การคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองทนทานต่ออลูมินัม และการขาดจุลธาตุอาหารโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

บัวทิพย์ อุบลประเสริฐ, พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, สิรนุช ลามศรีจันทร์,
อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์ และ พีรนุช การีรส
ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทร. 5795530 โทรสาร 5795530

บทคัดย่อ

พันธุ์ Gasoy 17 เชียงใหม่ 60 และ BSR 101 ได้รับการคัดเลือกจากถั่วเหลืองจำนวน 14 พันธุ์ เพื่อศึกษาวิธีการเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมา และการคัดเลือกลักษณะทนทานต่ออลูมินัม และการขาดจุลธาตุอาหารโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การทดลองเริ่มจากนำฝักอ่อนของทั้ง 3 พันธุ์ มาฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีในระดับต่าง ๆ กัน แล้วนำใบเลี้ยงอ่อนไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ รังสีในปริมาณ 1-5 Gy ส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอมบริโอในพันธุ์เชียงใหม่ 60 และ BSR 101 แต่รังสีในปริมาณ 1-3 Gy ส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอมบริโอในพันธุ์ Gasoy 17 นำโซมาติกเอมบริโอจากทุกพันธุ์มาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว pH 5.8 เป็นเวลา 5 สัปดาห์ โซมาติกเอมบริโอที่ได้นำมาคัดเลือกในสภาพทนทานต่ออลูมินัม โดยการเลี้ยงโซมาติกเอมบริโอของพันธุ์ Gasoy 17 และเชียงใหม่ 60 ในอาหารเหลวที่มีปริมาณอลูมินัมระดับต่าง ๆ กัน (5.6 11.2 และ 16.8 ppm) พบความเป็นพิษของอลูมินัมทำให้เปอร์เซ็นต์การเพิ่มน้ำหนักสดของโซมาติกเอมบริโอลดลง โซมาติกเอมบริโอที่ผ่านการคัดเลือกยังไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ ส่วนการคัดเลือกลักษณะที่ทนต่อสภาพการขาดจุลธาตุอาหาร ทำโดยการเลี้ยงโซมาติกเอมบริโอของพันธุ์ BSR 101 ในอาหารเหลวที่มี pH สูง (pH 6-8) ซึ่งจะทำให้เหล็กตกตะกอนไม่อยู่ในรูปที่พืชจะนำไปใช้ประโยชน์ได้ โซมาติกเอมบริโอที่คัดเลือกได้สามารถนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร เพื่อการชักนำให้เกิดต้นได้ 8 ต้น นำออกปลูกในกระถางเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ เพื่อศึกษาความทนทานต่อสภาพการขาดจุลธาตุอาหารต่อไปในรุ่นลูกหลาน

TH9800040

A-13

In Vitro Selection for Soybean Lines Tolerant to Aluminum and Trace Element Deficiencies

Buathip Uhonprasert et al.
Dept. of Applied Radiation and Isotopes, Faculty of Science, Kasetsart University.
Tel. 5795530 Fax. 5795530

ABSTRACT

Gasoy 17, Chiang Mai 60 and BSR 101 were chosen among 14 soybean cultivars for mutation induction experiment and *in vitro* selection for soybean lines tolerant to aluminum and trace element deficiencies. Young pods from all 3 cultivars were irradiated with gamma-rays at different doses and immature cotyledons were cultured in an induction medium. Somatic embryogenesis was markedly enhanced by irradiation with 1-5 Gy in Chiang Mai 60 and BSR 101 and with 1-3 Gy in Gasoy 17. The somatic embryos were multiplied by culturing in liquid medium (pH 5.8) for 5 weeks. The somatic embryos of Gasoy 17 and Chiang Mai 60 were cultured for tolerance to aluminum in media containing different Al levels (5.6 11.2 and 16.8 ppm). Al toxicity resulted in a low percentage of fresh weight of the somatic embryos. Somatic embryos selected at different Al's were cultured in a regeneration medium but no plantlet has emerged so far. Selection for tolerance to trace element deficiencies was done by culturing somatic embryos of BSR 101 in high pH medium (pH 6-8). Under high pH the availability of iron in the medium was noticeably decreased through precipitation of Fe-compounds. Somatic embryos selected at different pH were cultured in the regeneration medium and 8 regenerated plants were grown to maturity for further investigation on tolerance to trace element deficiencies in their progenies.

1. บทนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่ง ซึ่งรัฐบาลได้เล็งเห็นความสำคัญ และได้กำหนดเป้าหมายการผลิตไว้ในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ตั้งแต่ฉบับที่ 1 จนถึงฉบับที่ 7 (พ.ศ. 2535-2539) ในแผนพัฒนาฉบับที่ 7 กำหนดการผลิตต่อไร่ของถั่วเหลืองเป็น 275 กิโลกรัมต่อไร่ ในขณะที่ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ของถั่วเหลืองปีเพาะปลูก 2535/2536 ได้เพียง 209 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งต่ำกว่าเป้าหมายมาก การกำหนดเป้าหมายของผลผลิตเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มผลผลิต แต่การเพิ่มผลผลิตต่อไร่นั้นต้องอาศัยพันธุ์ดีร่วมกับการจัดการที่เหมาะสม รวมทั้งต้องพิจารณาผลิตถั่วเหลืองในแหล่งใหม่ ๆ เนื่องจากพื้นที่ปลูกในแหล่งดั้งเดิมไม่สามารถขยายเพิ่มได้อีก พื้นที่ราบลุ่มในภาคกลางมีพื้นที่กว้างขวาง มีการชลประทานดี ซึ่งหากนำถั่วเหลืองมาปลูกก็จะสามารถเพิ่มผลผลิตของถั่วเหลืองได้ทางหนึ่ง อย่างไรก็ตามพื้นที่บริเวณราบลุ่มภาคกลางดังกล่าวมีปัญหาของดินเปรี้ยวจนถึงดินเปรี้ยวจัด ซึ่งจะเกิดความเป็นพิษของอลูมินัม เหล็กและแมงกานีส ประกอบกับมีรายงานว่าถั่วเหลืองที่ปลูกในดินชุดที่เป็นด่าง (calcareous soil) บริเวณจังหวัดสระบุรี ลพบุรี นครสวรรค์ และนครราชสีมา แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก ซึ่งถั่วเหลืองที่นำมาปลูกจำเป็นจะต้องเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถทนทานต่อสภาพดินดังกล่าว จึงจะให้ผลผลิตได้ แนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหา คือการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองโดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา มาช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองที่ทนต่อสภาพดินกรด ดินด่างหรือดินที่มีการขาดจุลธาตุอาหารที่สำคัญ

จุดประสงค์ของการวิจัยเรื่องนี้ คือการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเทคนิคการฉายรังสีแกมมาใช้ในการสร้างสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินที่เป็นกรดและด่าง

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วิธีการวิจัยประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. การเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลืองเพื่อชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ

ถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลองมี 14 พันธุ์ คือ พันธุ์ สจ. 4 เชียงใหม่ 60 นครสวรรค์ 1 KUSL 20004 Gasoy 17 BSR 101 Century 84 PI 437654 A_{11} A_{12} A_{13} A_{14} A_{15} และ A_{20} พันธุ์ต่างประเทศที่ใช้ทั้งหมดได้รับจากมหาวิทยาลัยอิลลินอยส์ ประเทสหรัฐอเมริกา วิธีการที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนให้เกิดเป็นโซมาติกเอมบริโอ เป็นวิธีการเดียวกับที่ได้รายงานไว้แล้ว (สิรนุช และคณะ 2535, 2536; ฉันทนา 2537)

2. การฉายรังสีแกมมาฝักอ่อนถั่วเหลืองพันธุ์ BSR 101 เชียงใหม่ 60 และ Gasoy 17

จากจำนวน 14 พันธุ์ ที่ใช้ในการวิจัยที่ 1 ได้เลือกพันธุ์ BSR 101 เชียงใหม่ 60 และ Gasoy 17 ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอมบริโอสูงสุด และรองลงมาใช้ในการทดลองฉายรังสีแกมมา นำ

ฝักอ่อนของถั่วเหลืองพันธุ์ BSR 101 เชียงใหม่ 60 และ Gasoy 17 มาฉายรังสีแกมมาในปริมาณ 1, 3, 5, 7, 9 และ 11 Gy ภายหลังการฉายรังสีแล้วนำใบเลี้ยงอ่อนมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอตามวิธีการเดียวกับที่ใช้ในวิธีวิจัยที่ 1

3. การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอมบริโอในอาหารเหลวที่ pH 5.8

นำโซมาติกเอมบริโอของถั่วเหลืองพันธุ์ BSR 101 เชียงใหม่ 60 และ Gasoy 17 ที่ได้จากวิธีวิจัยที่ 2 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MF_5 (Finer and Nagasawa, 1988) ที่ปรับ pH เป็น 5.8 และตรวจสอบการเจริญเติบโตในอาหารเหลวเมื่อเลี้ยงไปได้ 5 สัปดาห์ ชั่งน้ำหนักของโซมาติกเอมบริโอ และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

4. การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอมบริโอในอาหารเหลวที่มีปริมาณอลูมินัมระดับต่าง ๆ กัน

นำโซมาติกเอมบริโอของถั่วเหลืองพันธุ์ Gasoy 17 และเชียงใหม่ 60 จากวิธีวิจัยที่ 3 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MF_5 ซึ่งเติมอลูมินัมปริมาณ 5.6, 11.2 และ 16.8 ppm การทดลองเพาะเลี้ยงเริ่มจากที่การเลี้ยงในอาหารมีปริมาณอลูมินัมระดับต่ำ คือ 5.6 ppm ก่อน เมื่อเลี้ยงได้ครบ 2 สัปดาห์ แบ่งโซมาติกเอมบริโอส่วนหนึ่งไปเพาะเลี้ยงในอาหาร เพื่อการชักนำให้เกิดต้นพืชตามวิธีการที่ได้รายงานไว้แล้ว (สิรนุช และคณะ 2535, 2536; ฉันทนา 2537) อีกส่วนหนึ่งย้ายลงเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตร MF_5 ที่มีอลูมินัม 11.2 ppm เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นจะย้ายต่อลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MF_5 ที่มีอลูมินัม 16.8 ppm ต่อไป ทุกขั้นตอนทำเช่นเดียวกัน เก็บข้อมูลโดยการชั่งน้ำหนักโซมาติกเอมบริโอก่อนทำการเพาะเลี้ยงและภายหลังได้เพาะเลี้ยงมาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ คำนวณหาอัตราการเจริญเติบโต โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นใน 2 สัปดาห์

5. การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอมบริโอในอาหารเหลวที่ pH ต่าง ๆ กัน

นำโซมาติกเอมบริโอของถั่วเหลืองพันธุ์ BSR 101 จากวิธีวิจัยที่ 3 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MF_5 ซึ่งปรับ pH เป็น 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 การทดลองเพาะเลี้ยงเริ่มจากที่การเลี้ยงที่ pH ต่ำ คือ pH 6.0 ก่อน เมื่อเลี้ยงได้ครบ 1 สัปดาห์ แบ่งโซมาติกเอมบริโอส่วนหนึ่งไปเพาะเลี้ยงในอาหาร เพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชตามวิธีการที่ได้รายงานไว้แล้ว (สิรนุช และคณะ 2535, 2536; ฉันทนา 2537) ส่วนหนึ่งย้ายลงเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตร MF_5 ที่ pH 6.5 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจะย้ายต่อลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MF_5 ที่ pH 7.0, 7.5 และ 8.0 ต่อไป ทุกขั้นตอนจะทำเช่นเดียวกัน คือแยกโซมาติกเอมบริโอส่วนหนึ่งมาเลี้ยงให้เกิดเป็นต้นพืช อีกส่วนหนึ่งย้ายลงเลี้ยงในอาหารที่มี pH ตามที่กำหนดไว้ เก็บข้อมูลโดยการชั่งน้ำหนักโซมาติกเอมบริโอก่อนนำมาเพาะเลี้ยงและภายหลังที่ได้เพาะเลี้ยงมาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ คำนวณหาอัตราการเจริญเติบโต โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นใน 1 สัปดาห์

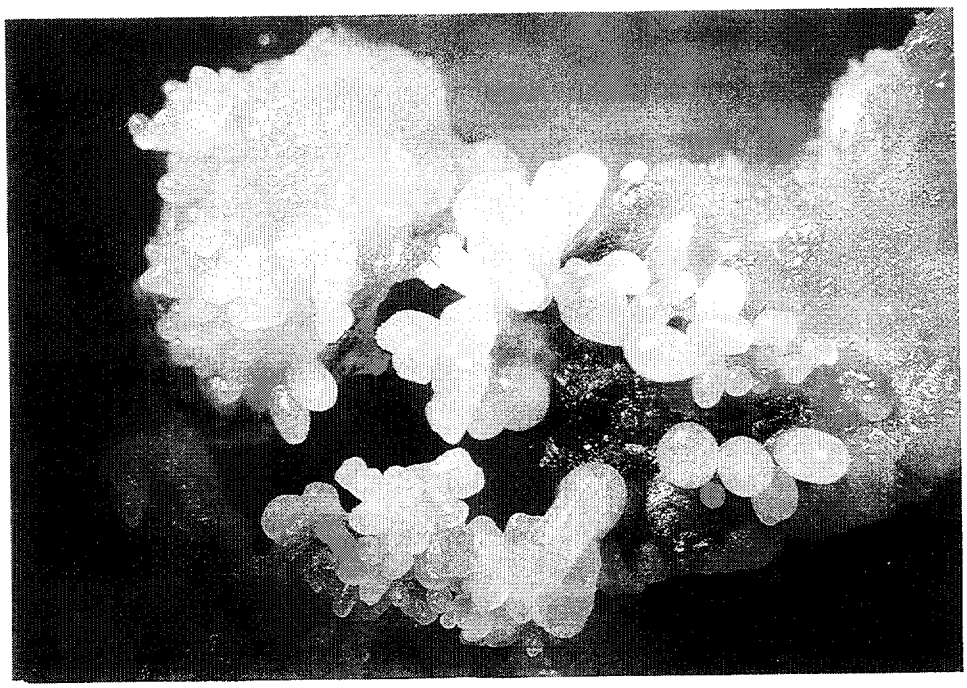
3. ผลการศึกษาวิจัยและบทวิจารณ์

1. การเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง จำนวน 14 พันธุ์

จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง จำนวน 14 พันธุ์ และตรวจสอบการเกิดโซมาติกเอมบริโอ และบันทึกระยะเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 1 จากผลการทดลองพบว่าพันธุ์ BSR 101 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอมบริโอสูงสุดเท่ากับ 17.78 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาในการเหนี่ยวนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอสั้นที่สุดเท่ากับ 20.5 วัน ส่วนพันธุ์ Century 84 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอมบริโอต่ำสุดเท่ากับ 1.50 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาในการเหนี่ยวนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอนานที่สุดเท่ากับ 35.5 วัน ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับที่มี รายงานไว้โดยนักวิจัยหลายท่านว่าความแตกต่างระหว่างจีโนไทพ์มีอิทธิพลต่อการเกิดโซมาติกเอมบริโอ (Barwale and Widholm, 1986; Komatsuda and Ohyama, 1988) พันธุ์ BSR 101 ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอมบริโอมากที่สุด รองลงมาคือพันธุ์ Gasoy 17 และเชียงใหม่ 60 ได้รับการคัดเลือกเพื่อนำไปใช้การฉายรังสีแกมมาต่อไป (รูปที่ 1)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์โซมาติกเอมบริโอเจเนซิสของใบเลี้ยงอ่อนถั่วเหลือง จำนวน 14 พันธุ์

พันธุ์	% โซมาติกเอมบริโอเจเนซิส	ระยะเวลาเหนี่ยวนำ (วัน)
SJ.4	4.25	28.5
Chiang Mai 60	10.50	25.0
Nakhon Sawan 1	1.75	34.5
KUSL 20004	12.01	21.5
Gasoy 17	10.65	25.0
BSR 101	17.78	20.5
Century 84	1.50	35.5
PI 437654	1.75	35.0
A11	1.80	32.5
A12	10.00	25.5
A13	1.80	34.0
A14	8.56	25.6
A15	1.85	34.5
A20	10.50	25.0



รูปที่ 1 โซมาติกเอมบริโอพัฒนาจากใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง

2. การฉายรังสีแกมมาถั่วเหลืองพันธุ์ BSR 101 เชียงใหม่ 60 และ Gasoy 17

การทดลองฉายรังสีแกมมาฝักอ่อนถั่วเหลืองพันธุ์ BSR 101 เชียงใหม่ 60 และ Gasoy 17 ในปริมาณต่าง ๆ กัน และนำใบเลี้ยงอ่อนไปเพาะเลี้ยงในอาหาร เพื่อชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ ผลการทดลองแสดงไว้ใน ตารางที่ 2 จากการทดลองพบว่าพันธุ์ BSR 101 และเชียงใหม่ 60 ที่ฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 1, 3 และ 5 Gy ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอมบริโอสูงกว่าพวกที่ไม่ได้ฉายรังสี ส่วนพันธุ์ Gasoy 17 การฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 1 และ 3 Gy ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอมบริโอสูงกว่าพวกที่ไม่ได้ฉายรังสี และยังใช้เวลาในการเหนี่ยวนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอน้อยกว่าพวกที่ไม่ได้ฉายรังสีในทุกพันธุ์ ส่วนการฉายรังสีแกมมาที่ 9 และ 11 Gy ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอมบริโอต่ำกว่าพวกที่ไม่ได้ฉายรังสีในทุกพันธุ์ การทดลองครั้งนี้ได้ผลสอดคล้องกับที่ได้เคยรายงานไว้แล้ว (สิรนุช และคณะ 2535) แสดงว่าปริมาณรังสีต่ำสามารถกระตุ้นให้เกิดการเจริญและพัฒนาของพืช ในขณะที่รังสีในปริมาณสูงให้ผลในทางตรงข้ามคือขัดขวางการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช ที่ปริมาณสูงมาก ๆ สามารถทำให้พืชตายได้

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์โซมาติกเอมบริโอเจเนซิสของใบเลี้ยงอ่อนถั่วเหลืองพันธุ์ BSR 101 เชียงใหม่ 60 และ Gasoy 17 เมื่อได้รับรังสีแกมมาปริมาณต่าง ๆ กัน

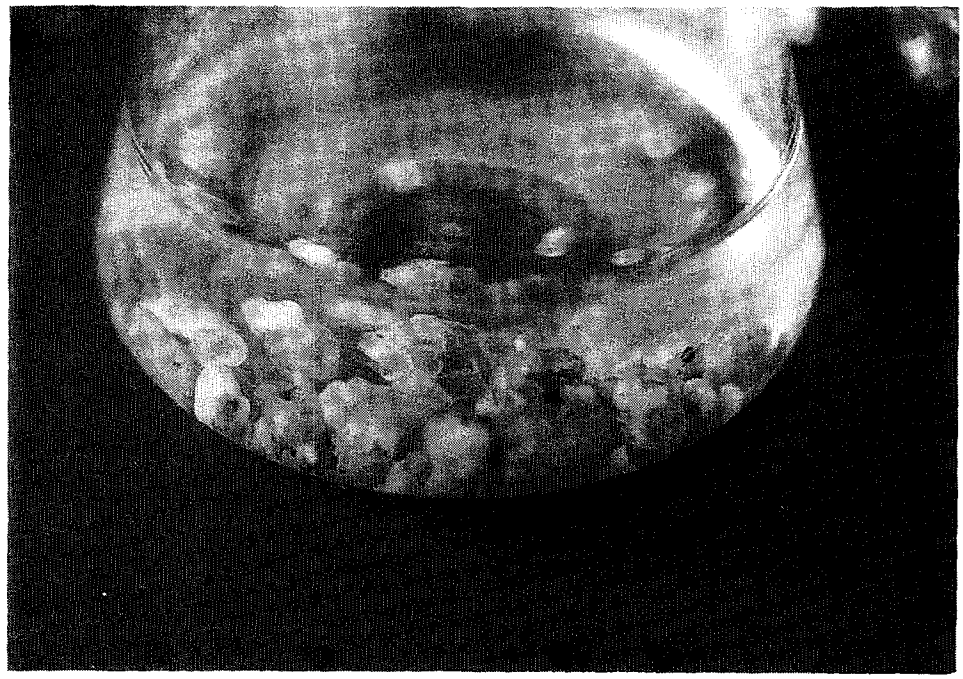
ปริมาณรังสี	% โซมาติกเอมบริโอเจเนซิส		
(Gy)	BSR 101	Chiang Mai 60	Gasoy 17
0	20.74	13.21	11.47
1	27.31	24.44	18.08
3	40.34	29.99	21.01
5	44.47	22.88	6.99
7	19.26	13.36	7.17
9	5.97	9.65	5.70
11	8.35	8.21	1.37

3. การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอมบริโอในอาหารเหลวที่ pH 5.8

ในการนำโซมาติกเอมบริโอของพันธุ์ BSR 101 Gasoy 17 และเชียงใหม่ 60 จากวิธีวิจัยที่ 2 มาเลี้ยงในอาหารสูตร MF_5 เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เพื่อตรวจสอบการเจริญเติบโตเปรียบเทียบระหว่างพวกฉายรังสีและไม่ฉายรังสี ผลการทดลองแสดงไว้ใน ตารางที่ 3 การทดลองพบว่าโซมาติกเอมบริโอของพวกที่ไม่ผ่านการฉายรังสีของถั่วเหลืองพันธุ์ BSR 101 Gasoy 17 และเชียงใหม่ 60 มีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มของน้ำหนักสดเป็น 76.3, 71.1 และ 110.6 ตามลำดับ ส่วนพวกที่ผ่านการฉายรังสีจะมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า โดยให้เปอร์เซ็นต์การเพิ่มของน้ำหนักสดเท่ากับ 81.2-97.6, 84.5-101.4 และ 124.4-160.6 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ารังสีในปริมาณต่ำสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างโซมาติกเอมบริโอในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงแล้ว เมื่อนำโซมาติกเอมบริโอมาเลี้ยงในอาหารเหลว ยังสามารถส่งผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของโซมาติกเอมบริโอได้อีกด้วย และรังสีในปริมาณสูง แม้จะไม่สามารถกระตุ้นการสร้างโซมาติกเอมบริโอในระยะแรก แต่เมื่อนำโซมาติกเอมบริโอที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ก็ยังสามารถส่งผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของโซมาติกเอมบริโอได้เช่นกัน โซมาติกเอมบริโอที่เลี้ยงในอาหารเหลวจะมีการเปลี่ยนโครงสร้างจากลักษณะรูปทรงกลม (globular) เป็นลักษณะรูปหัวใจ (heart shape) เป็นส่วนใหญ่ (รูปที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Li และคณะ (1985) ที่พบว่าโซมาติกเอมบริโอที่เลี้ยงในอาหารเหลว เซลล์จะพัฒนารูปร่างเป็นรูปทรงกลมและหัวใจปนกันอยู่

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเพิ่มน้ำหนักสดโซมาติกเอมบริโอของถั่วเหลืองพันธุ์ BSR 101 Gasoy 17 และเชียงใหม่ 60 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MF_5 เป็นเวลา 5 สัปดาห์

ปริมาณรังสี	% การเพิ่มน้ำหนักสด		
(Gy)	BSR 101	Gasoy 17	Chiang Mai 60
0	76.3	71.1	110.6
1	82.9	98.6	160.6
3	83.2	86.9	141.2
5	81.2	87.3	129.4
7	90.1	101.4	130.9
9	86.5	94.8	124.4
11	97.6	84.5	135.9



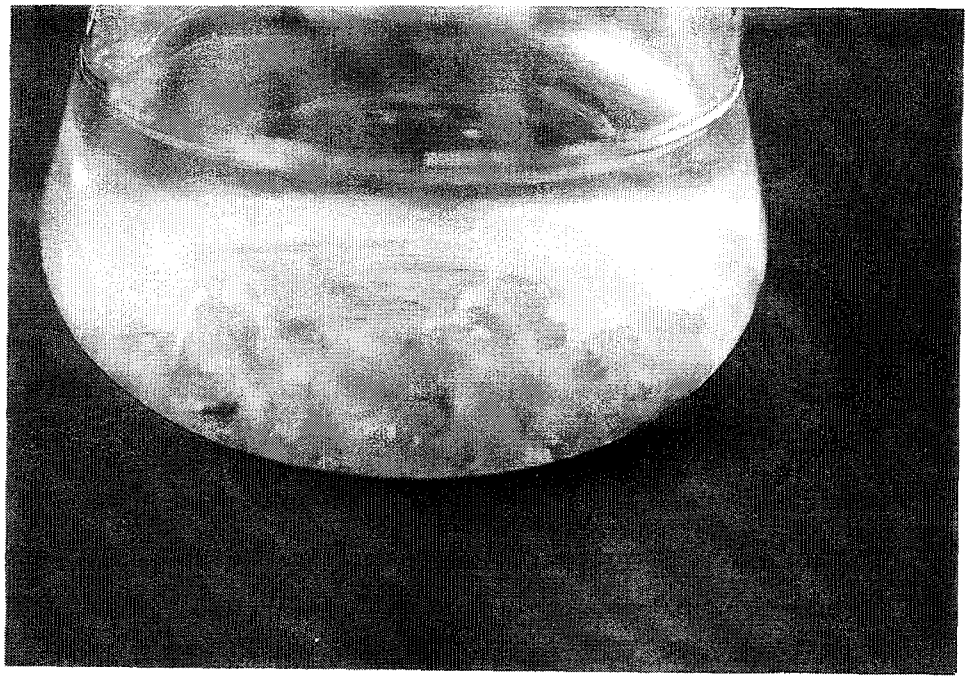
รูปที่ 2 โซมาติกเอมบริโอในอาหารเหลวสูตร MF_5 (pH 5.8)

4. การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอมบริโอในอาหารเหลวที่มีปริมาณอลูมินัมระดับต่าง ๆ กัน

โซมาติกเอมบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวตามวิธีวิจัยที่ 3 นำมาเลี้ยงต่อในอาหารเพื่อการคัดเลือกที่มีปริมาณอลูมินัมในระดับต่าง ๆ กัน ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 4 จากการทดลองพบว่า เปอร์เซ็นต์การเพิ่มของน้ำหนักสดของถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ ลดลงเมื่อปริมาณอลูมินัมเพิ่มมากขึ้นในทุกระดับของอัตรารังสี และในพันธุ์ Gasoy 17 เปอร์เซ็นต์การเพิ่มของน้ำหนักสดจากโซมาติกเอมบริโอที่ไม่ได้รับการฉายรังสีและฉายรังสีที่ 1 และ 3 Gy มีอัตราใกล้เคียงกัน แต่ในพันธุ์เชียงใหม่ 60 การเพิ่มของน้ำหนักสดจากโซมาติกเอมบริโอที่ไม่ได้รับการฉายรังสีและฉายรังสี 1 และ 3 Gy มีอัตราแตกต่างกัน โดยที่ปริมาณอลูมินัม 5.6 ppm. โซมาติกเอมบริโอที่ไม่ได้รับการฉายรังสีมีการเพิ่มของน้ำหนักสด 10.1 เปอร์เซ็นต์ แต่โซมาติกเอมบริโอที่ได้รับการฉายรังสีที่ 1 และ 3 Gy มีการเพิ่มของน้ำหนักสดสูงขึ้น 20.2 และ 44.5 เปอร์เซ็นต์ และที่ปริมาณอลูมินัม 11..2 และ 16.8 ppm การแสดงผลก็คล้ายคลึงกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ารังสีอาจจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและพันธุกรรมของพันธุ์เชียงใหม่ 60 ทำให้โซมาติกเอมบริโอมีความทนทานต่ออลูมินัมและมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า โซมาติกเอมบริโอได้เปลี่ยนแปลงรูปร่างจากลักษณะรูปหัวใจกลายเป็นลักษณะก้อนค่อนข้างกลม ลักษณะผิวค่อนข้างหยาบ เปลี่ยนสีจากสีเขียวอ่อนเป็นสีเหลือง และน้ำตาล ตามลำดับ (รูปที่ 3)

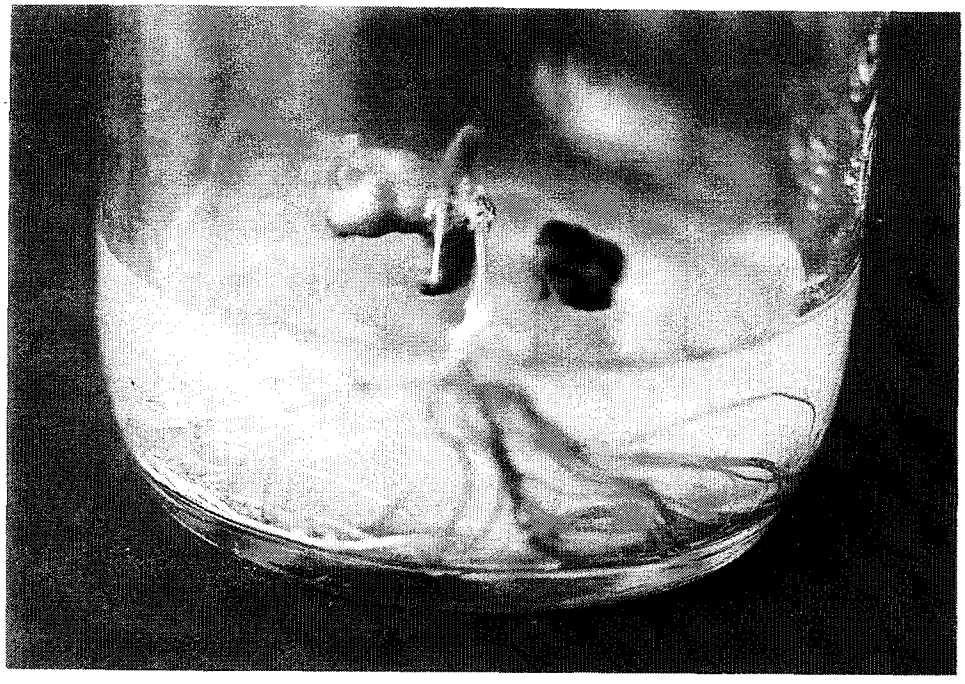
ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเพิ่มน้ำหนักสดโซมาติกเอมบริโอของถั่วเหลืองพันธุ์ Gasoy 17 และเชียงใหม่ 60 เมื่อเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่มีอลูมินัมระดับต่าง ๆ กัน

ปริมาณอลูมินัม (ppm)	ปริมาณรังสี (Gy)					
	0		1		3	
	Gasoy 17	CM 60	Gasoy 17	CM 60	Gasoy 17	CM 60
5.6	15.5	10.1	15.0	20.2	16.7	44.5
11.2	12.2	3.2	14.5	12.8	15.0	10.2
16.8	-2.5	1.4	-2.8	3.0	0.1	3.5



รูปที่ 3 โซมาติกเอมบริโอในอาหารคัดเลือกที่มีอลูมินัม

จากการนำโซมาติกเอมบริโอที่ผ่านการคัดเลือกในอาหารที่มีอลูมินัมระดับต่าง ๆ กันมาเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นพืช พบว่าไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ มีเพียงรากเกิดขึ้นแต่ไม่มีส่วนของลำต้น (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 โซมาติกเอมบริโอที่ผ่านการคัดเลือกในอาหารคัดเลือกที่มีอลูมินัม พัฒนาไปเป็นต้นไม่สมบูรณ์เกิดเฉพาะราก

5. การเพาะเลี้ยงโซมาติกเอมบริโอในอาหารเหลวที่ pH ต่าง ๆ กัน

โซมาติกเอมบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวตามวิธีวิจัยที่ 3 ได้นำมาเลี้ยงต่อในอาหารเพื่อการคัดเลือกที่ปรับ pH ให้เพิ่มขึ้นเป็น 6-8 ผลการทดลองแสดงไว้ใน ตารางที่ 5 จากการทดลองพบว่า เปอร์เซ็นต์การเพิ่มของน้ำหนักสดในแต่ละระดับ pH แตกต่างกันออกไป ที่ pH 6.5 และ pH 7.5 มีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มของน้ำหนักสดสูงกว่าที่ pH อื่น ๆ แสดงว่าโซมาติกเอมบริโอมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าการเพาะเลี้ยงที่ pH อื่น ๆ ทั้งในกลุ่มที่ฉายรังสีและไม่ได้ฉายรังสี ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการย้ายโซมาติกเอมบริโอจาก pH 5.8 ลงมาเลี้ยงในอาหารที่มี pH 6.0 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โซมาติกเอมบริโอจะค่อย ๆ ปรับตัว เมื่อย้ายลงเลี้ยงต่อในอาหารที่มี pH 6.5 จะทำให้การปรับตัวได้ดีขึ้น จึงมีอัตราการเจริญเติบโตดี แต่ที่ระดับ pH 7.0 อัตราการเจริญเติบโตของโซมาติกเอมบริโอเริ่มลดลงกว่าเดิม อาจเนื่องจากที่ pH 7.0 นี้ โซมาติกเอมบริโอจะไม่มีธาตุเหล็กใช้โดยสมบูรณ์ เนื่องจากการตกตะกอนของธาตุเหล็กทำให้ธาตุเหล็กไม่สามารถถูกนำไปใช้ได้ (ยงยุทธ 2524) เมื่อย้ายลงเลี้ยงใน pH 7.5 โซมาติกเอมบริโอมีการปรับตัวใหม่ ทำให้อัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้นอีกครั้งหนึ่ง เมื่อนำกลับไปเลี้ยงใน pH 8.0 อัตราการเจริญเติบโตของโซมาติกเอมบริโอลดลง โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเพิ่มของน้ำหนักสดต่ำลง โซมาติกเอมบริโอได้เปลี่ยนแปลงรูปร่างจากลักษณะรูปหัวใจกลายเป็นลักษณะก้อนค่อนข้างกลม ลักษณะผิวค่อนข้างหยาบ เปลี่ยนสีจากสีเขียวอ่อนเป็นสีเหลือง และสีน้ำตาล ตามลำดับ (รูปที่ 5) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ pH 8.0 ต่อไปอีกระยะหนึ่ง พบว่าโซมาติกเอมบริโอหยุดการเจริญเติบโต

และตายไปในที่สุด จากผลการทดลองนี้แสดงว่าจะต้องมีการปรับปรุงเทคนิคการคัดเลือกโซมาติกเอมบริโอที่ทนต่อสภาพดินเป็นด่าง วิธีหนึ่งซึ่งจะต้องนำไปใช้ในการคัดเลือกครั้งต่อไป คือการเพิ่มช่วงเวลาของการคัดเลือกในแต่ระดับ pH จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการปรับ pH ตามต้องการเพียง 1 สัปดาห์ จะต้องเพิ่มเป็น 2 สัปดาห์ เพื่อให้การปรับตัวของโซมาติกเอมบริโอในแต่ละสภาพ pH เป็นไปอย่างสมบูรณ์ จะทำให้ได้ผลการทดลองที่แม่นยำมากขึ้น

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การเพิ่มน้ำหนักสดโซมาติกเอมบริโอของถั่วเหลืองพันธุ์ BSR 101 เมื่อเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่มี pH ระดับต่าง ๆ กัน

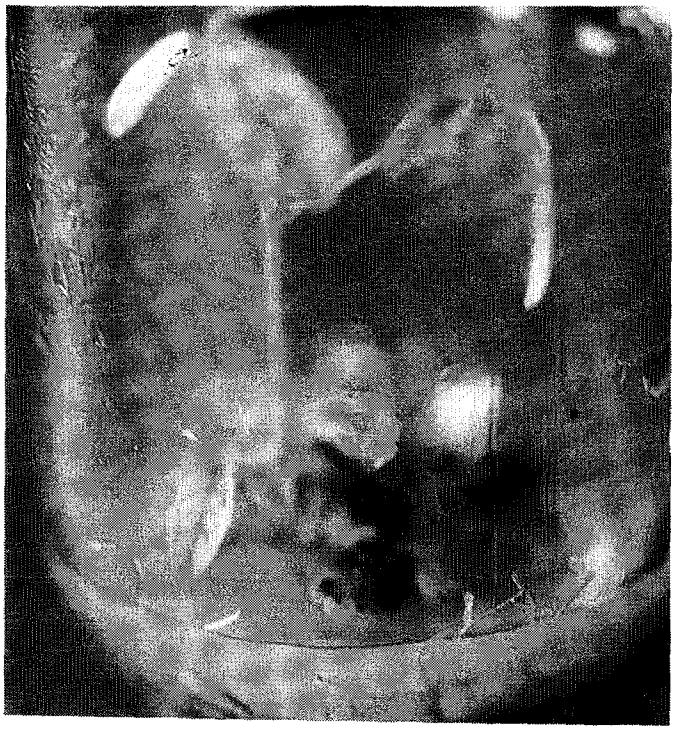
ปริมาณรังสี	pH					ค่าเฉลี่ย
(Gy)	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	
0	9.25	20.26	12.99	15.16	6.57	12.85
1	3.76	31.59	10.76	13.41	5.41	12.98
3	8.62	19.69	14.40	13.58	7.88	12.83
5	11.28	16.88	6.18	18.35	6.90	11.92
7	12.30	17.81	10.86	10.80	9.74	12.30
9	13.45	18.62	7.33	14.38	10.12	12.78
11	5.81	28.51	7.32	15.56	7.96	12.43

รูปที่ 5 โซมาติกเอมบริโอในอาหารคัดเลือก (pH 8)

จากการนำโซมาติกเอมบริโอที่ผ่านการคัดเลือกใน pH ต่าง ๆ มาเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นพืช พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชได้ แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นพืชต่ำมาก ดังตารางที่ 6 ต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีจำนวนน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอมบริโอในอาหารเหลวเป็นเวลานานติดต่อกันหลายสัปดาห์ ทำให้สูญเสียคุณสมบัติในการพัฒนาเป็นต้นพืชได้ และนอกจากนี้การเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีการปรับ pH ให้สูงกว่าสภาพตามปกติที่เพาะเลี้ยง ทำให้โซมาติกเอมบริโอไม่แข็งแรง เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นพืช จึงได้จำนวนต้นพืชน้อยลง ต้นถั่วเหลืองที่ได้จากการวิจัยได้นำออกปลูกในกระถางเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ เพื่อติดตามศึกษาและคัดเลือกหาลักษณะทนทานต่อสภาพดินด่างในรุ่นลูกหลานต่อไป (รูปที่ 6)

ตารางที่ 6 จำนวนต้นอ่อนที่พัฒนาจากโซมาติกเอมบริโอที่ผ่านการคัดเลือกในอาหารคัดเลือกที่มี pH ระดับต่าง ๆ กันของถั่วเหลืองพันธุ์ BSR 101

ปริมาณรังสี (Gy)	pH	จำนวนต้นอ่อน	Plant regeneration* (%)
0	6.0	3	6.0
5	6.0	1	2.0
3	7.0	1	1.0
7	7.5	1	0.5
5	8.0	2	1.0



รูปที่ 6 ต้นอ่อนที่พัฒนาจากโซมาติกเอมบริโอที่ผ่านการคัดเลือกในอาหารคัดเลือก (pH 8)

4. สรุปผล

จากการเพาะเลี้ยงถั่วเหลือง จำนวน 14 พันธุ์ ในอาหารที่ชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ พบว่าถั่วเหลืองพันธุ์ BSR 101 มีความสามารถในการเกิดโซมาติกเอมบริโอได้ดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ เมื่อนำพันธุ์ BSR 101 เชียงใหม่ 60 และ Gasoy 17 ไปฉายรังสีแกมมาพบว่าพันธุ์ BSR 101 และเชียงใหม่ 60 ที่ได้รับรังสีในปริมาณต่ำที่ระดับ 1-5 Gy ส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอมบริโอได้ ส่วนพันธุ์ Gasoy 17 ที่ได้รับรังสีในปริมาณต่ำที่ระดับ 1-3 Gy รังสีสามารถส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอมบริโอได้เช่นกัน และเมื่อนำโซมาติกเอมบริโอของพันธุ์ Gasoy 17 และเชียงใหม่ 60 ไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีปริมาณอลูมินัมระดับต่าง ๆ กัน พบว่าอลูมินัมมีผลต่อการเจริญเติบโตของโซมาติกเอมบริโอ โดยเมื่อปริมาณอลูมินัมเพิ่มขึ้น การเจริญเติบโตของโซมาติกเอมบริโอจะลดลง และจากการนำโซมาติกเอมบริโอที่ผ่านการคัดเลือกไปเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดต้นถั่วเหลือง พบว่ายังไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ และเมื่อนำโซมาติกเอมบริโอของพันธุ์ BSR 101 ไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่ pH ต่าง ๆ กัน พบว่า pH มีผลต่อการเจริญเติบโตของโซมาติกเอมบริโอ ซึ่งการเจริญเติบโตลดต่ำสุดที่ pH 8 และจากการนำโซมาติกเอมบริโอที่ผ่านการคัดเลือกไปเพาะเลี้ยง เพื่อให้เกิดเป็นต้นถั่วเหลือง พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นพืชต่ำมากทั้งในพวกที่ฉายรังสีและไม่ฉายรังสี

5. เอกสารอ้างอิง

1. ฉันทนา คงนคร. 2537. ความแปรปรวนของถั่วเหลืองพันธุ์ไทยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอเจนิกแคลลัสในสภาพแขวนลอย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
2. ยงยุทธ โอสถสภา. 2524. เอกสารคำสอนวิชาปุ๋ย. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 315 น.
3. สิรนุช ลามศรีจันทร์, อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์ และ สุมินทร์ สมุทคุปต์. 2535. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองในสภาพแขวนลอย. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 26: 151-157.
4. สิรนุช ลามศรีจันทร์, อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์ และ สุมินทร์ สมุทคุปต์. 2535. ผลของรังสีต่อการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง, น. 645-651. *ใน* รายงานการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 30 สาขาพืช. 29 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2535 จัดโดย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ร่วมกับกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการพลังงาน. 645-651.
5. สิรนุช ลามศรีจันทร์, พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, กุลวดี ชัยประสิทธิ์, ฉันทนา คงนคร, พีรนุช การีรส และ ศศิธร เชื้อกุณะ. 2536. ความก้าวหน้าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองในประเทศไทย. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 27: 453-462.

6. Barwale, U.B.; H.R. Kerns and J.M. Widholm. 1986. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. Planta 167: 473-481.

7. Chen, Y. and P. Barak. 1982. Iron nutrition of plants in calcareous soil. Adv. Agron. 35: 217-241.

8. Finer, J.J. and A. Nagasawa. 1988. Development of embryonic suspension culture of soybean (*Glycine max*, Merrill). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 15: 125-136.

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

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