บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยหลักของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ แบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นจากส่วนต่างๆ ของถั่วเหลือง และศึกษาหาสภาวะในการแยก และชักนำให้กลับคืนเป็นเซลล์ปรกติของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงของถั่วเหลือง

การชักนำให้เกิดต้นจากส่วนต่างๆ ของถั่วเหลือง

การชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์ หรือเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงเป็นขั้นตอนสำคัญของการใช้วิธี somatic hybridization ในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น การสร้างพันธุ์พืชใหม่ๆ โดยผ่านทาง somaclonal variation หรือการใช้วิธีการทาง genetic engineering ถึงแม้ว่ามีงานวิจัยและรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่าเซลล์เพาะเลี้ยงของพืชสามารถจะหวลกลับเป็นต้นใหม่ได้จากเซลล์ๆ เดี่ยวในพืชหลายๆ species แต่สำหรับถั่วเหลืองแล้วยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก

ถั่วเหลืองได้ชื่อว่าเป็นพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและบังคับให้เกิดต้นใหม่ได้ยากที่สุดพืชหนึ่ง จึงมีนักวิทยาศาสตร์จำนวนมาก พยายามศึกษาวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองจนหลายรายสามารถทำประสบความสำเร็จ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาและวิจัยซ้ำเพื่อให้เกิดผลเช่นเดียวกันจะมีปัญหาตลอดเวลา แต่อย่างไรก็ตามพอจะสรุปได้ว่ามีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้ได้แก่

1. ชนิดและความเข้มข้นของสารเร่งการเจริญเติบโต ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น

NAA และ 2,4-D (Barwale et al; 1986, Lazzeri et al; 1987, Li et al;1985, Lippmann and Lippmann; 1984)

2. พันธุกรรม (Komasuda and Ohyama, 1988)

3. ธาตุอาหาร ปัจจัยทางกายภาพและเคมี (Lazzeri et al 1987)

4. ลักษณะการวางชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อบนอาหารเพาะเลี้ยง (Hartweck et al 1988)

จนถึงปัจจุบันมีรายงานจำนวนมากในต่างประเทศ แสดงถึงความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลือง และการชักนำให้เกิดต้น โดยผ่านแคลลัสทั้งทางออร์แกโนเจเนซิส และเอมบริโอเจเนซิส ตลอดจนในประเทศก็เริ่มที่จะมีรายงานวิจัย เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองบ้างแล้ว (สมศักดิ์ 2531, ทศพล 2533) แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก

มีเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆของถั่วเหลืองที่มีรายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดต้น ได้หลายส่วนเช่น ใบ ใบเลี้ยง ใบเลี้ยงวัยอ่อน คัพภะวัยอ่อน ไฮโปคอทิลและส่วนข้อใบเลี้ยง แต่ที่นิยมใช้และประสบความสำเร็จมากที่สุดคือส่วนคัพภะวัยอ่อนและใบเลี้ยงวัยอ่อน แต่เนื่องจากว่าส่วนคัพภะวัยอ่อน และใบเลี้ยงวัยอ่อนนั้นเป็นส่วนที่หาได้ยากและต้องใช้เวลานานในการเพาะเลี้ยงเพื่อที่จะให้ได้มาซึ่งคัพภะวัยอ่อน และใบเลี้ยงวัยอ่อน การทดลองนี้จึงเปลี่ยนมาใช้ส่วนใบและไฮโปคอทิล ในการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้น แม้ว่าอวัยวะทั้ง 2 ส่วนจะมีศักยภาพในการทำให้เกิดต้นน้อยกว่าส่วนคัพภะวัยอ่อน และใบเลี้ยงวัยอ่อน แต่ก็มีรายงานวิจัยอยู่บ้างที่สามารถชักนำให้เกิดต้นจากส่วนใบ และไฮโปคอทิลได้ (Wright et al 1987 และ Freytag et al 1989)

จากการวิจัยทางด้านด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลาย ๆ ชนิดที่ผ่านมาในอดีตพบว่าการชักนำให้เกิดต้นให้ประสบความสำเร็จนั้นส่วนใหญ่จะเนื่องมาจากอิทธิพลภายนอกโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators หรือ hormones) โดยจะเห็นได้จากการทำให้เซลล์พืช (somatic cell) สามารถกลับมาเป็นต้นใหม่ได้โดยตรงผ่านทางกระบวนการเอมบริโอเจเนซิส หรือโดยทางอ้อมผ่านทางกระบวนการออร์แกโนเจเนซิสก่อน งานวิจัยนี้จึงได้ทำการหาชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากส่วนใบ
และไฮโปคอทิล

จากผลการทดลองชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นจากส่วนใบคู่แรกนั้นได้ทำการเลือกอาหาร 6 สูตร ที่มีรายงานว่าสามารถทำให้เกิดเอมบริโอเจเนซิสหรือออร์แกโนเจเนซิสได้ โดยมีอาหารที่เสริมด้วยออกซินอยู่ 2 ชนิดคือ NAA และ 2,4-D ส่วนไซโตไคนินที่ใช้คือ BA และ kinetin จากการทดลองพบว่าในอาหารทุกสูตรสามารถที่จะชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีทุกสูตร แคลลัสอาจจะแยกเป็น2 กลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาคือ ชนิด compact และ friable โดยจะขึ้นกับชนิดของออกซินที่ใช้ NAA จะให้แคลลัสชนิด compact และ 2,4-D จะให้แคลลัสชนิด friable

เมื่อทำการย้ายแคลลัสทั้งหมดที่เกิดขึ้นในอาหารทุกสูตร มาทำการเลี้ยงเพื่อให้กลับคืนเป็นต้นใหม่ (regeneration) พบว่ามีอาหารเพียง 1 สูตร ที่สามารถทำให้เนื้อเยื่อใบของถั่วเหลืองคู่แรกนั้นสามารถเกิด regeneration ได้คือ สูตร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. ซึ่งเป็นอัตราส่วนของฮอร์โมนที่ใช้ในการชักนำให้เกิดออร์แกโนเจเนซิสได้สำเร็จในพวก wild

Glycine คือ G. canescens สายพันธุ์ P.I.440942 และ G. clandestina สายพันธุ์ P.I. 440948 (Myer et al 1989) ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในตระกูลใกล้เคียงกับถั่วเหลืองโดยจะให้เปอร์เซ็นต์การเกิด regeneration ประมาณ 3.3% สำหรับในอาหารสูตรอื่นที่เหลือ ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่มีรายงานว่า สามารถทำให้เกิดเอมบริโอเจเนซิสได้ ในงานวิจัยนี้พบว่าไม่สามารถทำให้เกิด regeneration ได้ทั้งนี้ อาจจะเป็นผลเนื่องจากว่า แต่ละสูตรที่นำมานั้นเป็นสูตรที่ใช้ในการชักนำให้เกิดเอมบริโอเจเนซิส ในคัพภะวัยอ่อนและใบเลี้ยงวัยอ่อน (Lazzeri 1988, Hartweck et al 1988 และ Li et al 1985) อาจจะเนื่องจากว่าส่วนคัพภะวัยอ่อนและใบเลี้ยงวัยอ่อนนั้น เป็นส่วนที่จะมีการเจริญต่อไปเป็นต้น มีอาหารและฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ ที่มีความสามารถที่จะควบคุมการเปลี่ยนแปลงให้เปลี่ยนจากเซลล์ชนิดหนึ่งกลับไปเป็นเซลล์ที่สามารถพัฒนาให้เกิด regenerationได้ในขณะที่ใบอ่อนคู่แรกนั้นเป็นเซลล์ที่ถูกพัฒนาให้เป็นเซลล์ที่อยู่ในขั้นตอนสุดท้ายแล้วจึงจำเป็นต้องหาชนิดและอัตราส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมให้แคลลัสที่เกิดจากส่วนนี้ เกิด redifferentiate ใหม่สามารถที่จะพัฒนาให้เกิด regeneration เป็นอวัยวะใหม่ได้

อย่างไรก็ตาม การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสของเนื้อเยื่อใบคู่แรกนั้นประสบความสำเร็จในพืชหลายๆชนิดเช่น จากการทดลองของ Ferreira และ Handro (1987) ได้ทำการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบอ่อนของ Stevia rebaudiana โดยใช้อาหารสูตร LSN เสริมด้วย BA 2 มก./ล. เมื่อ BA 2 มก./ล. และ NAA 2.0 มก./ล. พบว่าสามารถทำให้เกิดต้นได้สูงถึง 50 ยอดต่อแคลลัสซึ่งนับว่าเป็นปริมาณที่สูงมาก นอกจากนั้นแล้วยังมีพืชอีกหลายๆ species ที่มีรายงานว่าสามารถทำให้เกิดเกิด ออร์แกนโนเจเนซิสโดยผ่านช่วงที่เป็นแคลลัสก่อน โดยการใช้อาหารชักนำให้เกิดแคลลัส จากนั้นจึงชักนำให้เกิด ออร์แกโนเจ

เนซิสแล้วชักนำให้กลับเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้เช่น Anthurium andraeanum, Crussula argentea, Arabidopsis thaliana, Brassica oleracea, Allium sativumหรือในพืชตระกูลเดียวกับถั่วเหลือง เช่น Medicago sativa เป็นต้น (Tisserat 1985)

ในขณะเดียวกันในถั่วเหลืองก็ได้มีการทดลองชักนำให้เกิดต้นจากใบคู่แรก โดย Wright และคณะ (1987) ได้ใช้อาหาร CS23 เสริมด้วย adenine sulfate 40 มก./ล., L-glutamine 1 กรัม/ลิตร และ 2,4,5-T 0.1 มก./ล. ทำการเพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัส และต้น แล้วจึงย้ายลงอาหาร B5 เสริมด้วย BA 5 ไมโครโมลาร์ โดยใช้เวลาในการทดลอง 2 เดือนสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ โดยพบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดต้นคือ ขนาดของใบที่ใช้ในการทดลอง ภาชนะบรรจุ ชนิดของออกซิน พันธุ์ถั่วหลืองและผลของวิธีการต่างๆ ที่ทำให้ glutamine ปราศจากเชื้อ พบว่าสามารถให้ต้นถั่วเหลืองที่สมบูรณ์สามารถนำไปเพาะเลี้ยงต่อไปได้

จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้ เราจึงเลือกเนื้อเยื่อของใบคู่แรกเป็น explant และ จะใช้สูตรอาหาร B5 เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. เป็นการเริ่มต้นศึกษาการเกิดต้นจากแคลลัสของถั่วเหลืองโดยจะมีการปรับปรุงและศึกษาหาอัตราส่วนของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการกลับคืนเป็นต้นของถั่วเหลืองที่ใช้

จากการศึกษาลักษณะการเจริญและการเกิดต้นจากแคลลัสในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. พบว่าแคลลัสสามารถที่จะเจริญเติบโตได้ดีโดยจะเข้าสู่ log phase ภายในหนึ่งสัปดาห์และจะอยู่ในช่วงนี้

ประมาณ 6 สัปดาห์ก็จะเข้าสู่ stationary phase และ decline phase แคลลัสทั่วๆไป จะมีสีเขียวเข้มเป็นแคลลัสแบบ compact รูปแบบของการเกิด regeneration นั้นน่าจะเป็นแบบออร์แกโนเจเนซิส เพราะว่าเกิดเฉพาะอวัยวะใดอวัยวะหนึ่งในแคลลัส หรือถ้าเกิดทั้งใบและราก จะพบว่าใบจะเหลือง หลุดไปก่อน แต่ขณะเดียวกันรากสามารถจะเจริญต่อไปได้เรื่อยๆ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Myer และคณะ (1989) ได้ทำการใช้อาหารที่มีชนิดและอัตราส่วนของฮอร์โมนแบบการทดลองนี้พบว่า แคลลัสจะแสดงการเกิดออร์แกโนเจเนซิส โดยเกิด shoot regeneration แต่ Myer และคณะกล่าวว่า แคลลัสที่เกิดขึ้นเป็นแบบ friable ซึ่งอาจจะเป็นเพราะว่า พืชใน genus Glycine ที่ทดลองนั้นมี speciesแตกต่างกัน

จากการทดลองของ Gamborg และคณะ (1968) พบว่าการเพิ่มไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมและไนเตรตจะมีผลช่วยให้การเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงของถั่วเหลืองสูงขึ้น นอกจากนี้ Gamborg ยังรายงานว่า ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของแครอท (carrot) การเพิ่มปริมาณไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมและไนเตรต จะสามารถช่วยเพิ่มโอกาสการเกิดเอมบริโอเจเนซิสให้สูงขึ้นด้วย ในการทดลองนี้จึงได้ทำการเพิ่มแอมโมเนียมไนเตรตลงไป 1650 มก./ล. ในอาหาร เช่นเดียวกับการทดลองของ Myer และคณะ (1989) ซึ่งเป็นปริมาณที่เท่ากับในอาหาร MS ซึ่งเป็นสูตรที่สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์พืชที่นิยมใช้กันมากในหลายๆ พืชและเมื่อทำการทดลองพบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่เพิ่มแอมโมเนียมไนเตรตพบว่าให้เปอร์เซ็นต์สูงขึ้น โดยให้เปอร์เซ็นต์ regeneration ถึง 8.5 % แต่พบว่าลักษณะของส่วนต้นที่เกิดขึ้นก็ยังคงเหมือนเดิมคือ เกิดเฉพาะใบ หรือราก ซึ่งยังคงไม่สามารถทำให้เจริญเติบโตต่อไปได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปเป็นระยะเวลาหนึ่งแล้วจะตายเหมือนเดิม จึงจำเป็นต้องต้องปรับปรุงและหาอัตราส่วนที่หมาะ

สมของฮอร์โมนต่อไป

จากที่กล่าวมาแล้วปัจจัยที่ทำให้เกิดความสำเร็จในการชักนำให้เกิดต้น ปัจจัยที่สำคัญที่สุดคือ ชนิดและอัตราส่วนที่เหมาะสมของฮอร์โมน จึงได้ทำการทดลองแปรผันความเข้มข้นของ NAA 0.10, 0.15 ,และ 0.20 มก./ล. และ BA 1-4 มก./ล. รวม 12 สูตร โดยใช้อาหารสูตร B5 พบว่ามีอาหารเพียง 2 สูตรเท่านั้นที่ให้ต้นถั่วที่ค่อนข้างจะสมบูรณ์คือมีลำต้น ใบและราก คือสูตร B5 ที่เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. จะให้ต้นถั่วเหลืองที่ลักษณะโดยทั่วไปเหมือนในสภาพธรรมชาติมากที่สุด และในสูตร B5 ที่เสริมด้วย BA 2 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. จะให้แคลลัสที่มีใบและรากซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ งานทดลองของ Wright (1987)

ในขณะเดียวกันอาหารอีก 4 สูตรคือสูตร B5 ที่เสริมด้วย BA 3 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล.,BA 3 มก./ล. NAA 0.20 มก./ล., BA 4 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล. และ BA 4 มก./ล. NAA 0.20 มก./ล. จะให้แคลลัสที่มีเฉพาะราก ซึ่งสังเกตได้ว่าอาหารที่เสริมตั้งแต่ BA 3 มก./ล. ขึ้นไปจะเกิดออร์แกโนเจเนซิส โดยเกิดเฉพาะราก

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า อัตราส่วนของฮอร์โมน มีความสำคัญ ต่อการเกิดอวัยวะต่าง ๆ ของแคลลัส โดยที่แต่ละอัตราส่วนความเข้มข้นของ ฮอร์โมน 2 ชนิด จะควบคุมให้เกิดอวัยวะที่ต่างๆ กัน คือเกิดแคลลัส ใบ ลำต้น หรือราก

Kukreja และคณะ (1986) ได้ทำการทดลองหาอัตราส่วนของความเข้มข้นของฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน คือ IAA, IBA, NAA และในกลุ่มไซโตไคนิน

คือ kinetin, BA, zeatin ต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้น Duboisia myoporides R.Br. ซึ่งเป็นพืชในตระกูล Solanaceae โดยใช้เนื้อเยื่อส่วนใบการทดลองได้หาอัตราส่วนของฮอร์โมนเป็นคู่ๆ ในอาหารสูตร MS โดยใช้ออกซินความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 มก./ล. และไซโตไคนิน 0-5 มก./ล. พบว่าเนื้อเยื่อใบมีการตอบสนอง 4 แบบ คือ เกิดเฉพาะแคลลัส ลำต้น ราก และไม่เกิดอะไรเลยและในการทดลองที่ใช้ NAA 0.5 มก./ล. และ BA 3 มก./ล. จะเกิดลำต้น และ NAA 5 มก./ล. BA 0 มก./ล. และ NAA 10 มก./ล. BA 0 มก./ล. จะเกิดเฉพาะราก นอกนั้นอีก 24 สูตรจะให้เฉพาะแคลลัสเท่านั้น ผลการทดลองนี้จึงเป็นการยืนยันอิทธิพลของสัดส่วนฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินที่มีต่อการเพาะเลี้ยงและการเกิด cell differentiate ของเนื้อเยื่อพืชโดยอัตราส่วนความเข้มข้นของฮอร์โมนออกซิน และไซโตไคนิน จะมีผลและเป็นตัวควบคุม การแสดงออกของทางสัณฐานวิทยาของ เนื้อเยื่อพืชว่าจะให้เกิดเป็นอวัยวะแบบใด

จากงานทดลองของ Wright (1987) ซึ่งทำการปรับปรุงสูตรอาหาร B5 โดยเพิ่ม L-glutamine ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบคูแรกพบว่าที่ความเข้มข้นของ glutamine 20 มิลลิโมลาร์จะให้เปอร์เซ็นต์ regeneration สูงขึ้น 50% ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรควบคุมที่ไม่ใส่glutamineจะพบว่าการเกิด regeneration เพียง 13% นอกจากนั้นยังต้องใช้เวลาในการเกิด regeneration 12 สัปดาห์ในขณะที่ glutamine จะไปกระตุ้นการเกิด regeneration ให้เกิดขึ้นภายใน 4 สัปดาห์ ในการวิจัยนี้จึงใช้สูตรอาหาร CS23 นี้มาปรับปรุงใช้กับการ regenerate เซลล์ถั่วเหลืองโดยใช้ชนิดและอัตราฮอร์โมนส่วนที่ได้ทำการทดลองหาอัตราส่วน ความเข้มข้นของฮอร์โมนมาเสริมแล้วเปรียบเทียบผลกับการทดลองของ Wright โดยแบ่งเป็น 3 สูตรคือ

1. เสริมด้วย 2,4-D 0.5 มก./ล. ซึ่งเป็นสูตรของ Wright

2. เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. และ BA 1 มก./ล.

3. เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.

จากการทดลองพบว่า มีเพียง 2 สูตรเท่านั้นที่เกิด regeneration คือ สูตรของ Wright คือ CS23 ที่เสริมด้วย 2,4-D 0.5 มก./ล. และสูตร CS23 ที่เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิด regeneration 6% เท่ากัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกันแล้ว ต้นที่เกิดจากการใช้ NAA กับ BA จะดีกว่าต้นที่ใช้ 2,4-D อย่างเดียวเพราะว่า ลักษณะสัณฐานของต้นที่เกิดขึ้นมีลำต้นและใบที่สมบูรณ์ดี ขณะที่อาหารสูตร CS23 ที่เสริมด้วย 2,4-D นั้น การเกิด regeneration นั้นมีแคลลัสที่มีลำต้นเพียง 1 ต้น นอกนั้นจะเป็นการเกิดที่มีแต่ใบมีก้านสั้นมาก ไม่เหมาะที่จะนำไปชักนำให้เกิดราก ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Lazzeri และคณะในปี 1985 และ 1987 ซึ่งได้ทำการชักนำให้เกิดต้นจากส่วน คัพภะวัยอ่อน และใบเลี้ยงวัยอ่อนของถั่วเหลือง โดยใช้ NAA และ 2,4-D ชักนำให้เกิดต้น พบว่า 2,4-D สามารถชักนำให้เกิด regeneration ได้มากกว่า ใช้ NAA แต่ว่าเอมบริออยด์ หรือต้นที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะผิดปกติมากกว่า และการเจริญไปเป็นต้นต่อไปก็จะเกิดช้ากว่า

Raghavan (1986) รายงานว่าชนิดของออกซินจะมีความเฉพาะเจาะจงต่อการเกิด somatic embryogenesis จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบของต้น eggplant (Solanum melongena) โดยใช้ออกซินชนิด 2,4-D และ 2,4,5-T ในหลายๆ ความเข้มข้นชักนำให้เกิดแคลลัส แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอเจ-เนซิสนอกจากจะเติม NAA ลงไปแทน จึงเป็นที่นิยมกันทั่วไปว่า NAA น่าจะเหมาะสมกว่า 2,4-D ในการพัฒนาให้เกิด regeneration อย่างไรก็ตามยังมีพืชอีกหลายชนิดที่ 2,4-D สามารถชักนำให้เกิด rgeneration ได้ดี

จากการทดลองของ Fujii และ Shimizu (1990) ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดยอด (shoot formation) ของต้น Chrysanthemum coccineum จากส่วน achenes และ petals พบว่า 2,4-D จะให้ เปอร์เซ็นต์ regeneration มากกว่า และไม่พบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาระหว่างการใช้ 2,4-D กับ NAA แต่อย่างใด

นอกจากชิ้นส่วนอื่นของถั่วเหลืองที่ถูกนำมาเพาะเลี้ยงและชักนำให้เกิดต้นคือส่วนไฮโปคอทิลทางงานของ Freytag และคณะ (1989) ได้ทำการศึกษาการเกิด somaclonal variation ของถั่วเหลืองที่เกิดจากการชักนำให้เกิดต้นจากส่วนไฮโปคอทิลที่อยู่ต่ำกว่าส่วนข้อใบเลี้ยง 2 มม. โดยใช้อาหารสูตร RV-5 เสริมด้วย IBA 0.1 มก./ล. และ BA 0.4 มก./ล. สามารถทำให้เกิด regeneration ได้โดยจะได้เปอร์เซ็นต์ regeneration ที่ต่ำกว่า ข้อใบเลี้ยง 2,4 และ 6 มม.และส่วน อีพิคอทิล (อยู่เหนือข้อใบเลี้ยง) 2 มม. โดยใช้อาหาร 3 สูตรคือ

1. เสริมด้วย IAA 0.10 มก./ล. และ BA 0.4 มก./ล.
2. เสริมด้วย IAA 0.25 มก./ล. และ BA 0.4 มก./ล.
3. เสริมด้วย 0.15 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. (อัตราส่วนที่ใช้ในใบคู่แรก)

จากการทดลองพบว่าสามารถที่จะเกิดแคลลัสได้ทุกส่วน แต่จะมีเพียงส่วนเดียวที่เกิด regeneration ได้คือ ส่วนไฮโปคอทิลที่ต่ำกว่าข้อใบเลี้ยง 2 มม. เท่านั้นอาจจะเนื่องมาจากฮอร์โมนที่ตกค้างอยู่ในเนื้อเยื่อไฮโปคอทิล ตรงบริเวณนั้นมีมากกว่าตรงส่วนอื่นๆ ก็ได้

ลักษณะของต้นถั่วเหลืองที่ได้ทั้ง 3 สูตร จะคล้ายกันกล่าวคือ มีลำต้นและใบ แต่ไม่พบราก โดยอาหารสูตรที่ 2 จะให้เปอร์เซ็นต์ rgeneration สูงสุดคือ 11% รองลงมาคือ สูตรที่ 2 (5%) และสูตรที่ 3 (3%)

นอกจากนี้ Kameya (1981) ได้ทำการทดลองชักนำให้เกิดต้นจากส่วนไฮโปคอทิลของพืชในตระกูล Glycine 8 species คือ G. clandestina, G. falcata , G. tabacina , G. latifolia , G. tomentella, G. canescens, G. soja ,และ G. max พบว่ามี 2 species เท่านั้นคือ G. canescens และ G. tomentella ที่เกิด regeneration ได้ โดยได้ประมาณ 6 และ 5% ตามลำดับ แต่ในถั่วเหลือง (G. max) นั้นไม่มีการเกิด regeneration

ผลการวิจัยของวิทยานิพนธ์นี้เมื่อเทียบกับการทดลองและรายงานของ Kameya และ Freytag แล้ว สูตรอาหารที่ 2 ที่เสริมด้วย IAA 0.25 มก./ล. และ BA 0.4 มก./ล. ให้เปอร์เซนต์การเกิด regeneration สูงกว่า จึงนำสูตรนี้มาแปรผัน ฮอร์โมน หาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยจะใช้ BA ตั้งแต่ 0.5-3 มก./ล. และ IAA ตั้งแต่0.1-0.4 มก./ล. รวมเป็น 16 สูตร ผลการทดลองพบว่ามีอาหารเพียง 4 สูตรเท่านั้นที่สามารถเกิดregeneration ได้ โดยสูตรที่เสริมด้วย IAA 0.2 มก./ล. และ BA 0.5 มก./ล.จะให้เปอร์เซนต์ regeneration สูงสุดคือ 17% อีกครั้งหนึ่งที่แสดงให้เห็นชัดเจนว่าว่าก็เป็นไปตามทฤษฎีที่ว่าชนิดและอัตราส่วนความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อพืชในอาหารให้เปลี่ยนเป็นอวัยวะแบบใด

นอกจากนี้แล้วยังได้ทำการทดลองใช้ใบคู่แรกของถั่วเหลืองมาชักนำให้

เกิดต้นในสูตรอาหาร RV-5 โดยแปรผันความเข้มข้นของ BA ตั้งแต่ 0.5-3 มก./ล.และ NAA 0.10 -0.25 มก./ล. ผลการทดลองพบว่าพบว่าไม่มีสูตรอาหารซึ่งสามารถที่จะชักนำให้เกิด regeneration ของเนื้อเยื่อใบคู่แรกได้เลย ทั้งนี้ อาจจะเป็นผลเนื่องมาจากองค์ประกอบของอาหารสูตร RV-5 ไม่เหมาะสมกับการชักนำให้เกิดต้นจากส่วนเนื้อเยื่อใบคู่แรกของถั่วเหลืองก็เป็นได้

สำหรับรายงานวิจัยที่มีการชักนำให้เกิดรากจากส่วนของต้นที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าการชักนำให้เกิดรากนั้นมักจะใช้อัตราส่วนของออกซินสูงและไซโตไคนินต่ำ (Dixon 1985; Pierik 1987) ตลอดจนการทดลองในถั่วเหลืองไม่ว่าจะเป็น Freytag (1989) ซึ่งใช้สูตร B5เสริมด้วย IBA 5 มก./ล. ในการชักนำให้เกิดราก สมศักดิ์ (2531) พบว่าใช้ 2,4,5-T 0.01 มก./ล. ชักนำให้เกิดรากได้ 100% การทดลองนี้จึงได้นำยอดถั่วเหลืองที่ได้จากการชักนำให้เกิดขึ้นไม่ว่าจะเป็นส่วนเนื้อเยื่อใบคู่แรกและไฮโปคอทิลมาทดลองในอาหาร 2 สูตรคือ B5 เสริมด้วย IBA 5 มก./ล. และ B5 เสริมด้วย NAA 0.15 มก./ล และ BA 4 มก./ล. ซึ่งเป็นสูตรที่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดรากมากที่สุด จากการทดลองแปรผันชนิดและอัตราส่วนความเข้มข้นของฮอร์โมน เมื่อชักนำให้เกิดรากเปรียบเทียบกันพบว่า สูตรอาหารทั้ง 2 สูตร ไม่สามารถที่จะทำให้เกิดรากได้ แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นของออกซินเท่ากับรายงานของ Freytag(1989) เนื่องจากส่วนแผลตรงบริเวณโดนที่ตัดนั้นเจริญไปเป็นแคลลัสแทน และในที่สุดใบก้จะเน่าและตายภายในเวลาประมาณ 14 วัน

ในทำนองเดียวกัน เพื่อทำการทดลอง ใช้ต้นถั่วเหลืองที่มีทั้งลำต้นและรากสมบูรณ์ไปเลี้ยงใน vermiculite ที่ผสมอาหารชนิดเดิม ที่ชักนำให้เกิดต้น นำไปไว้ให้อยู่ในสภาพเดิมในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือที่อุณหภูมิ ก็ไม่สามารถทำให้

ต้นถั่วเหลืองเจริญเติบโตต่อไปได้แบบต่อเนื่อง

การที่ต้นถั่วเหลืองที่มีทั้ง ลำต้นและราก ไม่สามารถจะเจริญเติบโตได้ อาจจะมีสาเหตุมาจาก

1. ต้นพืชที่เลี้ยงในสภาพหลอดทดลองส่วน cuticle จะมีการพัฒนาหรือสร้างน้อยมาก เพราะเนื่องจากในสภาพหลอดทดลองมีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 90-100% จึงเกิดการเสียน้ำเมื่อถูกย้ายออกมา เนื่องจากว่าสภาพอากาศภายนอกจะมีความชื้นสัมพัทธ์น้อยกว่าพืชจึงเสียน้ำอย่างรวดเร็ว

2. รากที่เกิดขึ้นมานั้นไม่สามารถทำหน้าที่ได้ในสภาพนอกหลอดทดลอง หรือเกิดรากในแบบออร์แกโนเจเนซิส (Pierik 1987)

3. ต้นถั่วเหลืองที่ได้นั้น เกิด regeneration แบบออร์แกโนเจเนซิส คือ ลำต้นและรากไม่ได้มาจากเซลล์ฯ เดียวกัน หรืออาจจะเป็นเพราะว่าสภาพแวดล้อมในขณะที่ย้ายลง vermiculite ยังไม่เหมาะสมจึงไม่สามารถทำให้ต้นถั่วเหลืองเจริญต่อไปได้

การแยกและการเลี้ยงโปรโตพลาสต์

การค้นพบวิธีการแยกและการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ซึ่งเป็นความก้าวหน้าทางวิชาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เทคนิคการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ให้ประโยชน์ทั้งในด้านการคัดเลือกพันธุ์เพื่อให้ได้มาซึ่งลักษณะพิเศษที่ต้องการ เช่น ทนต่อดินที่เป็นกรดหรือเกลือสูง ทนต่อโรค หรือการนำเอาโปรโตพลาสต์จากพืช 2 พันธุ์มารวมกันให้เกิดเป็นพันธุ์ใหม่ ตลอดจนการขยายพันธุ์พืชจำนวนมากได้อย่างรวดเร็ว ฯลฯ

ปัจจัยทั่วไปที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ คือ

1. สภาพของพืชที่นำมาแจกโปรโตพลาสต์

2. ชนิดและความเข้มข้นของสารรักษาแรงดันออสโมซิส เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีแรงดันออสโมซิสแตกต่างกัน

3. องค์ประกอบของสารต่างๆที่มีภายในเซลล์พืช

4. เทคนิคการแยกโปรโตพลาสต์

5. อุณหภูมิที่ใช้ในการแยก จะมีผลต่อเอนไซม์ที่ใช้พบว่าโดยทั่วไปมักจะอยู่ประมาณ 25 ^{o}C

6. ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ (ประสาทพร, 2528)

ชิ้นส่วนของพืชที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ของถั่วเหลืองกันมากที่สุดคือส่วนใบ Schwenk(1981)สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบโดยใช้เอนไซม์ pectolyase 0.1% cellulase 0.2% แมนนิทอล 8% pH 5.8 Wei และ Xu (1988) แยกโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงวัยอ่อน โดยใช้ cellulase 4% macerozyme 0.3% และ hemicellulase 2% โดยใช้แมนนิทอล 9% นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่นๆ อีกที่สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงวัยอ่อน และใบของถั่วเหลืองได้ (Dhir 1991, Gamborg et al 1983)

ในการวิจัยนี้ได้ทำการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงโดยแปรผันสภาวะต่างๆที่ใช้ cellulase และ macerozyme ของถั่วเหลืองพบว่าไม่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ได้ ได้ผลเป็นเซลล์เดี่ยวๆ เท่านั้น(รูปที่ 22) ส่วนในใบเลี้ยงซึ่งเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ก็ไม่สามารถที่จะย่อยได้สมบูรณ์เช่นกันแต่จะเห็นโปรโตพลาสต์ที่ถูกหุ้มด้วยผนังเซลล์ได้ชัดเจน (ดังรูปที่ 23) ไม่ว่าจะเพิ่มเวลาในการแยกหรือจะเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ก็ตาม

การที่ไม่สามารถจะแยกโปรโตพลาสต์จากใบและใบเลี้ยงได้อาจจะเนื่องจากว่าการเตรียมชิ้นส่วนของพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์ นั้นอาจจะขึ้นอยู่กับสภาพและช่วงอายุที่พืชเจริญอยู่ นอกจากนั้นใบถั่วเหลืองยังไม่สามารถที่จะลอกเอาส่วน epidermis ออกได้จึงต้องทำการหั่นใบให้ได้ขนาดเล็ก ๆ ในการทดลองนี้ใช้ใบถั่วเหลืองอายุประมาณ 15 วัน และ 45 วัน ในการทดลองแยก ซึ่งอาจจะเป็นช่วงเวลาที่ไม่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้เพียง Cellulase และ Maceroyme ของบริษัท Yakult เท่านั้นดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าแอคติวิตีของเอนไซม์อาจไม่สูงพอ หรืออาจเนื่องมาจากความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ที่มีต่อผนังเซลล์ของใบถั่วเหลือง อาจจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ชนิดอื่นเช่น pectolyase

เมื่อทำการแยกแยกโปรโตพลาสต์จากส่วนแคลลัสและเซลล์แขวนลอยเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นวัตถุประสงค์ของโครงการเพราะมีข้อดีคือ ตัดปัญหาเรื่องการปนเปื้อน (contamination) และพืชอยู่ในสภาพที่เลี้ยงอยู่ในอาหารซึ่งมีอายุและความสม่ำเสมอของโครงสร้างผนังเซลล์มากกว่า Myer (1989) ได้ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเซลล์แขวนลอยของพืชในตระกูล Glycine คือ G. canescens และ G.clandestina พบว่าสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ ข้อเสียของการแยกโปรโตพลาสต์ จากเซลล์เพาะเลี้ยงคือการเตรียมเซลล์จะใช้เวลานานและใช้ค่าใช้จ่ายสูง ในการเตรียมเซลล์ให้ได้จำนวนมาก ๆ

ในการเตรียมแคลลัสและเซลล์แขวนลอยที่เหมาะสมนั้น คุณลักษณะของเซลล์จะเป็นตัวกำหนดว่าจะใช้เป็นเซลล์ตั้งต้นแยกโปรโตพลาสต์ได้หรือไม่ดังจะเห็นได้จากการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสแบบ compact (ข้อ 3.6.1 รูปที่) พบว่าไม่สามารถที่จะแยกโปรโตพลาสต์ได้ แม้ว่าจะใช้เวลานานในการ

ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อเซลล์ที่จะใช้แยกโปรโตพลาสต์คือ ออกซิน ทั้งนี้เพราะสารชนิดนี้จะทำให้องค์ประกอบของเซลล์เปลี่ยนไปทำให้ง่ายต่อการสลายตัวโดยเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายองค์ประกอบของผนังเซลล์ (ประสาทพร, 2528) จากผลการทดลองพบว่า 2,4-D จะเป็นออกซินที่เหมาะสมในการเลี้ยง ในสภาวะของแคลลัสจะทำให้แคลลัสเกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ ฉ่ำน้ำ และในเซลล์แขวนลอยก็จะทำให้การกระจายตัวของเซลล์กระจายตัวได้ดี ไม่เกาะกลุ่มกันมากนัก สอดคล้องกับการทดลองของทศพล (2533)ที่ใช้ 2,4-D ในการเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลืองได้เช่นกัน

ผลการวิจัยที่ได้แยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสและเซลล์แขวนลอยที่สภาวะต่างๆกันเริ่มตั้งแต่ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกคือในแคลลัสนั้นใช้ความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์คือ 4:0.5% ส่วนในเซลล์แขวนลอยนั้นเป็น 3:0.5% จัดว่าเป็นการใช้ความเข้มข้นเซลลูเลสในการแยกค่อนข้างสูง โปรโตพลาสต์ที่แยกได้มีขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ 8-20 ไมครอน มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตอยู่ในช่วง 60-75% เมื่อเทียบกับรายงานของ Schwenk(1981)ซึ่งใช้เซลลูเลสเพียง 0.2% ส่วน Myer (1989)และ Chowhury (1985) ใช้เซลลูเลสเพียง 1%เท่านั้นทั้งนี้อาจจะเนื่องจากองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารที่ต่างกันจะมีผลให้ได้องค์ประกอบและโครงสร้างของผนังเซลล์แตกต่างกันออกไปได้

สำหรับความเข้มข้นของสารรักษาแรงดันออสโมซิสนั้นใช้แมนนิทอล ซึ่งในกรณีของแคลลัสถั่วเหลือง ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือช่วง 10-13% โดยความเข้มข้นของแมนนิทอล 11 และ 13% จะให้ปริมาณโปรโตพลาสต์สูงสุด ส่วนใน

เซลล์แขวนลอยความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะสมซึ่งคือ10% ซึ่งใกล้เคียงกับ Schwenk (1981) ใช้ 8% ในขณะที่ Myer (1989)ใช้สูงถึง 12.7% Xuและคณะ (1982) ใช้13% ในการแยกโปรโตพลาสต์แต่การทดลองต่อๆ ไปจะเลือกใช้ความเข้มข้นของแมนนิทอลเท่ากับ 10% เพราะว่าที่ 10% นี้ให้ปริมาณโปรโตพลาสต์ได้ใกล้เคียงกับปริมาณสูงสุดในการแยกของเซลล์แคลลัสและเซลล์แขวนลอย

เวลาที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสและเซลล์แขวนลอยคือ 2 ชั่วโมง โดยจะให้ปริมาณสูงสุด ซึ่งจะเร็วกว่า การแยกจากใบเลี้ยงวัยอ่อนซึ่งใช้เวลา 18 ชั่วโมง (Wei และ Xu1988) จากรากซึ่งใช้เวลา 16 ชั่วโมง (Xu และคณะ 1982) ช้ากว่าใบซึ่งใช้เวลา 1 ชั่วโมง (Schwenk 1981) และสอดคล้องกับการแยกในเซลล์แขวนลอยของ Chowhury และ Widholm (1985) และ Myers (1989) ซึ่งใช้เวลา 2 ชั่วโมง

สำหรับ pH ที่เหมาะสมในการแยกนั้นแคลลัสใช้ 5.6 และเซลล์แขวนลอยใช้ 5.2 การศึกษาผลของ pH ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ยังไม่เคยมีรายงานว่ามีการศึกษาผลของ pH ต่อการแยกโปรโตพลาสต์แต่ที่นิยมใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์นั้นพบว่าจะอยู่ที่ 5.8 (Dixon 1985) ในการแยกจากใบ, ใบเลี้ยงและ pH 5.5 ในการแยกจากเซลล์แขวนลอย 5.5-5.6 (Myer 1989 และ Chowhury และ Widholm 1985)

การทดลองเติมสารจำพวกเกลือบางชนิดเช่นลงไป $CaCl_2$ และ $MgSO_4$ ลงไปในสารละลายแยกโปรโตพลาสต์นั้นจะช่วยในการทำงานของเอนไซม์ส่วน

MES ที่ดีและนิยมาใช้นั้นจัดว่าเป็น buffer เพื่อรักษาสภาพของโปรโตพลาสต์หลังจากการแยก ในแคลลัสพบว่า $CaCl_2$ จะช่วยให้ได้บริมาณโปรโตพลาสต์ มากขึ้น ส่วนในเซลล์แขวนลอยไม่มีผลเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วน $MgSO_4$ และ MES ไม่ช่วยให้มีบริมาณโปรโตพลาสต์มากขึ้น

สำหรับอายุของเซลล์ที่ใช้ผลการทดลองแสดงว่าระยะที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์แยกคือ ช่วงอยู่ในระยะ log phase หรือ exponential phase โดยเหมือนกันทั้งในแคลลัสและเซลล์แขวนลอย โดยในแคลลัสจะอยู่ในช่วงสัปดาห์ที่ 3 ถึง 6 ส่วนในเซลล์แขวนลอยอยู่ในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ถึง 4 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของประสาทพร (2528) บุญชู (2528) และ Dixon(1985)เนื่องจากว่าเซลล์ในระยะนี้มีอัตราการแบ่งตัวค่อนข้างสูง การสร้างผนังเซลล์จะถูกสร้างบาง ๆ มีบริมาณเซลลูโลสน้อย

การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้สำเร็จนั้นปัจจัยที่สำคัญคือ

1. ความเข้มข้นของโปรโตพลาสต์ในอาหารพบว่าที่เหมาะสมคือ $5x10^4$ -10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2. ชนิดและองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยง

จากการทดลองเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ในอาหาร K8P ซึ่งเป็นอาหารที่มีรายงานว่าสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์ของถั่วเหลืองและพืชหลายชนิดสามารถเจริญกลับมาเป็นแคลลัสและต้นได้ โดยไม่ใช้ฮอร์โมนและแปรผันความเข้มข้นของแมนนิทอล เพื่อที่รักษาแรงดันออกสโมซิสของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ โดยใช้ความเข้มข้นของโปรโตพลาสต์ 10^5 เซลล์ต่อมล. แปรผันแมนนิทอล ตั้ง

แต่ 0-8% พบว่าในสูตร K8P ที่ไม่เพิ่มแมนนิทอลลงไปโปรโตพลาสต์ จะมีการแบ่งตัวเป็น 2 เซลล์ ไม่พบมีการแบ่งตัวต่อไปและพบการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์เพียง 3 สูตร คือ K8P ที่มี 0.2 และ 4% ของแมนนิทอล เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปก็ไม่สามารถจะแบ่งเซลล์เพิ่มได้ จึงทำการแปรผันสารตัวอื่นเพื่อกระตุ้นในการแบ่งเซลล์ ในการทดลองแปรผัน zeatin ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนิน เพราะพบว่าจากการทดลองเลี้ยงโปรโตพลาสต์ zeatin เป็นฮอร์โมนที่ช่วยในการเจริญของโปรโตพลาสต์ไม่ว่าจะเป็นถั่วเหลือง (Wei และ 1988) Glycine canescens และ G.clandestina (Myers 1989) การทดลองจึงทำการแปรผัน zeatin โดยใช้ความเข้มข้นของฮอร์โมน BA,2,4-D และ NAA ตามงานทดลองที่พบว่าประสบความสำเร็จ (Wei และ Xu 1988) และใช้ความเข้มข้นของ zeatin 0.5-8 มก./ล. โดยเพิ่มทีละเท่าตัว พบว่า ความเข้มข้นของ zeatin4 มก./ล. พบเซลล์ของโปรโตพลาสต์ ซึ่งดูเหมือนจะมีการแบ่งเซลล์แต่มีเพียงความเข้มข้นของ zeatin ที่ 1 และ 4 เท่านั้นที่โปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์แต่ไม่แบ่งเซลล์

จากการทดลองเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ผ่านมายังไม่ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของถั่วเหลืองในแบ่งตัวเพิ่มปริมาณ ได้ซึ่งแม้จะใช้อาหารตามที่มีรายงานว่าประสบความสำเร็จ รวมทั้งการแปรผันอัตราส่วนของฮอร์โมนความเข้มข้นของสารรักษาแรงดันออสโมซิสแล้วก็ตาม อาจจะเนื่องมาจากว่าความไม่เหมาะสมของอาหารหรือปริมาณของโปรโตพลาสต์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยังมีปริมาณไม่เหมาะสม จำเป็นต้องมีการปรับปรุงวิธีการต่อไปอีก

การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์

การทดลองนี้ก็เพื่อที่จะยืนยันว่าแคลลัสที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงนั้นสามารถที่

จะใช้กลับคืนเป็นต้นได้ จากการทดลองพบว่าแคลลัสเหล่านี้จะสามารถเปลี่ยนกลับมาเป็นแคลลัสที่มีลักษณะที่จะเกิด regeneration ได้ และพบว่าเมื่อแปรผันอาหาร พบว่า ที่ความเข้มข้นของ NAA 0.15 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. สามารถเกิดรากได้โดยเกิดประมาณ 10% แสดงว่ามีแนวโน้มที่จะสามารถจะชักนำให้เกิดกลับมาเป็นต้นใหม่ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อนำแคลลัสเหล่านี้ไปแยกด้วย เอนไซม์เซลลูเลส และมาเซอโรไซม์ จะพบเซลล์ที่มีลักษณะเหมือนท่อลำเลียงอยู่มากมาย (รูปที่ 52)

มีรายงานว่าแคลลัสที่ทำการเลี้ยงไปนาน ๆจะสูญเสียความสามารถที่จะกลับคืนมาเป็นต้น แม้ว่าพืชชนิดนั้นจะสามารถทำให้กลับคืนมาเป็นต้นได้ง่าย Wang และ Nguyen(1990) ได้ทำการทดลองชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอยของข้าวสาลี (wheat) ซึ่งเป็นพืชที่สามารถกลับคืนมาเป็นต้นได้ง่าย โดยใช้เซลล์แขวนลอยอายุ 2.5 ปี เปรียบเทียบกับ เซลล์แขวนลอยอายุ 2 เดือนพบว่า มีเพียง 3 พันธุ์จาก 12 พันธุ์เท่านั้นที่เกิดยอด (shoot) และเกิดเพียง 0.25-1% ซึ่งแคลลัสถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลองแยกโปรโตพลาสต์นี้มีอายุราว 12-15 เดือน จึงอาจเป็นไปได้ว่ามีการสูญเสียการกลับคืนเป็นต้นไปโดยจะเห็นว่าเกิดเฉพาะรากเท่านั้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการวิจัย

1. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อใบคู่แรกของถั่วเหลือง คือสูตร B5 เสริมด้วยแอมโมเนียไนเตรต 1650 มก./ล. และใช้ฮอร์โมน BA 1-3 มก./ล. และ NAA 0.10-0.20 มก./ล. โดยจะให้แคลลัสที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาสมบูรณ์และมีการเจริญเติบโตที่ดี
2. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นจากเนื้อเยื่อใบคู่แรกคือสูตร B5 เสริม ด้วย แอมโมเนียมไนเตรต 1650 มก./ล. BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. และ B5 เสริมด้วย แอมโมเนียมไนเตรต 1650 มก./ล. BA 2 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล.
3. ในการวิจัยพบว่าไฮโปโคทิลส่วนที่ต่ำกว่าข้อใบเลี้ยง 2 มม. เท่านั้นที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้
4. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากไฮโปคอทิลคือสูตร RV-5 เสริมด้วย NAA 0.1-0.4 มก./ล. และ BA 0.5-3 มก./ล.
5. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นจาก ไฮโปคอทิลคือสูตร RV-5 เสริมด้วย BA 0.5 มก./ล. และ IAA 0.2 มก./ล.
6. สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสคือ ใช้ความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 4: 0.5%,แมนนิทอล 11,และ 13%,pH 5.6 เสริมด้วย $CaCl_2$ 10 mM เวลาที่ เหมาะสมในการแยกคือ 2 ชั่วโมง และใช้เซลล์ที่อยู่ในช่วง log phase
7. สภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์จากเซลล์แขวนลอยคือ ใช้ความเข้มข้นของเซลลูเลสต่อมาเซโรไซม์ 3:0.5%, แมนนิทอล 11% ,pH 5.2 เวลาที่เหมาะสมคือ 2 ชั่วโมง และใช้เซลล์ที่อยู่ในช่วง log phase
8. การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ สามารถทำให้แบ่งเซลล์และสร้างผนังเซลล์ได้แต่ไม่

สามารถชักนำให้แบ่งเซลล์ต่อไปให้ได้มากกว่า 2 เซลล์

9. แคลลัสที่เลี้ยงไปในอายุ 12-15 เดือนนั้น สามารถเกิด regeneration ได้ แต่เกิดเฉพาะราก แต่พบเซลล์ท่อลำเลียงในเซลล์ของแคลลัส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย