สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เรื่อง การคัดเลือกมะเขือเทศทนทานต่อสารไกลฟอเสทโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์

โดย

1. นางสาวจารุวรรณ ชัยวิฑูอนุกูล รหัสประจำตัว 33503005
2. นายบัณฑิต ศิลป์เจริญ รหัสประจำตัว 33503019
3. นางสาวสมหญิง จิตตนูนท์ รหัสประจำตัว 33503033

ปพ.
จ3377
2536

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน.เดือน.ปี.....

.b1953792

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2536

Selection for Glyphosate Tolerance in Tomato (*Lycopersicon esculentum* var pyriforme) cell culture

1. Miss Jaruwan Chaiwituanugul

2. Mr. Bandit Silapachalern

3. Miss Somying Jittanoon

A Special Project Submitted in Partial Fufillment of the

Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

1993

หน้าอนุมัติ

หัวข้อโครงงานพิเศษ การคัดเลือกมะเขือเทศทนทานต่อสารไกลฟอเสทโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

โดย 1.นางสาวจารุวรรณ ชัยวิฑูอนุกูล รหัสประจำตัว 33503005

2.นายบัณฑิต ศิลปเจริญ รหัสประจำตัว 33503019

3.นางสาวสมหญิง จิตตนูนท์ รหัสประจำตัว 33503033

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา 1.อาจารย์พนา โลหะทรัพย์ทวี

2.ดร.พวงเพชร พูนทรัพย์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

หัวหน้าภาควิชา

(อาจารย์ อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล)

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

ประธานคณะกรรมการ

(ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม)

กรรมการ

(อาจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม)

กรรมการ

(อาจารย์ พนา โลหะทรัพย์ทวี)

กรรมการ

(ดร.พวงเพชร พูนทรัพย์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การคัดเลือกมะเขือเทศทนทานต่อสารไกลโฟเสทโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์
นักศึกษา	นางสาว จารุวรรณ ชัยวิฑูอนุกูล
	นาย บัณฑิต ศิลปเจริญ
	นางสาว สมหญิง จิตตนูนท์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ พนา โลหะทรัพย์ทวี
	ดร.พวงเพชร พูนทรัพย์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2536

บทคัดย่อ

เมื่อเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบเลี้ยงของมะเขือเทศ ในอาหารสูตร Murashige และ Skoog ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต naphaleneacetic acid (NAA) และ benzyladenine (BA) พบว่า อัตราส่วนของ NAA ต่อ BA ที่สามารถชักนำให้ลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบเลี้ยง เกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส คือ NAA 1.5 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ร่วมด้วย BA 9.0 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ และเมื่อนำแคลลัส ส่วนของยอดที่เกิดจากแคลลัส และส่วนของยอดที่เกิดจากเมล็ดของมะเขือเทศ มาทดสอบความทนทานต่อสารไกลโฟเสท พบว่าค่าความเข้มข้นของไกลโฟเสทที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต 50 เปอร์เซนต์ (LD_{50}) ของแคลลัส ชิ้นส่วนยอดที่เกิดจากแคลลัสและเมล็ด มีค่าเท่ากับ 0.08 0.006 และ 0.007 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

Special Project Title	Selection for Glyphosate Tolerance in Tomato (*Lycopersicon esculentum* var pyriforme) cell culture
Student	Miss Jaruwan Chaiwituanukul
	Mr.Bandit Sillapachareun
	Miss Somying Jittanoon
Special Project Adviser	Mr.Pana Lohasupthawee
	Dr.Puangpet Poonsup
Department	Applied Biotechnology
Academic year	1993

Abstract

Explants were obtained from hypocotyls and cotyledon of tomato and grown on a modified Murashige and Skoog's medium with various combination of napthaleneacetic acid (NAA) and benzyladenine (BA). The suitable hormone combination for embryogenic callus formation was at 1.5×10^{-3} mM NAA and 9.0×10^{-3} mM BA. Cultured calli , shoot tips from both calli and seeds of tomato were tested for glyphosate tolerance. The 50 percent growth inhibition of calli ,shoot tips from both calli and seeds by glyphosate were 0.08 , 0.006 and 0.007 mM , respectively

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้น ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะผู้จัดทำขอขอบคุณ อาจารย์ พนา โลหะทรัพย์ทวี และ ดร.พวงเพชร พูนทรัพย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ รวมทั้งกรุณาตรวจแก้ทางด้านภาษา และให้คำแนะนำ ในด้านต่าง ๆ ในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้ ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม และ อาจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ซึ่งได้กรุณาเป็นคณะกรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษ คุณพยอม เกียรติกำจร เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้ยืมอุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการคอมพิวเตอร์ ตลอดจนเพื่อน ๆ รวมทั้งน้องทุกคนที่ช่วยล้างขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการปฏิบัติโครงงานพิเศษนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ ดร.กรินทร์ ฐานพัฒนา ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องเอกสารอ้างอิง และข้อมูลต่างๆ รวมทั้ง อ.ธวัช เปาวรยะ ที่ได้กรุณาให้เมล็ดพันธุ์ตลอดจนให้ข้อมูลต่างๆเกี่ยวกับมะเขือเทศพันธุ์สีดาห้วยทราย ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

23 มีนาคม 2537

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญรูป	ง
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 ขั้นตอนการทดลอง	12
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	18
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	40
ภาคผนวก ก. สูตรอาหาร MS	
ข. วิธีการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	
เอกสารอ้างอิง	

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของไกลโฟเสท

2 ตำแหน่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์กรดชิคิมิคโดยไกลโฟเสท

3 เอมบริโอจีนิคแคลลัส

4 การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เสริมด้วย NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

5 การเกิดยอดและรากจากเนื้อเยื่อส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เสริมด้วย NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

6 การเจริญของส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ไม่เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต

7 การเกิดยอดและรากจากแคลลัสของส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เสริมด้วย NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

8 การเปรียบเทียบการเจริญของแคลลัสจากส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เสริมด้วย NAA 5.0 x 10^{-4} มิลลิโมลาร์ร่วมกับ BA 9.0 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ และ NAA 5.0 x 10^{-4} มิลลิโมลาร์ร่วมกับ BA 1.8 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์

9 การเปรียบเทียบการเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสจากส่วนของใบเลี้ยงที่เจริญในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เสริมด้วย NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

10 การเกิดยอดและรากจากส่วนของใบเลี้ยงที่เจริญในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เสริมด้วย NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

11 ผลของไกลโฟเสทต่อดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัส

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

12 ค่า LD_{50} ของไกลโฟเสทในแคลลัสจากส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศที่เจริญในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เสริม NAA 1.5×10^{-3} มิลลิโมลาร์ร่วมกับ BA 1.8×10^{-3} มิลลิโมลาร์ ที่ผสมไกลโฟเสทความเข้มข้นต่างๆ

13 ลักษณะแคลลัสที่ได้รับสารไกลโฟเสทความเข้มข้นต่างๆ

14 ต้นที่เจริญจากแคลลัส

15 ผลของไกลโฟเสทต่อดัชนีการเจริญเติบโตของต้นที่เกิดจากแคลลัส

16 ค่า LD_{50} ของไกลโฟเสทในต้นที่เกิดจากแคลลัสของมะเขือเทศที่เจริญในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ผสมไกลโฟเสทความเข้มข้นต่างๆ

17 ลักษณะต้นที่เจริญจากแคลลัสหลังจากทดสอบไกลโฟเสท

18 ลักษณะต้นที่เจริญจากเมล็ดหลังจากทดสอบไกลโฟเสท

19 ผลของไกลโฟเสทต่อดัชนีการเจริญเติบโตของต้นที่เกิดจากเมล็ด

20 ค่า LD_{50} ของไกลโฟเสทต้นที่เกิดจากเมล็ดที่เจริญในอาหาร MS ที่ผสมไกลโฟเสทความเข้มข้นต่างๆ

21 ลักษณะของต้นที่เจริญในอาหารผสมไกลโฟเสทเปรียบเทียบกับต้นที่เจริญในอาหารสูตรควบคุม

22 การเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร MS เสริมด้วย NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

23 การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส ยอด และรากของเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร MS เสริมด้วย NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

บทที่ 1

บทนำ

ในหลายปีที่ผ่านมาได้มีการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการผลิตสายพันธุ์พืชที่ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช รวมถึงศึกษากลไกการทำงานของสารกำจัดวัชพืชที่มีต่อเซลล์พืช ตัวอย่างเช่น การศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงยาสูบในอาหารที่ใส่สารกำจัดวัชพืช sulphonylureas และการศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงข้าวโพดในอาหารที่ใส่สารกำจัดวัชพืช imidazolinones นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยที่ใช้สารกำจัดวัชพืชตัวอื่นๆ เช่น paraquat, picloram, bentazone, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, atrizine และ glyphosate โดยศึกษาในพืชหลายๆชนิด เช่น แครอท แพงพวยฝรั่ง มะเขือเทศ ลำโพง ฯลฯ ทั้งนี้เพื่อผลิตสายพันธุ์ที่ต้านทาน-ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชให้กับเกษตรกร

ในปัจจุบัน เกษตรกรมีการใช้สารกำจัดวัชพืชมากขึ้น (สารพิษในประเทศไทย, 2530-2534) ทำให้น่ากลัวว่า สักวันหนึ่งข้างหน้าอาจจะมีวัชพืชที่มีการปรับตัวให้ทนทาน-ต้านทานต่อสารที่เกิดขึ้น และเมื่อต้องการที่จะทำลายวัชพืชนั้นจำเป็นที่จะต้องเพิ่มปริมาณสารที่ใช้ ซึ่งอาจจะเป็นอันตรายต่อพืชที่ปลูกได้ แต่ถ้าพืชปลูกเป็นพันธุ์ที่ทนทาน-ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชแล้วปัญหาดังกล่าวก็จะหมดไป

สำหรับการคัดเลือกพันธุ์พืชที่ทนทาน-ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชนั้น สามารถทำได้ทั้งในระดับต้นพืช โดยทำการคัดเลือกในแปลงทดลอง หลังจากที่ให้สารกำจัดวัชพืชแล้ว ก็คัดเลือกต้นที่ไม่ถูกทำลาย หรือต้นที่แสดงอาการเป็นพิษแต่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ การคัดเลือกโดยวิธีนี้ต้องใช้ต้นพืชจำนวนมาก ทำให้เปลืองทั้งเนื้อที่ เวลา และค่าใช้จ่ายมาก แต่ปัจจุบันนี้ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์พืชเป็นที่นิยมมาก ทั้งนี้เนื่องจาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล สภาพดินฟ้าอากาศ ปราศจากศัตรูพืช ใช้เนื้อที่น้อย และสามารถควบคุมคุณภาพและปริมาณผลผลิตได้

การคัดเลือกพันธุ์พืชที่ทนทาน-ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์พืชทำได้โดยการใส่สารกำจัดวัชพืชลงไปในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ และคัดเลือกเซลล์ที่สามารถรอดชีวิตและเจริญได้ในอาหารดังกล่าว(E.D. Nafziger, 1984; R.C. Cresswell

, 1988 และ C.M. Smith, 1986) เนื่องจาก เซลล์ที่รอดชีวิตได้นั้นมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมในด้านความทนทาน-ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช และสามารถถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวได้ เมื่อได้เซลล์ทนทาน-ต้านทานแล้ว ก็นำเซลล์เหล่านี้มาพัฒนาให้เป็นต้นต่อไป

วัตถุประสงค์ของปัญหาพิเศษ

1. เพื่อคัดเลือกเซลเพาะเลี้ยงมะเขือเทศที่ทนทานต่อสารไกลโฟเสท
2. เพื่อชักนำเซลมะเขือเทศที่ทนทานต่อสารไกลโฟเสท ให้พัฒนาเป็นต้นพืชต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้มะเขือเทศสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถทนทานต่อสารไกลโฟเสท โดยสายพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้ในการทดลอง เป็นพันธุ์ที่เกษตรกรไทยนิยมปลูกกันมากในปัจจุบัน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการปลูกมะเขือเทศต่อไป

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

มะเขือเทศ

มะเขือเทศมีชื่อสามัญว่า tomato ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Lycopersicon esculentum.* Mill เป็นพืชผักที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เป็นแหล่งโปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุ มะเขือเทศเป็นพืชที่นิยมปลูกในประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะปลูกมะเขือเทศชนิดรับประทานสดมาก มะเขือเทศที่ใช้บริโภคสดจะเป็นส่วนประกอบของอาหารและอาหารพื้นเมือง ส่วนมะเขือเทศที่ส่งโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อนำไปแปรรูปเป็นซ้อสมะเขือเทศ ปลากระป๋องในซ้อสมะเขือเทศ น้ำมะเขือเทศเข้มข้น น้ำมะเขือเทศเพื่อดื่ม และ มะเขือเทศกระป๋อง เป็นต้น

นอกจากนี้มะเขือเทศยังเป็นพืชผักที่รัฐบาลกำหนดไว้ ให้เป็นพืชผักที่มีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นธุรกิจครบวงจร และขยายการผลิตทั้งปริมาณและคุณภาพเพื่อทดแทนการนำเข้า เนื่องจากอุตสาหกรรมต่อเนื่องของมะเขือเทศเริ่มขยายความสำคัญมากขึ้น โดยเฉพาะอุตสาหกรรมปลากระป๋อง นอกจากนี้ ประเทศไทยยังมีศักยภาพที่จะขยายการผลิตมะเขือเทศทั้งในรูปผลผลิตสด และผลิตภัณฑ์ได้อีกมากและพร้อมที่จะก้าวขึ้นเป็นประเทศส่งออกมะเขือเทศรายสำคัญประเทศหนึ่ง

มะเขือเทศพันธุ์สีดาห้วยทราย (สีดาพระราชทาน) เป็นพันธุ์มะเขือเทศที่ถูกคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มาจากมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 1 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อให้สามารถปลูกได้ผลดีในสภาพนอกฤดู และพบว่า มะเขือเทศพันธุ์นี้สามารถต้านทานต่อโรคไวรัสด่างเหลือง (yellow leaf callus) ได้ดีมาก อีกทั้งยังให้ผลผลิตสูง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศ

การศึกษาทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศส่วนใหญ่นั้น จะศึกษาถึงปัจจัยต่างๆที่ชักนำให้เนื้อเยื่อสามารถพัฒนาไปเป็น แคลลัส ยอด และรากได้

Hanson (1982) ได้สรุปปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศได้ 5 ข้อ ดังนี้

1.สภาพแวดล้อมก่อนที่จะนำต้นพืชมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศก่อนที่จะนำเนื้อเยื่อมาเลี้ยง พบว่ามีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อเป็นอย่างมาก De langhe และ De Bruijne (1976) ได้รายงานว่าการพ่นต้นมะเขือเทศด้วยสารละลาย 2-chloroethyl trimethyl-ammoniumchloride (ccc) ที่มีความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2,5 และ 8 วัน ก่อนทำการตัดใบมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะช่วยส่งเสริมการสร้างยอดได้ปริมาณเพิ่มขึ้นตามลำดับ Carlson (1979) ได้ศึกษาถึงการเลี้ยงต้นมะเขือเทศในสารละลายที่เติมสารประกอบไนโตรเจน 3 ระดับ คือ 50 200 และ 350 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 สัปดาห์ จึงตัดใบมาเลี้ยง พบว่าปริมาณการเกิดยอดจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อต้นพืชได้รับไนโตรเจนในปริมาณที่สูงขึ้นตามลำดับ ส่วนรายงานของ Preece และ Read (1980) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบมะเขือเทศที่ได้จากต้นที่พ่นด้วย giberellic acid (GA_3) 5 x 10^{-4} โมลาร์, benzyladenine (BA) 5 x 10^{-4} โมลาร์และ GA_3 1 x 10^{-4} โมลาร์ ร่วมกับ BA 5 x 10^{-4} โมลาร์ โดยพ่นก่อนตัดใบมาเลี้ยง 1 สัปดาห์ ต้นที่พ่นด้วย BA จะช่วยส่งเสริมการเกิดรากของเนื้อเยื่อ ส่วนต้นที่พ่นด้วย GA_3 ร่วมกับ BA จะยับยั้งการเกิดยอดของเนื้อเยื่อใบ

2.ลักษณะทางพันธุกรรมของมะเขือเทศ

เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบมะเขือเทศสายพันธุ์ต่างๆเพื่อดูความสามารถในการเกิดยอด พบว่า ปริมาณการเกิดยอดแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ พันธุ์ Large Red Cherry สามารถเกิดยอดได้สูงสุด (Padmanabhan และคณะ, 1974; Behki และ Lesley, 1976; Hanson, 1982) มะเขือเทศบางสายพันธุ์ มีการเกิดแคลลัสได้มาก แต่มีความสามารถในการเกิดยอดได้น้อย ซึ่ง Padmanabhan และคณะ (1974) ได้รายงานว่าเป็นผลมาจากอิทธิพลของยีนที่ควบคุมลักษณะการเกิดแคลลัสและการเกิดยอดอยู่คนละตำแหน่ง (loci) กัน และลักษณะเหล่านี้สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นอื่นๆได้

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเกิดยอดระหว่างมะเขือเทศพันธุ์ป่า (*L. peruvianum* Mill.) และพันธุ์ปลูก (*L. esculentum* Mill.) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลำต้น (stem internode) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบ และการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์ส่วนใบ

พบว่า มะเขือเทศพันธุ์ป่าส่วนใหญ่มีปริมาณการเกิดยอดได้สูงกว่าพันธุ์ปลูกมาก (De Langhe และ De Bruijne, 1976; Tal และคณะ, 1977; Miihlbach, 1980)

3.ชนิดของเนื้อเยื่อ

การทดลองหาตำแหน่งที่เหมาะสมของใบที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำใบที่ 1 ถึงใบที่ 5 จากส่วนยอดมาเพาะเลี้ยงนั้น พบว่า ตำแหน่งใบที่ 1 และ 2 จากส่วนยอดมีปริมาณการเกิดยอดได้ดีที่สุด ส่วนใบที่ 5 นั้นเกิดเป็นแคลลัสได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Ohki และคณะ, 1978)

4.ส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศ

สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศ โดยทั่วไปใช้สูตรของ Murashige และ Skoog (MS) (1962) ซึ่ง Kurtz (1982) ได้ดัดแปลงโดยใช้วิตะมินจากสูตรของ Gamborg's B-5 แทนการใช้วิตะมินของสูตร MS เพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนของมะเขือเทศ ส่วน De Langhe และ De Bruijne (1976) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนลำต้นอ่อนและใบอ่อนมะเขือเทศบนอาหารสูตรของ Linsmier และ Skoog (1965) สำหรับสูตรอาหารที่เหมาะต่อการเลี้ยงรากคือสูตรของ White (1943) (Norton และ Boll, 1954)

ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้พัฒนาไปเป็นแคลลัส ยอด และรากได้นั้น คือ การใช้ชนิดและอัตราส่วนของไซโตไคนินและออกซินที่เหมาะสม สำหรับเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด เช่น การเติม IPA ร่วมกับ indoleacetic acid (IAA)ในอัตราส่วนประมาณ 10-20 เท่า (1.5×10^{-5} โมลาร์ IPA และ 10^{-6} โมลาร์ IAA) ลงในสูตรอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนมะเขือเทศ พบว่าทำให้มีการเกิดยอดได้เป็นจำนวนมาก (Ohki และคณะ, 1978) และการเติม IAA ร่วมกับ Kinetin ในอัตราส่วน 1:1 (IAA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร Kinentin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร) ลงในสูตรอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบของมะเขือเทศ พบว่า ทำให้มีการเกิดยอดได้ (Padmanabhan และคณะ, 1974) เช่นเดียวกับ Hangarter และคณะ (1980)ได้รายงานว่า การเติม IAA ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะกระตุ้นการเกิดแคลลัสและยอดได้ดี และยังมีรายงานว่า จะไม่เกิดการสร้างแคลลัสจากส่วนของใบมะเขือเทศ ถ้าไม่มีการเติม napthaleneacetic acid (NAA) ลงในอาหารไม่ว่า BA จะมีความเข้มข้นเท่าใดก็ตาม

(Behki และ Lesley, 1976) กล่าวโดยสรุปแล้ว เมื่อเนื้อเยื่อพืชได้รับสารทั้ง 2 กลุ่มนี้ในอัตราส่วนที่สมดุลสำหรับชิ้นส่วนแต่ละชนิดแล้ว ก็จะพัฒนาไปเป็นส่วนต่างๆที่ต้องการได้ดี ถ้าความเข้มข้นของออกซินสูง เนื้อเยื่อก็จะเจริญเป็นแคลลัสหรือรากและไปยับยั้งการเกิดยอด แต่ถ้ามีความเข้มข้นของไซโตไคนินสูง เนื้อเยื่อจะถูกชักนำให้เกิดเป็นยอด และการสร้างรากก็จะถูกยับยั้ง (De Langhe และ De Bruijne, 1976; Ohki และคณะ, 1978)

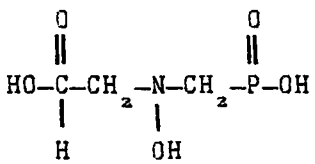
5.สภาวะแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศที่สำคัญ คือ อุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส ได้รับแสงที่มีความเข้มแสง 200-400 แรงเทียน และมีความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประมาณ 50-60 เปอร์เซนต์ (Gunay และ Rao, 1979; Ohki และคณะ, 1978)

สารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท (Glyphosate)

คุณสมบัติทางกายภาพ

ในปี 1972 Franz แห่งบริษัทมอนซานโต้ได้ผลิตไกลโฟเสทเป็นสารกำจัดวัชพืชที่เกษตรกรนิยมใช้ (ทศพล, 2533) มีสูตรโครงสร้างทางเคมี ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 : สูตรโครงสร้างทางเคมีของไกลโฟเสท

ไกลโฟเสทมีชื่อทางเคมี คือ N-(phosphonomethyl)glycine สูตรทางเคมีคือ $C_3H_8NO_5P$ มีน้ำหนักโมเลกุล 169.1 ชื่อสามัญ คือ glyphosate (ANSI,BSI,ISO,WSSA) และชื่อทาง

การค้าที่จำหน่ายโดยทั่วไปได้แก่ Roundup (ราวด์อั้พ) 41เปอร์เซนต์ L, glyphosate (ไกลโฟเสท) 41 เปอร์เซนต์ EC, Cowboy (คาวบอย) 41 เปอร์เซนต์ L, spark (สปาร์ค) 16 เปอร์เซนต์ L, phosate (โฟเสท), brace (เบรส), fire (ไฟร์) 41เปอร์เซนต์ L, clean up (คลีนอั้พ) สภาพทางฟิสิกส์เป็นของแข็ง สีขาว ไม่มีกลิ่น มีจุดหลอมตัว-จุดเดือดที่ 200 องศาเซลเซียส ละลายน้ำได้ 1.2 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (พรชัย, 2531)

คุณสมบัติทางชีวภาพ (M.L. Racchi, 1990)

ในปีค.ศ. 1971 Barld และคณะได้นำเอาไกลโฟเสทในรูปของเกลือ isopropylamine มาใช้ปราบวัชพืช ซึ่งได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจาก ไกลโฟเสทมีคุณสมบัติเฉพาะคือ เป็นสารกำจัดวัชพืชแบบไม่เลือกทำลาย (nonselective) มีฤทธิ์ในการควบคุมวัชพืชได้หลายชนิด ไม่ถูกทำลายด้วยแสง และเมื่ออยู่ในรูปเกลือจะละลายน้ำได้ดี ไกลโฟเสทจะแทรกซึมเข้าสู่พืชโดยผ่านทางส่วนที่สัมผัสอากาศ ซึ่งมักจะเป็นส่วนที่ประกอบด้วยคลอโรฟิล จากนั้นจึงเคลื่อนย้ายไปสะสมอยู่ที่บริเวณเนื้อเยื่อเจริญและเกิดความเป็นพิษต่อพืช (Spranlkle และคณะ, 1975a,1975c)

นอกจากนี้ ไกลโฟเสทจะไม่สะสมอยู่ในธรรมชาติ เนื่องจาก ไกลโฟเสทจะถูกดูดซึมด้วยอนุภาคดินอย่างรวดเร็ว และจุลินทรีย์ในดิน เช่น *Pseudomonas* (Kishore และ Jacob, 1987) และ *Arthrobacter* (Pipke และคณะ, 1987) จะย่อยสลายไกลโฟเสท เพื่อเป็นแหล่งของฟอสฟอรัสสำหรับใช้ในการเจริญเติบโต (Quinn และคณะ, 1988) และความเป็นพิษของไกลโฟเสทยังถูกทำลายได้ด้วยปฏิกิริยาเคมีในดิน (Torstensson และ Aamisepp, 1977 ; Torstensson, 1982; Sprankle และคณะ, 1975b)

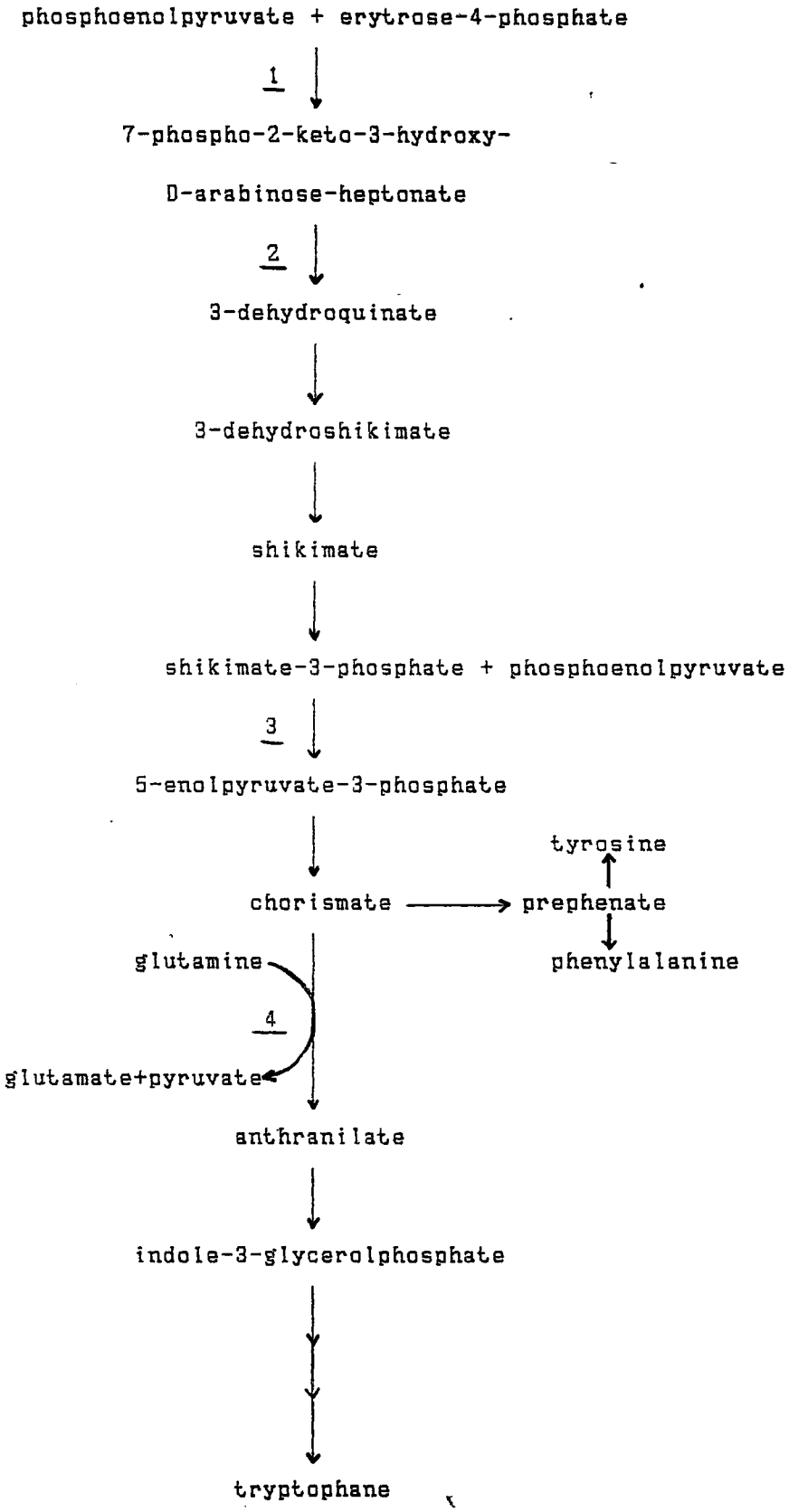
ชีวเคมีของไกลโฟเสท

ไกลโฟเสทเป็นสารยับยั้งที่รุนแรง ในวิถีการสังเคราะห์กรดชิคิมิค (shikimic acid pathway)ซึ่งเป็นวิถีการสร้างกรดอะมิโนประเภทอะโรมาติก (aromatic amino acid) และสารทุติยภูมิอีกหลายชนิด และเนื่องจากในสัตว์ไม่มีวิถีการสังเคราะห์ชนิดนี้จึงทำให้ไกลโฟเสทเป็นพิษต่อสัตว์ในระดับต่ำ พบว่า มีค่าความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง (LD_{50}) (acute-oral,rat)

5,400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของไกลโฟเสท

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์กรดชิคิมิคโดยไกลโฟเสทนี้ ทำให้เกิดการขาดกรดอะมิโนประเภทอะโรมาติก ซึ่งก่อให้เกิดผลกระทบเบื้องต้น คือทำให้การสังเคราะห์โปรตีน และสารประกอบพวกฟีโนลิค (phenolic compounds) เกิดขึ้นช้าลงหรือไม่เกิดเลย ซึ่งทำให้เซลตาย

จากการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ เอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์กรดชิคิมิคและปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์เหล่านี้กับไกลโฟเสท ทำให้สรุปได้ว่า ไกลโฟเสทจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Enolpyruvil 3 phosphate synthase (EPSPS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการถ่ายโอนหมู่คาร์บอกซิลไวนิล (carboxylvinyl) ของ phosphoenolpyruvate (PEP) ไปให้กับ shikimate-3-phosphate (S3P) ได้เป็น Enolpyruvil 3 phosphate กับหมู่ฟอสเฟต และยังพบว่า ไกลโฟเสทเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันกับ PEP และเป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขันกับ S3P ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ EPSPS (Boocock และ Coggins, 1983; Amrhein และคณะ, 1983; Steinrucken และ Amrhein, 1980,1984)



รูปที่ 2 : แสดงตำแหน่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์กรดชิคิมิคโดยไกลโฟเสท

จากรูปที่ 2 ตำแหน่งของเอนไซม์ที่ถูกไกลโฟเสทยับยั้งการทำงาน คือ

ตำแหน่งที่ 1 เอนไซม์ phospho-2-keto-3-hydroxyheptonate aldolase

ตำแหน่งที่ 2 เอนไซม์ dehydroxyquinate synthase

ตำแหน่งที่ 3 เอนไซม์ 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthase)

ตำแหน่งที่ 4 เอนไซม์ anthranilate synthase

จาก shikimic acid pathway พบว่า เอนไซม์ในตำแหน่งที่ 1 2 และ 4 จะถูกยับยั้งอย่างไม่รุนแรง แต่ตำแหน่งที่ 3 มีการยับยั้งอย่างรุนแรง ทำให้เกิดการสะสมชิคิเมทในเนื้อเยื่อที่ได้รับไกลโฟเสท (Duke, 1985) เป็นผลให้เกิดการขาดกรดอะมิโนประเภทอะโรมาติกซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโต

<u>การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์</u> (M.L. Racchi, 1990)

การสร้างสายพันธุ์พืชที่สามารถต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเป้าหมายที่สำคัญอย่างหนึ่งของเทคโนโลยีชีวภาพในด้านเกษตรกรรม เพราะเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชมีข้อได้เปรียบหลายประการ คือ สามารถกำหนดคุณลักษณะของเซลพืชที่ต้องการและในการคัดเลือกที่มีความเฉพาะเจาะจงสูง คือสามารถคัดเลือกเซลล์พืชที่ต้องการออกจากเซลล์พืชจำนวนมากซึ่งแตกต่างกันทางพันธุกรรมได้ ในการทดลองเพียงครั้งเดียว ยิ่งไปกว่านั้นวิธีการใช้สารกำจัดวัชพืชในขบวนการคัดเลือก ก็เป็นวิธีง่ายๆและแน่นนอนกว่า เมื่อเทียบกับการคัดเลือกพืชที่เจริญในแปลงทดลอง

ความพยายามที่จะให้ได้พืชที่สามารถต้านทานสารกำจัดวัชพืช โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชได้เริ่มทำมาหลายปีแล้ว และประสบความสำเร็จครั้งแรกในปี 1978 โดยได้พืชที่สามารถต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชและมีความเสถียรทางพันธุกรรมด้วย ในปี 1978 Chaleff และ Parsons ได้รายงานถึง การคัดเลือกยาสูบ (Nicotiana tobacum) ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช picloram โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ยาสูบในอาหารเหลว (Chaleff และ Parson, 1978) และในปีเดียวกัน Radin และ Carlson ประสบความสำเร็จในการชักนำเซลล์ยาสูบ

ที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช bentazon และ phenmedipham ให้พัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้

ความสำเร็จเหล่านี้ สนับสนุนให้เกิดงานวิจัยทำนองนี้ออกมาอีกมากมาย โดยมีจุดประสงค์ที่จะคัดเลือกสายพันธุ์พืชที่ทนทาน-ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช ตัวอย่างเช่น การคัดเลือกเซลล์ยาสูบทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช paraquat (Miller และ Hughes, 1980) การคัดเลือกเซลล์มะเขือเทศทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช paraquat (Thomas และ Prett, 1982) การคัดเลือกเซลล์ยาสูบทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช amitrole (Singer และ McDaniel, 1984) การคัดเลือกเซลล์ข้าวโพดทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช imidazolinone (Anderson และ Georgoon, 1988) การคัดเลือกเซลล์แพงพวยฝรั่งทนทานต่อสารกำจัดวัชพืช glyphosate (Cresswell และคณะ, 1988)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมี

1.พืชทดลอง

เมล็ดมะเขือเทศพันธุ์สีดาห้วยทราย (*Lycopersicon esculentum* var periforme)

2.สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใช้เกลือซึ่งเป็นธาตุอาหารหลัก (macronutrients) และ ธาตุอาหารรอง (micronutrients) ชนิด AR (analytical reagent) ตามสูตร Murashige & Skoog (1962) ดูภาคผนวก ก.

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators)

- NAA (alpha-naphthaleneacetic acid)
- BA (benzyladenine)

2.3 สารอินทรีย์

- น้ำตาลซูโครส

2.4 สารที่ใช้ปรับ pH ได้แก่ 0.1 นอร์มอล NaOH และ 0.1 นอร์มอล HCl

2.5 สารที่ทำให้อาหารแข็งตัว

- วุ้นผง (agar)

2.6 สารฆ่าเชื้อที่ใช้ในการล้างเมล็ดมะเขือเทศก่อนจะลงในขวดอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- สารละลายคลอรอกซ์ (chlorox) ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์
- เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์
- น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2.7 สารฆ่าเชื้อในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

- เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์

2.8 สารปราบวัชพืช glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine) 95 เปอร์เซนต์ จากบริษัท Sigma Chemical

3.อุปกรณ์

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ บิกเกอร์ ,ปิเปต , กระบอกตวง ขวดสีชาสำหรับเก็บ stock และ ขวดวัดปริมาตร เป็นต้น

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมสารละลายไกลโฟเสทเพื่อใช้ในการทดลอง ได้แก่ ปิเปตที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว millipore filter พร้อมกระดาษกรอง ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ขวดหรับใส่ไกลโฟเสทที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วพร้อมฝาปิด

3.3 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นขวดแก้วสำหรับใส่อาหารพร้อมฝาพลาสติกทนความร้อน มีขนาดเล็ก กลาง และใหญ่

3.4 ฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร เพื่อใส่อาหารเหลว

3.5 อุปกรณ์สำหรับตัดเนื้อเยื่อ เช่น มีดผ่าตัด และ ปากคีบ

3.6 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish) พร้อมกระบอกใส่

3.7 ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow carbinet)

3.8 อะลูมิเนียมฟอยล์

3.9 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

3.10 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)

3.11 เตาไมโครเวฟ (microwave oven)

3.12 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.13 ตู้อบ (hot air oven)

3.14 อุปกรณ์ที่ใช้ในการถ่ายภาพ

4.ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งควบคุมความเข้มแสง 700 ลักซ์โดยหลอดไฟ fluorescent Toshiba FL 40T9W/38W cool white ช่วงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ช่วงมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน

ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลว (suspension) จะวางฟลาสก์ที่ใส่อาหารเหลวบนเครื่องเขย่า (shaker) ซึ่งมีความเร็ว 120 รอบ/นาที

ขั้นตอนการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศ พันธุ์ลีดาห้วยทราย (ลีดาพระราชทาน) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์จากภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นำมาทำการทดลองดังต่อไปนี้

วิธีการเพาะเลี้ยงเมล็ดมะเขือเทศให้ได้ต้นที่ปลอดเชื้อ

1. เตรียมอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซนต์ วุ้น 0.8 เปอร์เซนต์ ปรับ pH 5.8

2. ทำการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดมะเขือเทศ โดยใช้น้ำสะอาดผสม Teepol 2-3 หยด เพื่อล้างเยื่อเมือกที่เมล็ดออก แล้วนำเมล็ดไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง หลังจากนั้นแช่เมล็ดในสารละลายคลอรอกซ์ 20 เปอร์เซนต์ ผสม tween-20 2-3 หยด ประมาณ 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

3. นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากได้ต้นปลอดเชื้อจึงนำไปทดลองต่อไป

วิธีการศึกษาอัตราส่วนของฮอร์โมน NAA ต่อ BA ที่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อมะเขือเทศเจริญไปเป็นเอมบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีที่สุด

1. เตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่มีความเข้มข้น 5.0×10^{-4}, 1.5×10^{-3}, 2.5×10^{-3} และ 3.0×10^{-3} มิลลิโมลาร์ และ BA ที่มีความเข้มข้น 1.8×10^{-3}, 9.0×10^{-3} และ 1.8×10^{-2} มิลลิโมลาร์ดัง และใช้สูตร MS ที่ไม่ได้ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นสูตรควบคุม

2. นำใบเลี้ยงและลำต้นใต้ใบเลี้ยงของต้นปลอดเชื้อมาศึกษาโดย

- ตัดเนื้อเยื่อส่วนของใบเลี้ยง แต่ละใบตัดเป็น 2 ส่วน คือส่วนโคนใบ (bottom) และส่วนปลายใบ (top) ถ่ายลงอาหารที่ได้เตรียมไว้ โดยใช้อาหารสูตร MS ที่ไม่เสริมฮอร์โมนเป็นสูตรควบคุม

- ตัดเนื้อเยื่อส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงออกเป็นท่อน แต่ละท่อนให้มีความยาว 1 เซนติเมตร ถ่ายลงอาหารที่เตรียมไว้ โดยใช้อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ไม่เสริมฮอร์โมนเป็นสูตรควบคุม

3. เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในข้อ 2 ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์

4. บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนเนื้อเยื่อที่เจริญไปเป็น แคลลัส เอมบริโอเจนิคแคลลัส ยอด และราก ของเนื้อเยื่อทั้ง 2 ส่วน

5. คัดเลือกส่วนของเนื้อเยื่อที่เจริญเป็นเอมบริโอเจนิคแคลลัส จากเนื้อเยื่อ 2 ส่วน และคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม ต่อการชักนำเนื้อเยื่อให้เจริญไปเป็นเอมบริโอจินิคแคลลัส

<u>วิธีการศึกษา ความทนทานของแคลลัสมะเขือเทศ ต่อความเข้มข้นของไกลโฟเสทระดับต่างๆ</u>

1. เตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่มีระดับฮอร์โมนที่คัดเลือกแล้วเสริมด้วยไกลโฟเสทที่ระดับความเข้มข้น ต่าง ๆ คือ 0.01 0.05 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ โดยให้อาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมไกลโฟเสทเป็นสูตรควบคุม

2. นำแคลลัสที่มีขนาดใกล้เคียงกัน มาชั่งน้ำหนักเริ่มต้น แล้วเพาะเลี้ยงลงในอาหารที่เตรียมไว้

3. นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4. ชั่งน้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้นและคำนวณหาค่าดัชนีการเจริญเติบโต จากสูตร

$$\text{ดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัส} = \frac{\text{น้ำหนักแคลลัสสุดท้าย} - \text{น้ำหนักแคลลัสเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักแคลลัสเริ่มต้น}} \times 100\ \%$$

นำค่าดัชนีการเจริญเติบโตมาเขียนกราฟกับความเข้มข้นของไกลโฟเสทระดับต่างๆ โดยให้ค่าดัชนีการเจริญเติบโตของสูตรควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซนต์ เพื่อนำมาหาค่า LD_{50} ของแคลลัสในอาหารกึ่งแข็งที่ใส่ไกลโฟเสท

<u>วิธีการศึกษาความทนทานต่อไกลโฟเสทของต้นมะเขือเทศ ที่เจริญจากเมล็ด และ ต้นที่เจริญจากเอมบริโอเจนิคแคลลัส</u>

1. เตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ไม่เสริมออร์โมน แต่เติมไกลโฟเสทที่ระดับความเข้มข้น 0.01,0.025,0.05 และ 0.075 มิลลิโมลาร์ โดยใช้สูตร MS ที่ไม่เติมไกลโฟเสท เป็นสูตรควบคุม

2. ตัดต้นปลอดเชื้อที่เกิดจากเมล็ด และ ต้นที่ปลอดเชื้อที่เกิดจากแคลลัส อายุ 4 สัปดาห์ ให้มีความยาว 3 เซนติเมตร ถ่ายลงอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เสริมไกลโฟเสทความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนาน 4 สัปดาห์

3. วัดความสูงหลังจากที่ครบ 4 สัปดาห์ แล้วนำมาหาค่าดัชนีการเจริญเติบโตจากสูตร

$$\text{ดัชนีการเจริญเติบโตของต้น} = \frac{(\text{ความสูงสุดท้าย} - \text{ความสูงเริ่มต้น})}{\text{ความสูงเริ่มต้น}} \times 100\ \%$$

นำค่าดัชนีการเจริญเติบโตที่ได้มาเขียนกราฟ กับความเข้มข้นของไกลโฟเสทความเข้มข้นต่าง ๆ โดยให้ค่าของดัชนีการเจริญเติบโตของสูตรควบคุมมีค่า 100 เปอร์เซนต์ เพื่อนำมาหาค่า LD_{50} ของต้นที่เจริญจากเมล็ด และ ต้นที่เจริญจากเอมบริโอเจนิคแคลลัส

<u>วิธีการศึกษาการเจริญของแคลลัสมะเขือเทศในอาหารเหลว</u>

1. เตรียมอาหารเหลวสูตร MS ที่เสริมออร์โมนในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเกิดเอมบริโอเจนิคแคลลัสในอาหารกึ่งแข็ง โดยแปรผันความเข้มข้นให้มากขึ้นและลดลงเป็น 2 เท่าของอาหารสูตรดังกล่าว

2. นำเอมบริโอจีนิคแคลลัสมาตัดให้มีชิ้นเนื้อเยื่อใกล้เคียงกัน ชั่งน้ำหนักเริ่มต้น ถ่ายลงในอาหารเหลว ที่เตรียมไว้ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3. ตรวจผลการทดลอง ใช้กระดาษกรองกรองเซลล์ที่ได้ สังเกตลักษณะแคลลัส นับจำนวนยอดและราก แล้วนำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ แล้วจึงชั่งน้ำหนักแคลลัสแห้ง

4. นำไปคำนวณหาค่าดัชนีการเจริญเติบโต จากสูตร

$$\text{ดัชนีการเจริญเติบโตของเซลล์} = \left(\frac{\text{น้ำหนักเซลล์สุดท้าย} - \text{น้ำหนักเซลล์เริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักเซลล์เริ่มต้น}}\right) \times 100\ \%$$

บทที่ 4

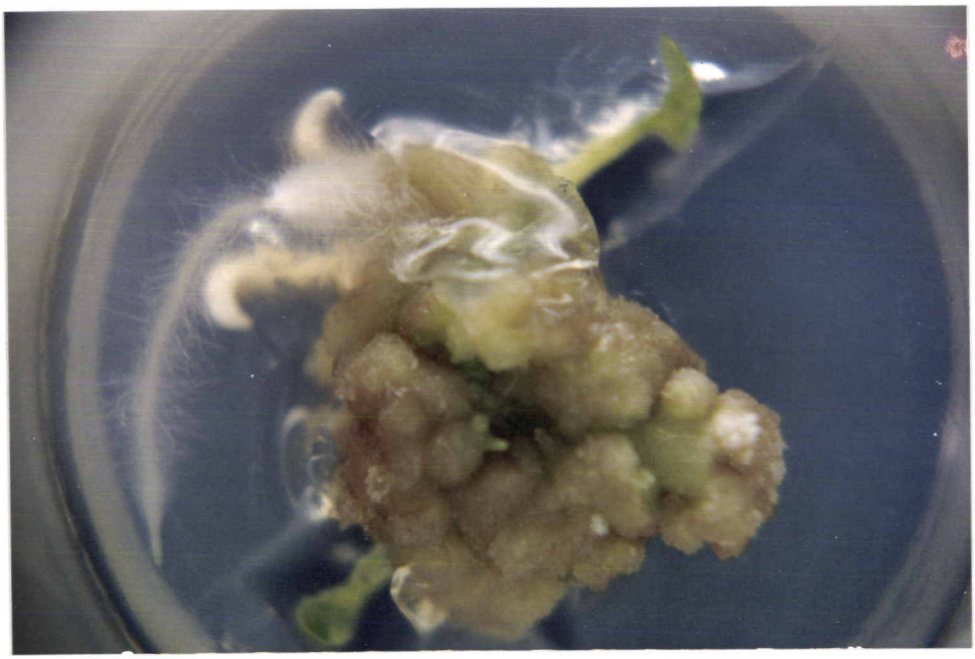
ผลการทดลองและวิจารณ์

การเพาะเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์สีดาห้วยทราย (สีดาพระราชทาน) ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS พบว่า การงอกของเมล็ดจะใช้เวลาประมาณ 5 วัน และมีเปอร์เซนต์การงอกประมาณ 70 % เมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนของมะเขือเทศนาน 4 สัปดาห์ จึงนำมาตัดส่วนใบเลี้ยงและลำต้นใต้ใบเลี้ยงเพื่อเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่อัตราส่วนต่างๆ เพื่อศึกษาอิทธิพลของอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ต่อ BA ในการชักนำให้เกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส ยอด และราก

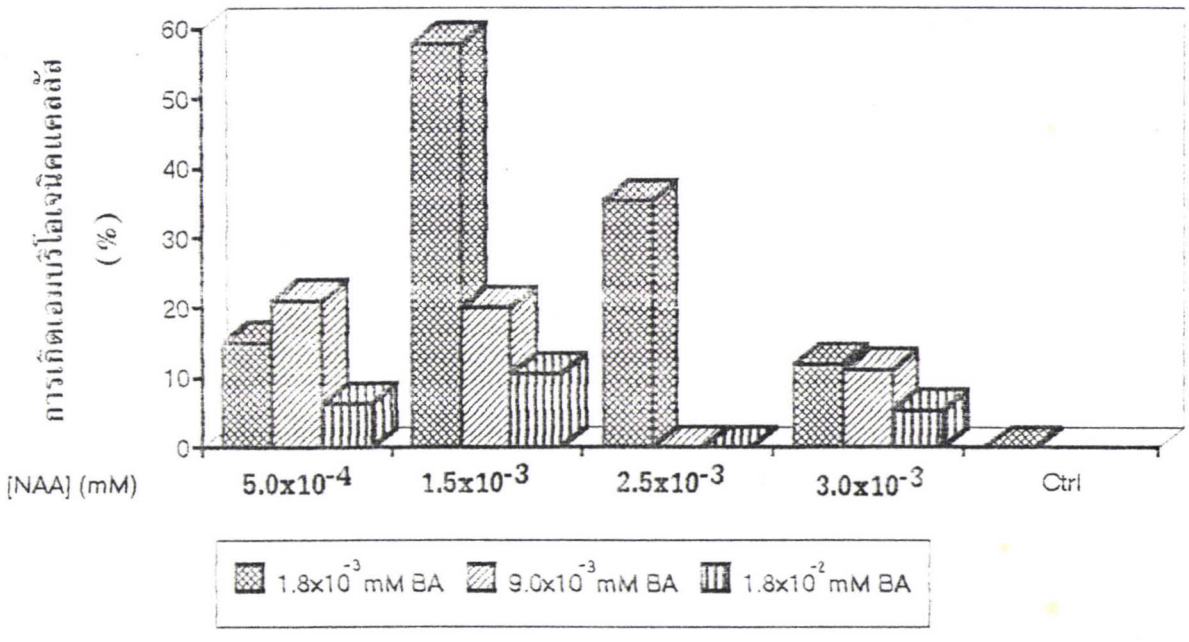
การทดลองจึงแบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1. ส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl)

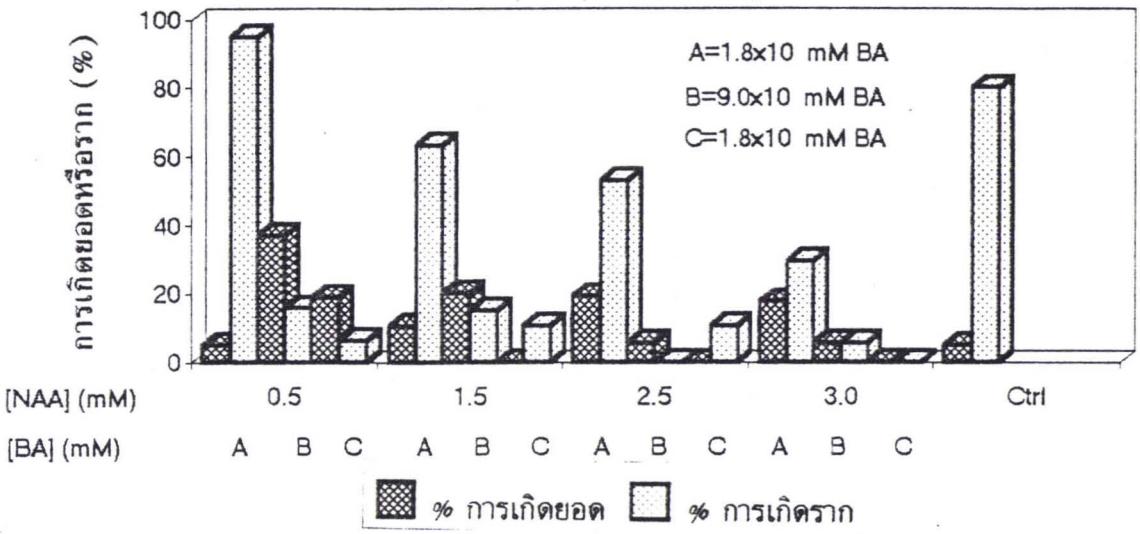
ส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงเจริญให้เอมบริโอจีนิคแคลลัส (รูปที่ 3) ได้สูงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยปริมาณ BA ต่ำ ในทุกความเข้มข้นของ NAA และจะให้เอมบริโอจีนิคแคลลัสได้สูงสุดประมาณ 60 เปอร์เซนต์ เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA 1.5×10^{-3} มิลลิโมลาร์ และ BA 1.8×10^{-3} มิลลิโมลาร์ และเมื่อใช้ NAA 2.5×10^{-3} มิลลิโมลาร์ และ BA 1.8×10^{-3} มิลลิโมลาร์ หรือ NAA 5.0×10^{-4} มิลลิโมลาร์ และ BA 9.0×10^{-3} มิลลิโมลาร์ จะให้เอมบริโอจีนิคแคลลัสประมาณ 40 เปอร์เซนต์ และ 20 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4) และมีการเจริญให้รากได้สูง เมื่อความเข้มข้นของ BA และ NAA ลดลงตามลำดับ โดยจะให้รากมากที่สุดประมาณ 90 เปอร์เซนต์ เมื่อเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารที่มี NAA 5.0×10^{-4} มิลลิโมลาร์ ต่อ BA 1.8×10^{-3} มิลลิโมลาร์ ส่วนยอดจะเจริญได้ดีเมื่อความเข้มข้นของ BA สูงขึ้น และความเข้มข้นของ NAA น้อยกว่า 2.5×10^{-3} มิลลิโมลาร์ และให้ยอดสูงสุดประมาณ 30 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้ NAA 5.0×10^{-4} มิลลิโมลาร์ และ BA 9.0×10^{-3} มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 5) แต่ในสูตรควบคุมซึ่งไม่เสริมสารควบบคุมการเจริญเติบโต พบว่าจะเกิดรากขึ้นเป็นจำนวนมาก (รูปที่ 6)



รูปที่ 3 : เอมบริโอจีนิคแคลลัส



รูปที่ 4 : การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง สูตร MS เสริมด้วย NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ



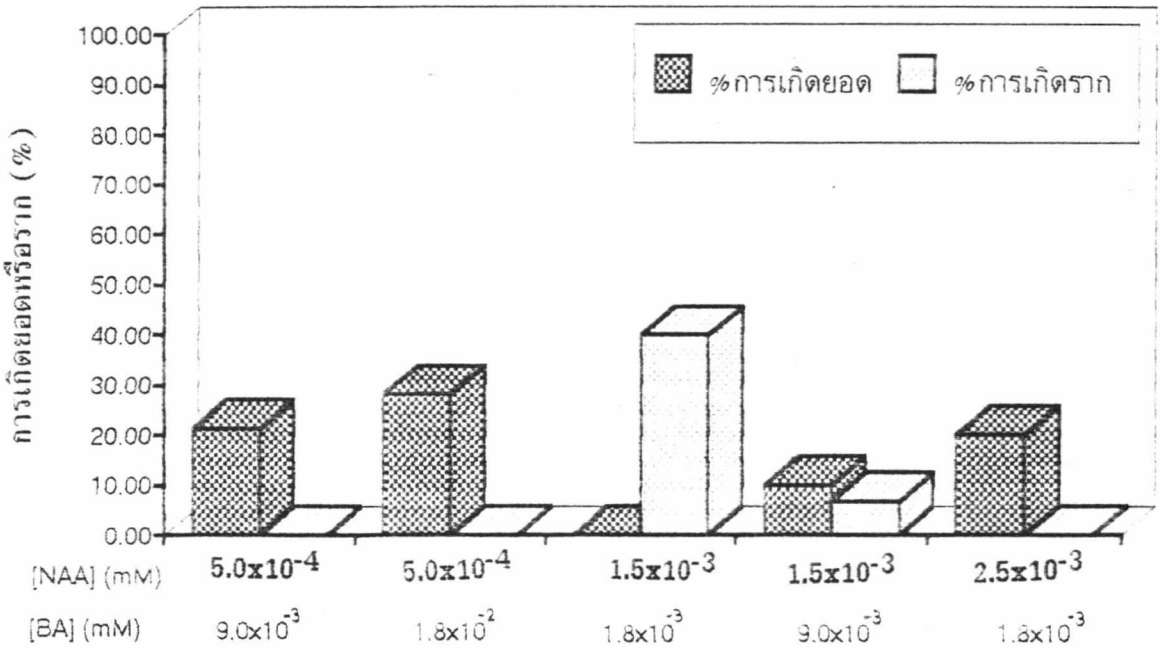
รูปที่ 5 : การเกิดยอดและการเกิดรากจากเนื้อเยื่อส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เสริมด้วย NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

รูปที่ 6 : การเจริญของส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ซึ่งไม่เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต

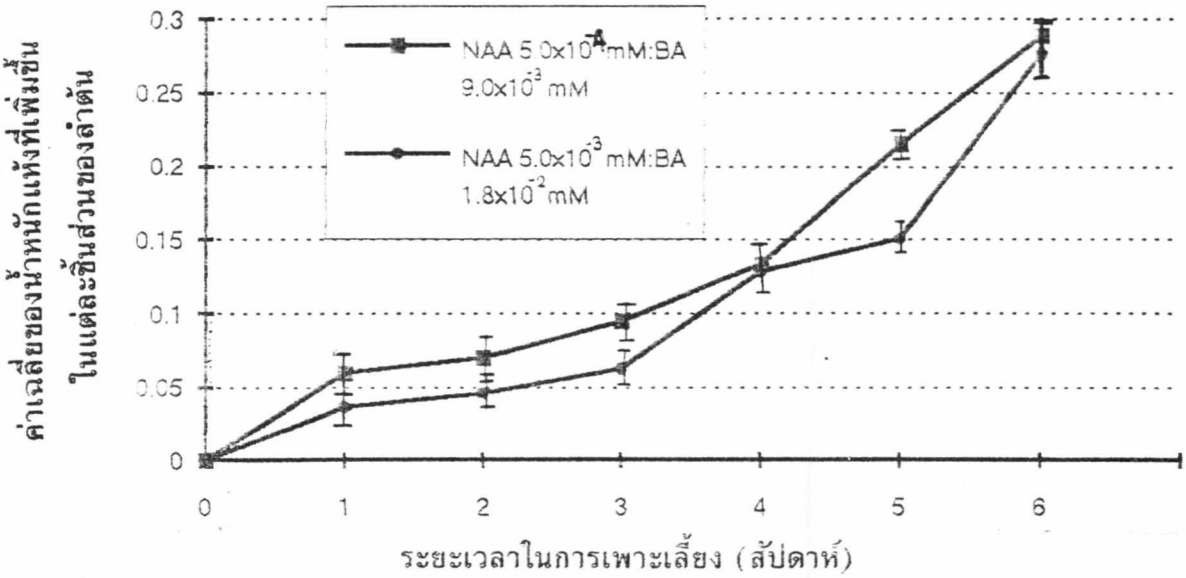
หลังจากพิจารณาการเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส, การเกิดยอด และการเกิดราก ประกอบกัน แล้วพบว่าสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของ NAA ต่อ BA ที่ 5.0×10^{-4} มิลลิโมลาร์ : 9.0×10^{-3} มิลลโมลาร์ , 5.0×10^{-4} มิลลิโมลาร์ : 1.8×10^{-2} มิลลิโมลาร์, 1.5×10^{-3} มิลลิโมลาร์ : 1.8×10^{-3} มิลลิโมลาร์, 1.5×10^{-3} มิลลิโมลาร์ : 9.0×10^{-3} มิลลิโมลาร์ และ 2.5×10^{-3} มิลลิโมลาร์ : 1.8×10^{-3} มิลลิโมลาร์ มีแนวโน้มที่จะมีการเกิดยอดและเอมบริโอจีนิคแคลลัสสูง จึงทำการถ่ายเนื้อเยื่อลงในอาหารทั้ง 5 สูตรดังกล่าว พบว่า การเกิดยอดสูงสุดเมื่อเลี้ยงส่วนของลำต้นให้ใบเลี้ยงในอาหาร NAA 5.0×10^{-4} มิลลิโมลาร์ร่วมกับ BA 9.0×10^{-3} มิลลิโมลาร์ และที่ความเข้มข้นของ NAA 5.0×10^{-4} มิลลิโมลาร์ ต่อ BA 1.8×10^{-3} มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 7) และอัตราการเจริญของแคลลัสที่เกิดจากส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงในสูตรอาหารดังกล่าวก็ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 8)

2. ส่วนของใบเลี้ยง (cotyledon)

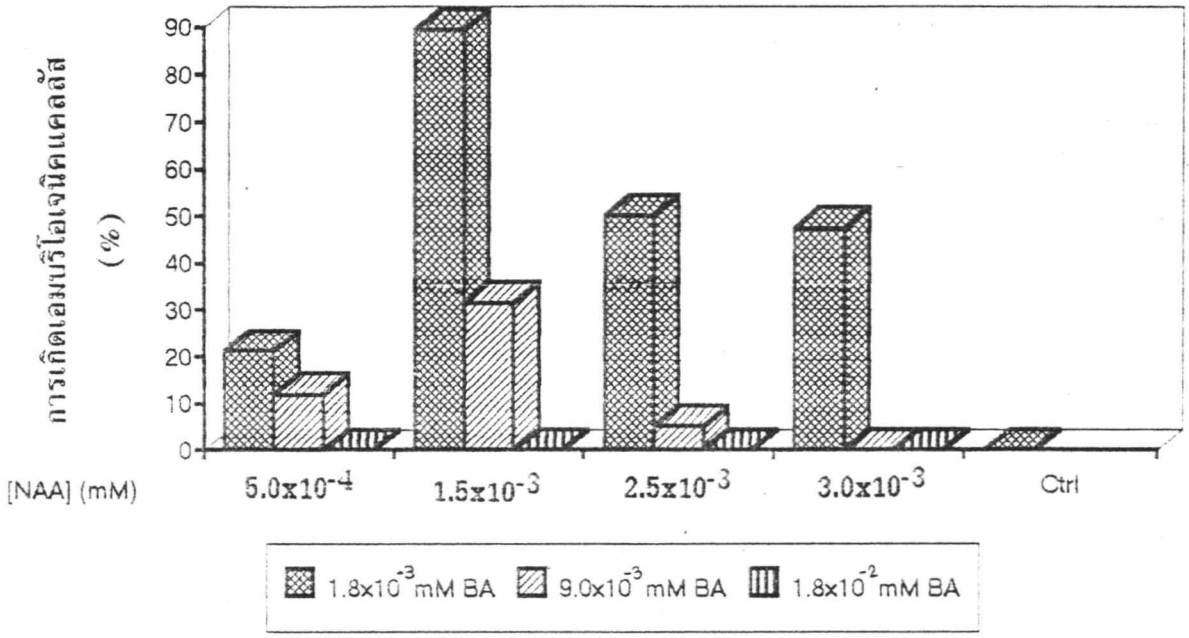
ส่วนของใบเลี้ยงเจริญให้เอมบริโอจีนิคแคลลัสได้สูงเมื่อใช้ความเข้มข้นของ BA ต่ำ ในทุกความเข้มข้นของ NAA และจะเจริญให้เอมบริโอจีนิคแคลลัสสูงสุดประมาณ 90 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของ NAA 1.5×10^{-3} มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.8×10^{-3} มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 9) และแนวโน้มการเกิดยอดจากใบเลี้ยงก็เช่นกัน คือ มีการเกิดยอดได้สูงเมื่อใช้ความเข้มข้นของ BA ต่ำ โดยจะให้ยอดได้สูงสุดประมาณ 70 เปอร์เซนต์เมื่อใช้ความเข้มข้นของ NAA 7.5×10^{-3} มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.8×10^{-3} มิลลิโมลาร์ แต่แนวโน้มของการเกิดรากไม่สม่ำเสมอ (รูปที่ 10)



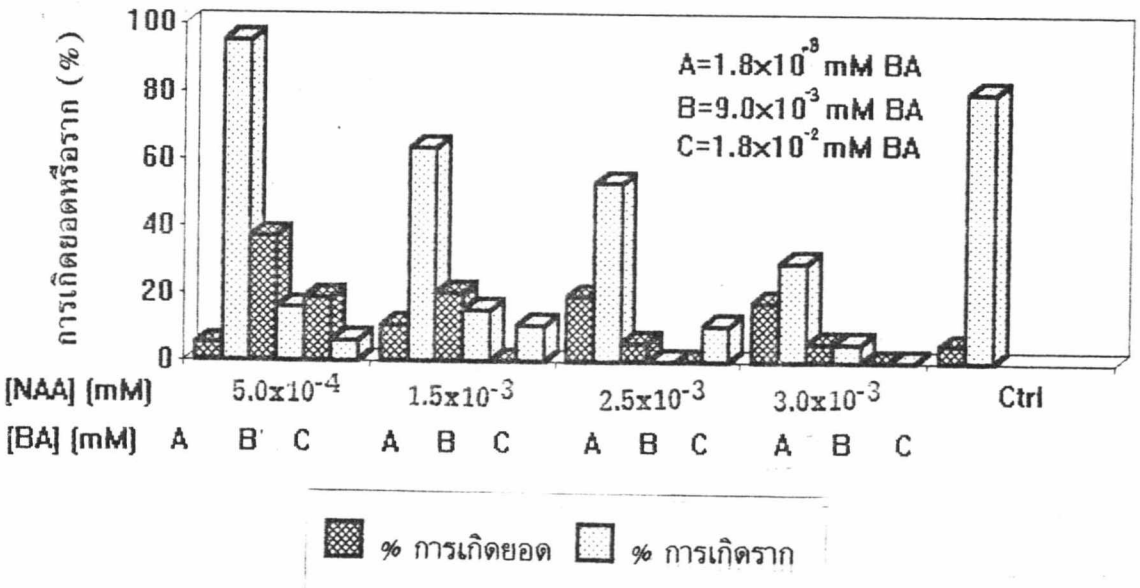
รูปที่ 7 : การเกิดยอดและรากจากแคลลัสของส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เสริมด้วย NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 8 : การเปรียบเทียบการเจริญของแคลลัสจากส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เสริมด้วย NAA 5.0 x 10^{-4} มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ BA 9.0 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ และ NAA 5.0 x 10^{-4} มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.8 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ และแสดงค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้น $\pm$ standard error



รูปที่ 9 : การเปรียบเทียบการเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสจากส่วนของใบเลี้ยงที่เจริญในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เสริมด้วย NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 10 : การเกิดยอดและรากจากส่วนของใบเลี้ยงที่เจริญในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เสริมด้วย NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

การทดสอบความทนทานต่อไกลโฟเสท

จากการศึกษาการเจริญของเอมบริโอจีนิคแคลลัสและยอดจากส่วนของใบเลี้ยง ซึ่งพบว่าอาหารที่มีความเข้มข้นของ NAA 1.5 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.8 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ ให้ผลการเจริญดีที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบการเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสจากส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงและส่วนของใบเลี้ยง พบว่า ส่วนของใบเลี้ยงให้เอมบริโอจีนิคแคลลัสมากกว่า (รูปที่ 3 และ 9) จึงเลือกแคลลัสจากส่วนของใบเลี้ยง เพื่อนำไปทดสอบไกลโฟเสท โดยเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เสริมด้วย NAA 1.5 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.8 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ พบว่า เมื่อความเข้มข้นของไกลโฟเสทสูงขึ้น ดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัสลดลงตามลำดับ (รูปที่ 11) และแคลลัสจะมีสีน้ำตาล และตายไปในที่สุด (รูปที่ 13) เมื่อนำมาหาค่า LD_{50} ของไกลโฟเสทที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัส 50 เปอร์เซนต์ พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.08 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 12)

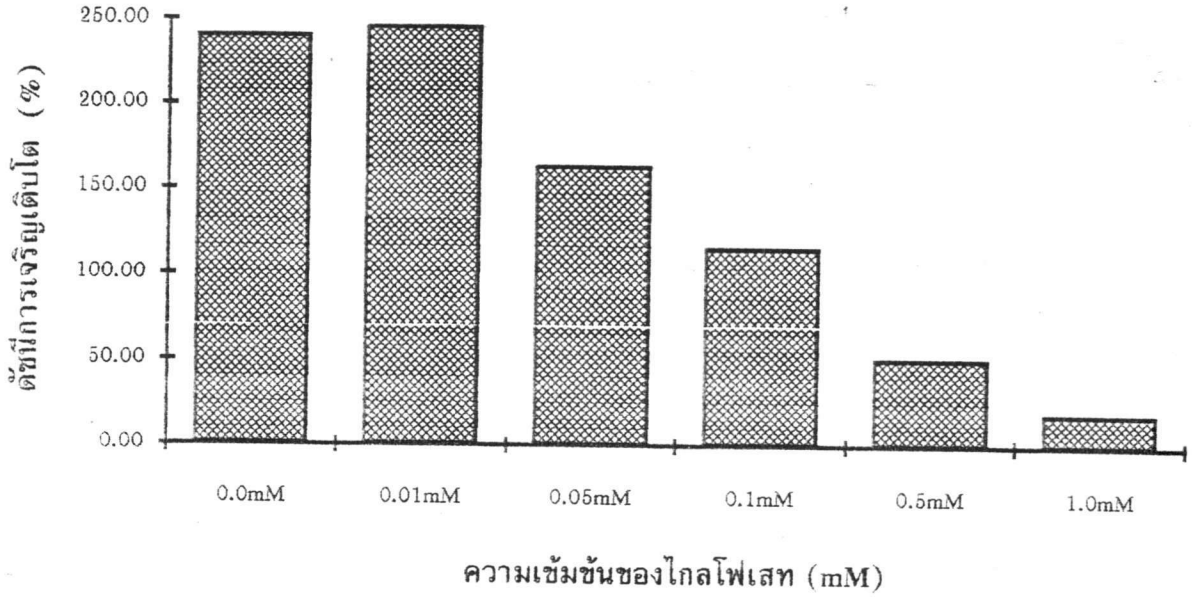
เนื่องจากมีต้นที่เกิดจากแคลลัส (รูปที่ 14) ในระหว่างการทำการคัดเลือกสูตรอาหาร จึงนำต้นที่ได้มาทำการทดสอบผลของไกลโฟเสทที่มีต่อการเจริญเติบโตของต้นนั้น โดยเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมไกลโฟเสทที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า การเจริญของต้นลดลงเมื่อความเข้มข้นของไกลโฟเสทเพิ่มขึ้น และการเกิดรากจะลดลง ยกเว้นที่ความเข้มข้นของไกลโฟเสท 0.075 มิลลิโมลาร์ มีการเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยมีการเจริญสูงกว่าการเจริญที่ความเข้มข้นของไกลโฟเสท 0.025 และ 0.05 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 15 และ รูปที่17) และมีค่า LD_{50} ของไกลโฟเสทที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ 50 เปอร์เซนต์ พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.00597 มิลลิโมลาร์ของไกลโฟเสท (รูปที่ 16)

จากนั้นได้ทำการทดสอบความทนทานต่อไกลโฟเสทของต้นที่เกิดจากเมล็ดโดยเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมไกลโฟเสทที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นการทดลองเปรียบเทียบกับการเจริญของต้นที่เจริญจากแคลลัส พบว่า เมื่อความเข้มข้นของไกลโฟเสทเพิ่มขึ้นการเจริญเติบโตของต้น และการเกิดรากจะลดลง ยกเว้นที่ระดับความเข้มข้นของไกลโฟเสท 0.075 มิลลิโมลาร์ การเจริญจะเพิ่มขึ้น โดยการเจริญจะสูงกว่าการเจริญของต้นที่ระดับความเข้มข้นของไกลโฟเสท 0.025 มิลลิโมลาร์และ 0.05 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 18 และ รูปที่ 19) เช่นเดียวกับในต้นที่เจริญ

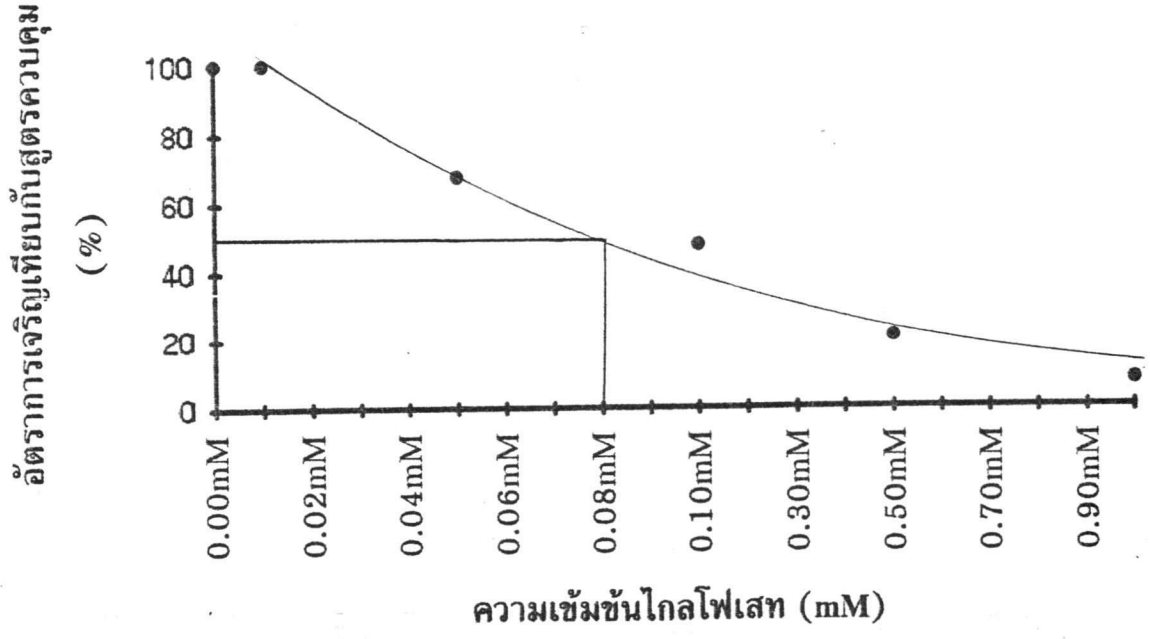
จากแคลลัส (รูปที่ 15) แต่ค่า LD_{50} ของไกลโฟเสทที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ 50 เปอร์เซนต์ พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.00694 มิลลิโมลาร์ของไกลโฟเสท (รูปที่ 20) ซึ่งสูงกว่าค่า LD_{50} ในต้นที่เจริญจากแคลลัส (รูปที่ 16) ลักษณะของต้นที่ได้รับไกลโฟเสทจะเริ่มเหลืองซีดภายในระยะเวลา 6 วัน และ ตายในที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรควบคุม (รูปที่ 21)

การศึกษาการเจริญของเซลล์มะเขือเทศในอาหารเหลว

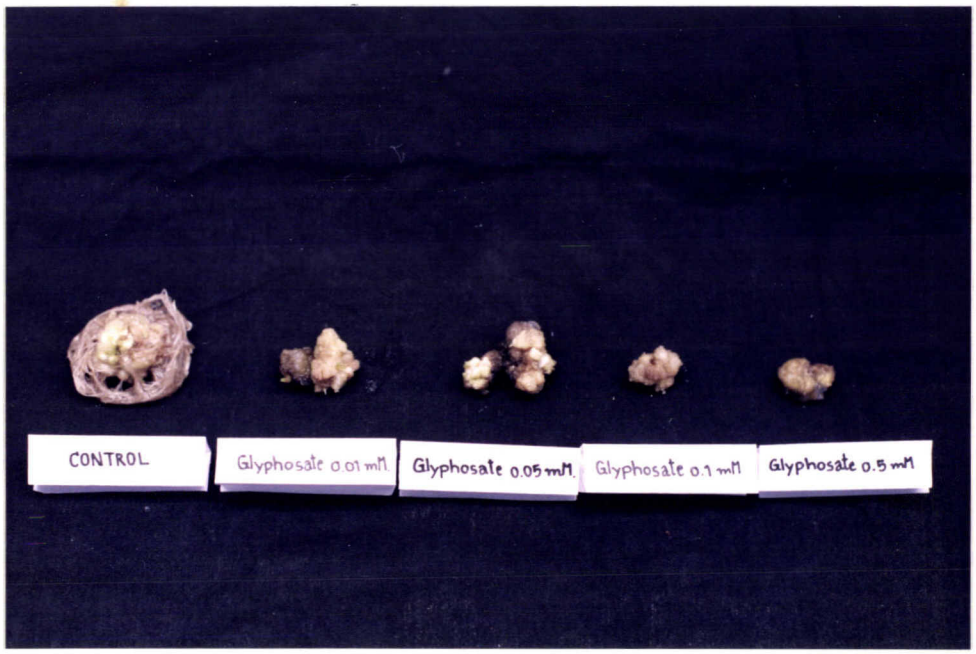
จากผลการทดสอบการเกิดแคลลัสจากส่วนใบเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เสริมด้วย NAA 1.5×10^{-3} มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.8×10^{-3} มิลลิโมลาร์ พบว่าเหมาะต่อการเจริญเป็นต้นใหม่จึงได้ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ได้จากอาหารสูตรดังกล่าว ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญในระดับเดียวกัน เปรียบเทียบกับการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA และ BA ลดลงครึ่งเท่า (NAA 7.5×10^{-4} มิลลิโมลาร์ : BA 9.0×10^{-3} มิลลิโมลาร์) และที่ระดับความเข้มข้นของ NAA และ BA เพิ่มขึ้น 2 เท่า (NAA 3.0×10^{-3} มิลลิโมลาร์ : BA 3.6×10^{-3} มิลลิโมลาร์) พบว่าเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA 3.0×10^{-3} มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ BA 3.6×10^{-3} มิลลิโมลาร์ มีดัชนีการเจริญสูงสุด (รูปที่ 22)และมีการเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส เมื่อศึกษาการเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส ยอด และราก ในเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสูตรดังกล่าวพบว่าสูตร MS ที่เสริมด้วย NAA 7.5×10^{-4} มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ BA 9.0×10^{-4} มิลลิโมลาร์ มีการเกิดยอดและการเกิดรากสูงสุด (รูปที่ 23)



รูปที่ 11 : ผลของไกลโฟเสทต่อดัชนีการเจริญเติบโตของแคลลัส

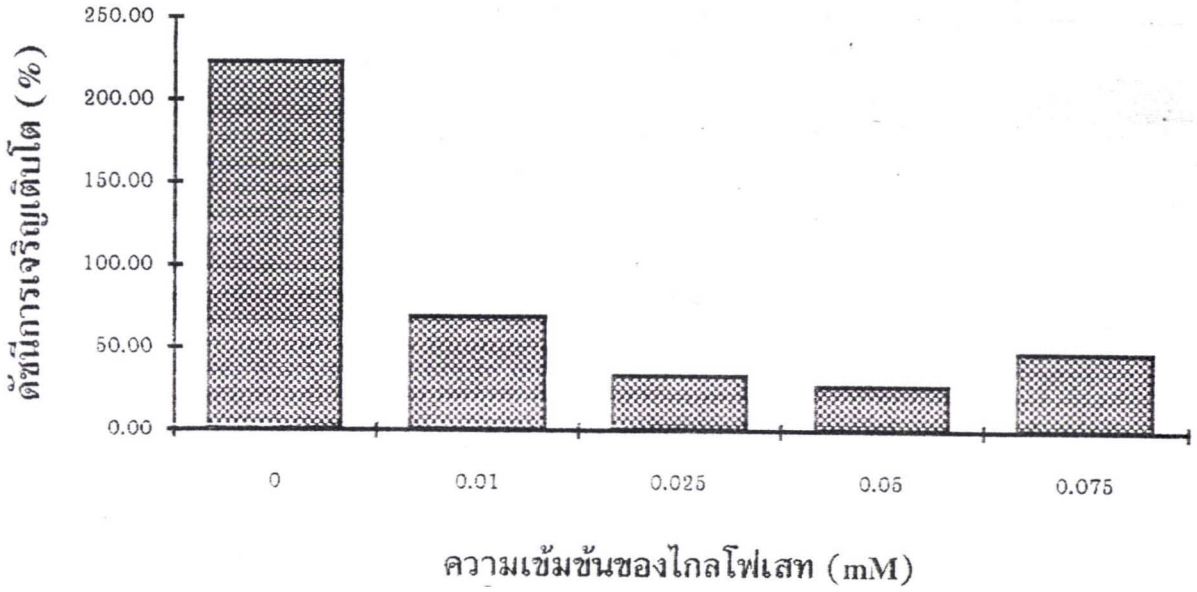


รูปที่ 12 : ค่า LD_{50} ของไกลโฟเสทในแคลลัสจากส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศที่เจริญในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เสริม NAA 1.5×10^{-3} มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.8×10^{-3} มิลลิโมลาร์ ที่ผสมไกลโฟเสทความเข้มข้นต่างๆ

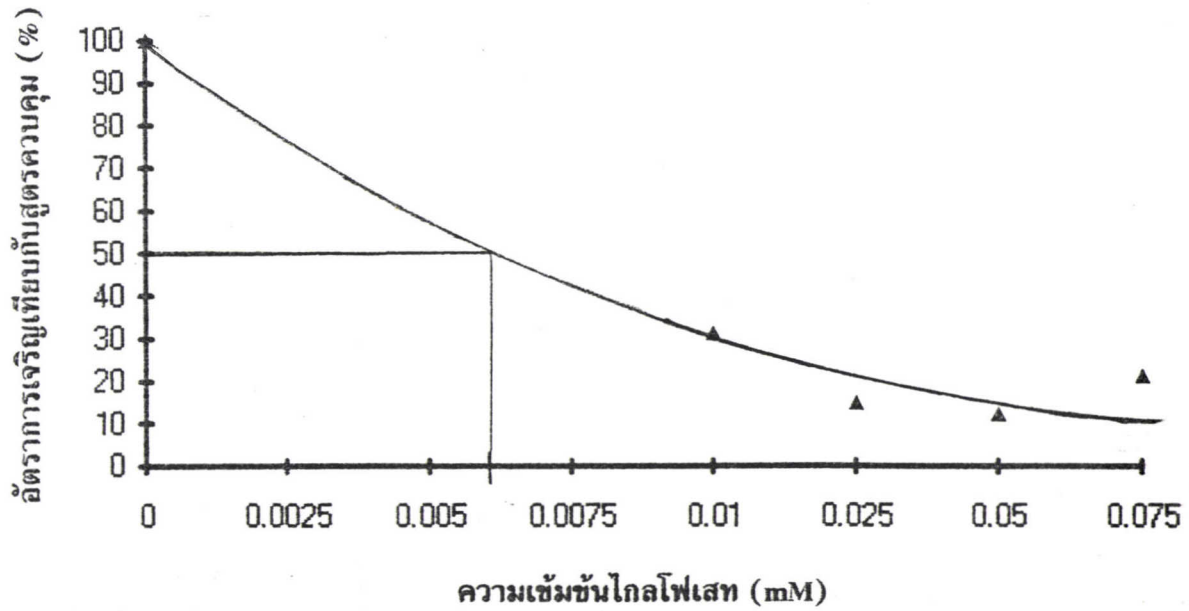


รูปที่ 13 : ลักษณะแคลลัสที่ได้รับสารไกลโฟเสทความเข้มข้นต่างๆ

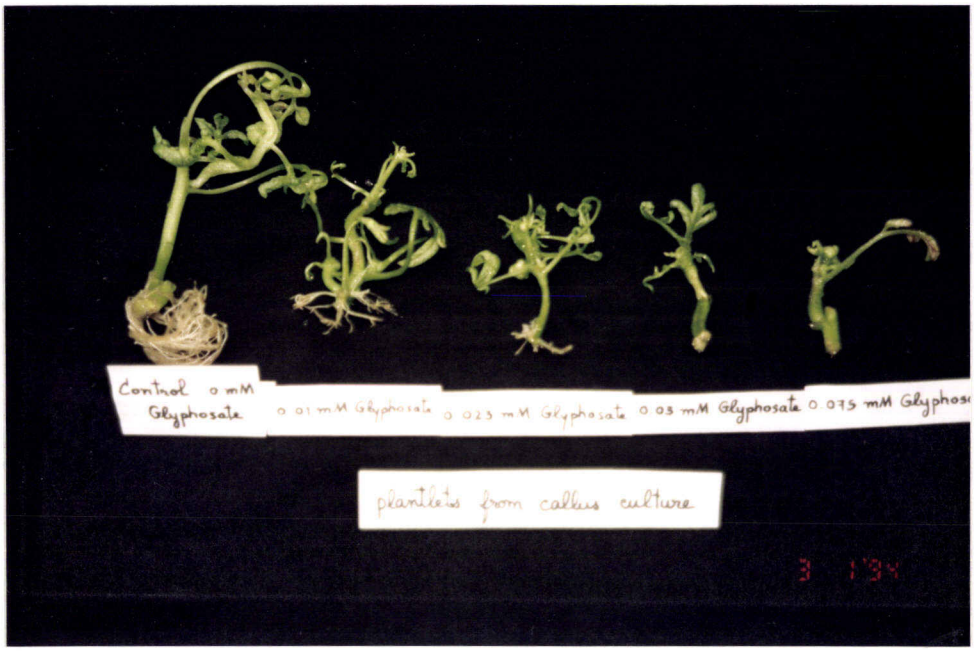
รูปที่ 14 : ต้นที่เจริญจากแคลลัส



รูปที่ 15 : ผลของไกลโฟเสทต่อดัชนีการเจริญเติบโตของต้นที่เกิดจากแคลลัส

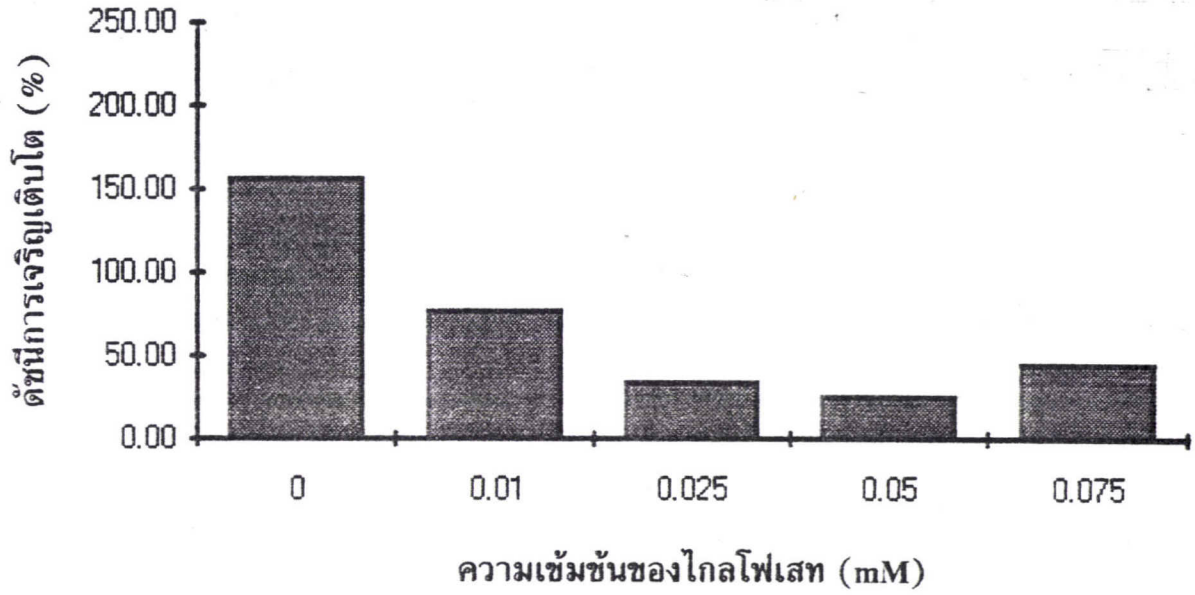


รูปที่ 16 : ค่า LD_{50} ของไกลโฟเสทในต้นที่เกิดจากแคลลัสของมะเขือเทศที่เจริญในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ผสมไกลโฟเสทความเข้มข้นต่างๆ

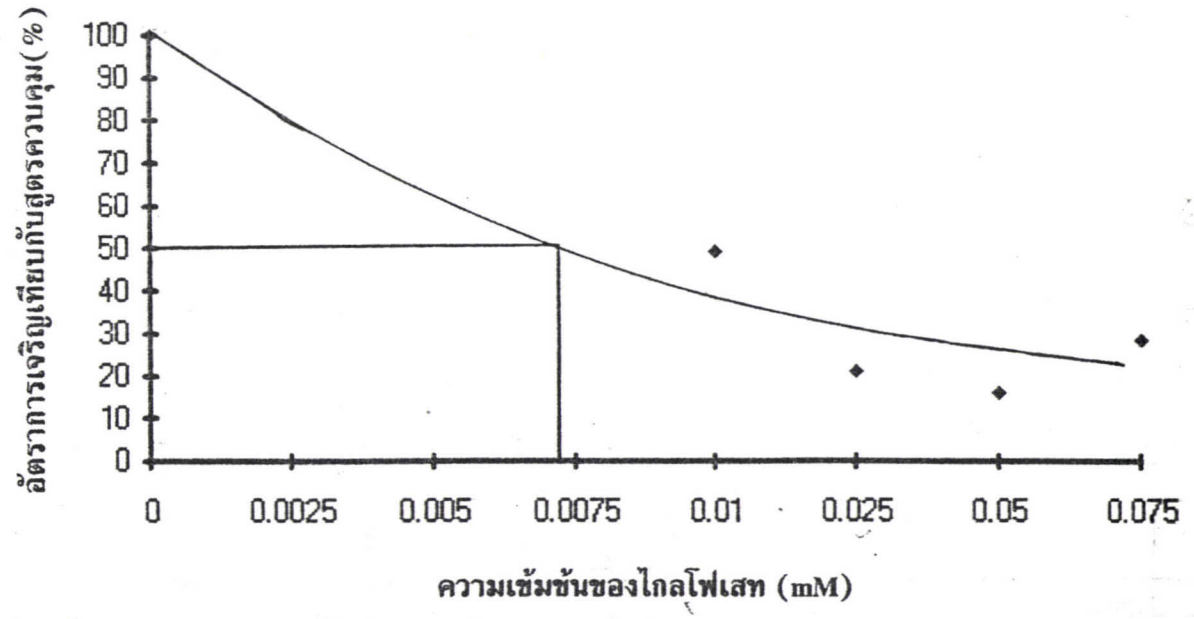


รูปที่ 17 : ลักษณะต้นที่เจริญจากแคลลัสหลังจากทดสอบไกลโฟเสท

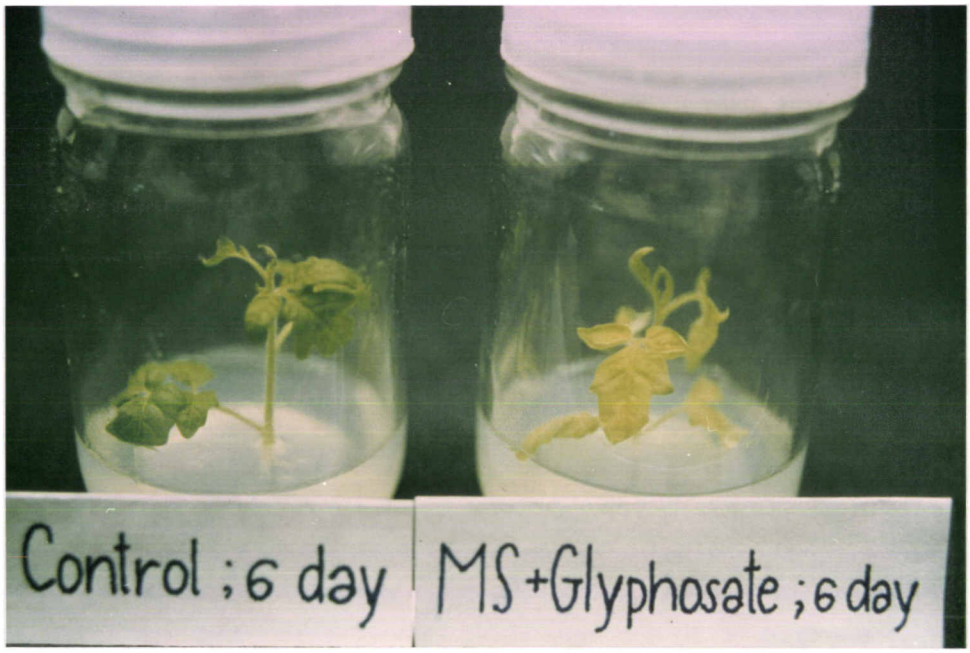
รูปที่ 18 : ลักษณะต้นที่เจริญจากเมล็ดหลังจากทดสอบไกลโฟเสท



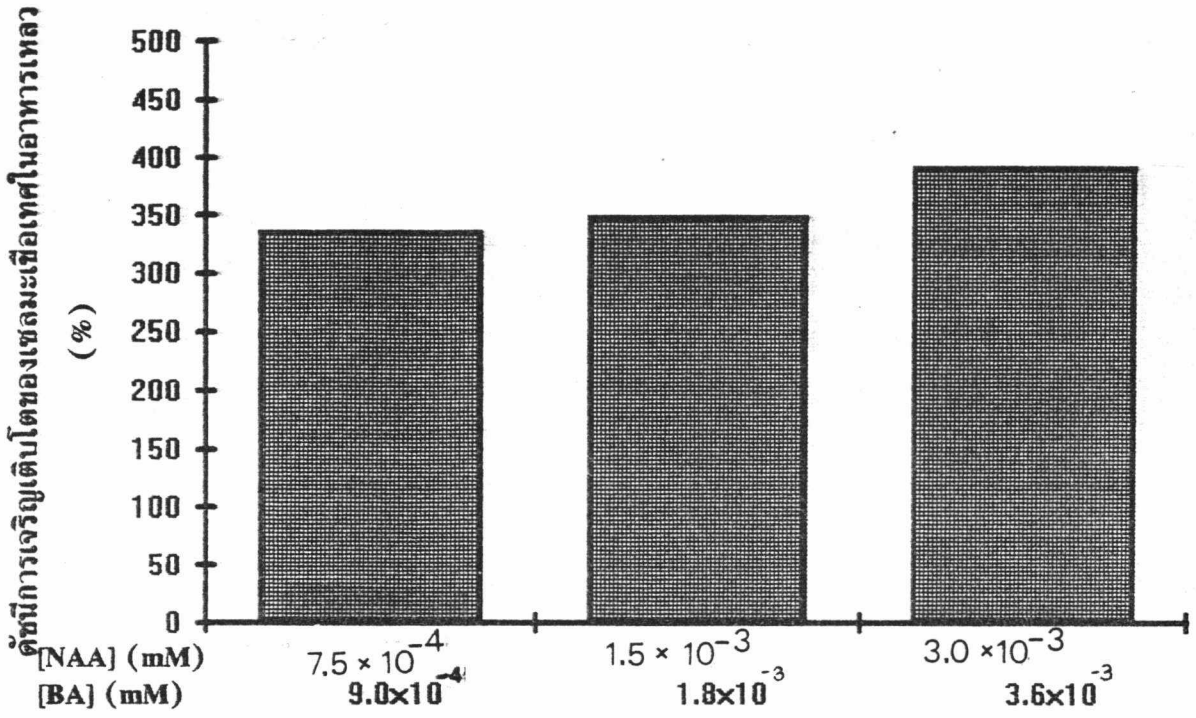
รูปที่ 19 : ผลของไกลโฟเสทต่อดัชนีการเจริญเติบโตของต้นที่เกิดจากเมล็ดที่เจริญในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ผสมไกลโฟเสทความเข้มข้นต่างๆ



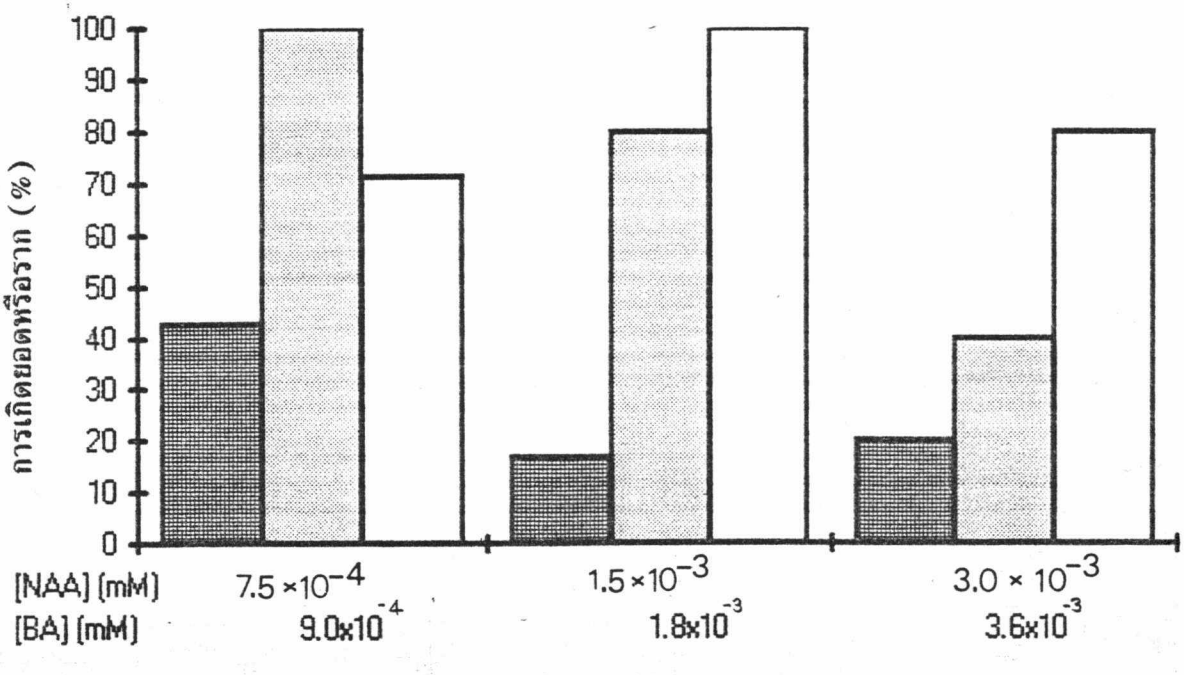
รูปที่ 20 : ค่า LD_{50} ของไกลโฟเสทในต้นที่เกิดจากเมล็ด



รูปที่ 21 : ลักษณะของต้นที่เจริญในอาหารผสมไกลโฟเสทเปรียบเทียบกับต้นที่เจริญในอาหารสูตรควบคุม



รูปที่ 22 : การเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร MS เสริมด้วย NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 23 : การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส ยอด และรากของเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร MS เสริมด้วย NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

วิจารณ์ผลการทดลอง

ความสามารถในการงอกของเมล็ด ขึ้นอยู่กับการล้างเมล็ดมะเขือเทศ เนื่องจากเมล็ดมะเขือเทศมีเมือกหุ้มเยื่อเมล็ด ซึ่งมีฮอร์โมนยับยั้งการงอกของเอมบริโอภายในเมล็ด ถ้าทำการเพาะปลูกตามธรรมชาติ เยื่อหุ้มชนิดนี้จะถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ในดิน ดังนั้น การนำเมล็ดมะเขือเทศมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะต้องล้างเมือกที่หุ้มเมล็ดออกให้หมด ก่อนที่จะนำไปฟอกฆ่าเชื้อเมล็ด แล้วถ่ายเมล็ดลงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS แต่วิธีการเพาะเลี้ยงเมล็ดที่ดีควรจะถ่ายเมล็ดลงในจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษกรองและน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยเรียงเมล็ดให้มีระยะห่างกันพอประมาณ เมื่อเลี้ยงได้ 7 วัน เมล็ดเริ่มงอกแล้วจะต้องถ่ายต้นที่เริ่มงอกลงขวดอาหาร และตัดส่วนที่ปนเปื้อนทิ้งไป วิธีนี้จะช่วยให้ได้จำนวนต้นมากตามความต้องการ

เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะได้ต้นที่มีความสูงเท่ากับขวดพอดี ไม่ควรใช้เวลามากกว่านี้ เพราะต้นจะสูงมากเกิน ทำให้ปลายยอดม้วยงอดอยู่ที่คอขวด ซึ่งจะไม่เหมาะที่จะนำมาทำการทดลองต่อไป หลังจากนั้นนำต้นที่ได้มาตัดเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนของใบเลี้ยง และส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS เสริมด้วย NAA และ BA ที่อัตราส่วนของ NAA ต่อ BA ที่มีค่าใกล้เคียง 1:1 จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อไปเป็นเอมบริโอจีนิคแคลลัสได้สูง (รูปที่ 4) แต่ถ้าอัตราส่วนความเข้มข้นของ NAA ต่อ BA ต่ำลง จะมีผลทำให้การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสลดลง ส่วนผลของการเกิดยอดและการเกิดรากนั้นพบว่า ถ้าความเข้มข้นของ BA คงที่ แต่ความเข้มข้นของ NAA เพิ่มขึ้น แนวโน้มของการเกิดยอดจะลดลง และที่อัตราส่วน NAA ต่อ BA เท่ากับ 1:18 จะเกิดยอดได้สูงที่สุด (รูปที่ 5) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก NAA เป็นสารควบคุมการเจริญในกลุ่มออกซินซึ่งส่งเสริมการสร้างราก ดังนั้นที่ความเข้มข้นของ NAA ในปริมาณสูงกว่า BA มากๆ จึงทำให้เกิดรากมากกว่าเกิดยอด อัตราส่วนของความเข้มข้นของ NAA ต่อ BA จะเกิดยอดต่างกันตามลำดับ ดังนี้ 1:18> 1:6> 1:36> 5:3 แต่ถ้าความเข้มข้นของ NAA สูงขึ้น แต่ความเข้มข้นของ BA คงที่ แนวโน้มการเกิดรากจะมีค่าลดลง

ในการพิจารณา คัดเลือกสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม จะต้องใช้ผลของการเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส การเกิดยอด และการเกิดราก มาประกอบ

กัน ส่วนของรากจะมีผลต่อการเกิดยอด การเกิดต้นจากแคลลัส และการเจริญของแคลลัส โดยทั่วไปรากจะเจริญได้รวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับยอดและแคลลัส และฮอร์โมนจากรากอาจมีผลต่อการเจริญของยอดและแคลลัสได้ จึงต้องเลือกสูตรอาหารที่ทำให้เกิดยอดในปริมาณมากกว่า ในการทดลองนี้ ได้คัดเลือกออกมาในขั้นต้น 5 สูตร และคัดเลือกเหลือ 2 สูตร คือสูตรที่เสริมด้วย NAA ต่อ BA เท่ากับ 5.0×10^{-4} มิลลิโมลาร์ ต่อ 1.8×10^{-3} มิลลิโมลาร์ และสูตรที่เสริมด้วย NAA ต่อ BA เท่ากับ 5.0×10^{-4} มิลลิโมลาร์ ต่อ 9.0×10^{-3} มิลลิโมลาร์ ซึ่งพบว่าแคลลัสเกิดการพัฒนาไปเป็นยอดทั้งหมด (รูปที่ 7)

ในคัดเลือกสูตรอาหาร ควรใช้แคลลัสที่เคยได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันกับสูตรอาหารที่ทำการคัดเลือก มาทำการทดลอง เพราะ ถ้าใช้แคลลัสที่เจริญอยู่ในสูตรอาหารอื่นมาทำการทดลอง อาจมีผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อเดิมซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสด้วยเช่นกัน

การเกิดยอด และการเกิดรากของแคลลัสที่ได้จากลำต้นใต้ใบเลี้ยงในสูตรอาหารดังกล่าว มีค่าใกล้เคียงกันมาก และเมื่อนำไปหาอัตราการเจริญเติบโตเปรียบเทียบกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 8) แต่ถ้าพิจารณาที่ อัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตของอาหารทั้ง 2 สูตร คือ ที่ความเข้มข้น NAA 5.0×10^{-4} มิลลิโมลาร์ ต่อ BA 9.0×10^{-3} มิลลิโมลาร์ และที่ NAA เข้มข้น 5.0×10^{-4} มิลลิโมลาร์ ต่อ BA 1.8×10^{-2} มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นอัตราส่วน 1:18 และ 1:36 ตามลำดับ ผลที่ได้ควรจะมีค่าที่แตกต่างกัน แต่ในการทดลองนี้ มีการถ่ายเนื้อเยื่อหลายครั้ง อาจจะทำให้มีการสะสมสารควบคุมการเจริญเติบโตในเนื้อเยื่อไว้มาก เมื่อนำมาวัดอัตราการเจริญจึงได้ผลที่ไม่แตกต่างกัน และการเจริญเป็นผลเนื่องมาจากระดับความเข้มข้นของ BA มากกว่าความเข้มข้นของ NAA

การเกิดยอดและรากเป็นผลจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งอาจใช้สารชนิดอื่นที่ไม่ใช่ NAA และ BA ชักนำให้เกิดยอดและรากในมะเขือเทศได้ Guney และ Rao (1980) พบว่า อาหารที่เติม kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารที่เติม IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อจากส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงเกิดยอดได้

สำหรับในส่วนของใบเลี้ยง เมื่อพิจารณาการเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส (รูปที่ 9) พบว่าที่ความเข้มข้น NAA คงที่ และความเข้มข้น BA เพิ่มขึ้น การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสจะลดลง

และที่ความเข้มข้นของ BA 1.8 x 10^{-2} มิลลิโมลาร์ ไม่ว่า NAA จะมีความเข้มข้นเป็นค่าคงที่ค่าใดก็ตามจะยับยั้งการเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส ซึ่งอาจเกิดจากความเข้มข้นของ BA ที่มากเกินไป แต่ถ้าความเข้มข้นของ BA คงที่ และความเข้มข้นของ NAA ตั้งแต่ 1.5 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ขึ้นไป การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสจะลดลง แสดงให้เห็นว่าทั้งความเข้มข้นของ NAA และ BA ที่สูงล้วนแต่มีผลยับยั้งการเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสทั้งสิ้น และสูตรอาหารส่วนใหญ่ที่ให้การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสสูงจะมีอัตราส่วนของความเข้มข้น NAA ต่อ BA ที่ใกล้เคียง (1:1) มีการเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสสูงที่ความเข้มข้นของ NAA 1.5 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ ไม่ว่าความเข้มข้นของ BA จะเป็นค่าเท่าใดก็ตาม และที่ความเข้มข้นของ BA 1.8 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ จะเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสสูงที่สุด ไม่ว่าความเข้มข้น NAA จะเป็นค่าเท่าใดก็ตาม จึงอาจสรุปได้ว่า ที่ความเข้มข้นของ NAA และ BA ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสได้สูงสุดในส่วนของใบเลี้ยง คือ NAA 1.5 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ 1.8 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์

จากการพิจารณาการเกิดยอดและการเกิดรากจากส่วนใบเลี้ยงมะเขือเทศ (รูปที่10) พบว่า ถ้าความเข้มข้นของ NAA คงที่และความเข้มข้นของ BA เพิ่มขึ้น พบว่าแนวโน้มการเกิดยอดมีค่าลดลง และถ้าอัตราส่วนความเข้มข้นของ NAA ต่อ BA มีค่าใกล้เคียง 1:1 พบว่าเกิดการให้ยอดมากกว่าการให้ราก แต่ที่ความเข้มข้น NAA 2.5 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ ต่อ BA 1.8 x 10^{-2} มิลลิโมลาร์ และที่ NAA 3.0 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ ต่อ BA 1.8 x 10^{-2} มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของ NAA ต่อ BA ที่ต่ำ พบว่าไม่มีการเกิดยอดและราก ซึ่งอาจเนื่องมาจากอัตราส่วนของฮอร์โมนที่ไม่เหมาะสม จึงไปมีผลยับยั้งการเกิดยอดและรากได้

เมื่อพิจารณาการเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส การเกิดยอด และการเกิดราก ประกอบกัน พบว่า ในการทดลองนี้ อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เสริม NAA 1.5 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.8 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศให้เกิดการเจริญเป็นต้นใหม่ โดยพิจารณาจากการเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัส และการเกิดยอดสูงสุดเท่านั้น เพราะถ้ามีรากเกิดขึ้น รากจะสร้างฮอร์โมนบางตัวที่ไปยับยั้งการเกิดยอดได้ ทำให้โอกาสในการเกิดต้นใหม่น้อยลง

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง (รูปที่ 4 และ 5) กับผลการทดลองที่ได้จากส่วนใบเลี้ยง (รูปที่ 9 และ 10) พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น NAA ตั้งแต่ 1.5 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ขึ้นไป และความเข้มข้น BA คงที่ค่าใดก็ตาม ส่วนใบเลี้ยงจะมีการให้ยอดสูงกว่าส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง พบว่า เมื่อความเข้มข้น BA สูงขึ้น และความเข้มข้น NAA (ตั้งแต่ 1.5 x 10^{-3} มิลลิโมลาร์ขึ้นไป) เป็นค่าคงที่ค่าใดก็ตาม การเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสจากทั้งส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงและส่วนใบเลี้ยงมีแนวโน้มลดลง แต่ในสูตรอาหารที่มีการเกิดเอมบริโอจีนิคแคลลัสสูง จะมีอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของ NAA ต่อ BA ใกล้เคียง 1:1 ทั้งในส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง และใบเลี้ยง

จากผลการทดลองของ Behki และ Lesley (1976) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงใบของมะเขือเทศในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 5.0 x 10^{-4} มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ BA 1 x 10^{-2} มิลลิโมลาร์ ซึ่งอัตราส่วนของ NAA ต่อ BA มีค่าเท่ากับ 1:20 จะเกิดการพัฒนาไปเป็นยอด แต่ถ้าอัตราส่วนของ NAA ต่อ BA มีค่าเท่ากับ 2.5:1 จะเกิดการพัฒนาไปเป็นราก แสดงให้เห็นว่า อัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซินต่อไซโตไคนินมีอิทธิพลต่อการพัฒนาเซลล์พืชไปเป็นยอดหรือราก

การทดสอบความทนทานของแคลลัสต่อไกลโฟเสท พบว่า เมื่อความเข้มข้นของไกลโฟเสทเพิ่มขึ้น การเจริญของแคลลัสจะลดลง สังเกตุได้จากรูปที่ 11 อย่างไรก็ตาม ในการทดลองบางครั้งแคลลัสที่ถูกทดสอบด้วยไกลโฟเสทที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากกว่าแคลลัสที่ถูกทดสอบด้วยไกลโฟเสทที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่านี้ อาจเนื่องจาก แคลลัสเกิดการกลายพันธุ์ให้ทนทานต่อไกลโฟเสท หรือแคลลัสเจริญได้เนื่องจากบางส่วนของแคลลัสไม่ได้สัมผัสถูกอาหารที่ใส่ไกลโฟเสท ดังนั้นผลการทดลองของแคลลัสในอาหารกึ่งแข็งที่ผสมไกลโฟเสทจึงยังไม่อาจสรุปได้ว่าแคลลัสสามารถทนทานต่อไกลโฟเสทได้จริง ต้องนำแคลลัสเหล่านี้ไปเพาะเลี้ยงและชักนำให้เกิดต้นพืชที่สมบูรณ์ แล้วนำต้นที่ได้ไปปลูกในแปลงทดลองเพื่อให้ออกผล นำเมล็ดที่ได้ไปปลูก แล้วนำต้นที่ปลูกได้ไปทำการทดสอบความทนทานต่อไกลโฟเสท ถ้าต้นที่จะทดสอบไม่ตาย แสดงว่าได้สายพันธุ์ที่สามารถทนทานต่อสารไกลโฟเสทได้

เมื่อทดสอบความทนทานของต้นที่เกิดจากแคลลัสต่อไกลโฟเสท (รูปที่ 15) พบว่า บางต้นสามารถเจริญได้ดีที่ความเข้มข้นของไกลโฟเสท 0.075 mM ต้นที่เจริญได้ในสภาวะนี้ อาจเป็น

ต้นที่มีความทนทานต่อสารไกลโฟเสทที่ระดับความเข้มข้นนี้ ซึ่งต้องนำไปทดสอบต่อไปโดยการปลูกลงแปลงทดลอง แล้วนำเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากต้นนี้ไปปลูกเพื่อทดสอบความทนทานไกลโฟเสทในแปลงทดลองต่อไป และในต้นที่เจริญจากเมล็ดก็เช่นเดียวกัน (รูปที่ 19) มีบางต้นที่สามารถเจริญได้ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมไกลโฟเสทที่มีความเข้มข้น 0.075 mM ซึ่งเป็นต้นที่อาจจะทนทานต่อสารไกลโฟเสทได้ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวในสภาพห้องทดลอง ดังนั้น จึงควรนำต้นที่ได้นี้ไปปลูกในแปลงทดลอง เพื่อทดสอบความทนทานต่อไกลโฟเสทต่อไป

เมื่อศึกษาค่า LD_{50} ของไกลโฟเสทต่อการยับยั้งการเจริญเติบโต 50 เปอร์เซนต์ของแคลลัสต้นที่เกิดจากแคลลัส และต้นที่เกิดจากเมล็ด พบว่า ค่า LD_{50} ของแคลลัสมีค่าสูงกว่าค่า LD_{50} ของต้นที่เกิดจากเมล็ด และต้นที่เกิดจากแคลลัสตามลำดับ (รูปที่ 12,16 และ 20) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ แคลลัสสัมผัสกับอาหารเพียงด้านเดียว และแคลลัสมีความสามารถในการดูดซึมไกลโฟเสทได้น้อย เนื่องจาก ไม่มีท่อลำเลียงเหมือนในต้นมะเขือเทศ

สำหรับต้นที่เกิดจากเมล็ดมีค่า LD_{50} สูงกว่าต้นที่เกิดจากแคลลัส เนื่องจากเซลล์พืชภายในเมล็ดเป็นเซลที่เจริญอยู่ในสภาพแวดล้อมภายนอก ซึ่งไม่มีการควบคุมสภาวะต่างๆให้เหมาะสมและเฉพาะเจาะจงเหมือนการเพาะเลี้ยงแคลลัสในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนั้นเมล็ดจึงมีความทนทานและสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนไปได้ดีกว่าต้นที่เกิดจากแคลลัส ซึ่งอาจเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมที่เรียกว่า somaclonal variation (Larkin and Scowcroft , 1981)

อย่างไรก็ตาม มีรายงานการวิจัยคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสท ดังนี้ 1) E. D. Nafziger J. M. Widholm และ F. W. Slife (1983) ศึกษาผลของแอสปาร์เตทต่อปริมาณสารไกลโฟเสทในเซลล์แครอท (*Dancus carota* L. cv Danvers) ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารไกลโฟเสท พบว่า มีความสัมพันธ์กันระหว่างปริมาณของแอสปาร์เตทที่เติมในอาหารและการรับไกลโฟเสทเข้าไปในเซลล์ โดยแอสปาร์เตทมีผลในทางตรงกันข้ามกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีเอสพีเอสโดยไกลโฟเสท ทั้งนี้โดยแอสปาร์เตทจะไปทำให้ความเข้มข้นของไกลโฟเสทภายในเซลลดลง นอกจากนี้ การเติมซัคซิเนต อัลฟา-คีโทกลูทาเรท กลูทาเมท ไพรูเวท และ มาเลท ลงในอาหารที่มีผลยับยั้งการรับสารไกลโฟเสทเข้าไปในเซลล์ด้วย

2) E. D. Nafziger J. M. Widholm H. C. Steinriicken และ J. L. Killmer (1984) ได้คัดเลือกเซลล์แคลลัสที่ทนทานต่อสารละลายไกลโฟเสทที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ได้สำเร็จ โดยการเพิ่มปริมาณไกลโฟเสทลงในอาหารให้มากขึ้นทุกครั้งที่ทำการย้ายเซลล์ เซลล์ที่คัดเลือกได้มีความทนทานต่อสารไกลโฟเสทเพิ่มขึ้นถึง 52 เท่า และสามารถเจริญในอาหารที่ไม่มีไกลโฟเสทได้อีกด้วย เซลล์ที่ได้คัดเลือกให้ทนทานต่อสารไกลโฟเสทนี้ มีระดับการทำงานของเอนไซม์อีพีเอสพีมากกว่าเซลล์ที่ไม่ทนต่อสารไกลโฟเสทถึง 12 เท่า ในขณะที่การทำงานของเอนไซม์ชิคิเมท ดีไฮโดรจีเนส (shikimate dehydrogenase) และเอนไซม์แอนธรานิเลทซินเธส (anthranilate synthase) ของเซลล์ทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ เซลล์ที่ทนทานต่อสารไกลโฟเสท ยังมีปริมาณของกรดอะมิโนอิสระมากขึ้น โดยเฉพาะทรีโอนีน (threonine) เมทไทโอนีน (methionine) ไทโรซีน (tyrosine) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ทริปโทเฟน (tryptophane) ฮิสติดีน (histidine) และ อาร์จินีน (arginine) ไกลโฟเสททำให้ปริมาณกรดอะมิโน เซอรีน (serine) ไกลซีน (glycine) เมทไทโอนีน ไทโรซีน ฟีนิลอะลานีน และ ทริปโทเฟน ลดลง 50-65 เปอร์เซนต์ ในเซลล์ที่ไม่ทนทานต่อสารไกลโฟเสท แต่ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในเซลล์ที่ทนทานต่อไกลโฟเสทไม่เปลี่ยนแปลง ความสามารถในการทนทานต่อไกลโฟเสทนี้ เนื่องมาจากการเพิ่มของเอนไซม์อีพีเอสพีในเซลล์ที่ทนทานต่อไกลโฟเสท ทำให้การทำงานของวิถีการสังเคราะห์กรดชิคิมิคดำเนินไปได้โดยปกติ

3) C. M. Smith D. Pratt และ G. A. Thompson (1986) ได้คัดเลือกสายพันธุ์เซลล์มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* x *L. peruvianum* hybrid) ที่ทนทานต่อสารไกลโฟเสท โดยเซลล์สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีไกลโฟเสท 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงกว่าความเข้มข้นที่ทำให้การเจริญของเซลล์ wild type ลดลง ถึง 100 เท่า เมื่อนำเซลล์ที่ได้จากสายพันธุ์นี้มาเลี้ยงในอาหารที่มีไกลโฟเสท พบว่า มีการสะสมกรดชิคิมิคน้อยกว่าเซลล์ wild type และมีการทำงานของเอนไซม์อีพีเอสพีมากกว่าเซลล์ wild type 8 และ 13 เท่า แต่ระดับการถูกยับยั้งโดยไกลโฟเสทจะเท่ากันในเซลล์ทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งแสดงว่าการที่สายพันธุ์ใหม่ทนทานต่อไกลโฟเสทนั้น เป็นผลเนื่องมาจากการสะสมเอนไซม์อีพีเอสพีที่มีความไวต่อระดับไกลโฟเสทในปริมาณมาก แต่นักวิจัยกลุ่มนี้ก็ไม่สามารถชักนำให้เซลล์ที่ทนทานต่อ

ไกลโฟเสทเจริญไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ หากแต่พบยอดที่ผิดปกติ และพบว่า แคลลัสที่เจริญจากใบของยอดนี้จะยังคงรักษาระดับความทนทานต่อไกลโฟเสทได้

จากตัวอย่างงานวิจัยดังกล่าว อาจกล่าวได้ว่า แคลลัสและต้นมะเขือเทศที่เกิดจากเมล็ดหรือ แคลลัส สามารถทนทานต่อสารไกลโฟเสทได้ เพราะเซลล์มะเขือเทศเหล่านั้นสามารถผลิตเอนไซม์อีพีเอสพี ซินเธส ได้ในปริมาณที่มากกว่าปกติ จึงไม่เกิดการสะสมกรดชิคิมิคจึงสามารถดำเนินวิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนแบบอะโรมาติก ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตได้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ ให้เกิดการเจริญเป็นต้นใหม่คือ อาหารกึ่งแข็งสูตร MS เสริมด้วย NAA 0.5×10^{-3} มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.8×10^{-2} มิลลิโมลาร์ หรือที่ BA 9.0×10^{-3} มิลลิโมลาร์

2. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศให้เกิดการเจริญเป็นต้นใหม่ คือ อาหารแข็งสูตร MS เสริมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1.5×10^{-3} มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ BA 1.8×10^{-3} มิลลิโมลาร์

3. ค่า LD_{50} ของไกลโฟเสทในแคลลัสมะเขือเทศ = 0.08 มิลลิโมลาร์

4. ค่า LD_{50} ของไกลโฟเสทในต้นที่เกิดจากแคลลัส = 0.006 มิลลิโมลาร์

5. ค่า LD_{50} ของไกลโฟเสทในต้นที่เกิดจากเมล็ด = 0.007 มิลลิโมลาร์

การคัดเลือกพันธุ์มะเขือเทศที่ทนทานต่อสารไกลโฟเสท อาจทำได้โดยการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามาช่วย โดยการคัดเลือกในระดับแคลลัส แต่ควรมีการคัดเลือกในระดับความเข้มข้นของไกลโฟเสทที่มีค่าเท่ากับ หรือมากกว่า LD_{50} หรือเพิ่มความเข้มข้นของไกลโฟเสทขึ้นทีละน้อย แต่ต้องทำการทดลองคัดเลือกแคลลัสในสารไกลโฟเสทเป็นระยะเวลานานกว่าที่ทำการทดลองนี้ และนำไปทดสอบในระดับต้นต่อไปในแปลงทดลอง เพื่อคัดเลือกต้นมะเขือเทศที่มีความทนทานต่อไกลโฟเสทได้สูงขึ้น

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (MS)(1962)

stock	สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ชั่งสารเตรียม stock (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิลิตรต่อลิตร)
1	NH_4NO_3	1,650	82,500	50	20
2	KNO_3	1,900	95,000	50	20
3	H_3BO_3	6.2	1,240	200	
	KH_2PO_4	170	34,000	200	
	KI	0.83	166	200	5
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	50	200	
	$CoCl_2.6H_2O$	0.025	5	200	
4	$CaCl_2.2H_2O$	440	88,000	200	5
5	$MgSO_4.7H_2O$	370	74,000	200	
	$MnSO_4.4H_2O$	22.3	4,460	200	5
	$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	1,720	200	
	$CuSO_4.5H_2O$	0.025	5	200	
6	Na_2EDTA	37.25	7,450	200	5
	$FeSO_4.7H_2O$	27.85	5,570	200	
7	glycine	2.0	400	200	
	nicotinic acid	0.5	100	200	5
	pyridoxine-HCl	0.5	100	200	
	thiamine-HCl	0.1	20	200	
8	myo-inositol	100	100	1	

ภาคผนวก ข.

วิธีการเตรียมอาหารสูตร MS

<u>วิธีการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS</u>

1.เตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

เตรียม stock ที่ 1-7 โดยชั่งสารเคมี ดังตารางอาหารสูตร MS โดยใช้ตาชั่ง 4 ตำแหน่ง แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น เก็บ stock ไว้ในตู้เย็น

2. ดูดสารละลาย stock ที่ 1-7 รวมกัน ชั่ง myo-inositol โดยใช้ตาชั่ง 4 ตำแหน่ง ให้ได้น้ำหนักดังตารางใส่ลงในบิกเกอร์เดียวกัน (เติมสารควบคุมการเจริญ ในสูตรอาหารที่ต้องการเติมสารควบคุมการเจริญ) เติมน้ำตาล 3 เปอร์เซนต์ ปรับปริมาตรปรับ pH 5.8

3. ถ้าต้องการเตรียมอาหารแข็ง เติมวุ้น 0.8-1.0 เปอร์เซนต์ แล้วนำไปต้มให้วุ้นละลาย ส่วนการเตรียมอาหารเหลวจะไม่เติมวุ้น

4. เทอาหารใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

5. ทำการฆ่าเชื้ออาหาร โดยใช้เครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา15 นาที อาหารที่ฆ่าเชื้อแล้วทิ้งอาหารไว้ให้เย็น

<u>วิธีเตรียม stock สารควบคุมการเจริญเติบโต</u>

1. เตรียม stock NAA (naphthalene acetic acid) (น้ำหนักโมเลกุล=186.20) ชั่ง NAA โดยใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ให้ได้น้ำหนักตามต้องการ แล้วใช้ NaOH 1 N เป็นตัวทำละลาย

2. เตรียม stock BA (benzyladenine) (น้ำหนักโมเลกุล=225.26) ชั่ง BA โดยใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ให้ได้น้ำหนักตามต้องการ แล้วใช้ NaOH 1 N เป็นตัวทำละลาย

<u>วิธีเตรียมสารละลายไกลโฟเสท</u>

1. ชั่งไกลโฟเสทด้วยตาชั่ง 4 ตำแหน่ง แล้วใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

2. กรองไกลโฟเสท โดยใช้ millipore filter เก็บในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

เอกสารอ้างอิง

ถวัลรัตน์ ผ่องใส . 2528 . การใช้เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์มะเขือเทศทนเค็ม . วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ , หน้า 13-15

ทศพล พรพรหม . 2533 . การคัดเลือกถั่วเหลืองทนทานต่อไกลโฟเสทในสภาพเรือนทดลองและโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ . วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

ธวัช ลวะปรยะ และ คณะ . มะเขือเทศสีดาห้วยทราย (สีดาพระราชทาน) . ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์ . 2531 . สารกำจัดวัชพืช (herbicide) . ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา . 2524 . หลักการและวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช . กรุงเทพฯ

รังสิต สุวรรณเขตนิคม . 2526 . ยากำจัดวัชพืชกับผลทางสรีรวิทยาของพืช . ภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

รังสิต สุวรรณเขตนิคม . 2531 . สารกำจัดวัชพืชกับผลทางสรีรวิทยาของพืช เล่ม 2 กลไกการทำลาย . ภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

สมภพ ฐิตะวสันต์ . 2527 . หลักการผลิตผัก . ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช . สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

Amrhein N. , Johanning D. , Schab J. and Schulz A. (1983) Biochemical basis for glyphosate tolerance in a bacterium and a plant tissue culture . FEBS Letters 157 , 191-196

Anderson P. C. and Georgson M. (1986) Selection of an imidazolinone tolerant mutant of corn . *In* DA somers , BG Gengenbach , DD Biesboer , WP Hackett. CE Green . cds . VI International Congress of Plant Tissue and Cell culture (Abstracts) . University of Minnesota , Minneapolis , 437

Balrd D. D. , Upchurch R. P. , Homesley W. B. and Franz J. E. (1971) Introduction of a new broad spectrum post emergence herbicide class with utility for herbaceous perennal weeds control . Proc. Natl. Centr. Weed Central Conf. 26 , 64-68

Boocock M. R. and Coggins J. R. (1983) Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate -3-phosphate synthase by glyphosate . FEBS Lett. 154 , 127-133

Behki R. M. and Lesley S. M. (1976) *In vitro* plant regeneration from leaf explants of *Lycopersicon esculentum* (tomato) . Can. J. Bot. 54 , 2409-2414

Carlson C. J. (1979) Influence of nitrogen nutrition in stock plant *in vitro* shoot production from tomato leaf segments (Abstr.) . Hort Science 14(3) , 38

Chaleff R. S. and Parsons M. F. (1978) Direct selection *in vitro* for herbicide-resistant mutants of Nocotiana tabacum . Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75 , 5104-5107

Cresswell R. C. , Fowler M. W. and Scragg A. H. (1988) Glyphosate-tolerant in Catharanthus roseus . Plant Science 54 , 55-63

De Lenghe E. and De Bruijne E. (1976) Continuous propagation at tomato plants by means of callus cultures . Scientia Hort 4 , 221-227

Hanson M. R. (1982) Cell and tissue culture of *Lycopersicon* . *In* Proc. 5th. Intl. Congr. Plant Tissue and Cell Culture . Tokyo , 471-474

Hangarter R. P. , Peterson M. D. and Good N. E. (1980) Biological activities of indolacetylamino acids and their use as auxins in tissue culture . Plant Physiol. 65 , 761-767

Kurtz S. M. (1982) *In vitro* response of *Lycopersicon esculentum* to sodium chloride . *In* Proc. 5th. Intl. Congr. Plant Tissue and Cell culture . Tokyo , 479-480

Larkin P. and Scoweroft W. R. (1981) Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement . Theor. Appl. Genet. 60 , 197-214

Linsmair E. M. and Skoog F. (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture . Physiol. Plant 18 , 100-127

Miihlbach H. P. (1980) Different regeneration potential of mesophyll protoplasts from cultivated and wild species of tomato . Planta 148(1) , 89-96

Miller D. K. and Huge K. W. (1980) Selection of paraquat-resistant variants of tobacco from cell cultures . In vitro 16 , 1085-1091

Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures . Physiol. Plant 15 , 473-492

Nafziger E. D. , Wildholm J. M. and Slife F. W. (1983) Effects of aspartate and other compounds on glyphosate uptake and growth inhibition in cultured carrot cells . Plant Physiol. 71 , 623-626

Nafziger E. D. , Wildholm J. M. , Steinrucken H. C. and Killmer J. L. (1984) Selection and characterization of carrot cell line tolerant to glyphosate . Plant Physiol. 76 , 571-574

Norton J. P. and Boll W. G. (1954) Callus and shoot formation from tomato roots *in vitro* . Science 27 , 358-367

Ohki S. , Bigot C. and Mousseau J. (1978) Analysis of shoot-formation capicity *in vitro* in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and their hybrids . Plant & Cell Physiol. 19(1) , 27-42

Padmanabhan V. , Paddock E. P. and Sharp W. R. (1974) Plantlet formation from *Lycopersicon esculentum* leaf callus . Can. J. Bot. 52 , 1429-1432

Preece J. E. and Read P. E. (1980) The influence of GA_3 and benzyl-adenine stock plant sprays on the growth and differentiation of tomato leaf explants cultured *in vitro* (Abstr.) . Hort Science 15(3) , 82

Racchi M. L. (1990) Glyphosate tolerance in plant cell cultures . The Impact of Biotechnology in Agriculture , 437-446

Radin D. N. and Carlson P. S. (1978) Herbicide-tolerant tobacco mutants selected in situ recovered via regeneration from cell culture . Genet. Res. Camb. 32 , 85

Singer S. R. and McDaniel C. N. (1984) Selection of amitrole tolerant tobacco calli and the expression of this tolerance in regenerated plants and progeny . Theor. Appl. 67 , 427-432

Smith C. M. , Pratt D. and Thompson G. A. (1986) Increased 5-enolpyruvyl shikimic acid - 3 - phosphate synthase activity in a glyphosate-tolerant variant strain of tomato cells . Plant Cell Reports 5 , 298-301

Sprankle P. , Meggit W.F. and Penner D. (1975a) Adsorption, action and translocation of glyphosate . Weed Scie. 23 , 235-240

Sprankle P. , Meggit W.F. and Penner D. (1975b) Adsorption, mobility and microbrial degradation of glyphosate in the soil . Weed Scie. 23 , 229-234

Sprankle P. , Meggit W.F. and Penner D. (1975c) Rapid inactivation of glyphosate in the soil . Weed Science 23 , 224-228

Steinrucken H. C. and amrhein N. (1984) EPSP synthase of Klebsiella pneumonie 2 inhibition by glyphosate . EUR . J. Biochem. 143 , 351-357

Tal M. , Dehan K. and Heikin H. (1977) Morphogenetic potential of cultured leaf sections of cultivated and wild species of tomato . Ann. Bot. 41 , 937-941

Thomas B. R. and Pratt D. (1982) Isolation of paraquat-tolerant mutants from tomato cell cultures . Theor. Appl. Genet. 63 , 169-176

Tortensson N. T. L. and Aamisepp A. (1977) Detoxication of glyphosate in soil . Weed Res. 17 , 209-212

Tortensson L. (1982) Decomposition of glyphosate in agricultural soils . Weeds and Weed control 23rd. Swedish Weed Confer. pp. 385-392

White P. R. (1943) Further evidence on the significance of glycine , pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots . Amer. J. Bot. 30 , 33-36