton. 1989) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นจากชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงของถั่วเหลืองนั้น พบว่าต้องการปัจจัยต่าง ๆ ที่แตกต่างกันไป ดังเช่น ได้มีการศึกษาการกระตุ้นให้เกิดตายอดจำนวนมากที่บริเวณชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงของถั่วเหลืองในอาหารแข็งสูตรดัดแปลงของ B5 (MB5) ที่มีฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 11 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นให้เกิดตายอดจำนวนมากได้(Cheng *et. al.* 1980) นอกจากนี้อาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารแข็งสูตรสูตรดัดแปลงของ MS (MMS) ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อบริเวณมุมระหว่างใบกับกิ่ง (leaf axil) เกิดยอดจำนวนมากได้ และพบว่า เมื่อใส่ IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารแข็งสูตร MMS จะเกิดยอดที่ฉ่ำน้ำ และแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันหลวม ๆ (friable callus) ส่วนในอาหารแข็งสูตร MB5 ที่มีฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดยอดที่สมบูรณ์ และเมื่อใช้ฟรุกโตสแทนน้ำตาลซูโครสทำให้เกิดยอดเพิ่มขึ้น (Saka *et. al.* 1980) อาหารสูตร B5 ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณยอดจากชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงของถั่วเหลืองได้เฉลี่ย 16 ยอดชิ้นส่วนข้อ จากนั้นชักนำยอดให้เกิดรากบนอาหารครึ่งสูตร MS ที่เติมซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ (Sharma and Kothari. 1994) สองปีต่อมาได้มีรายงานว่าเมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงของถั่วเหลืองในอาหารที่มีธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองของสูตร L2 (วิตามินตามอาหารสูตรB5) และเติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด (Kern *et. al.* 1986) ได้มีการศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่มีผลต่อการเกิดยอดในอาหารสูตร MS โดยลดความเข้มข้นของธาตุอาหาร น้ำตาลซูโครส และฮอร์โมน BA พบว่า ธาตุอาหาร และน้ำตาลซูโครสมีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดน้อยมาก แต่ถ้าลดความเข้มข้นของ BA ลงจาก 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีผลยับยั้งการชักนำให้เกิดยอด (Wright *et. al.* 1986) การใช้อาหารสูตรดัดแปลงของ MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน เลี้ยงเมล็ด เอมบริโอ ยอด และรากถั่วเหลือง พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้หลายยอด โดยที่จำนวนยอดหรือจำนวนตายอดที่เกิดขึ้นใหม่นี้แปรผันตามความเข้มข้นของไซโตไคนินที่ใช้ (Hisajima *et. al.* 1986)



รูปที่ 2.3 แสดงชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยง ประกอบไปด้วยตายอด (apical dome) และตาข้าง (axillary bud)

ที่มา : Novak (1990)

2.3 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีประโยชน์มหาศาล ตัวอย่างของประโยชน์ที่นำไปใช้ทางด้านเภสัชกรรม คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร ซึ่งอาจสร้างสารตัวยาได้มากกว่าในธรรมชาติ เช่น ที่ประเทศอินเดียได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมะระแล้วสกัดเอาอินซูลินมารักษาโรคเบาหวานได้สำเร็จ ซึ่งก่อนหน้านี้สกัดอินซูลินได้จากตับสัตว์เพียงอย่างเดียว ส่วนประโยชน์ทางด้านการเกษตร คือ ทำให้ได้พืชปราศจากโรค และใช้ในการขยายสายพันธุ์พืชทำให้ได้ต้นพืชเป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว ต้นที่ได้จะมีลักษณะเหมือนต้นเดิมทุกประการ นอกจากนี้ยังใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น ทำการเพาะเลี้ยงละอองเกสร หรือ อับละอองเกสรของพืชแล้วให้สารโคลชิซีน (colchicine) เพื่อให้ได้เป็นต้นพันธุ์แท้ (homozygous diploid) ใช้เป็นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป ประการสุดท้าย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในขวดนี้ยังใช้เป็นวิธีการเก็บรวบรวมพันธุ์พืชได้เป็นอย่างดี สามารถส่งไปแลกเปลี่ยนพันธุ์กับต่างประเทศได้สะดวก (อรดี สหวัชรินทร์. 2526 ; Street. 1973)

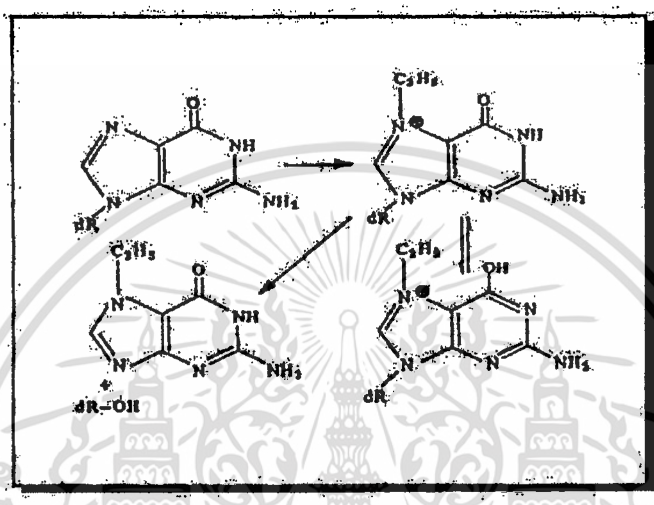
2.4 การชักนำให้พืชเกิดการกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ คือ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของเซลล์ การกลายพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับการสูญหายไปของยีน หรือ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในยีน เรียกว่า การกลาย

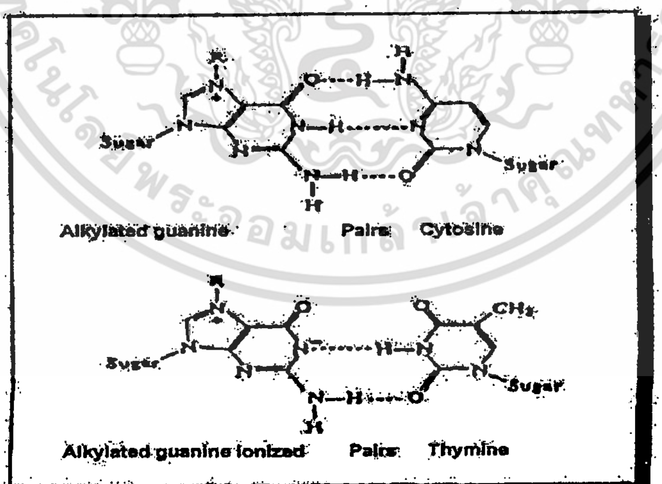
พันธุ์ของยีน (gene mutation) ส่วนการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซม การสูญหายไป หรือ การเข้ามาของส่วนของโครโมโซมที่ครอบคลุมมากกว่าหนึ่งยีน เรียกว่า การกลายพันธุ์ของโครโมโซม (chromosome mutation) (สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2540) การกลายพันธุ์ของพืชเกิดขึ้นได้ 2 วิธี คือ เกิดเองตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) ซึ่งเกิดขึ้นในอัตราค่อนข้างต่ำ และโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation) โดยสิ่งก่อกลายพันธุ์ซึ่งแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagen) ได้แก่ รังสีแกมมา รังสีเอ็กซ์ รังสีอุลตราไวโอเลต และอนุภาคนิวตรอนโดยจะก่อให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม และสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagen) ได้แก่ สารเคมีต่าง ๆ ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ DNA เช่น ethyleneimine (EI) ethyl methanesulfonate (EMS) N-nitroso-N-methyl urethane (NMUT) N-nitroso-N-ethyl urethane (NURT) N-nitroso-N-ethyl urea (NEU) และ base analogues เช่น 5-bromo-uracil (5-BU) (Sigurbjornsson. 1983) นอกจากนี้ยังมีสารเคมีอีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นสารอัลคาลอยด์ที่สกัดจากหัวหรือเมล็ดของโคลชิคัม (*Colchicum autumnale* Linn.) และดองดึงส์ (*Gloriosa superba* Linn.) คือ สารโคลชิซีน (colchicine) เป็นสารเคมีที่จัดไว้ในกลุ่มเมตะเฟสพอยซัน (metaphase-poison) มีผลทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมโดยขัดขวางการเกิดของเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) และขัดขวางการแยกจากกันของโครโมโซมโดยการเข้ารวมตัวกับองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนของไมโครทิวบิวส์ (microtubules) ทำให้โครโมโซมไม่ถูกดึงแยกไปคนละขั้วของเซลล์ในระยะแอนนาเฟส (เอกรินทร์ สายฟ้า. 2525) มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ (Narin and Raina. 1975) ทำให้ต้นพืชมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า (Kumar. 1952 ; Sucharit and Surathin. 1993) หรือเกิดโพลีพลอยด์ (polyploid) (Eigsti. 1949) ทำให้พืชมีลักษณะแตกต่างจากพันธุ์เดิม คือ ทำให้พืชมีใบหนา และใหญ่ ดอกใหญ่ และสีเข้ม ผล เมล็ด ละอองเกสร และส่วนอื่น ๆ ของลำต้นมีขนาดใหญ่กว่า และมีความเป็นหมันมากกว่า (Elliott. 1958)

การชักนำให้พืชเกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS (ethyl methane sulfonate) ซึ่งเป็นสารเคมีในกลุ่มแอลคิเลติงเอนเจนต์ (alkylating agent) มีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ $C_3H_8O_3S$ เป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีความหนาแน่น (กรัมต่อมิลลิลิตร) เท่ากับ 1.206 มีจุดเดือดเท่ากับ 85-86 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 10 มิลลิเมตรปรอท มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 124.16 ละลายในน้ำได้ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ มีหมู่เอทิล (ethyl group) คือ C_2H_5 ซึ่งจะถูกถ่ายให้กับโมเลกุลของ DNA ในปฏิกิริยาแอลคิเลชั่น (alkylation) EMS สามารถเข้าทำปฏิกิริยาแอลคิเลชั่นกับเบสพิวรีน และไพริมิดินรวมทั้งหมู่ฟอสเฟตของ DNA โดยการเข้าแทนที่คู่เบส (single base substitution) ในตำแหน่ง N-7 ของเบสกัวนิน (G) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาแอลคิเลชั่นมากที่สุด (รูปที่ 2.4) โดยหมู่เอทิลของ EMS เข้ามาอยู่ในโมเลกุลของเบสกัวนินทำให้คุณสมบัติในการเกิดไอออไนเซชันแตกต่างไปจากเบสกัวนินที่ปกติ ซึ่งภายหลังการทำปฏิกิริยาแล้วกลายเป็น 7-เอทิลกัวนิน (7-ethylguanine)

สามารถจับคู่กับเบสไทมิน (T) ได้นำไปสู่การเกิดการกลายพันธุ์ชนิดทรานซิชันได้ (G ≡ C → A = T) (รูปที่ 2.5) (IAEA. 1977 ; IAEA. 1990) เช่น การทดลองแช่เมล็ดถั่วเหลืองด้วยสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะของการไม่เกิดปมบนรากของถั่วเหลืองพันธุ์ Bragg มีอัตราการงอกประมาณ 2.8 เปอร์เซ็นต์ (Carroll *et. al.* 1986)



รูปที่ 2.4 หมู่เอทิลเข้าไปจับที่ตำแหน่ง N-7 ของกัวนิน (guanine)
ที่มา : สิรนุช ลามศรีจันทร์ (2540)



รูปที่ 2.5 การจับคู่ของแอลคิเลดเตดกัวนิน (alkylated guanine) กับไซโตซีน (cytosine) [บน] และการจับคู่ของรูปแอลคิเลดเตดกัวนินไอออไนซ์ (alkylated guanine ionized) กับไทมิน (thymine) [ล่าง]
ที่มา : สิรนุช ลามศรีจันทร์ (2540)

2.5 ความหมายของดินเค็ม

ดินเค็ม (saline soil) คือ ดินที่มีปริมาณเกลือที่ละลายน้ำได้มากเกินไปจนเป็นอันตรายต่อพืช มีค่าเปอร์เซ็นต์เกลือสูงกว่า 0.12 และมีค่าพีเอชสูงกว่า 8.5 เมื่อเทียบระดับความเค็มเป็นค่าเปอร์เซ็นต์เกลือ สามารถแบ่งการตอบสนองของพืชต่อความเค็มได้ดังนี้ (สมศรี อรุณินท์. 2542)

0.00-0.12 เปอร์เซ็นต์เกลือ ความเค็มไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชทุกชนิด

0.12-0.25 เปอร์เซ็นต์เกลือ ความเค็มมีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชที่อ่อนแอต่อความเค็มบางชนิด ได้แก่ ถั่วต่าง ๆ เช่น ถั่วเขียว ถั่วฝักยาว ถั่วเหลือง เป็นต้น

0.25-0.50 เปอร์เซ็นต์เกลือ ความเค็มมีผลต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของพืชหลายชนิด ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง หม่อน ชมพู่ เป็นต้น

0.50-1.00 เปอร์เซ็นต์เกลือ พืชทนเค็มเท่านั้นจะเจริญเติบโต และให้ผลผลิตได้ ได้แก่ ดอกคำฝอย ฝ้าย หน่อไม้ฝรั่ง เป็นต้น

มากกว่า **1.00** เปอร์เซ็นต์เกลือ พืชทนเค็มจัดหรือชอบเกลือเท่านั้นจะเจริญเติบโต และให้ผลผลิตได้ส่วนมากจะเป็นวัชพืชชอบเกลือ ได้แก่ ชะคราม หนามแดง โกงกาง จาก เป็นต้น

2.6 การทนเค็มของพืช

พืชทนเค็ม (halophytes) หมายถึง พืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนบริเวณดินที่มีเกลือความเข้มข้นสูง พืชเหล่านี้ปรับตัวได้อย่างรวดเร็ว ตลอดช่วงการเจริญเติบโต แต่พืชไม่ทนเค็ม (glycophytes) หมายถึง พืชที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนบริเวณดินที่มีเกลือความเข้มข้นสูง แต่สามารถปรับตัวได้บ้างในบางสภาพที่มีความเค็มน้อย ตัวอย่างพืชที่มีความทนทานต่อความเค็มแตกต่างกัน เช่น ข้าว ข้าวโพด สามารถทนเค็มได้ในระดับความเค็มที่ 0.25 – 0.50 เปอร์เซ็นต์เกลือโดยประมาณ ส่วนพืชที่มีความสามารถทนเค็มได้ที่ระดับความเค็มสูงกว่า 1.00 เปอร์เซ็นต์เกลือโดยประมาณ แทบจะไม่มีพืชขึ้นเลย มีเพียงวัชพืชชอบเกลือบางชนิด เช่น ชะคราม หนามแดง หนามปี แสม โกงกาง จาก เป็นต้น (Flowers *et. al.* 1982) ในพืชบางชนิดที่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในระดับความเค็มสูง เพราะมีกลไกในการทนเค็มต่างกับวัชพืชชนิดอื่น ๆ (สมศรี อรุณินท์. 2542) ดังนี้

2.6.1 หลีกเลี่ยงการสะสมเกลือในไซโตรพลาสซึมในปริมาณที่เป็นพิษโดยการมีต่อมเกลือ (salt gland) หรือเคลื่อนย้ายเกลือไปสะสมในแวคคิวโอล

2.6.2 สร้างเอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีความสามารถในการทนทานต่อความเข้มข้นของเกลือสูงได้

2.6.3 โดยการดูดเกลือเข้ามาสะสมในบริเวณราก หรือ ลำต้น

2.6.4 โดยการเพิ่มปริมาณน้ำภายในเซลล์ทำให้ความเข้มข้นของเกลือภายในเซลล์ลดลง

2.6.5 รากพืชสามารถที่จะแทรกตัวในดินที่เป็นแผ่นทึบได้ หรือรากพืชจะหลีกเลี่ยงบริเวณที่มีความเค็มสูง เช่น จะอยู่บริเวณผิวดิน ถ้าดินชั้นล่างเค็ม

2.6.6 รากพืชจะไม่ดูดเกลือ แต่จะดูดเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำเข้าไป

2.6.7 สร้างสารเคลือบใบ สร้างใบให้หนาขึ้น เพื่อเก็บน้ำไว้ใช้

2.7 ผลของความเค็มที่มีต่อพืช

พืชที่ขึ้นในดินเค็มโดยมากมักพบตายเป็นหย่อม ๆ เจริญเติบโตช้า ต้นแคระแกรน การเจริญเติบโตของพืชที่อยู่ในแปลงไม่สม่ำเสมอกัน อาการที่พบส่วนใหญ่ขนาดใบเล็กลง และใบสีเขียวเข้มกว่าปกติ ใบหนาหรือมีอาการอวบน้ำ ใบกรอบ ใบกระด้าง ใบไหม้จากปลายใบมายังโคนใบ ใบแก่จะไหม้ก่อนใบอ่อน และยังไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ ทำให้โครงสร้าง ลำต้น ราก เปลี่ยนแปลง ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และยังพบว่ามีผลต่อการสังเคราะห์แสงของพืชด้วย ความเค็มยังมีผลทำให้พืชเกิดอาการขาดน้ำ ถึงแม้จะมีน้ำแต่พืชดูดไปใช้ไม่ได้เนื่องจากมีแรงดันออสโมติคที่แปรตามความเค็ม ถ้าความเค็มสูงขึ้นแรงดันออสโมติคก็สูงขึ้นด้วย พืชยิ่งดูดน้ำน้อยลง นอกจากนี้อันตรายจากธาตุโซเดียมยังมีผลทำให้โครงสร้างของดินเลว ดินแน่น รากพืชชอนไชไปได้ยาก (สมศรี อรุณินท์. 2542 ; Frankenberger and Bingham. 1982 ; Miller. 1986 ; Van Hoorn. 1971)

2.8 ผลกระทบจากเกลือที่มีต่อพืชในระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ

พืชชนิดต่าง ๆ จะมีความสามารถในการทนเค็มไม่เท่ากันแล้ว พืชแต่ละชนิดก็มีระยะของการเจริญเติบโตแต่ละช่วงที่ทนเค็มต่างกันอีกด้วย โดยจะแยกไปตามระยะการเจริญเติบโต (สมศรี อรุณินท์. 2542) ดังนี้

2.8.1 ระยะเมล็ดงอก ความเค็มมีผลทำให้เมล็ดงอกช้ากว่าปกติ และมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกลดลง ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และระดับความเค็มที่ต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามใบพืชที่งอกออกมาเองบางชนิดจะไม่แสดงอาการหรือมีอาการน้อยมาก เนื่องจากพืชอาศัยอาหารที่มีอยู่ภายในเมล็ดพืช เพื่อใช้ในการงอก

2.8.2 ระยะกล้าอ่อน ในระยะนี้พืชจะได้รับผลกระทบจากความเค็มมาก และมีเปอร์เซ็นต์การตายสูง

2.8.3 ระยะก่อนออกดอก เป็นระยะที่มีความสามารถในการทนเค็มสูง การเจริญเติบโตน้อยมาก พืชจะแสดงอาการให้เห็น คือ ปลายใบไหม้ และม้วน

2.8.4 ระยะออกดอก ความเค็มมีผลต่อการเจริญของเกสรตัวผู้ ทำให้ผลการผสมเกสรติดลดลง เปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบสูง เป็นผลให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก

2.8.5 ระยะเก็บเกี่ยว ในระยะนี้จะไม่ค่อยได้รับผลกระทบโดยตรง แต่ผลที่เกิดขึ้นเป็นผลกระทบที่ได้รับก่อนระยะนี้

2.9 การศึกษาการคัดเลือกพืชเพื่อให้ได้ลักษณะทนเค็ม

การคัดเลือกพืชเพื่อให้ได้ลักษณะพืชทนเค็มนั้นมีจุดประสงค์ เพื่อหาพืชที่มีความทนเค็มมากที่สุด และนำพืชนั้นไปใช้ประโยชน์ต่อไป วิธีการที่ใช้คัดเลือกพืชทนเค็ม ดังเช่น การทดลองของ Abel and MacKenzie (1964) ได้ศึกษาการงอกของถั่วเหลือง 6 สายพันธุ์บนดินที่ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ซึ่งมีความเข้มข้น 6 ระดับ พบว่าที่ความเข้มข้นสูงที่สุด คือ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ความสามารถในการทนเค็มของถั่วเหลืองทั้ง 6 สายพันธุ์อยู่ในช่วง 10-20 เปอร์เซ็นต์ ของสิ่งทดลองควบคุม ในปี ค.ศ. 1986 Weil and Khalil ได้รายงานการงอกของถั่วพู และถั่วเหลือง 2 สายพันธุ์บนดินที่ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6 ระดับ พบว่าการงอกของถั่วเหลืองสายพันธุ์ Jackson Lee และถั่วพู ที่เกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ คือ 14 56 และ 28 เปอร์เซ็นต์ของสิ่งทดลองควบคุมตามลำดับ และวัดการเจริญเติบโตของต้นอ่อนด้วยการหาน้ำหนักแห้ง พบว่า ถั่วเหลืองสายพันธุ์ Lee และถั่วพู มีน้ำหนักแห้ง 33.3 เปอร์เซ็นต์ของสิ่งทดลองควบคุม ส่วนสายพันธุ์ Jackson ไม่มีการเจริญเติบโต ต่อมาในปี 2000 Yi and Tian ศึกษาการงอกของเมล็ดถั่วเหลือง 11 สายพันธุ์ ในเวอร์มิคูไรต์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์จากนั้นนำต้นอ่อนมาเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารสูตรของ Hoagland ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ บันทึกผลการงอกหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน พบว่า ความทนเค็มทำให้มีการสร้างโพรลีนในต้นกล้าและในใบพืชเพิ่มขึ้นจึงวัดความสามารถในการทนเค็มของถั่วเหลืองโดยพิจารณาจากการวัดระดับโพรลีนในต้นอ่อนของถั่วเหลืองทั้ง 11 สายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ T5 มีปริมาณโพรลีนสูงสุดเท่ากับ 441.2 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ขณะที่ อรุณศิริ กำลัง (2525) ได้ศึกษาการงอกของถั่วเหลือง 4 สายพันธุ์ คือ สจ.1 สจ.2 สจ.4 และวิลเลียม บนดินที่ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 0.1 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงในดินที่ปลูกถั่วเหลืองทำให้เปอร์เซ็นต์การงอก ความสูงของต้นกล้า น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และความยาว

รากลดลง และพบว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.1 มีแนวโน้มว่าจะทนต่อความเค็มได้ดีกว่าอีก 3 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ต่อมาในปี ค.ศ. 1992 Johnson and Smith ได้ทดสอบการทนเค็มของเมล็ด alfalfa 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ Regent-S เป็นสายพันธุ์ที่ได้มาจากการพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ จากนั้นนำไปปลูกในสภาพธรรมชาติเพื่อเก็บเมล็ด และสายพันธุ์พ่อ แม่ คือ สายพันธุ์ Saranac เลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0.00 0.15 0.30 0.45 และ 0.60 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 42 วัน วัดการเจริญเติบโตของต้นอ่อนโดยการหาน้ำหนักแห้ง พบว่า ต้นอ่อนจากสายพันธุ์ Regent-S ทุกระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์มีน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกับสิ่งทดลองควบคุม ซึ่งต่างจากสายพันธุ์ Saranac คือ ที่ระดับเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.45 และ 0.60 เปอร์เซ็นต์ ต้นอ่อนมีน้ำหนักแห้งต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของสิ่งทดลองควบคุม จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการทนเค็มของต้นอ่อนจากเมล็ดถั่ว alfalfa ซึ่งพัฒนามาจากแคลลัสที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ มีแนวโน้มที่จะคัดเลือกสายพันธุ์ทนเค็มได้สูงกว่าสายพันธุ์พ่อ แม่ ถวัลย์รัตน์ ผ่องใส (2528) ได้รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบมะเขือเทศพันธุ์ VF 134-1-2 และพันธุ์ P 5-237 บนอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายลงเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 1 1.5 2 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ามีเพียงความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์เท่านั้นที่เนื้อเยื่อใบมะเขือเทศทั้ง 2 พันธุ์ สามารถเกิดตายอดได้ จากนั้นชักนำตายอดให้เจริญเติบโตไปเป็นยอดที่สมบูรณ์ในอาหารสูตรเดิมที่ไม่เติมเกลือ และชักนำยอดให้เกิดรากบนอาหารสูตร MS นอกจากนี้ ศิริลักษณ์ สุวรรณจิตร (2540) ได้รายงานการทนเค็มของแคลลัสหญ้าแฝกดอน (*Vetiveria nemoralis* A. Camus) 5 สายพันธุ์ คือ แหล่งพันธุ์กำแพงเพชร 1 ประจวบคีรีขันธ์ นครสวรรค์ ห้วยเดียก กุดบาด และหญ้าแฝกหอม (*V. zizannioides* Nash.) 4 แหล่งพันธุ์ คือ แหล่งพันธุ์สุราษฎ์ธานี สงขลา 3 ศรีลังกา และอินโดนีเซีย โดยเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D 1.105 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 1 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ในที่มีแสง เป็นเวลา 45 วัน พบว่าที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสของกำแพงเพชร 1 ทนเค็มได้สูงสุดโดยมีค่า LD_{50} เท่ากับ 3.32 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำแคลลัสมาชักนำให้เกิดต้นบนอาหารสูตร MS ในที่มีแสง เป็นเวลา 60 วัน พบว่าแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ 3.3 เปอร์เซ็นต์ นำต้นมาทดสอบความทนเค็มอีกครั้งบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 1.105 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นเดิมเป็นเวลา 45 วัน พบว่าต้นสามารถทนเค็มได้ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

3.1 พันธุ์พืชทดลอง

- เมล็ดแห้งถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 (*Glycine max* [L.] Merrill cv. SJ.4) จากศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น LIBROR EB-4000 H ของบริษัท SHIMADZU
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น A-200s ของบริษัท Satorius analytic
- เครื่องวัดความเป็นกรดและด่าง (pH meter) รุ่น HM-7E ของบริษัท TOA Electronics
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-3D ของบริษัท Hirayama MFG. CORP.
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air-flow cabinet) รุ่น ABS 1200 ของบริษัท Microflow
- เครื่องอังน้ำ (water bath) ของบริษัท CREST
- ตู้ดูดควัน รุ่น Astecair 5000 E
- เครื่องเขย่า รุ่น SGM 300 ของบริษัท Gallenkamp
- ตู้อบลมร้อน รุ่น ED53 ของบริษัท WTB binder
- Hot plate stirrer รุ่น SP46920-26 ของบริษัท BARNSTAD/THERMOLYNE
- ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีความเข้มแสง 1000 ลักซ์ ช่วงเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส
- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Stereomicroscope) รุ่น CHS 3 ของบริษัท Olympus
- แท่งแก้วคนสาร
- ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ พร้อมฝาพลาสติก
- จานเลี้ยงเชื้อ (pretidish)
- ขวดสีชา
- ขวดดูแรน (duran)

- ชุดกรองมิลลิพอร์ (millipore)
- กระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate)
- ปั๊มสูญญากาศ (suction)
- หลอดฉีดยา (syringe)
- ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)
- กระบอกตวงสาร (cylinder)
- ปิเปตต์ (pipette)
- ฟลาสก์ (flask)
- บีกเกอร์ (beaker)
- กรวยแก้ว
- ปากคีบ (forcep)
- มีดผ่าตัด
- กล้องถ่ายรูป
- หลอดไฟ
- ตะเกียงแอลกอฮอร์
- ไม่ขีดไฟ

3.2.2 สารเคมี

- Ammonium Nitrate (NH_4NO_3) ของบริษัท Fluka
- Boric Acid (H_3BO_3) ของบริษัท Merck
- Benzyladenine, BA ($C_{12}H_{11}N_6$) ของบริษัท Fluka
- Calcium Chloride ($CaCl_2.2H_2O$) ของบริษัท Merck
- Cobalt Chloride ($CoCl_2.6H_2O$) ของบริษัท Merck
- Cupper Sulfate ($CuSO_4.5H_2O$) ของบริษัท Merck
- Disodium Ethelene Diamine Tetraacetate (Na_2EDTA) ของบริษัท M&B laboratory chemicals
- Ferrous Sulfate ($FeSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Merck
- Glycine ($C_2H_5NO_2$) ของบริษัท Fluka
- Hydrochloric Acid (HCl) ของบริษัท J.T. Baker
- Magnesium Sulfate ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท Merck
- Manganese Sulfate ($MnSO_4.H_2O$) ของบริษัท Merck
- Myo-inositol ($C_6H_{12}O_6$) ของบริษัท Fluka

- Nicotinic Acid ($C_6H_5NO_2$) ของบริษัท Fluka
- Potassium Chloride (KCl) ของบริษัท Merck
- Potassium Dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck
- Potassium Nitrate (KNO_3) ของบริษัท Merck
- Potassium Iodide (KI) ของบริษัท Merck
- Pyridoxine.HCl ($C_8H_{11}ClNO_3$) ของบริษัท Merck
- Sodium Hydroxide (NaOH) ของบริษัท Merck
- Sodium Molybdate ($Na_2MoO_4.2H_2O$) ของบริษัท Merck
- Sucrose ($C_6H_{12}O_{11}$)
- Thiamine.HCl ($C_{12}H_{17}ClN_4OS.HCl$) ของบริษัท Fluka
- Zinc Sulfate ($CuSO_4.H_2O$) ของบริษัท Merck
- Ethyl Methanesulfonate ($C_3H_8O_3S$) ของบริษัท Fluka
- Sodium Chloride (NaCl) ของบริษัท Merck
- Gelrite ของบริษัท Fluka
- น้ำกลั่นดีไอโอไนซ์ (deionized water)
- น้ำกลั่น (distilled water)
- คลอรอกซ์ (Clorox)
- สารลดแรงตึงผิวทวีน 20 (Tween 20)
- แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และตัวอย่างพืชทดลอง

3.3.1.1 การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เตรียมอาหารแข็งสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งมีองค์ประกอบธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง และสารประกอบอินทรีย์ตามสูตรดัดแปลงของ B5 (MB5) (Cheng *et. al.* 1980) (ภาคผนวก ก) โดยบรรจุใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขวดละประมาณ 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.3.1.2 การเตรียมเมล็ดถั่วเหลืองให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ

นำเมล็ดถั่วเหลืองมาคัดเลือกเฉพาะเมล็ดที่สมบูรณ์ คือ เมล็ดไม่ลีบ ไม่ฝ่อ ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วยการแช่เมล็ดในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อต่อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เติมสารลดแรงตึงผิว (Tween 20) จำนวน 2-3 หยด ต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร เขย่านาน 10 นาที โดยใช้เครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เพื่อให้เมล็ดถั่วเหลืองทุกเมล็ดได้รับการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง โดยทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

3.3.2 การขยายพันธุ์ถั่วเหลืองโดยเทคนิค micropropagation

3.3.2.1 การกระตุ้นให้เกิดตายอด

นำเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดแล้ว ลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA ความเข้มข้น 11 มิลลิกรัมต่อลิตร (Cheng *et. al.* 1980) แล้วนำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 26-28 องศาเซลเซียส ให้ได้รับแสงจากหลอด ฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสงประมาณ 1000 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน (ใช้สภาพการเพาะเลี้ยงเช่นนี้ตลอดการทดลอง) เป็นเวลา 14 วัน จึงนำต้นอ่อนที่ได้มาตัดชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงนำไปทำการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.3.2.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

นำชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงที่ได้จากการทดลองตอนที่ 3.3.2.1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้อาหารทั้งหมด 18 สูตร (ตารางที่ 3.1) นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 30 วัน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) แต่ละการทดลองมี 10 ซ้ำ สังเกต และบันทึกการเปลี่ยนแปลงโดยนับจำนวนยอด วัดความยาวยอด และลักษณะอื่น ๆ ที่พบ พร้อมทั้งบันทึกภาพ

ตารางที่ 3.1 อาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้เลี้ยงชิ้นส่วนข้อ

สูตรที่	ฮอร์โมน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	BA	IBA
1	0	0
2	0	0.002
3	0	0.005
4	0.2	0
5	0.2	0.002
6	0.2	0.005
7	0.4	0
8	0.4	0.002
9	0.4	0.005
10	0.6	0
11	0.6	0.002
12	0.6	0.005
13	0.8	0
14	0.8	0.002
15	0.8	0.005
16	1.0	0
17	1.0	0.002
18	1.0	0.005

3.3.2.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ยอดเกิดราก

ตัดยอดเดี่ยวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก คือ อาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลือกเฉพาะยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์ และมีความยาวเกินกว่า 2 เซนติเมตร (ยอดหรือกลุ่มยอดที่มีความยาวน้อยกว่า 2 เซนติเมตร ย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม) มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม IBA ระดับความเข้มข้น 0 0.2 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 30 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละการทดลองมี 10 ซ้ำ สังเกตและบันทึกจำนวน ความยาว และลักษณะราก พร้อมทั้งบันทึกภาพ

3.3.3 การหาค่า LD_{50} ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองที่เพาะในหลอดทดลอง

นำเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดแล้ว ลงเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MB5 เป็นเวลา 7 วัน เลือกต้นอ่อนที่มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันไว้ทั้งหมด นำไปชั่งน้ำหนักสดเริ่มต้นของต้นอ่อน บันทึกผลทั้งหมด ก่อนนับจำนวนต้นที่เลือกมาได้แยกลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 11 ระดับ คือ 0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 14 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละการทดลองมี 10 ซ้ำ เมื่อครบกำหนด 14 วัน นำต้นอ่อนถั่วเหลืองไปชั่งน้ำหนักสดสุดท้ายอีกครั้ง แล้วนำมาคำนวณค่าดัชนีการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองในแต่ละความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์โดยที่

$$\text{ดัชนีการเจริญเติบโต} = \frac{\text{น้ำหนักสดสุดท้าย - น้ำหนักสดเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}$$

นำค่าดัชนีการเจริญเติบโตนี้มาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองในแต่ละความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์โดยเปรียบเทียบกับหน่วยทดลองควบคุม (100%) เพื่อหาค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ทำให้ค่าดัชนีการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ของค่าดัชนีการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองที่ไม่ได้เลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (LD_{50}) เพื่อต้องการหาค่าความทนเค็มของต้นถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ในสภาพธรรมชาติ ก่อนนำมาชักนำให้กลายพันธุ์เพื่อทนเค็มด้วยสารเคมี

3.3.4 การหาค่า LD_{50} ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการงอกของเมล็ดถั่วเหลืองที่เพาะในหลอดทดลอง

นำเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดแล้ว แช่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วโดยมีระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ กัน คือ 0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง คัดเลือกเมล็ดที่มีการดูดซับน้ำ และมีการเจริญของรากลงเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นเดิม 11 ระดับ เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเป็นเวลา 14 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละการทดลองมี 20 ซ้ำ หาค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเหลืองเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของเมล็ดถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการแช่สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (หน่วยทดลองควบคุม) จากกราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเหลือง (LD_{50}) เพื่อใช้ในการคาดคะเนระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการคัดเลือกต้นถั่วเหลืองเพื่อทนเค็ม บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนเมล็ดที่งอก วัดการเจริญเติบโตโดยการวัดความสูง น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของต้นอ่อน และคิดค่าดังกล่าวเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยการเปรียบเทียบกับหน่วยทดลองควบคุมที่ไม่ได้แช่สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ พร้อมทั้งบันทึกภาพ

3.3.5 การศึกษาการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี

3.3.5.1 การชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์

3.3.5.1.1 การชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ และคัดเลือกลักษณะทนเค็ม

นำเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดแล้ว แช่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยคัดเลือกระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ต้นอ่อนถั่วเหลืองสามารถเจริญเติบโตอยู่รอดได้ และมีลักษณะสมบูรณ์พอที่จะตัดชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงไปขยายพันธุ์ได้ คือ ระดับความเข้มของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 (หน่วยทดลองควบคุม) 0.4 0.5 0.6 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ (จากผลการทดลองตอนที่ 3.3.4) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดถั่วเหลืองเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่มี BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นเดิม คือ 0 0.4 0.5 0.6 และ 0.7 เป็นเวลา 14 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละการทดลองมี 20 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนเมล็ดที่

งอก พร้อมทั้งบันทึกภาพ คัดเลือกต้นอ่อนที่สมบูรณ์พอที่จะตัดชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยง ลงเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก คือ อาหารสูตรที่มีฮอร์โมน BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากผลการทดลองตอนที่ 3.3.2.2) เป็นเวลา 30 วัน บันทึกจำนวนยอด และความยาวยอด พร้อมทั้งบันทึกภาพ จากนั้นตัดยอดเดี่ยวที่สมบูรณ์ลงเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ชักนำให้ยอดเกิดราก คือ อาหารสูตรที่มีฮอร์โมน IBA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากผลการทดลองตอนที่ 3.3.2.3) เป็นเวลา 30 วัน บันทึกผลการทดลองโดยให้คะแนนการเกิดราก และการเจริญเติบโตของยอด พร้อมทั้งบันทึกภาพ

3.3.5.2 การชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS

3.3.5.2.1 ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

นำเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดแล้ว แช่ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วจึงนำเมล็ดมาแช่ในสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ระดับความเข้มข้น 0 0.3 0.6 0.9 1.2 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตรต่อปริมาตร) พีเอช 7.4 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้มีปริมาตรสารละลาย EMS 1 มิลลิลิตรต่อเมล็ด ในขวดปิดฝาสนิท เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะเขย่า เมื่อถึงเวลาที่กำหนดนำเมล็ดถั่วเหลืองล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วหลาย ๆ ครั้ง เพื่อชะล้างสารเคมีส่วนเกินออกจากเมล็ดไม่ให้หลงเหลืออยู่ ซับเมล็ดให้แห้งด้วยกระดาษซับที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำเมล็ดถั่วเหลืองเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 14 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละการทดลองมี 20 ซ้ำ เพื่อใช้ในการคาดคะเนปริมาณความเข้มข้นของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดกลายพันธุ์เพื่อทนเค็มของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 บันทึกผลการทดลอง โดยนับจำนวนเมล็ดที่งอกแล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยการเปรียบเทียบกับจำนวนเมล็ดที่งอกของเมล็ดที่ไม่ได้ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS (หน่วยทดลองควบคุม) พร้อมทั้งบันทึกภาพ

3.3.5.2.2 ศึกษาการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS และคัดเลือกลักษณะทนเค็ม

นำเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดแล้ว แช่ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วจึงนำเมล็ดมาแช่ในสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ระดับความเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (จากผลการทดลองตอนที่ 3.3.5.2.1) พีเอช 7.4 ที่อุณหภูมิ 25

องศาเซลเซียส ให้มีปริมาตรสารละลาย EMS 1 มิลลิลิตรต่อเมล็ด ในขวดปิดฝาสนิท เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะเขย่า เมื่อถึงเวลาที่กำหนดนำเมล็ดถั่วเหลืองล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วหลาย ๆ ครั้ง เพื่อชะล้างสารเคมีส่วนเกินออกจากเมล็ดไม่ให้หลงเหลืออยู่ ซับเมล็ดให้แห้งด้วยกระดาษซับที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว แล้วนำเมล็ดถั่วเหลืองเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ (จากผลการทดลองตอนที่ 3.3.4) เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 14 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละการทดลองมี 34 ซ้ำ บันทึกผลการทดลอง โดยนับจำนวนเมล็ดที่งอก พร้อมทั้งบันทึกภาพ คัดเลือกต้นอ่อนที่สมบูรณ์พอที่จะตัดชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงลงเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก คือ อาหารสูตรที่มีฮอร์โมน BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากผลการทดลองตอนที่ 3.3.2.2) เป็นเวลา 30 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละการทดลองมี 20 ซ้ำ บันทึกผลการทดลอง โดยนับจำนวนยอด ความยาวยอด พร้อมทั้งบันทึกภาพ จากนั้นตัดยอดเดี่ยวที่สมบูรณ์ลงเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ชักนำให้ยอดเกิดราก คือ อาหารสูตรที่มีฮอร์โมน IBA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากผลการทดลองตอนที่ 3.3.2.3) เป็นเวลา 30 วัน บันทึกผลการทดลองโดยให้คะแนนการเกิดราก และการเจริญเติบโตของยอด พร้อมทั้งบันทึกภาพ

3.3.6 การศึกษาการทดสอบความทนเค็มของต้นถั่วเหลืองที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว

นำต้นถั่วเหลืองที่เป็นต้นสมบูรณ์ คือ มียอด และราก ในสภาพปลอดเชื้อไปทดสอบความทนเค็ม โดยย้ายลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม บันทึกการรอดชีวิตของต้นถั่วเหลือง โดยดูจากลักษณะ สี และการเปลี่ยนแปลง พร้อมทั้งบันทึกภาพ

บทที่ 4

ผลการวิจัย และวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาการขยายพันธุ์ถั่วเหลืองโดยเทคนิค micropropagation

4.1.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

เมื่อนำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA ความเข้มข้น 11 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน เพื่อกระตุ้นให้เกิดตายอด พบว่า ต้นอ่อนที่งอกออกมาจากเมล็ดมีลักษณะขนาดเล็ก อวบน้ำ และมีเฉพาะรากแก้ว จากนั้นนำต้นอ่อนมาตัดชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยง (รูปที่ 4.1)

รูปที่ 4.1 [A] แสดงลักษณะของต้นอ่อนถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน ซึ่งมีลักษณะขนาดเล็ก อวบน้ำ และมีเฉพาะรากแก้ว (ขวา) เปรียบเทียบกับลักษณะของต้นอ่อนถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 เป็นเวลา 14 วัน (ซ้าย) และ [B] แสดงตำแหน่งชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยง (ลูกศรชี้)

นำชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงที่ตัดออกมาจากต้นอ่อน มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0 0.002 หรือ 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่ายอดที่เกิดขึ้นมาใหม่นั้นเจริญมาจากตายอด (apical dome) และตาข้าง (axillary bud) บริเวณข้อ บางการทดลองตรงบริเวณฐานของชิ้นส่วนข้อมีแคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น (compact callus) และมีรากเกิดขึ้น อาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก และมีแคลลัสเกิดขึ้นน้อย คือ อาหารสูตรที่ 6 ซึ่งเป็นอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนข้อมากที่สุดเท่ากับ 6.4 ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยจำนวนยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตรอื่น ๆ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Cheng *et. al.* (1980) ที่รายงานว่าการเติมสาร BA ร่วมกับ IBA ในสัดส่วนที่เหมาะสม คือ เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารแข็งสูตร MB5 จะทำให้ชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงพัฒนาไปเป็นแคลลัส และยอดจำนวนมากได้ ส่วนในอาหารแข็งสูตร MB5 ที่มีการเติม BA ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นไปกว่านี้ พบว่า ยอดที่เกิดขึ้นมาจะมีลักษณะอวบสั้น และมีการเกิดแคลลัสมากขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะของยอดที่ไม่สมบูรณ์

ความยาวของยอดที่เจริญมาจากตายอด และตาข้างของชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่ 3 คือ อาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวนั้นมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 4.48 เซนติเมตรต่อชิ้นส่วนข้อ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยความยาวของยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตรอื่นที่มีการเติม BA ร่วมกับ IBA ระดับความเข้มข้นอื่น ๆ เนื่องจาก IBA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของกลุ่มออกซินมีผลทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ และการยืดยาวของเซลล์ (Pierik. 1987) (ตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.2)

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ย เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 บนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 30 วัน[1/]

สูตรที่	BA (มก. /ล.)	IBA (มก. /ล.)	จำนวนยอดเฉลี่ย[2/] (ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ)	ความยาวยอดเฉลี่ย[2/] (ซม. ต่อชิ้นส่วนข้อ)	ลักษณะอื่น ๆ ที่พบ
1	0	0.000	1.3^{f}	3.79^{b}	ราก
2	0	0.002	1.8^{f}	4.06^{b}	ราก
3	0	0.005	1.5^{f}	4.48^{a}	ราก
4	0.2	0.000	5.1^{abc}	2.73^{c}	แคลลัส
5	0.2	0.002	5.5^{ab}	1.76^{de}	แคลลัส
6	0.2	0.005	6.4^{a}	2.46^{c}	แคลลัส
7	0.4	0.000	5.2^{ab}	1.52^{def}	แคลลัส
8	0.4	0.002	5.0^{abc}	1.64^{def}	แคลลัส
9	0.4	0.005	5.1^{abc}	1.83^{d}	แคลลัส
10	0.6	0.000	4.2^{bcd}	1.42^{efgh}	แคลลัส
11	0.6	0.002	4.3^{bcd}	1.63^{def}	แคลลัส
12	0.6	0.005	4.1^{bcd}	1.43^{efgh}	แคลลัส
13	0.8	0.000	3.2^{de}	1.52^{def}	แคลลัส
14	0.8	0.002	3.4^{de}	1.45^{efgh}	แคลลัส
15	0.8	0.005	3.7^{cde}	1.47^{efg}	แคลลัส
16	1.0	0.000	2.3^{ef}	1.12^{h}	แคลลัส
17	1.0	0.002	2.5^{ef}	1.17^{gh}	แคลลัส
18	1.0	0.005	2.4^{ef}	1.30^{fgh}	แคลลัส
F-test			*	*	
C.V. (%)			37.53	16.36	

หมายเหตุ : [1/] = ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ๆ ละ 1 ค่าสังเกต

[2/] = ค่าเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ โดยค่าตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์แบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

* = มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

รูปที่ 4.2 แสดงการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 บนอาหารแข็ง สูตร MB5 ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 30 วัน

4.1.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ยอดเกิดราก

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ยอดถั่วเหลืองเกิดราก โดยการตัดแยกยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์ และมีความยาวเกิน 2 เซนติเมตร จากชิ้นส่วนข้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตรลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ คือ 0 0.2 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ยอดเกิดราก คือ อาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากว่าสามารถชักนำให้ยอดเกิดรากได้และไม่มีแคลลัสเกิดขึ้น ในขณะที่อาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้น ถึงแม้ว่าจะให้จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยมากกว่า แต่บริเวณรอยตัดที่ก่อให้เกิดรากที่โคนของยอดมีแคลลัสเกิดขึ้นมาก ทำให้เนื้อเยื่อพืชลำเลียงน้ำและแร่ธาตุอาหารไปเลี้ยงแคลลัสตรงบริเวณรอยตัดมากกว่าที่จะไปเลี้ยงยอด ซึ่งมีผลทำให้การเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองผิดปกติ (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.3)

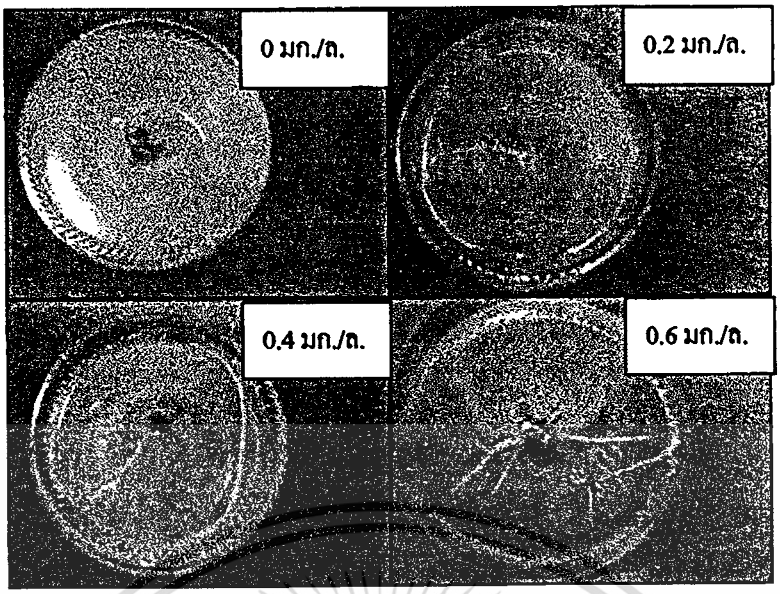
ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนรากเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ย และลักษณะราก เมื่อเลี้ยงยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงของต้นอ่อนถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 บนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม IBA ระดับความเข้มข้น 0 0.2 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน[1/]

ความเข้มข้นของ IBA (มก. / ล.)	จำนวนรากเฉลี่ย[2/] (ราก ต่อ ยอด)	ความยาวรากเฉลี่ย[2/] (ซม. ต่อ ยอด)	ลักษณะราก
0.0	0.6[b]	0.41[c]	ไม่มีรากเกิดขึ้นและเกิดแคลลัสเล็กน้อย
0.2	1.2[b]	1.74[b]	รากเส้นเล็กยาวไม่เกาะกันเป็นกระจุก และไม่เกิดแคลลัส
0.4	1.1[b]	1.79[b]	รากเส้นเล็กยาวไม่เกาะกันเป็นกระจุก และไม่เกิดแคลลัส
0.6	3.1[a]	3.01[a]	รากเส้นใหญ่สั้นเกาะกันเป็นกระจุก และเกิดแคลลัสมาก
F-test	*	*	
C.V. (%)	49.44	48.37	

หมายเหตุ : [1/] = ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ๆ ละ 1 ค่าสังเกต

[2/] = ค่าเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ โดยค่าตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์แบบ DMRT

* = มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.3 แสดงการเกิดราก เมื่อเลี้ยงยอดที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงของต้นอ่อนถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 บนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม IBA ระดับความเข้มข้น 0 0.2 0.4 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน

4.2 ผลการศึกษาการหาค่า LD_{50} ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองที่เพาะในหลอดทดลอง

การทดลองนี้หาค่า LD_{50} โดยวัดการเจริญเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นหลังจากเลี้ยงต้นถั่วเหลืองในอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 11 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน พบว่า ต้นถั่วเหลืองที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์มีการเจริญเติบโตโดยดูจากค่าดัชนีการเจริญเติบโตเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 2.51 กรัมต่อต้น ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาได้แก่ต้นถั่วเหลืองที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.9 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 1.69 1.25 1.19 0.75 0.52 0.42 0.36 0.32 และ 0.28 กรัมต่อต้น ตามลำดับ โดยต้นถั่วเหลืองที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าดัชนีการเจริญเติบโตน้อยที่สุดเท่ากับ 0.26 กรัมต่อต้น (ตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.4) การเลี้ยงต้นถั่วเหลืองบนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ผลทำให้ต้นถั่วเหลืองเจริญเติบโตได้น้อยกว่าต้นถั่วเหลืองที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยพิจารณาจากค่าดัชนีการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับค่าดัชนีการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองที่เลี้ยงบนอาหารไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (100%) พบว่า มีค่าต่ำกว่าบนอาหารไม่เติม

เกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองมีค่าต่ำลงเป็นสัดส่วนผกผันกับค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 0 ถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์นั้น พบว่า ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองได้มากที่สุด การที่ต้นถั่วเหลืองมีค่าดัชนีการเจริญเติบโตลดลงในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์นั้น ก็เนื่องมาจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารมีผล ทำให้ต้นถั่วเหลืองเกิดการสูญเสียน้ำ เมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้นทำให้เกิดการสูญเสียน้ำมากขึ้น (Greenway and Munns. 1983 ; Flowers and Yeo. 1986 ; Blum. 1988 ; Sharma. 1995) สภาพเช่นนี้อาจมีผลทำให้เซลล์ดูดน้ำ แร่ธาตุ วิตามิน จากอาหารได้น้อยลง (Smith and McComb. 1981a) จึงเกิดภาวะการขาดน้ำและแร่ธาตุที่จำเป็นภายในเซลล์ ซึ่งมีผลทำให้อัตราการแบ่งเซลล์และอัตราการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ลดลง รวมทั้งพิษของ Na^+ และ Cl^- จากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์โดยตรงทำให้เซลล์ถูกทำลายและตายลงได้ (Barnett and Naylor. 1966 ; Slatyer. 1967 ; Levitt. 1972) จึงทำให้การเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองลดลง

การทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่มีผลทำให้ค่าดัชนีการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ของต้นถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ (LD_{50}) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.25 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.5)

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าดัชนีการเจริญเติบโตเฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม NaCl ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน[1/]

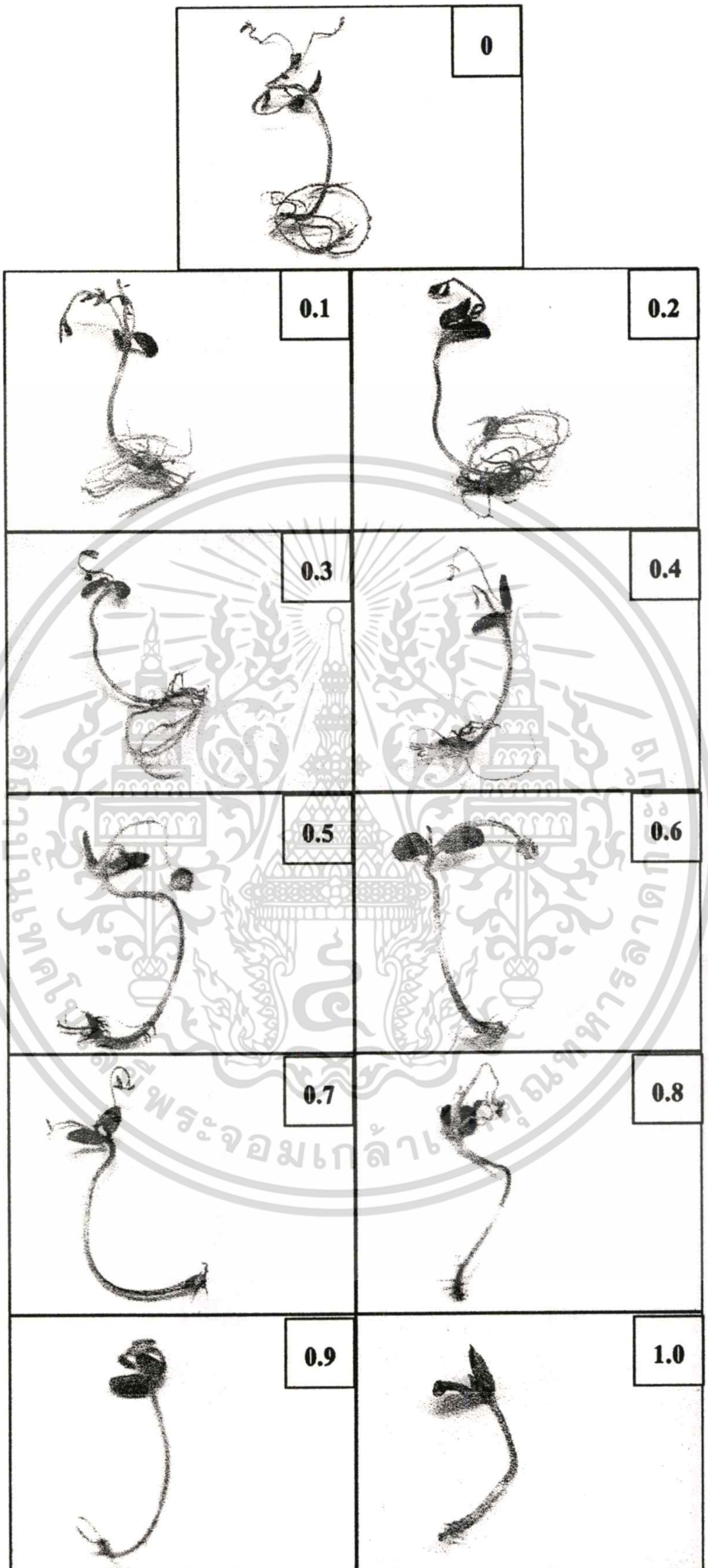
ความเข้มข้นของ NaCl (เปอร์เซ็นต์)	ดัชนีการเจริญเติบโตเฉลี่ย[2/] (กรัมต่อต้น)	เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเจริญเติบโต[3/]
0.0	2.51[a]	100
0.1	1.69[b]	67.33
0.2	1.25[c]	49.80
0.3	1.19[c]	47.41
0.4	0.75[d]	29.88
0.5	0.52[de]	20.72
0.6	0.42[e]	16.73
0.7	0.36[e]	14.34
0.8	0.32[e]	12.75
0.9	0.28[e]	11.16
1.0	0.26[e]	10.36
F-test	*	
C.V. (%)	41.46	

<u>หมายเหตุ</u> : [1/] = ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ๆ ละ 1 ค่าสังเกต

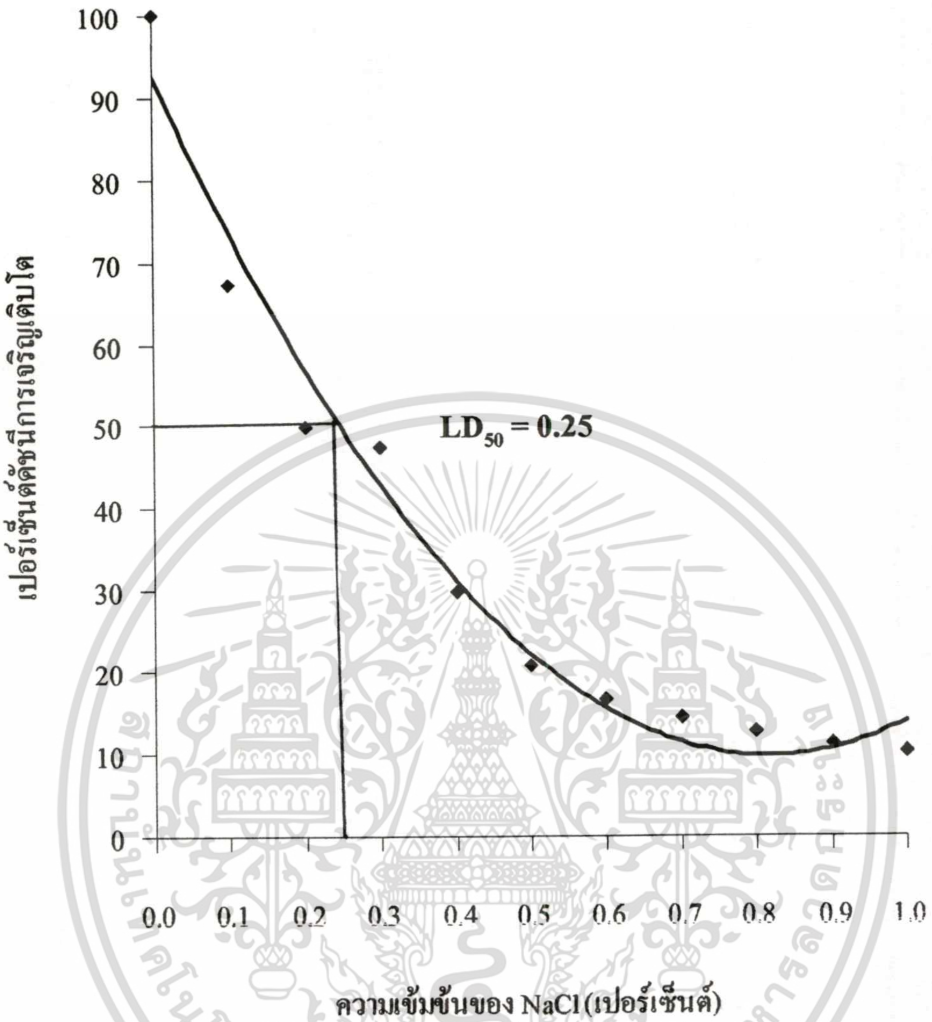
[2/] = ค่าเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ โดยค่าตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์แบบ DMRT

[3/] = เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับหน่วยทดลองควบคุม

* = มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.4 ลักษณะการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม NaCl ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของ NaCl ที่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 เป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ของต้นถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับ NaCl (LD_{50})

4.3 ผลการศึกษาการหาค่า LD_{50} ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการงอกของเมล็ดถั่วเหลืองที่เพาะในหลอดทดลอง

เมื่อนำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด มาแช่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0 ถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ก่อนเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้นเดิม เป็นเวลา 14 วัน มาศึกษาการเจริญเติบโต และการตรวจสอบระดับความทนเค็มของเมล็ดถั่วเหลือง โดยนับจำนวนเมล็ดที่งอกเปรียบเทียบกับหน่วยการทดลองควบคุม โดยกำหนดให้หน่วยการทดลองควบคุมเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมล็ดถั่วเหลืองสามารถงอกได้ในอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้นที่ 0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การงอกจะลดลง เมื่อระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับ 0 0.1 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเปอร์เซ็นต์การงอกมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับ 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเปอร์เซ็นต์การงอกน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงสุดที่เมล็ดสามารถงอกได้ คือ 0.7 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 15.52 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4) และพบว่าค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การงอกที่ LD_{50} มีค่าเท่ากับ 0.38 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.6)

เมื่อศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองเมื่อเลี้ยงเมล็ดบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน พบว่า บนอาหารที่ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์มีจำนวนเมล็ดที่งอกเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 2.9 ต้นต่อซ้ำ ส่วนบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.7 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนเมล็ดที่งอกเฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 0.45 ต้นต่อซ้ำ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0 0.1 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ พบต้นอ่อนที่มีลักษณะสมบูรณ์ (normal seedling) คือ ต้นอ่อนที่มีใบเลี้ยงที่สมบูรณ์ ใบจริงจำนวน 2 ใบ และประกอบไปด้วยรากแก้ว (primary root) และรากแขนง (secondary root) ส่วนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0.4 0.5 0.6 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ นั้นพบต้นอ่อนที่มีเฉพาะรากแก้ว ใบเลี้ยงมีอาการใบเหลือง ไม่มีใบจริง เป็นลักษณะของต้นอ่อนที่ไม่สมบูรณ์ (abnormal seedling) ค่อนข้างมากเนื่องมาจากอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้นดังกล่าวมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชด้วยการทำให้ค่าศักย์ของน้ำ (water potential) ของอาหารต่ำลงเป็นผลให้เนื้อเยื่อพืชดูดน้ำ และอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้น้อย (Smith and McComb. 1981b) และพบลักษณะของเมล็ดที่มีเฉพาะรากขนาดเล็กสั้น ๆ จนถึงลักษณะที่ไม่มีรากเจริญออกมาบนอาหาร

ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0.8 0.9 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ คาดว่าเนื่องมาจากระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เติมลงในอาหารสูงเกินไปจึงทำให้ค่า water potential ของอาหารมีค่าต่ำมากจนกระทั่งเมล็ดถั่วเหลืองไม่สามารถดูดน้ำเข้าไปกระตุ้นให้เอมบริโอสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน เพื่อไปกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์แอลฟาอะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง และน้ำตาลที่เป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตของเอมบริโอได้ (Dily *et. al.* 1990 ; Mohr and Schopter. 1995) (รูปที่ 4.7)

ตารางที่ 4.4 แสดงจำนวนเมล็ดที่งอกเฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 เมื่อเลี้ยงเมล็ดบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม NaCl ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน[1/]

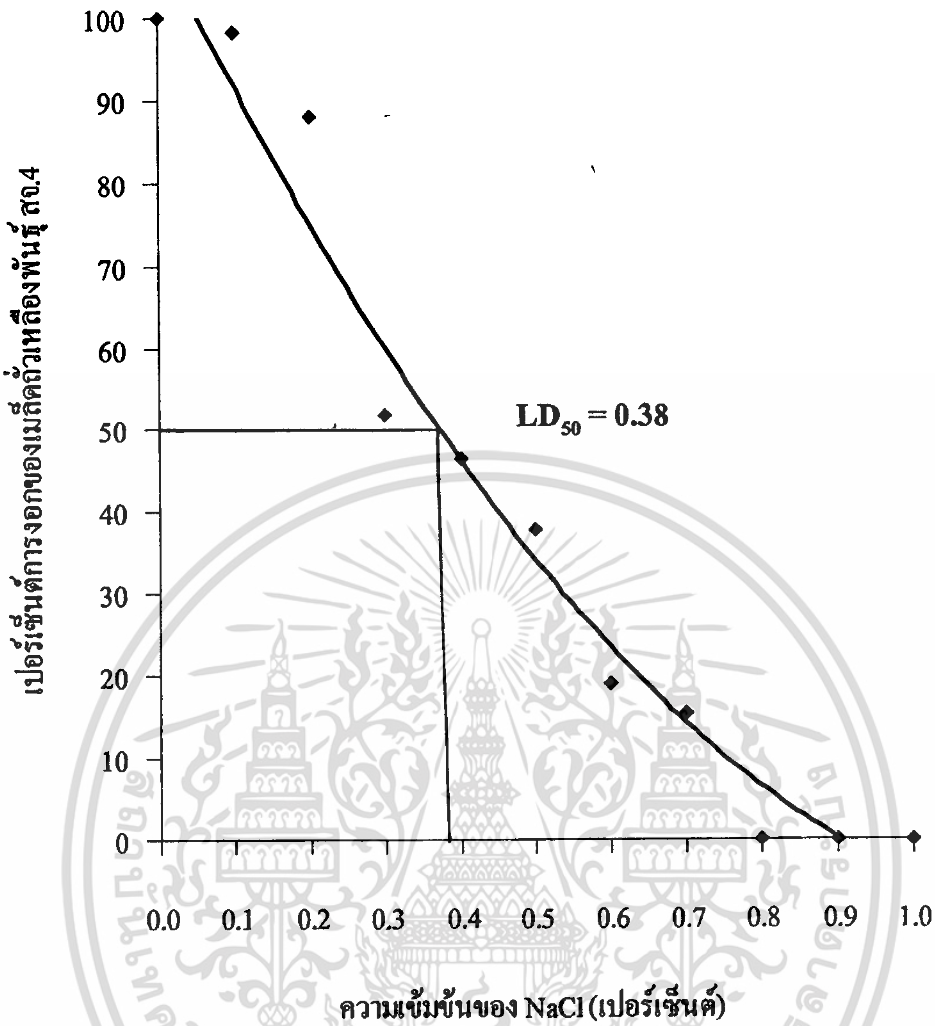
ความเข้มข้นของ NaCl (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนเมล็ดที่งอกเฉลี่ย[2/] (ต้นต่อซ้ำ)	เปอร์เซ็นต์การงอก[3/]
0.0	2.90[a]	100
0.1	2.85[a]	98.28
0.2	2.55[b]	87.93
0.3	1.50[c]	51.72
0.4	1.35[cd]	46.55
0.5	1.10[d]	37.93
0.6	0.55[e]	18.97
0.7	0.45[e]	15.52
0.8	0[f]	0
0.9	0[f]	0
1.0	0[f]	0
F-test	*	
C.V. (%)	39.18	

<u>**หมายเหตุ**</u> : [1/] = ทำการทดลอง 20 ซ้ำ ๆ ละ 3 ค่าสังเกต

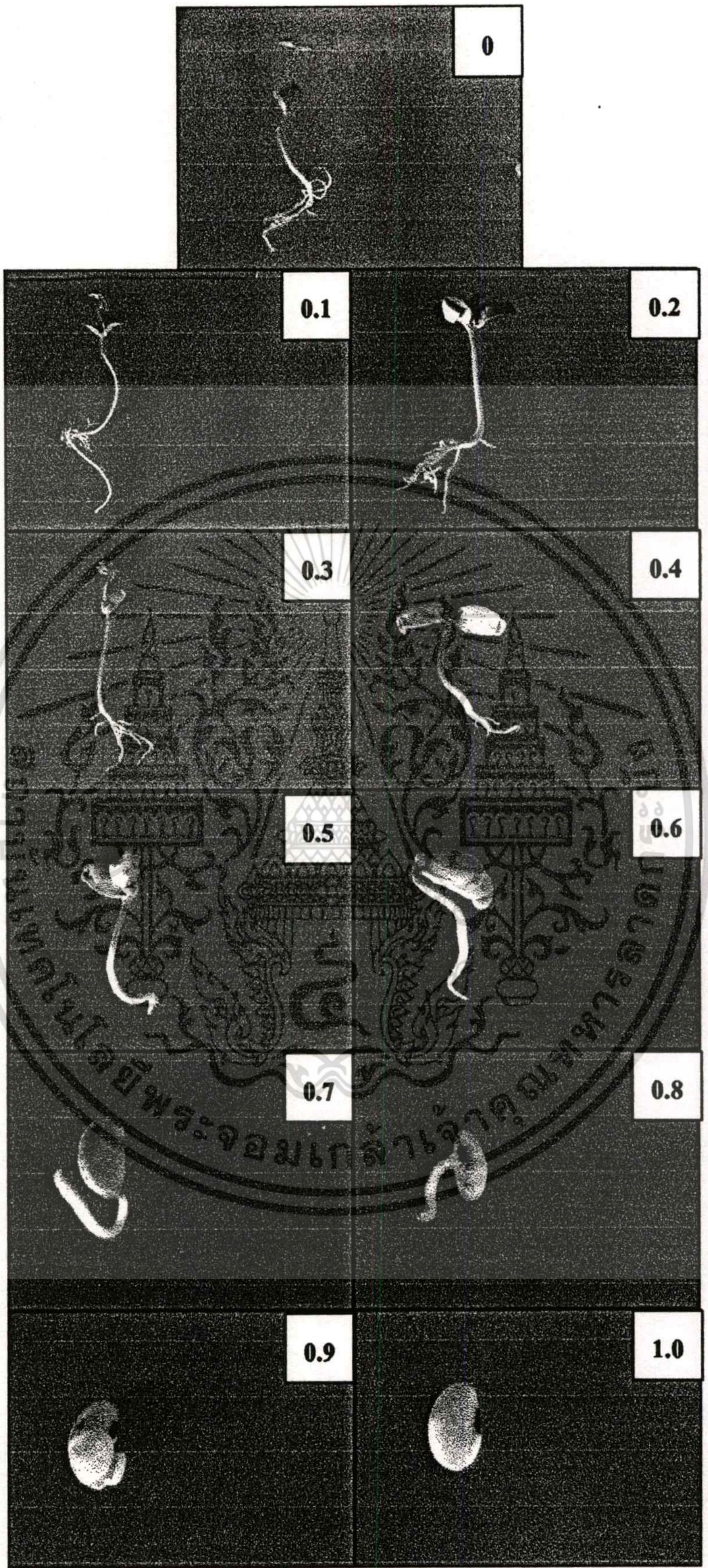
[2/] = ค่าเฉลี่ยจาก 20 ซ้ำ โดยค่าตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์แบบ DMRT

[3/] = เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับหน่วยทดลองควบคุม

* = มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงค่าความเข้มข้นของ NaCl ที่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 เป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ของเมล็ดถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับ NaCl (LD_{50})



รูปที่ 4.7 ลักษณะต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 เมื่อเลี้ยงเมล็ดบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม NaCl ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน

การวัดการเจริญเติบโต เช่น การวัดน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และความสูงของต้นอ่อน เพื่อสนับสนุนการพิจารณาเลือกใช้ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในการคัดเลือกต้นถั่วเหลืองเพื่อทนเค็มนั้น พบว่า น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และความสูงของต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดเมื่ออายุ 14 วัน ลดลงเมื่อมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นลงในอาหารแข็งสูตร MB5 ที่ใช้เลี้ยงเมล็ดถั่วเหลือง (ตารางที่ 4.5 รูปที่ 4.8 รูปที่ 4.9 และรูปที่ 4.10)

เมื่อเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารแข็งสูตร MB5 ที่ใช้เลี้ยงเมล็ดถั่วเหลือง พบว่า การเจริญเติบโตของต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดลดลง ทำให้ต้นอ่อนมีน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และความสูงเฉลี่ยต่อต้นลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 (หน่วยทดลองควบคุม) ขณะที่เมล็ดที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0.8 0.9 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมล็ดถั่วเหลืองไม่สามารถงอกเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถวัดการเจริญเติบโตได้ จากการทดลองนี้พบว่าน้ำหนักสดเฉลี่ยต่อต้นของต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 0.595 กรัมต่อต้น ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักสดเฉลี่ยต่อต้นของต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.575 0.574 0.566 0.556 0.499 0.300 และ 0.240 กรัมต่อต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

น้ำหนักแห้งเฉลี่ยต่อต้นของต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 0.193 กรัมต่อต้น ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักแห้งเฉลี่ยต่อต้นของต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.174 0.166 0.161 0.157 0.139 0.080 และ 0.061 กรัมต่อต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

การเจริญเติบโตทางด้านความสูงของต้นอ่อน พบว่า ความสูงเฉลี่ยต่อต้นของต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 0.7 เปอร์เซ็นต์นั้น พบว่า บนอาหารที่ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต้นอ่อนมีความสูงเฉลี่ยต่อต้นมากที่สุดเท่ากับ 11.063 เซนติเมตรต่อต้น รองลงมา คือ บนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 9.413 เซนติเมตรต่อต้น ในขณะที่ความสูงเฉลี่ยต่อต้นของต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0.2 ถึง 0.7 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 8.300 7.397 5.757 4.562 2.260 และ 1.440 เซนติเมตรต่อต้น ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 แสดงน้ำหนักสดเฉลี่ย น้ำหนักแห้งเฉลี่ย และความสูงเฉลี่ยของต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 เมื่อเลี้ยงเมล็ดบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม NaCl ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 0.7 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน[1/]

ความเข้มข้นของ NaCl (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักสดเฉลี่ย[2/] (กรัมต่อต้น)	น้ำหนักสด (เปอร์เซ็นต์)[3/]	น้ำหนักแห้งเฉลี่ย[2/] (กรัมต่อต้น)	น้ำหนักแห้ง (เปอร์เซ็นต์)[3/]	ความสูงเฉลี่ย[2/] (ซม.ต่อต้น)	ความสูง (เปอร์เซ็นต์)[3/]
0	0.595[a]	100	0.193[a]	100	11.063[a]	100
0.1	0.575[ab]	97.82	0.174[ab]	90.16	9.413[b]	84.74
0.2	0.574[ab]	96.47	0.166[b]	86.53	8.300[c]	74.59
0.3	0.566[ab]	95.13	0.161[bc]	82.90	7.397[d]	66.38
0.4	0.556[ab]	93.45	0.157[bc]	81.35	5.757[e]	49.77
0.5	0.499[b]	93.11	0.139[c]	79.79	4.562[f]	45.59
0.6	0.300[c]	91.60	0.080[d]	73.13	2.260[g]	36.96
0.7	0.240[c]	89.75	0.061[d]	69.43	1.440[h]	28.78
F-test	*		*		*	
C.V. (%)	36.84		32.78		20.84	

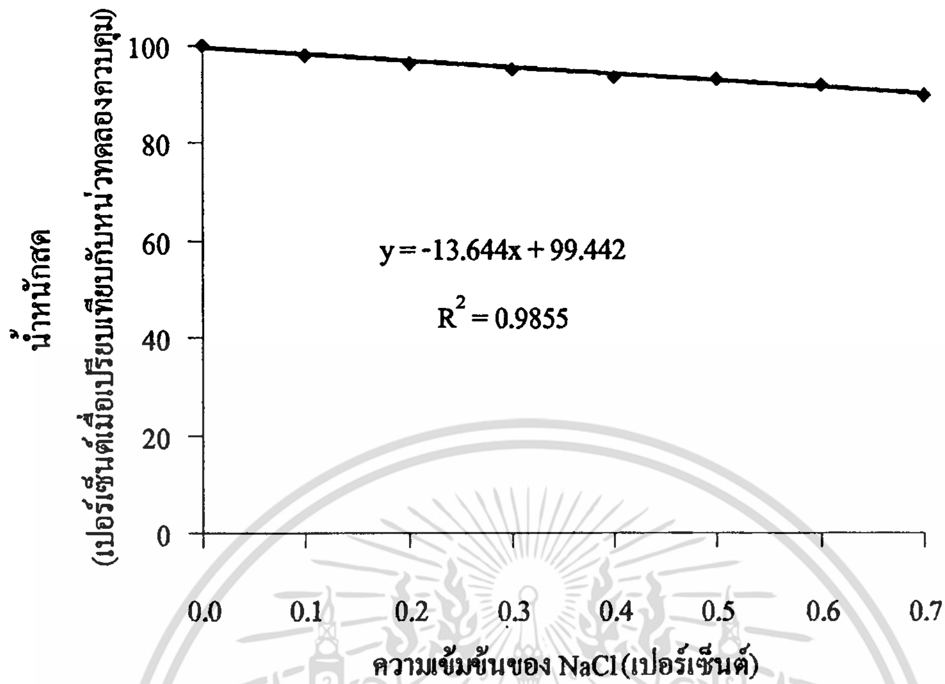
หมายเหตุ : ที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl 0.8 0.9 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ไม่วัดน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และความสูงของต้นอ่อน เนื่องจากเมล็ดไม่สามารถงอกได้

[1/] = ทำการทดลอง 20 ซ้ำ ๆ ละ 3 ค่าสังเกต

[2/] = ค่าเฉลี่ยจาก 20 ซ้ำ โดยค่าตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์แบบ DMRT

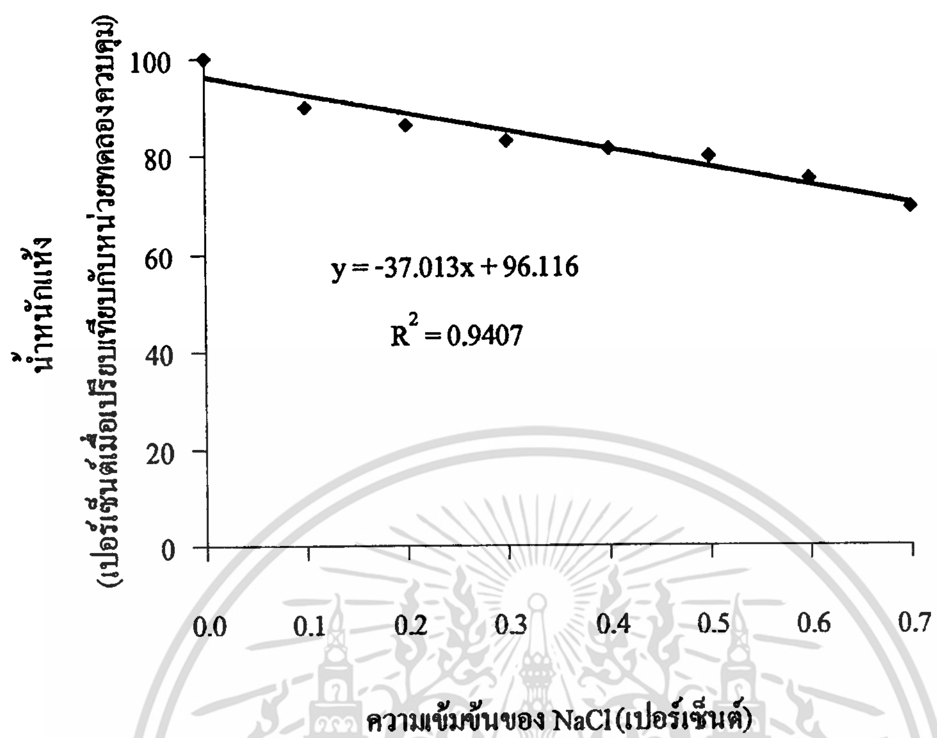
[3/] = เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับหน่วยทดลองควบคุม

* = มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ



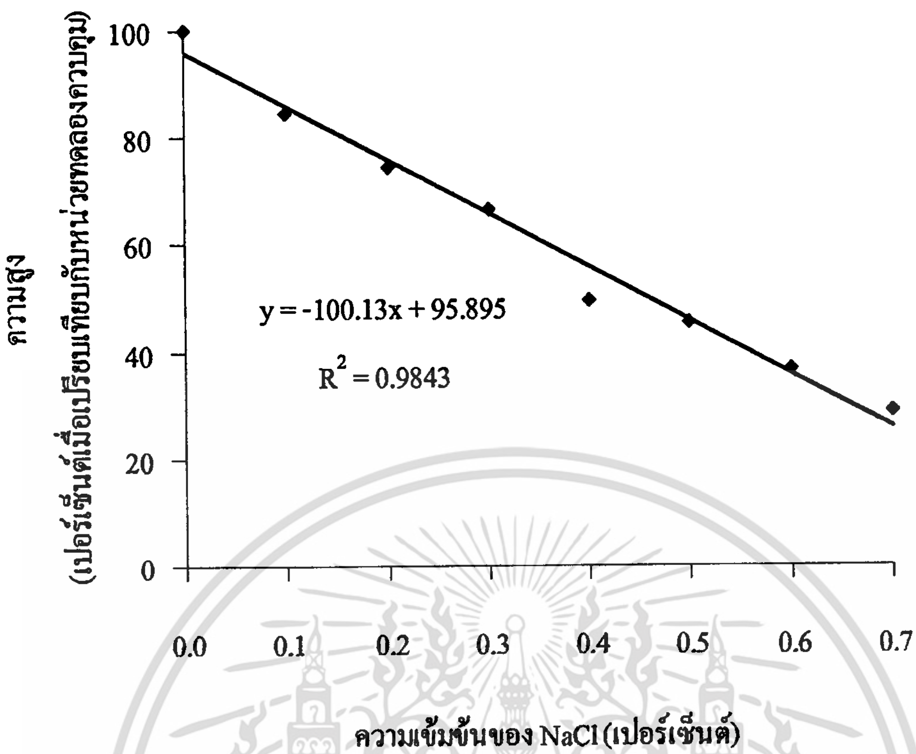
รูปที่ 4.8 แสดงเปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับหน่วยทดลองควบคุมในการวัดน้ำหนักสดของต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 เมื่อเลี้ยงเมล็ดบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม NaCl ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 0.7 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน

<u>หมายเหตุ</u> : ที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl 0.8 0.9 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ไม่วัดน้ำหนักสด เนื่องจากเมล็ดไม่สามารถงอกได้



รูปที่ 4.9 แสดงเปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับหน่วยทดลองควบคุมในการวัดน้ำหนักแห้งของต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 เมื่อเลี้ยงเมล็ดบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม NaCl ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 0.7 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน

<u>หมายเหตุ</u> : ที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl 0.8 0.9 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ไม่วัดน้ำหนักแห้ง เนื่องจากเมล็ดไม่สามารถงอกได้



รูปที่ 4.10 แสดงเปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับหน่วยทดลองควบคุมในการวัดความสูงของต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 เมื่อเลี้ยงเมล็ดบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม NaCl ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 0.7 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน

<u>หมายเหตุ</u> : ที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl 0.8 0.9 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ไม่วัดความสูงเนื่องจากเมล็ดไม่สามารถงอกได้

4.4 ผลการศึกษาการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี

4.4.1 ผลการศึกษาการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ และคัดเลือกลักษณะทนเค็ม

ในการกำหนดระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงสุดที่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 เป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ของเมล็ดถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ (หน่วยทดลองควบคุม) เพื่อนำไปใช้ชักนำให้เกิดกลายพันธุ์ในถั่วเหลืองเพื่อทนเค็มนั้น เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองข้อที่ 4.3 พบว่า ความเข้มข้นดังกล่าว คือ 0.38 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.6) การทดลองครั้งนี้เลือกระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 4 ระดับ คือ 0.4 0.5 0.6 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ค่อนข้างสูง และมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลือง แต่เมล็ดยังสามารถนำมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ ซึ่งคาดว่าการแช่เมล็ดถั่วเหลืองในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีเพียงสายพันธุ์ที่ทนเค็มเท่านั้นที่สามารถงอกเจริญเติบโตได้ (อรุณศิริ กำลัง. 2525) และเมื่อย้ายเมล็ดที่ผ่านการแช่สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ทั้ง 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0.0 0.4 0.5 0.6 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ ลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 ระดับ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เป็นเวลา 14 วัน พบว่า บนอาหารที่ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์เลย มีจำนวนต้นอ่อนสมบูรณ์เฉลี่ยต่อซ้ำมากที่สุดเท่ากับ 2.85 ต้นต่อซ้ำ รองลงมาคือ บนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 0.5 0.6 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 1.30 0.90 0.65 และ 0.50 ต้นต่อซ้ำ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และพบต้นอ่อนที่มีลักษณะสมบูรณ์พอที่จะตัดชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงไปชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้บนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อาหารสูตรที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0.6 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์นั้น พบแต่ต้นอ่อนที่มีลักษณะไม่สมบูรณ์พอที่จะตัดชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงไปชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ โดยพบว่าไม่มีการเจริญเติบโตของปลายยอด (ตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.11) จึงเลือกระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 ระดับ คือ 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ถั่วเหลืองเกิดการกลายพันธุ์ โดยมีผลกระทบต่อการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ดถั่วเหลืองน้อยกว่า และยังพบต้นอ่อนที่มีลักษณะสมบูรณ์พอที่จะตัดชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงได้มากกว่า ในการทดลองครั้งนี้ เมื่อย้ายเมล็ดที่ผ่านการแช่สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น คือ 0 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร

และเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน พบว่า บนอาหารที่ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์มีจำนวนต้นอ่อนสมบูรณ์เฉลี่ยต่อซ้ำมากที่สุดเท่ากับ 2.35 ต้นต่อซ้ำ รองลงมา คือ อาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 1.50 และ 0.95 ต้นต่อซ้ำ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.12)

ตารางที่ 4.6 แสดงจำนวนต้นอ่อนสมบูรณ์เฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์ต้นอ่อนสมบูรณ์ เมื่อเลี้ยงเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 บนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NaCl ระดับความเข้มข้น 0 0.4 0.5 0.6 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน[1/]

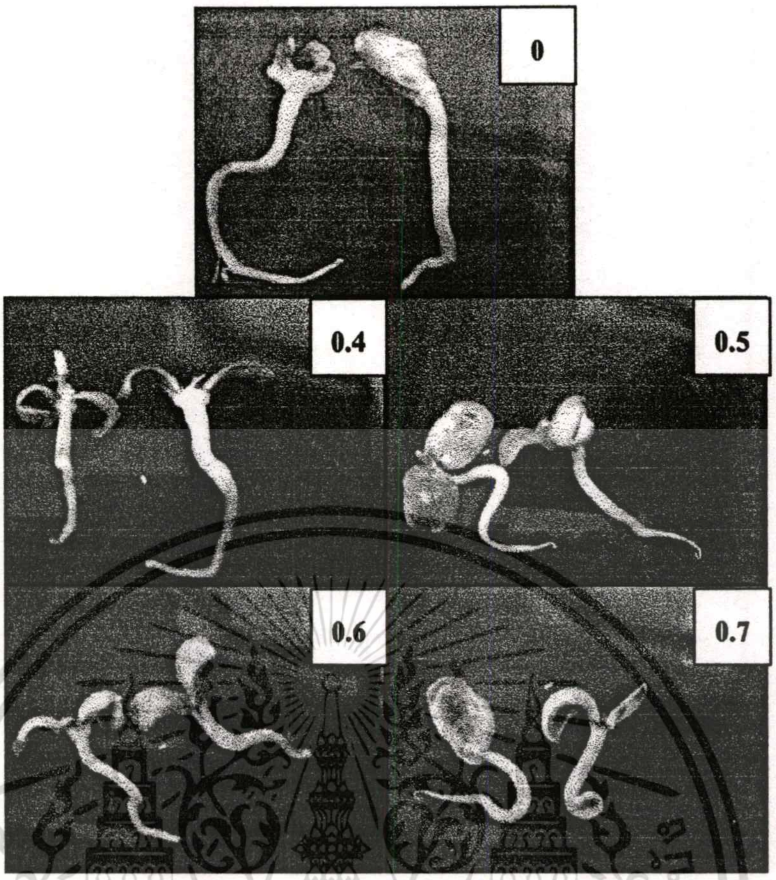
ความเข้มข้นของ NaCl (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนต้นอ่อนสมบูรณ์เฉลี่ย[2/] (ต้นต่อซ้ำ)	เปอร์เซ็นต์ต้นอ่อนสมบูรณ์[3/]
0	2.85[a]	100
0.4	1.30[b]	45.61
0.5	0.90[c]	31.58
0.6	0.65[cd]	22.81
0.7	0.50[d]	17.54
F-test	*	
C.V. (%)	42.27	

<u>หมายเหตุ</u> : [1/] = ทำการทดลอง 20 ซ้ำ ๆ ละ 3 ค่าสังเกต

[2/] = ค่าเฉลี่ยจาก 20 ซ้ำ โดยค่าตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์แบบ DMRT

[3/] = เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับหน่วยทดลองควบคุม

* = มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.11 ลักษณะต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 เมื่อเลี้ยงเมล็ดบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NaCl ระดับความเข้มข้น 0 0.4 0.5 0.6 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน

ตารางที่ 4.7 แสดงจำนวนต้นอ่อนสมบูรณ์เฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์ต้นอ่อนสมบูรณ์ เมื่อเลี้ยงเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 บนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NaCl ระดับความเข้มข้น 0 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน1/

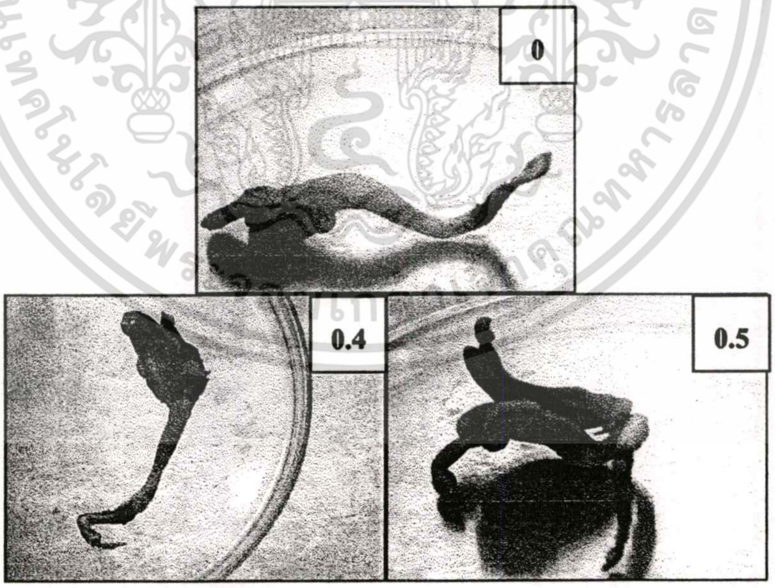
ความเข้มข้นของ NaCl (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนต้นอ่อนสมบูรณ์เฉลี่ย2/ (ต้นต่อซ้ำ)	เปอร์เซ็นต์ต้นอ่อนสมบูรณ์3/
0	2.35^{a}	100
0.4	1.50^{b}	63.83
0.5	0.95^{c}	40.43
F-test	*	
C.V. (%)	52.68	

<u>หมายเหตุ</u> : 1/ = ทำการทดลอง 20 ซ้ำ ๆ ละ 3 ค่าสังเกต

2/ = ค่าเฉลี่ยจาก 20 ซ้ำ โดยค่าตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์แบบ DMRT

3/ = เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับหน่วยทดลองควบคุม

* = มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.12 ลักษณะต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 เมื่อเลี้ยงเมล็ดบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NaCl ระดับความเข้มข้น 0 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน

เมื่อตัดชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงจากต้นอ่อนที่มีลักษณะสมบูรณ์ซึ่งงอกจากเมล็ดที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0 0.4 หรือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน ย้ายลงเลี้ยงบนอาหารอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก พบว่า การเกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนข้อที่ตัดมาจากต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดเมื่อได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะลดลง อาจเนื่องมาจากการที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงในอาหารทำให้การเจริญเติบโตของต้นอ่อนเป็นไปได้ช้า (นฤมล ทีโพนทัย. 2534) โดยยอดใหม่ซึ่งเจริญมาจากชิ้นส่วนข้อที่ตัดมาจากต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนข้อเท่ากับ 2.33 และ 1.67 ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ ตามลำดับ และความยาวยอดเฉลี่ยเท่ากับ 0.43 และ 0.32 เซนติเมตรต่อยอด ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนยอด และความยาวเฉลี่ย ซึ่งเจริญมาจากชิ้นส่วนข้อที่ตัดมาจากต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.47 ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ และ 0.72 เซนติเมตรต่อยอด ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.13)

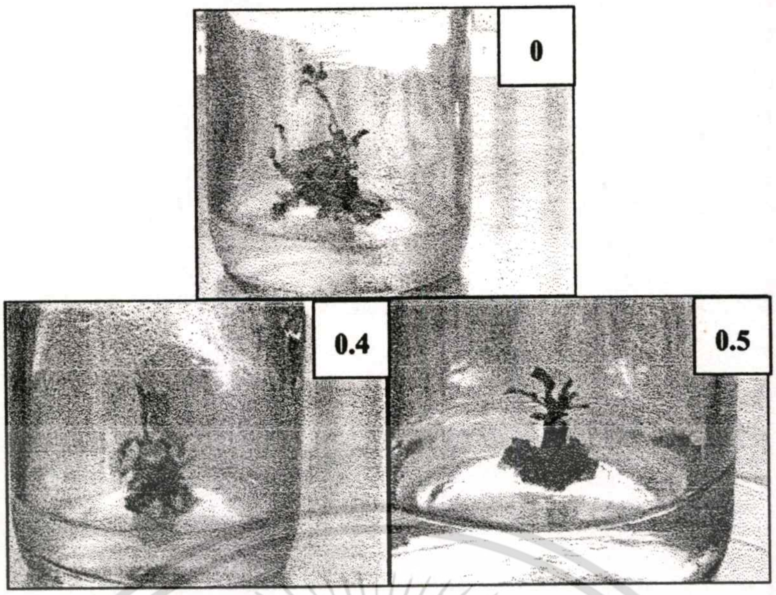
ตารางที่ 4.8 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ยของยอดใหม่ที่เกิดจากการนำชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงที่ตัดมาจากต้นอ่อนซึ่งงอกจากเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NaCl ระดับความเข้มข้น 0 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก เป็นเวลา 30 วัน[1/]

ความเข้มข้นของ NaCl (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนยอดเฉลี่ย[2/] (ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ)	ความยาวยอดเฉลี่ย[2/] (ซม.ต่อชิ้นส่วนข้อ)
0.0	3.47[a]	0.72[a]
0.4	2.33[b]	0.43[b]
0.5	1.67[b]	0.32[b]
F-test	*	*
C.V. (%)	43.13	59.95

หมายเหตุ : 1/ = ทำการทดลอง 15 ซ้ำ ๆ ละ 1 ค่าสังเกต

2/ = ค่าเฉลี่ยจาก 15 ซ้ำ โดยค่าตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์แบบ DMRT

* = มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.13 การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากของชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงที่ตัดมาจากต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NaCl ระดับความเข้มข้น 0 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก เป็นเวลา 30 วัน

จากการนำชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงที่ตัดมาจากต้นอ่อนเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก พบว่า สามารถตัดแยกยอดเดี่ยวลักษณะสมบูรณ์ที่เจริญมาจากตายอด และตาข้างตรงบริเวณชิ้นส่วนข้อของต้นอ่อนที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ ได้เพียง 8 ยอด และระดับความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ได้ 4 ยอด ส่วนชิ้นส่วนข้อของต้นอ่อนที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์นั้นไม่พบยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์พอที่จะตัดยอดได้ เนื่องจากยอดมีการเจริญเติบโตช้า เมื่อนำยอดที่ตัดจากชิ้นส่วนข้อของต้นอ่อนที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ลงเลี้ยงบนอาหารชักนำยอดให้เกิดราก พบว่า สามารถชักนำยอดที่ตัดมาจากต้นอ่อนที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ให้เกิดราก ซึ่งเป็นลักษณะของต้นสมบูรณ์ได้เพียง 5 ต้น และ 2 ต้น ตามลำดับ

4.4.2 ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

เมื่อนำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ที่ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ระดับความเข้มข้น 0 0.3 0.6 0.9 1.2 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดถั่วเหลืองย้ายลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 เป็นเวลา 14 วัน นับจำนวนเมล็ดที่งอก และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับจำนวนเมล็ดที่งอกจากเมล็ดที่ไม่ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS (หน่วยทดลองควบคุม) เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ จากการทดลองครั้งนี้ พบว่า ค่าความเข้มข้นของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ที่ 0.6 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเหลืองน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับหน่วยทดลองควบคุมซึ่งไม่ได้แช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS และเมื่อแช่เมล็ดในสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น มีแนวโน้มว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเหลืองลดลง โดยเมื่อแช่เมล็ดในสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.3 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเหลืองมีค่าเท่ากับ 100 92.86 และ 35.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ระดับความเข้มข้นสูง ๆ คือ ที่ระดับความเข้มข้น 0.9 1.2 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมล็ดไม่สามารถงอก และเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนได้ คาดว่าสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS มีผลยับยั้งการงอกของเมล็ด โดยน่าจะมีผลต่อการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญ (Ando. 1970 ; Koornneef *et. al.* 1981) เมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า เมื่อแช่เมล็ดในสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ระดับความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ จำนวนเมล็ดที่งอกเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 1.95 เมล็ดต่อซ้ำ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเมล็ดที่งอกเฉลี่ยจากเมล็ดที่ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.10 เมล็ดต่อซ้ำ แต่แตกต่างกันทางสถิติกับจำนวนเมล็ดที่งอกเฉลี่ยจากเมล็ดที่ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ระดับความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.75 เมล็ดต่อซ้ำ (ตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.14) และพบว่าค่าความเข้มข้นของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การงอกที่ LD_{50} มีค่าเท่ากับ 0.49 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.15)

ตารางที่ 4.9 แสดงจำนวนเมล็ดที่งอกเฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ที่ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ระดับความเข้มข้น 0 0.3 0.6 0.9 1.2 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ก่อนเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 เป็นเวลา 14 วัน[1/]

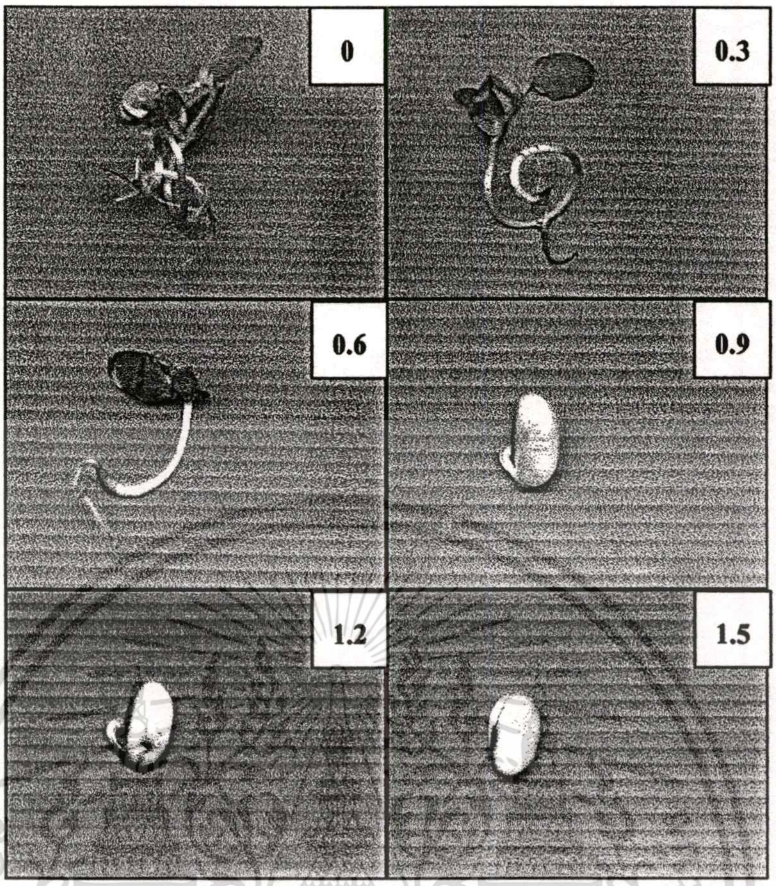
ความเข้มข้นของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	จำนวนเมล็ดที่งอกเฉลี่ย[2/] (เมล็ดต่อซ้ำ)	เปอร์เซ็นต์การงอก[3/]
0	2.10[a]	100
0.3	1.95[a]	92.86
0.6	0.75[b]	35.71
0.9	0.00[c]	0.00
1.2	0.00[c]	0.00
1.5	0.00[c]	0.00
F-test	*	
C.V. (%)	57.95	

<u>หมายเหตุ</u> : [1/] = ทำการทดลอง 20 ซ้ำ ๆ ละ 3 ค่าสังเกต

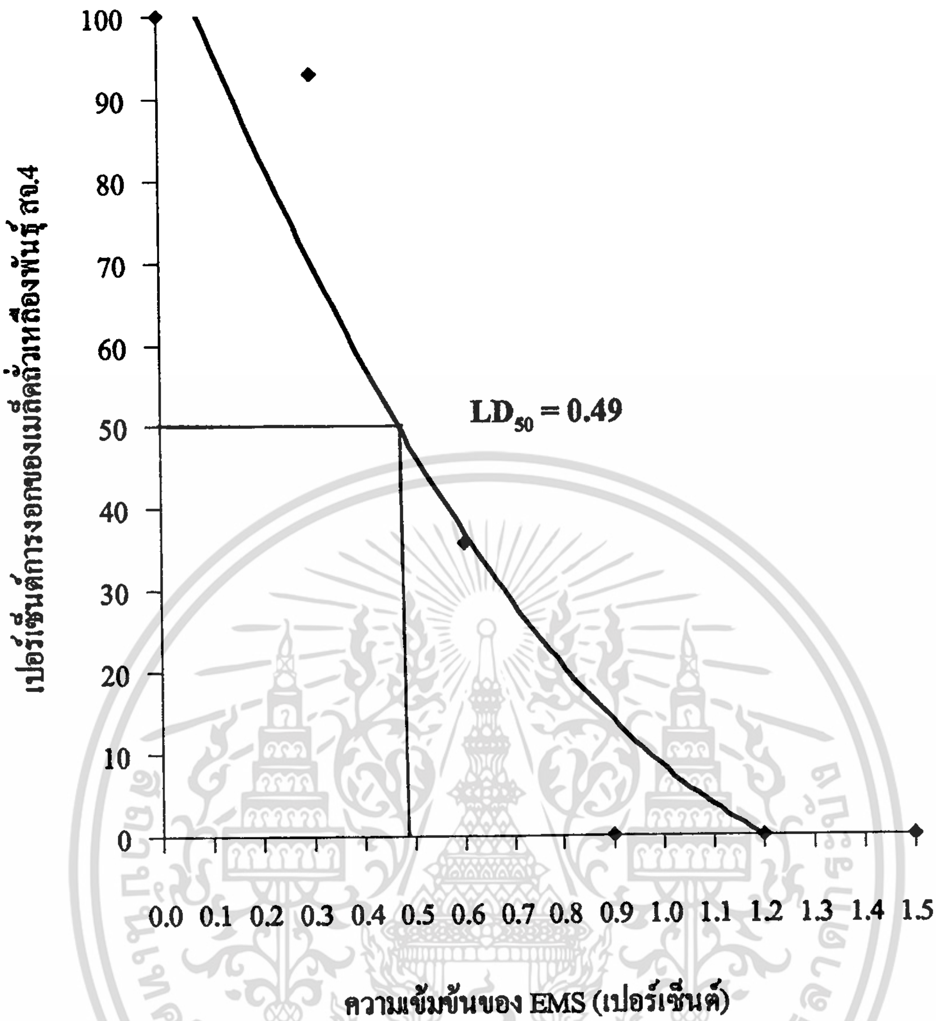
[2/] = ค่าเฉลี่ยจาก 20 ซ้ำ โดยค่าตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์แบบ DMRT

[3/] = เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับหน่วยทดลองควบคุม

* = มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.14 ลักษณะการงอกของเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ที่ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ระดับความเข้มข้น 0 0.3 0.6 0.9 1.2 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ก่อนเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 เป็นเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.15 แสดงค่าความเข้มข้นของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ที่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 เป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ของเมล็ดถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS (LD_{50})

4.4.3 ผลการศึกษาการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS และคัดเลือกลักษณะทนเค็ม

จากผลการทดลองข้อ 4.4.2 แสดงให้เห็นว่าค่าความเข้มข้นของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ที่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเหลืองเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับหน่วยทดลองควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS มีค่าเท่ากับ 0.49 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.15) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ ได้ใช้ระดับความเข้มข้นของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ที่ต่ำกว่า 0.49 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะมีผลกระทบต่อการงอก และการเจริญเติบโตของเมล็ดถั่วเหลืองน้อยกว่า หลังจากนำเมล็ดแช่ในสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้ายเมล็ดลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ ที่ 14 วัน หลังการเลี้ยง พบว่า จำนวนต้นอ่อนสมบูรณ์เฉลี่ยที่งอกจากเมล็ดที่ไม่ได้ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 1.18 ต้นต่อซ้ำ รองลงมา คือ เมล็ดที่ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีจำนวนต้นอ่อนสมบูรณ์เฉลี่ยเท่ากับ 0.62 ต้นต่อซ้ำ ซึ่งแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนเมล็ดที่ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ระดับความเข้มข้น 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบแต่เมล็ดที่มีลักษณะการงอกที่ผิดปกติ ได้แก่ เมล็ดที่งอกได้เฉพาะราก และเมล็ดที่งอกได้เฉพาะยอด ไม่พบต้นอ่อนที่มีลักษณะสมบูรณ์พอที่จะตัดชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงเลย ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากผลของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS หรือ กรดมีเทนซัลโฟนิค และเอธิลแอลกอฮอล์ ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์เป็นผลให้ความสามารถในการงอกของเมล็ดลดลง (Gaul *et. al.* 1966) (ตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.16)

ตารางที่ 4.10 แสดงจำนวนต้นอ่อนสมบูรณ์เฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์ต้นอ่อนสมบูรณ์ที่งอกจากเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 เมื่อเลี้ยงเมล็ดที่ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ระดับความเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NaCl ระดับความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน[1/]

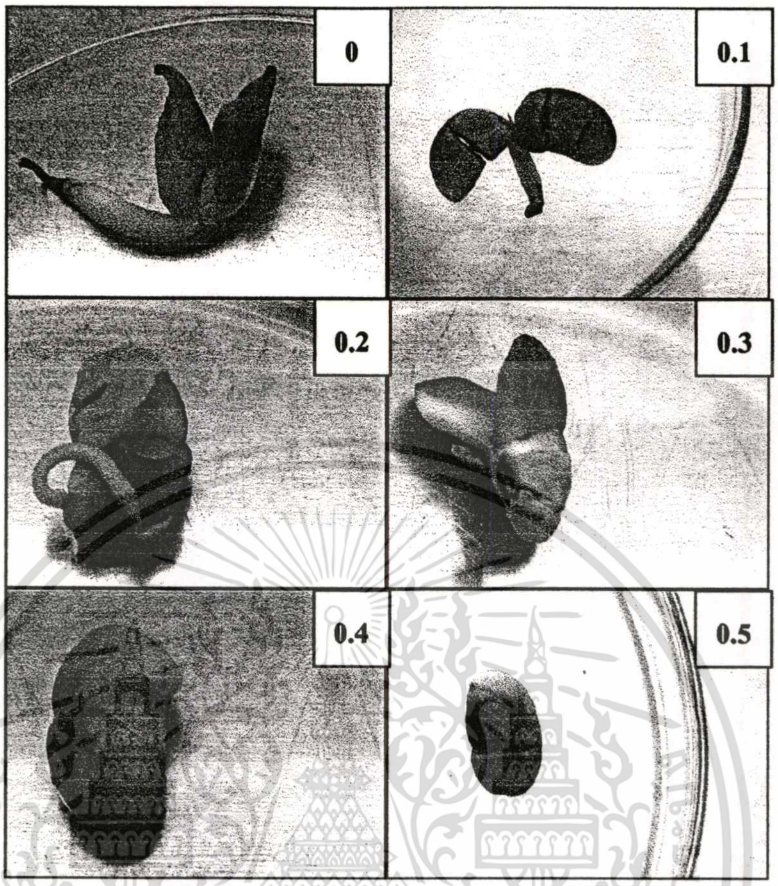
ความเข้มข้นของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	จำนวนต้นอ่อนสมบูรณเฉลี่ย[2/] (ต้นต่อซ้ำ)	เปอร์เซ็นต์ต้นอ่อนสมบูรณ์[3/]
0	2.71[a]	100
0.1	0.62[b]	22.88
0.2	0.000[c]	0.00
0.3	0.000[c]	0.00
0.4	0.000[c]	0.00
0.5	0.000[c]	0.00
F-test	*	
C.V. (%)	42.61	

<u>หมายเหตุ</u> : [1/] = ทำการทดลอง 34 ซ้ำ ๆ ละ 3 ค่าสังเกต

[2/] = ค่าเฉลี่ยจาก 34 ซ้ำ โดยค่าตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์แบบ DMRT

[3/] = เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับหน่วยทดลองควบคุม

* = มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.16 ลักษณะต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 เมื่อเลี้ยงเมล็ดที่ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ระดับความเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NaCl ระดับความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน

คัดเลือกลักษณะต้นอ่อนที่สมบูรณ์พอที่จะตัดชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงจากต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ความเข้มข้น 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 14 วัน มาตัดชิ้นส่วนข้อย้ายลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน เพื่อชักนำให้ตายอด และตาข้าง ตรงบริเวณข้อเจริญไปเป็นยอดจำนวนมาก พบว่า ชิ้นส่วนข้อที่ตัดมาจากต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ความเข้มข้น 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ โดยยอดใหม่ที่เจริญมาจากชิ้นส่วนข้อที่ตัดมาจากต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ และผ่านการเลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะขนาดเล็ก และสั้น โดยชิ้นส่วนข้อที่ตัดมาจากต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนข้อเท่ากับ 3.70 และ 2.35 ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.17)

ตารางที่ 4.11 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ยของยอดใหม่ที่เกิดจากการนำชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงที่ตัดมาจากต้นอ่อนซึ่งงอกจากเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ที่ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ความเข้มข้น 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และผ่านการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NaCl ระดับความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก เป็นเวลา 30 วัน[1/]

ความเข้มข้นของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนข้อ[2/] (ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ)	ความยาวยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนข้อ[2/] (ซม.ต่อชิ้นส่วนข้อ)
0	3.70[a]	2.426[a]
0.1	2.35[b]	0.700[b]
F-test	*	*
C.V. (%)	59.90	58.63

หมายเหตุ : [1/] = ทำการทดลอง 20 ซ้ำ ๆ ละ 1 ค่าสังเกต

[2/] = ค่าเฉลี่ยจาก 20 ซ้ำ โดยค่าตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์แบบ DMRT

* = มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

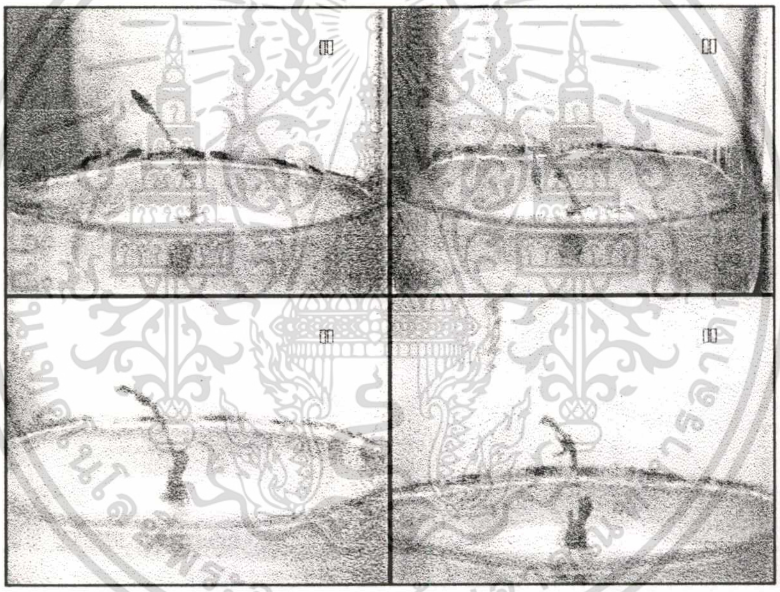
รูปที่ 4.17 การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากของชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงที่ตัดมาจากต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ที่ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ความเข้มข้น 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และผ่านการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NaCl ระดับความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก เป็นเวลา 30 วัน

เมื่อตัดแยกยอดเดี่ยวลักษณะสมบูรณ์ที่เจริญมาจากตายอด และตาข้าง ตรงบริเวณชิ้นส่วนข้อของต้นอ่อนที่ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก พบว่า สามารถตัดยอดได้อย่างละ 2 ต้น มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน เพื่อชักนำยอดให้เกิดราก

4.5 ผลการศึกษาการทดสอบความทนเค็มของต้นถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ที่ผ่านการคัดเลือกลักษณะทนเค็มแล้ว

เมื่อนำต้นถั่วเหลืองที่เป็นต้นสมบูรณ์ คือ มียอด และราก ที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนข้อที่ตัดมาจากต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.4 เปอร์เซ็นต์ (Ps) โดยผลิตได้ 2 ต้น และของชุดการทดลองควบคุม (Pc) ผลิตได้ 5 ต้น พบว่าสามารถเลือกต้นที่มีลักษณะใกล้เคียงกันในชุด Ps และ ชุด Pc ได้เพียงชุดละ 1 ต้นเท่านั้น เพื่อทดสอบความทนเค็มเป็นเวลา 7 วัน บนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.18)

	ก่อนทดสอบ	หลังทดสอบ
ต้น Pc		
ต้น Ps		



รูปที่ 4.18 ลักษณะการเจริญของต้นถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อที่ตัดมาจากต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.4 เปอร์เซ็นต์ (ต้น Ps) และชุดการทดลองควบคุม (ต้น Pc) เมื่อนำมาทดสอบความทนเค็มบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม NaCl ระดับความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างต้น Pc และ ต้น Ps หลังจากทดสอบความทนเค็ม เป็นเวลา 7 วัน พบว่าต้น Pc มีลักษณะชะงักการเจริญเติบโตและใบร่วง ขณะที่ ต้น Ps มีลักษณะเจริญ และแข็งแรงดีกว่าต้น Pc อาจเนื่องมาจากการคัดเลือกต้นอ่อนบนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์จะทำให้พืชปรับสภาพทางสรีรวิทยา (Paek *et. al.* 1989) ให้เหมาะสมกับความเครียดที่ได้รับ โดยใช้กลไกการทน

เค็ม ดังเช่น การสะสมโซเดียมไอออน และคลอไรด์ไอออน สำหรับปรับค่าแรงดันออสโมติกของสารละลายภายในเซลล์ให้ใกล้เคียงกับค่าแรงดันออสโมติกของสารละลายภายนอกเซลล์ ซึ่งมีผลทำให้ต้น Ps สามารถดูดน้ำ และแร่ธาตุอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ หรืออาจจะขจัดไอออนส่วนเกินออกจากต้นโดยใช้เซลล์ราก ดังเช่น การทดลองของ Phupaibul (1990) ที่รายงานว่าต้นอ่อนที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์จะมีปริมาณโซเดียมไอออน และคลอไรด์ไอออนที่เหมาะสม เมื่อนำไปขยายพันธุ์ และทดสอบความทนเค็มจึงทำให้ต้นสามารถปรับสภาพทางสรีรวิทยาได้ดีกว่าต้นที่มาจากการคัดเลือกต้นอ่อนที่ไม่ได้ผ่านการเลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการขยายพันธุ์ถั่วเหลืองโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้ชิ้นส่วนข้อตรงตำแหน่งใบเลี้ยงเกิดยอดจำนวนมาก คือ อาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 6.4 ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำยอดให้เกิดราก คือ อาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม IBA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งชักนำให้ยอดเกิดรากได้

จากการศึกษาการหาค่า LD_{50} ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองที่เพาะในหลอดทดลอง โดยการนำต้นถั่วเหลืองมาเลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ค่าดัชนีการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองจะมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.2 ถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์ ค่าดัชนีการเจริญเติบโตของต้นถั่วเหลืองมีค่าต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของหน่วยทดลองควบคุม และค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเจริญเติบโตเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ของหน่วยทดลองควบคุม (LD_{50}) เท่ากับ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ในทำนองเดียวกันจากการศึกษาการหาค่า LD_{50} ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการงอกของเมล็ดถั่วเหลืองที่เพาะในหลอดทดลอง โดยการนำเมล็ดเลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดจะลดลง เมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.4 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปค่าเปอร์เซ็นต์การงอกลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และการวัดการเจริญเติบโต เช่น น้ำหนักสดเฉลี่ย ความสูงเฉลี่ย และน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของต้นอ่อนลดลง เมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ สูงขึ้น และค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเหลืองเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ของหน่วยทดลองควบคุม (LD_{50}) เท่ากับ 0.38 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ และคัดเลือกลักษณะทนเค็มพบว่า เมื่อนำเมล็ดเลี้ยงบนอาหารสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0 0.4 0.5 0.6 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เฉพาะอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ที่สามารถให้ยอดได้ เมื่อตัดชิ้นส่วนข้อของต้นอ่อนที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้นดังกล่าวไปชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีการเกิดจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 2.35 1.50 และ 0.95

ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ ตามลำดับ และนำยอดไปชักนำให้เกิดรากบนอาหารสูตร MB5 ที่เติม IBA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ พบว่า เมื่อนำเมล็ดที่ผ่านการแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.3 0.6 0.9 1.2 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้ายลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB5 พบว่า สามารถหาค่าปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ที่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเหลืองเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ของหน่วยทดลองควบคุม (LD_{50}) เท่ากับ 0.49 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS และคัดเลือกลักษณะทนเค็มโดยนำเมล็ดมาแช่สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้ายลงเลี้ยงบนอาหารสูตร MB5 ที่เติม BA 11 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกลือโซเดียมคลอไรด์ระดับความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ พบว่า EMS ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ไม่พบจำนวนต้นอ่อนสมบูรณ์ จากนั้นนำชิ้นส่วนข้อของต้นอ่อนที่ผ่านการแช่ EMS ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรMB5 ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IBA 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกระตุ้นให้เกิดยอดจำนวนมาก พบว่า มีการเกิดจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 3.70 และ 2.35 ยอดต่อชิ้นส่วนข้อ ตามลำดับ และนำยอดไปชักนำให้เกิดรากบนอาหารแข็งสูตร MB5 ที่เติม IBA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการศึกษาการทดสอบความทนเค็ม พบว่า ต้นถั่วเหลืองที่เกิดจากชิ้นส่วนข้อที่ตัดมาจากต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการเจริญบนอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ได้ดีกว่าต้นที่ไม่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ส่วนการทดสอบความทนเค็มของต้นถั่วเหลืองที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS นั้น พบว่า ลักษณะต้นที่ผลิตได้มีลำต้นเตี้ย แคระแกรน และตายไปในที่สุดจนไม่สามารถนำมาทำการทดสอบความทนเค็มได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การที่พืชสะสม Na^+ และ Cl^- ไว้ในเซลล์เป็นปริมาณมากจนเกิดเป็นอันตรายกับเซลล์ หรือ พืชอาจสะสมกรดมีเทนซัลโฟนิค และเอธิลแอลกอฮอล์ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS ไว้ในเซลล์เป็นปริมาณมาก มีผลยับยั้งการเจริญเติบโต และทำให้เซลล์ตายได้ (Ben-Hayyim and Kochba. 1983 ; Gaul *et. al.* 1966)

บรรณานุกรม

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2541. เอกสารวิชาการ ถั่วเหลือง. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

กรมวิชาการเกษตร. 2541. การสัมนาเรื่องแนวทางการวิจัยและพัฒนาพืชเร่งรัด. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์สถาบันวิจัยพืชไร่.

ถวัลย์รัตน์ ผ่องใส. 2528. “การใช้เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์มะเขือเทศทนเค็ม.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นฤมล ทีโพนทัย 2534. “อิทธิพลของโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อการเจริญเติบโตผลผลิตและองค์ประกอบทางเคมีของถั่วพืชอาหารสัตว์.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2542. ถั่วเหลือง ใน พืชเศรษฐกิจ. เล่มที่ 1. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524. หลักการและวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อ. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ : ฝ่ายโรงพิมพ์สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริลักษณ์ สุวรรณจิตร. 2540 “การคัดแยกและคัดเลือกหญ้าแฝกทนเค็มในสภาพหลอดทดลอง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สมศรี อรุณินท์. 2542. เอกสารคู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐ : ดินเค็ม. กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. กรุงเทพฯ : ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรดี สหวัชรินทร์. 2526. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ : ฟันนี่พับลิชชิ่ง.

อรุณศิริ กำลัง. 2525. “อิทธิพลของเกลือแกงที่มีต่อการเจริญเติบโตและการสะสมไอออนต่าง ๆ ของถั่วเหลือง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาปฐพีวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรุณี ยูวะนิยม. 2542. เอกสารคู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐ : ดินเค็ม. กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

บรรณานุกรม

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2541. เอกสารวิชาการ ถั่วเหลือง. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

กรมวิชาการเกษตร. 2541. การสัมนาเรื่องแนวทางการวิจัยและพัฒนาพืชเร่งรัด. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์สถาบันวิจัยพืชไร่.

ถวัลย์รัตน์ ผ่องใส. 2528. “การใช้เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์มะเขือเทศทนเค็ม.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นฤมล ทีโพนทัย 2534. “อิทธิพลของโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อการเจริญเติบโตผลผลิตและองค์ประกอบทางเคมีของถั่วพืชอาหารสัตว์.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2542. ถั่วเหลือง ใน พืชเศรษฐกิจ. เล่มที่ 1. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524. หลักการและวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อ. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ : ฝ่ายโรงพิมพ์สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริลักษณ์ สุวรรณจิตร. 2540 “การคัดแยกและคัดเลือกหญ้าแฝกทนเค็มในสภาพหลอดทดลอง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สมศรี อรุณินท์. 2542. เอกสารคู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐ : ดินเค็ม. กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. กรุงเทพฯ : ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรดี สหวัชรินทร์. 2526. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ : ฟันนี่พับลิชชิ่ง.

อรุณศิริ กำลัง. 2525. “อิทธิพลของเกลือแกงที่มีต่อการเจริญเติบโตและการสะสมไอออนต่าง ๆ ของถั่วเหลือง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาปฐพีวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรุณี ยูวะนิยม. 2542. เอกสารคู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐ : ดินเค็ม. กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

activities." Soil Sci. Soc. of Amer. J. 46 : 1173-1177.

Greenway, H. and R. Munns. 1983. "Interactions between growth, uptake of Cl^- and Na^+ and water relations of plants in saline environments. II. Highly vacuolates cells." Plant Cell Environ. 6 : 575-589.

Gaul, H. *et. al.* 1966. EMS-induced genetic variability in barley : the problem of EMS-induced sterility and a method to increase the efficiency of EMS treatment, pp. 63-84. In IAEA (ed.). Mutation in Plant Breeding. Proceeding of a Panel on Coordination of Research on the Production and use of Induced Mutations in Plant Breeding. IAEA, Vienna.

Hisajima *et. al.* 1986. Microplant propagation through multiple shoot formation from seeds, embryos and excised single shoots, pp. 123-126. In B. Napompeth and S. Suphadrabandhu (eds.). New Frontiers in Breeding Research. Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok.

IAEA. 1977. Manual on Mutation Breeding : Technical Report Series No. 119. 2nd ed. Joint FAO/IAEA Division of Atomic Energy in Food and Agriculture. 288 pp.

IAEA. 1990. Methods of Induction of Mutations : Standard for Laboratory Operations Involving Chemical Mutagens. A Training Manual. Plant Breeding Unit Joint FAO/IAEA. 73 pp.

Johnson, D.W. and S.E. Smith. 1992. "Response to NaCl of alfalfa plants regenerated from non-saline callus cultures." Plant Soil. 143 : 311-315.

Kerns, H.R. *et al.* 1986. "Correlation of cotyledonary node shoot proliferation and somatic embryoid development in suspension cultures of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.)." Plant Cell Rep. 5 : 140-143.

Koornneef, M. *et. al.* 1981. "Isolation and use of mutation in Arabidopsis thaliana and tomato." pp. 227-247. In Induced Mutation A Tool in Plant Research. IAEA, Vienna.

Kumar, L.S.S. 1952. "Doubling of chromosomes induced by glorisine isolated from Gloriosa superba." J. Sci. Ind. Res. 11 : 446.

Levitt, J. 1972. Salt and Ion Stresses, pp. 489-529. In J. levitt (ed.). Responses of Plants to Environmental Stresses, Missouri.

McClean, H. and K.F. Grafton. 1989. "Regeneration of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis." Plant Sci. 60 : 117-122.

Miller, D.E. 1986. "Root systems in relation to stress tolerance." Hort. Science 21 : 963-968.

Mohr, H. and P. Schopfer. 1995. Plant physiology. New York : Springer-Verlag. 629 p.

Narin, P. and Raina, S.N. 1975. "Cytological assay of C-mitotic potency of colchicines obtained from *Gloriosa superba* Linn." Cytologia (Tokyo). 40(3/4) : 751-757.

Novak, F.J. 1990. Plant Tissue Culture Techniques for Mutation Breeding. A Training Manual. Joint FAO/IAEA Programme, IAEA Laboratories-Seibersdorf, Austria. Plant Breeding Unit. 194 p.

Paek, K.Y., C.H. Lee and S.H. Shin. 1989. "Biotechnological approaches for improving salt tolerance : selection and physiological studies of salinity stress." Korean J. Plant Tissue Cult. 16(1) : 1-14.

Pierik, R.L.M. 1987. In Vitro Culture of Higher Plants. Dordrecht : Martinus Nijhoff Publishers. 344 p.

Phupaibul, P. 1990. "Responses of corn, soybean and sesbania plants to salt stress." M.S. thesis, Kyoto Univ., Kyoto.

Sachs, T. 1991. Pattern Formation in Plant Tissue. Jerusalem : Cambridge University Press. 234 pp.

Saka, H. *et. al.* 1980. "Stimulation of multiple shoot formation on soybean stem nodes in culture." Plant Sci. Lett. 19 : 193-201.

Sharma, V.K. and Kothari. 1994. "Genotypic differences of multiple shoot forming capacity in soybean (*Glycine max*. L. Merr.)." Plant Tissue Cult. (Bangladesh). 4(1) : 17-24.

Sharma, S.K. 1995. "Studies on growth, water regulations and distribution of Na^+, K^+ and other ions in wheat under short-term exposures to salinity. Indian." J. Plant Physiol. 38 : 233-235.

Sigurbjornsson, B. 1983. Induced mutation. 153-176. *In* D.R. Wood ed. Madison, Wisconsin : Crop Breeding. Amer. Soc. Agron. and Crop Sci. Soc. Amer.

Skoog, F. and C.O. Miller. 1957. "Chemical regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissues Cultured *in Vitro*." Sym. Soc. Exp. Bio. 11(1957) : 118-131.

Slatyer, R.D. 1967. Plant Water Relationship. Acadamic Press, New York. 336 p.

Smith, M.K. and J.A. McComb. 1981a. "Use of callus culture to detect NaCl tolerance in cultivars of tree species of pasture legumes." Aust. J. Plant Physiol. 8 : 437-442.

________________________. 1981b. "Effect of NaCl on the growth of whole plant and their corresponding callus culture." Aust. J. Plant Physiol. 8 : 267-275.

Street, H.E. 1973. Plant tissue and cell culture. Berkeley and Los Angeles :

University of California Press. 503 pp.

Sucharit, S. and Surathin, K. 1993. "The role of medicinal plants for the study of mosquito species complex." Mahidol Univ. Ann. Res. Abst. 1993. And Bibliogy. Nonformal. Public. 1993. 21 : 183.

Van Hoorn, J.W. 1971. "Salt tolerance and crop management of salt affected soil." 136-148. *In* Salinity seminar Baghdad. Rome : Food and Argricultural Organization of the United nations.

Weil, R.R. and N.A. Khalil. 1986. "Salinity tolerance of winged bean as compared to that of soybean." Agron. J. 78 : 67-70.

Wright et. al. 1986. "Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*." Plant Cell Rep. 5 : 150-154.

Yi, Z. and L. Tian. 2000. "Changes of proline levels and abscisic acid content in tolerant/sensitive cultivars of soybean under osmotic conditions." Soybean Genet. Newsl. 27 : 221-224.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. องค์ประกอบสูตรอาหารดัดแปลงของ B5 (MB5) (Cheng *et al.* 1980)

<u>ธาตุอาหารหลัก</u>	<u>ปริมาณที่ใช้ในอาหาร 1 ลิตร (มิลลิกรัม)</u>
$CaCl_2.2H_2O$	150
$NaH_2PO_4.H_2O$	150
KNO_3	2500
$MgSO_4.7H_2O$	250
$(NH_4)_2SO_4$	134
<u>ธาตุอาหารรอง</u>	
$CoCl_2.6H_2O$	0.03
$CuSO_4.5H_2O$	0.03
H_3BO_3	3.00
KI	0.80
$MnSO_4.H_2O$	10.00
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.30
$ZnSO_4.4H_2O$	2.00
Na_2EDTA	36.00
$FeSO_4.7H_2O$	30.00
<u>สารประกอบอินทรีย์</u>	
Myo-inositol	100
Nicotinic acid	1
Pyridoxine.HCl	1
Thiamine.HCl	5
Sucrose	30000
Agar	6000

ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร (พีเอช) 5.5

2. วิธีการเตรียมอาหาร

เพื่อความสะดวกจะเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (Stock solution) คือ การรวมสารเคมีชนิดที่สามารถรวมกันได้โดยไม่ตกตะกอนไว้ด้วยกันก่อนนำมาเตรียมอาหาร (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540)

2.1 วิธีเตรียมสารละลายเข้มข้นสูตรอาหาร MB5

Stock solution 1 ธาตุอาหารหลัก (50 เท่า)	กรัม/1000 มิลลิลิตร
$CaCl_2.2H_2O$	7.50
$NaH_2PO_4.H_2O$	7.50
KNO_3	125.00
$MgSO_4.7H_2O$	12.50
$(NH_4)_2SO_4$	6.70

Stock solution 2 ธาตุอาหารรอง (100 เท่า)	กรัม/500 มิลลิลิตร
$CoCl_2.6H_2O$	0.003
$CuSO_4.5H_2O$	0.003
H_3BO_3	0.300
KI	0.080
$MnSO_4.4H_2O$	1.000
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.030
$ZnSO_4.4H_2O$	0.200

Stock solution 3* Iron (100 เท่า)	กรัม/500 มิลลิลิตร
Na_2EDTA	3.600
$FeSO_4.7H_2O$	3.000

*ชั่ง Na_2EDTA ใส่ลงไปในน้ำกลั่นละลายให้เข้ากันดีก่อน ชั่ง $FeSO_4.7H_2O$ ใส่ลงไปละลายให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

Stock solution 4 <u>วิตามิน</u> (100 เท่า)	**กรัม/500 มิลลิลิตร**
Myo-inositol	10.000
Nicotinic acid	0.100
Pyridoxine.HCl	0.100
Thiamine.HCl	0.500

3. การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

3.1 ใส่น้ำกลั่นลงใน Volumetric flask (ขนาด 1 ลิตร) 400 มิลลิลิตร วางบนเครื่องกวน (magnetic stirrer)

3.2 เติม Stock solution 1 20 มิลลิลิตร

3.3 เติม Stock solution 2 5 มิลลิลิตร

3.4 เติม Stock solution 3 5 มิลลิลิตร

3.5 เติม Stock solution 4 5 มิลลิลิตร

3.6 เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัม คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3.7 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตตามความต้องการ

3.8 ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

3.9 ปรับความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช) ให้ได้ 5.5 ด้วย 0.2 M HCl และ 0.5 N KOH

3.10 เติมวุ้น 6 กรัม นำไปต้มให้วุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3.11 บรรจุอาหารลงขวด (ขนาด 4 ออนซ์) ขวดละ 20 มิลลิลิตร แล้วปิดฝา

3.12 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

3.13 หลังจากนำขวดอาหารขึ้นมาจากหม้อนึ่ง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น (วุ้นแข็ง) จึงนำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อได้

สรุปขั้นตอนการเตรียมอาหาร

รวม Stock solution 1, 2, 3, 4

↓

เติมน้ำตาลซูโครส

↓

เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

↓

ปรับความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช) 5.5

↓

ปรับปริมาตร

↓

เติมวุ้น

↓

ต้มให้วุ้นละลาย

↓

แบ่งใส่ขวดขนาด 4 ออนซ์ ขวดละ 20 มิลลิลิตร

↓

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ภาคผนวก ข.

สารเคมี และสารควบคุมการเจริญเติบโต

1. การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 1 ลิตร โดยเตรียมดังนี้ คือ

1.1 กลุ่มไซโตไคนิน

ชั่ง BA หนัก 0.1 กรัม ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากสารละลายหมดแล้ว เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

1.2 กลุ่มออกซิน

ชั่ง IBA หนัก 0.1 กรัม ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากสารละลายหมดแล้ว เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร จะได้สารละลายความเข้มข้นสูง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 ลิตร

2. การเตรียมน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อ

2.1 คลอรอกซ์ 8 เปอร์เซ็นต์

ได้จากจากการใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 92 มิลลิลิตร แล้วเติมคลอรอกซ์ (มีชื่อทางการค้าว่า ไฮเตอร์) ลงไป 8 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันดี

2.2 แอลกอฮอร์ 70 เปอร์เซ็นต์

ได้จากจากการใช้เอทธิลแอลกอฮอร์ 95 เปอร์เซ็นต์จำนวน 70 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 25 มิลลิลิตรลงไป ละลายให้เข้ากันดี

3. การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

3.1 การฆ่าเชื้อเครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่าง ๆ โดยนำเครื่องแก้วที่ต้องใช้ไปอบในตู้อบ (Hot air Oven) อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง

3.2 การฆ่าเชื้อภายในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow) เช็ดตู้ย้ายเนื้อเยื่อด้วย 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ แล้ว เปิดแสงอุลตร้าไวโอเลตทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ก่อนทำการทดลอง

ประวัติผู้เขียน

นายณพวัฒน์ ตั้งสุวงศ์ไท เกิดเมื่อวันที่ 26 กรกฎาคม ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ปีการศึกษา 2539 ในสาขาวิชาจุลชีววิทยา (MICROBIOLOGY) และเข้าทำงานที่บริษัทผลิตเครื่องมือแพทย์ ET DISPOSABLE MEDICAL CO., LTD. มหาชัยเมืองใหม่ จังหวัดสมุทรสาคร ก่อนที่จะมาศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2542 และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2547