บทที่ 1

บทนำ

ถั่วเหลือง (Glycine max L. Merr.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก และประเทศไทย เนื่องจากเมล็ดถั่วเหลืองมีคุณลักษณะเด่นสำคัญ 2 ประการ คือ มีทั้งน้ำมันและโปรตีนในปริมาณที่สูง โดยทั่วไปถั่วเหลืองจะมีปริมาณไขมันตั้งแต่ 24.3 ถึง 53.8% โดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 40.3% และมีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 8.2 ถึง 27% โดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 21.2% (Hilderbrand และคณะ 1986) ถั่วเหลืองจึงเป็นวัตถุดิบสำคัญสำหรับอุตสาหกรรมต่างๆ หลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมน้ำมันพืช อุตสาหกรรมอาหารสัตว์เป็นต้น นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังเป็นพืชที่ให้ความอุดมสมบูรณ์แก่ดิน เพราะสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศนำมาใช้ประโยชน์ได้ โดยทำงานร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย Rhizobium japonicum เมื่อส่วนต่างๆ ของต้นเน่าเปื่อยในดิน จะทำให้ดินมีปริมาณไนโตรเจน และอินทรีย์วัตถุเพิ่มขึ้น อันเป็นประโยชน์ต่อพืชที่จะปลูกต่อไป

จากผลผลิตถั่วเหลืองในระยะที่ผ่านมา และการคาดการณ์ผลผลิตในช่วงแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 6 พบว่าปริมาณถั่วเหลืองที่ผลิตได้ในประเทศนั้นยังไม่เพียงพอกับความต้องการ (ตารางที่ 1) ซึ่งอาจกล่าวโดยสรุปได้ว่าปริมาณถั่วเหลืองที่ผลิตได้ในประเทศ มีเพียงประมาณครึ่งหนึ่งของปริมาณความต้องการถั่วเหลืองทั้งประเทศ โดยเฉพาะกากถั่วเหลือง จะเห็นได้ว่าในแต่ละปีประเทศไทยเสียเงินตราต่างประเทศคิดเป็นมูลค่าไม่ต่ำกว่าหนึ่งพันล้านบาท สำหรับการนำเข้ากากถั่วเหลือง (เกียรติ เกษตร และคณะ 2531) กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ตารางที่ 1 ประมาณการณ์ผลผลิต ความต้องการและการใช้ประโยชน์ของถั่วเหลือง ในอุตสาหกรรมต่างๆในประเทศไทย

ปี	ผลผลิตถั่วเหลือง	ปริมาณใช้บริโภคและอุตสาหกรรมอาหาร	ปริมาณใช้สกัดน้ำมัน	ปริมาณกากถั่วเหลือง	ปริมาณกากถั่วเหลืองนำเข้า	ปริมาณความต้องการกากถั่วเหลืองในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์	ปริมาณความต้องการถั่วเหลืองทั้งประเทศ	ปริมาณถั่วเหลืองที่ยังไม่เพียงพอ
๒๕๒๐-๒๖	๑๑๖.๕๗	๒๘.๕๗-๔๘.๕๗	๖๘.๐๐-๘๘.๐๐	๖๒.๕๖	๑๒๖.๘๖	๑๘๙.๓๒	๒๕๕.๑๕	๑๓๘.๕๘
๒๕๒๗	๑๗๙.๑๐	๖๔.๑๐	๑๑๕.๐๐	๙๒.๐๐	๒๙๖.๒๕	๓๘๘.๒๔	๕๔๙.๔๐	๓๗๐.๓๐
๒๕๒๘	๒๔๖.๔๐	๙๗.๘๕	๑๔๘.๕๕	๑๑๕.๓๕	๑๕๕.๐๒	๒๗๐.๓๗	๔๔๓.๘๘	๑๙๗.๔๘
๒๕๒๙	๓๐๙.๔๐	๑๒๗.๗๕	๑๘๑.๖๕	๑๓๕.๔๐	๑๙๙.๙๔	๓๓๕.๒๔	๕๖๔.๑๐	๒๕๔.๗๐
๒๕๓๐*	๓๕๐.๓๐	๑๑๗.๘๐	๒๓๒.๕๐	๑๘๒.๕๐	๒๐๒.๕๐	๓๘๕.๐๐	๖๐๘.๒๖	๒๕๗.๙๖
๒๕๓๑*	๓๘๗.๐๐	๑๔๗.๐๐	๒๔๐.๐๐	๑๘๘.๔๐	๒๕๖.๖๐	๔๓๕.๐๐	๗๐๑.๑๔	๓๑๕.๑๔
๒๕๓๒*	๔๑๐.๐๐	๑๕๕.๘๐	๒๕๔.๒๐	๑๙๙.๕๕	๒๘๕.๔๕	๔๘๕.๐๐	๗๗๓.๖๓	๓๖๓.๖๓
๒๕๓๓*	๔๔๐.๐๐	๑๖๗.๒๐	๒๗๒.๘๐	๒๑๔.๑๕	๓๒๐.๘๕	๕๓๕.๐๐	๘๔๘.๗๓	๕๐๘.๗๓
๒๕๓๔*	๔๗๐.๐๐	๑๗๘.๖๐	๒๙๑.๔๐	๒๒๘.๗๕	๓๕๖.๒๕	๕๘๕.๐๐	๙๒๓.๘๒	๔๕๓.๘๒

ที่มา : ผลผลิตถั่วเหลืองจากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร
ปริมาณการใช้และปริมาณความต้องการถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากการคำนวณ
ปริมาณกากถั่วเหลืองนำเข้าจากกรมศุลกากร

หมายเหตุ • ประมาณการณ์
• หน่วย (พันตัน)

ได้แก้ปัญหานี้ โดยจัดทำโครงการเร่งรัดการเพิ่มผลผลิตถั่วเหลืองขึ้น ซึ่งใช้วิธีการขยายพื้นที่การเพาะปลูก และเพิ่มผลผลิตต่อไร่ให้สูงขึ้น

เป็นที่ทราบกันดีว่าการที่จะเพิ่มผลผลิตต่อไร่ให้สูงขึ้นได้นั้น ปัจจัยที่สำคัญคือการใช้เมล็ดพันธุ์ที่ดีมีคุณภาพในการเพาะปลูก เมล็ดพันธุ์ดีโดยทั่วไปหมายถึงเมล็ดพันธุ์ที่ให้ต้นพืชที่เจริญเติบโตได้ดี ผลผลิตต่อไร่สูง ต้านทานศัตรูพืชได้ดี ลักษณะทางพันธุกรรมที่จำเป็นต่อการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองได้แก่ ลักษณะความต้านทานการหักล้ม ขนาดเมล็ดโต ความต้านต่อโรค ปริมาณโปรตีน และน้ำมันสูง

การผสมเกสรแล้วคัดเลือกพันธุ์ เป็นวิธีการที่ใช้โดยในการปรับปรุงพันธุ์พืชทั่วๆไปรวมทั้งถั่วเหลืองด้วย ในปัจจุบันนี้ความก้าวหน้าทางด้านเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์พืช ได้นำไปสู่ทิศทางใหม่ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ทำให้สามารถทำการเพาะพันธุ์ และขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจสำคัญหลายชนิด ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ยกตัวอย่างเช่น พืชในตระกูล Gramineae เช่น ข้าว (Oryza sativa) ข้าวโพด (Zea mays) ในตระกูล Leguminosae เช่น Medicago sativa พืชในตระกูล Cruciferae เช่น Brassica olearacea และยังมีพืชอื่นๆอีกมาก ที่สามารถขยายพันธุ์ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืช (Tisserat 1985)

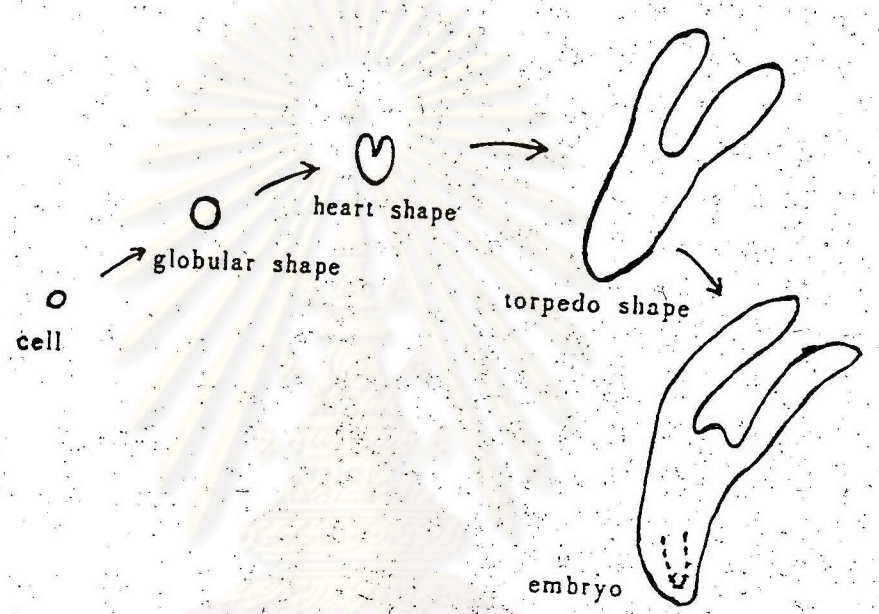
การที่เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถนำมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชก็เนื่องจากว่าพืชมีคุณสมบัติพิเศษที่เรียกว่า "Totipotency" คุณสมบัตินี้ก็คือเซลล์พืชมีความสามารถของเซลล์พืชที่จะมีการเจริญเติบโตเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านสรีระ เคมี กายวิภาค ตลอดจนมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพซึ่งสามารถมองเห็นได้ เช่น การเกิดยอด ราก และ

อื่นๆ ขบวนการต่าง ๆ ที่พืชเปลี่ยนแปลงจากเซลล์เพาะเลี้ยงแล้วพัฒนาเปลี่ยนแปลงกลับมาเป็นต้นที่ครบสมบูรณ์ได้เราเรียกว่า plant regeneration ซึ่งมีกระบวนการเกิดได้ 2 แบบคือ

1. ออร์แกนโนเจเนซิส (Organogenesis) คือการเกิดยอด ราก และ/หรืออวัยวะอื่นๆซึ่งเป็นผลมาจากการรวมตัวของเซลล์ที่อยู่ใกล้เคียงกัน และเจริญต่อไปเป็นจุดเริ่มต้นของยอดหรือราก (shoot or root primodia) การเกิดยอด ราก หรืออวัยวะอื่นๆ นี้จะเกิดเป็นอิสระไม่ขึ้นต่อกัน ปัจจัยสำคัญจะอยู่ที่เนื้อเยื่อหรือเซลล์เมื่อได้รับสิ่งกระตุ้นแล้วจะเจริญไปเป็นอะไร

2. เอมบริโอเจเนซิส (Embryogenesis) คือการเกิดยอด ราก และ/หรือ อวัยวะอื่นๆ โดยเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเหมือนการพัฒนาของไข่ กล่าวคือเซลล์จะแบ่งตัวและเจริญเป็น Proembryo, Globular-shaped embryo, Heart-shaped embryo,Torpedo-shaped embryo จนกระทั่งเป็นเอมบริโอ (embryo) ผลที่สุดจะเจริญไปเป็นยอดและรากพร้อมกัน โดยปลายข้างหนึ่งจะเจริญเป็นยอดและอีกข้างหนึ่งจะเป็นราก (ภาพที่ 1) (ไพบูลย์, 2524)

ข้อได้เปรียบของการขยายพันธุ์ ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์ในสภาพ in vitro ต่อการขยายพันธุ์แบบเดิมก็คือสามารถช่วยย่นระยะเวลาในการสร้างสายพันธุ์แท้ นอกจากนี้ยังมีโอกาสที่จะเกิด somaclonal variation ซึ่งมีผลทำให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ๆขึ้น อีกทั้งยังใช้เป็นเทคนิคในการส่งถ่ายยีน (gene) ซึ่งมีศักยภาพต่อการปรับปรุงคุณภาพของน้ำมัน และโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง ตลอดจนเพิ่มขีดความสามารถของพืชที่ได้ให้มีความต้านทานต่อแมลง ไวรัส และวัชชพืช (Batlery และคณะ 1989, Greenberg 1988, McCabe และคณะ 1988, Hinchee และคณะ 1988, Chang และ Wang 1989, Owen และ Smigocki 1988, Parrott และคณะ 1988,และ Kao 1977) อย่างไรก็ตามการนำเทคนิค



รูปที่ 1 การพัฒนาของเซลล์เพาะเลี้ยงไปเป็นเอมบริออยด์ ในกระบวนการเอมบริโอเจเนซิส (ไพบูลย์ 2524)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังกล่าว มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองยังมีอุปสรรคอยู่ เนื่องจากขั้นตอนที่สำคัญในการเปลี่ยนจากเนื้อเยื่อ หรือเซลล์เพาะเลี้ยง ให้กลับมาเป็นต้นถั่วเหลือง (plant regeneration) ยังไม่สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Lazzeri และคณะ 1988,และ Wei และ Xu 1988) งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาถึงเทคนิคและวิธีการที่เหมาะสมในการทำให้เนื้อเยื่อหรือเซลล์เพาะเลี้ยงของถั่วเหลืองมีการเปลี่ยนแปลงกลับเป็นต้นพืชใหม่

การตรวจเอกสาร

ถั่วเหลือง (Glycine max L. Merr.) เป็นพืชที่จัดอยู่ในตระกูล Leguminosae subgenus soja มีชื่อสามัญเรียกกันต่างๆ ได้แก่ soya bean, soja bean, Chinese pea, Manchurian bean, และ soybean (กรมส่งเสริมการเกษตร)

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วเหลือง มีรายงานเป็นครั้งแรกเมื่อปี1966 โดย Blades ศึกษาอิทธิพลของไคเนติน (kinetin) ต่อกลไกการเจริญของแคลลัสถั่วเหลืองพันธุ์ Agate จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อใบเลี้ยงพบว่าการเจริญของแคลลัสสามารถถูกยับยั้ง ถ้ามี purine analogue ได้แก่ 2,6-di aminopurine,8-azaguanine,และ 8-azaadenine แต่ 6-mercaptopurine หรือ antibiotic puromycin ไม่สามารถยังยั้งการเจริญได้ การแก้ไขการระงับเจริญโดย 8-azaguanine นั้นสามารถทำได้โดยเพิ่มความเข้มข้นของไคเนตินในอาหารเพาะเลี้ยง แสดงให้เห็นว่าไคเนตินมีผลต่อเมทาบอลิซึม (metabolism) ของ RNA ต่อมาในปี 1968 Witham ได้นำส่วนใบเลี้ยงของถั่วเหลืองมาชักนำให้เกิดแคลลัสพบว่า แคลลัสจะเจริญเติบโตดีเมื่อใช้ออกซินเป็น 2,4-D ควบคู่กับ

ไคเนติน การทดสอบของทั้ง 2 นำไปสู่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลือง โดยจะมีการเพาะเลี้ยงจากส่วนต่าง ๆ คือ ใบ ใบเลี้ยง คัพภะวัยอ่อน (immature embryo),ใบเลี้ยงวัยอ่อน (immature cotyledon),ส่วนลำต้น (hypocotyl) เป็นต้น

ในปี 1981 Kartha ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดต้นจากเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด (meristem) ของพืชในตระกูลถั่ว 5 ชนิด พบว่า อาหารที่สามารถชักนำให้เกิดต้นของถั่วเหลืองได้คืออาหารสูตร MS เสริมด้วย BA ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.05-0.1 ไมโครโมลาร์ กับ NAA 1 ไมโครโมลาร์ โดยจะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นประมาณ 25-33% นอกจากนี้ Pavlina (1986) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสของถั่วเหลืองสายพันธุ์ 146/82-5 โดยใช้ส่วนใบเลี้ยง ลำต้น และปลายยอด โดยเลี้ยงบนอาหารสูตรการที่เสริมด้วย 2,4-D และ ไคเนติน Hymowitz และคณะ (1986)ได้ทำการชักนำให้เกิดต้นจากเนื้อเยื่อส่วนยอดของถั่วเหลืองสายพันธุ์ที่เป็นพันธุ์ป่า (wild type) คือ Glycine clandestina ซึ่งมีจำนวนโครโมโซม (chromosome number;2n)เท่ากับ 40 โดยจะเกิดส่วนยอด (shoot) บนชิ้นส่วนของใบโดยตรง โดยจะเป็นการเกิดแบบ ออร์แกโนเจเนซิส (organogenesis) เมื่อใช้อาหารสูตร B5 เสริมด้วย BA NAA และไคเนติน ต่อมาในปี 1987 Wright ได้เพาะเลี้ยงใบอ่อนคู่แรก (primary leaves) จากต้นกล้าอายุ 5 วัน ในอาหารสูตร CS23 เสริมด้วย 2,4,5-T สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และเมื่อย้ายลงในอาหารสูตร B5 ที่เติม BA สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ภายใน 4 สัปดาห์

เนื้อเยื่อพืชส่วนอื่นของถั่วเหลือง ที่พบว่าประสบความสำเร็จมากที่สุดในการชักนำให้เกิดต้นได้แก่ ส่วน คัพภะวัยอ่อน (immature embryo) และส่วนใบ

เลี้ยงวัยอ่อน (immature cotyledon) โดย Widholm และ Rick (1983) ได้ชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์แขวนลอย ที่เกิดจากการเลี้ยง ใบเลี้ยงวัยอ่อนของ Glycine canescens โดยใช้อาหาร B5 เสริมด้วย NAA 0.5 มก./ล. จากนั้นจึงย้ายลงอาหาร B5 ชนิด กึ่งแข็ง (semi solid) เพื่อกระตุ้นให้เกิดยอด เมื่อได้ยอดแล้วจึงกระตุ้นให้เกิดรากโดยใช้อาหาร MS ที่มีความเข้มข้นของ IBA ตั้งแต่ 0 - 0.1 มก./ล. ต่อมา Li และคณะ (1985) ชักนำให้เกิด somatic embryogenesis ของถั่วเหลืองจากส่วนคัพภะวัยอ่อน พันธุ์ TGM 119 โดยเลี้ยงแคลลัส ในอาหารเหลว 2 สัปดาห์ จึงนำไปกรองให้ได้เซลล์เดี่ยว ๆ แล้วเลี้ยงให้เป็น โปรเอมบริออยด์ (proembryoid)ก่อน โดยใช้เวลาประมาณ 1 เดือน จากนั้นจึงย้ายลงอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยออกซินชนิดต่างๆเช่น 2,4-D, NAA, BA, IAA และไคเนติน ความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่า BA 0.2 มก./ล. และ IAA 0.1 มก./ล. จะทำให้เกิดเอมบริออยด์ (embryoid) globular stage และ heart stage และเมื่อนำแคลลัสเหล่านี้ไปเลี้ยงในที่มีความเข้มของแสงต่ำ พบว่าสามารถทำให้มีใบเกิดขึ้นได้ นอกจากนี้ Lippmann และ Lippmann (1984)ได้ทดลองเลี้ยงส่วนใบเลี้ยงวัยอ่อนขนาด 4-5 มม. บนอาหาร L2 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินได้แก่ 2,4-D, MCPA, 2,4,5-T, NAA, IAA, และ IBA พบว่าการเกิดแคลลัสมีความสัมพันธ์กับชนิดและปริมาณออกซิน ในอาหารซึ่งให้ 2,4-D และ MCPA สามารถชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ ในขณะที่ 2,4,5-T, NAA, และ IBA จะมีผลทำให้เกิดเฉพาะแคลลัสเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลในระดับสูงๆจะมีผลไปยับยั้งการเกิดเอมบริโอเจเนเนซิส

Lazzeri และคณะ (1985) ได้ทำการชักนำให้เกิดต้นจากส่วนคัพภะวัยอ่อนบนอาหาร MSB เสริมด้วย 2,4-D 5-10 มก./ล. หรือ NAA 10 มก./ล. พบว่า 2,4-D 10 มก./ล. จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอเจนเนซิส มาก

กว่า 90% อย่างไรก็ตาม ลักษณะของสัณฐานวิทยา (morphology) ของต้นที่ชักนำด้วย 2,4-D นั้นค่อนข้างจะผิดปกติ ในขณะที่ NAA จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอเจเนซิสน้อยกว่าแต่ให้ต้นที่มีลักษณะปกติ ขณะเดียวกัน Barwale และคณะ (1986) ได้ศึกษาขั้นตอนการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของถั่วเหลืองที่ได้จากแคลลัสของคัพภะวัยอ่อนของถั่วเหลืองพันธุ์ William 82 โดยผ่านทางเอมบริโอเจนเนซิสและออร์แกโนเจนเนซิส พบว่าในการเกิดเอมบริโอเจเนซิสนั้นสามารถจะใช้อาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยไธอามีน(thiamine) และหากเพิ่มนิโคตินิคแอซิด(nicotinic acid) จะช่วยให้การเกิดเอมบริโอเจเนซิสเพิ่มขึ้นถึง 76% สำหรับการเกิดออร์แกนโนเจเนซิสนั้น ทำได้โดยเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เสริมด้วย BA และ NAA ส่วน Ghazi และคณะ (1986)ได้ศึกษาการเกิดโซมาติคเอมบริโอเจเนซิส (somatic embyogenesis)จากแคลลัสของคัพภะวัยอ่อน 2 แบบ คือแบบที่มีลักษณะเรียบใส (smooth-shiny) และลักษณะหยาบ (rough) โดยแคลลัสแบบลักษณะเรียบใสนั้นจะพัฒนามาจากส่วนใบเลี้ยง เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2,4-D สามารถพัฒนาให้เกิดเป็นต้นได้ ในขณะที่แคลลัสชนิดหยาบที่พัฒนามาจากส่วนคัพภะวัยอ่อน ใบเลี้ยง ลำต้น และไฮโปคอทิลของต้นอ่อน เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีฮอร์โมนชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้

ในปี 1987 Lazzeri และคณะ ได้ศึกษากลไกการเกิดโซมาติคเอมบริโอเจเนซิส โดยศึกษาผลของอาหาร ลักษณะทางกายภาพ และสารเคมีบางชนิดโดยชักนำให้เกิดต้นจากส่วนใบเลี้ยงวัยอ่อนที่เลี้ยงในอาหาร MSB เสริมด้วย NAA พบว่าน้ำตาลซูโครส (sucrose) และ กลูโคส (glucose) จะมีผลต่อการเกิดโซมาติคเอมบริโอเจเนซิส โดยจะเกิดเอมบริออยด์เพิ่มมากขึ้นและถ้าลดความเข้มข้นของน้ำตาลจาก 12% ลงมาเหลือ 1.5% และในช่วง pH ระหว่าง 5.0 ถึง 7.0 จะให้ผลของการเกิดเอมบริโอเจเนซิส ใกล้เคียงกัน แต่ว่าที่ pH ต่ำ ๆ จะ

ให้เอมบริออยด์ที่มีลักษณะปรกติมากกว่า ค่า pH ที่เหมาะสมที่สุดคือ 5.5 การเลี้ยงเนื้อเยื่อ แสงไม่มีผลต่อการเกิดเอมบริโอเจเนซิส การเกิดเอมบริโอเจเนซิสจะสูงขึ้นเมื่อเสริมด้วย yeast extract นอกจากนี้ยังพบว่าใช้วุ้นของ Difco-Bacto agar นอกจากนี้ Lazzeri และคณะ (1987) ยังรายงานว่า 2,4-D จะมีอิทธิพลต่อการเกิดเอมบริโอเจเนซิสโดยให้ผลผลิตใกล้เคียงกับ NAA แต่ NAA จะเหมาะกว่าเมื่อเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเอมบริออยด์ที่เกิดขึ้น และการ subculture บ่อยๆ จะทำให้การเกิดเอมบริโอเจเนซิสลดลง

Finer (1988) ได้ชักนำให้เกิด โซมาติคเอมบริโอเจเนซิส และ embryogenic tissue โดยชักนำให้เกิดจากส่วนคัพภะวัยอ่อน เมื่อใช้อาหารสูตร MSB เสริมด้วย 2,4-D 40 มก./ล. และซูโครส 6% สามารถทำให้เกิดโซมาติคเอมบริโอใน 4 สัปดาห์ โดยจะเกิดขึ้นตรงส่วน apical หรือ terminal ของ primary somatic embryo

ในปี 1988 Lazzeri และคณะ รายงานถึงผลของซูโครสและออกซินต่อการเกิดเอมบริโอเจเนซิส โดยใช้ความเข้มข้นของ NAA ตั้งแต่ 6.25 ถึง 50 มก./ล. และซูโครส 0.5 ถึง 4% พบว่าผลผลิตของการเกิดโซมาติคเอมบริโอจะเกิดมากขึ้นที่ความเข้มข้นซูโครส 1 หรือ 2% และ NAA 6.25 หรือ 12.5 มก./ล. โดยจะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดเอมบริโอเจเนซิสจะสูงถึง 32 - 41% ในขณะเดียวกัน Hartwick และคณะ (1988) ได้ศึกษาผลของออกซิน ซูโครส และตำแหน่งในการวางของใบเลี้ยงวัยอ่อนต่อการเกิดเอมบริออยด์ โดยใช้ถั่วเหลืองพันธุ์ J103 และ McCall พบว่าสูตรอาหาร และตำแหน่งในการวางที่เหมาะสม สำหรับพันธุ์ J 103 คือ 2,4-D 0.25 มก./ล. และซูโครส 1.5% และวางแบบ abaxial ในขณะที่พันธุ์ McCall นั้นใช้ 2,4-D 0.25 มก./ล. และ 1 มก./ล.และซูโครส

1% และวางแบบ abaxial เช่นกัน

นอกจากการชักนำให้เกิดต้นในอาหารแข็งแล้ว อีกวิธีหนึ่งที่สามารถชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสของถั่วเหลืองได้ก็คือ การชักนำให้เกิดโซมาติคเอมบริโอเจเนซิส โดยการเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเซลล์แขวนลอย หรือให้อยู่ในสภาวะที่เลี้ยงในอาหารเหลวระยะหนึ่งแล้วชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ในอาหารแข็งโดยในปี 1968 Gamborg และคณะ ได้ศึกษาธาตุอาหารต่างๆ ที่จำเป็นในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลืองและรากและได้พัฒนาสูตรอาหารให้ชื่อว่า B5 Medium ซึ่งปัจจุบันเป็นอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงพืชตระกูลถั่ว จนกระทั่งปี 1983 Gamborg และคณะประสบความสำเร็จ ในการชักนำให้เกิดโซมาติคเอมบริโอเจเนซิสใน Glycine species โดยทดลองถึง 16 สายพันธุ์ (cell lines) พบว่าการเกิดโซมาติคเอมบริโอต้องการ picloram หรือ 2, 4-D และ Kerns และคณะ 1986 ได้ทำการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลืองจากส่วนไฮโปคอทิลและใบเลี้ยงของหลายๆ พันธุ์ พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว L2 เสริมด้วย 2,4-D 0.4 มก./ล. จะให้เอมบริออยด์แต่ไม่สามารถชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

นอกจากการใช้อวัยวะส่วนต่างๆ ของถั่วเหลือง ในการชักนำให้เกิดต้นที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ส่วนของอวัยวะที่สามารถทำให้เกิด โซมาติคเอมบริโอเจเนซิสได้อีกเช่นส่วน stem node segment และไฮโปคอทิล โดย Beversdorf และ Bingham (1977) ได้ศึกษา สัดส่วนผสม (combination)ของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการเกิดเอมบริออยด์ของไฮโปคอทิล พบว่าอาหารที่เสริมด้วย 2,4-D 0.4-0.8 มก./ล. และ kinetin 0.25-0.5 มก./ล โดยจะให้ การเจริญ ซึ่งจะพัฒนาต่อไปเป็นเอมบริออยด์ได้ผลผลิตสูงมาก แต่ยังไม่สามารถที่จะทำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ Cheng และคณะ (1980) สามารถกระตุ้นให้ส่วนข้อใบเลี้ยง (cotyle-

donary node segment) เกิด multiple shoot bud โดยใช้อาหารที่เสริมด้วย BA 5-50 ไมโครโมลาร์ และ shoot bud ที่เกิดขึ้นจะกระตุ้นให้เกิดต้นโดยย้ายจากอาหารที่มี BA 10-50 ไมโครโมลาร์ไปลงใน BA 1 ไมโครโมลาร์และกระตุ้นให้เกิดรากโดยใช้อาหารที่ไม่มีออกซิน นอกจากนั้น Saka และคณะ (1980) สามารถชักนำให้เกิด shoot bud บนส่วน stem node segment โดยนำไปเลี้ยงให้ไปเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีฮอร์โมน ก่อนแล้วจึงย้ายไปลงในอาหารที่มีไซโตไคนิน (cytokinin) ที่เหมาะสมคือ BA 1-5 ไมโครโมลาร์ในอาหารสูตร MMS และ BA 1-50 ไมโครโมลาร์ ในอาหารสูตร MSB พบว่าอาหาร MSB จะให้การเกิดและการเจริญของ shoot bud ดีกว่า MMS และจะเพิ่มมากขึ้นถ้าใช้น้ำตาลฟรุคโตสแทนน้ำตาลซูโครส

Kameya และ Widholm (1981) ได้ชักนำให้เกิด adventitious bud และ shoot formation ในพืชตระกูล Glycine โดยใช้ส่วนไฮโปคอทิลและใบเลี้ยงในอาหาร MS เสริมด้วย NAA 0.1-5 มก./ล และ BA 0.1-10 มก./ล. พบว่ามี 8 species ที่สามารถกลับคืนมาเป็นต้นได้ โดยพันธุ์ที่เกิดสูงที่สุดคือ G. canescens, G. tomentella ตามลำดับ ต่อมา Wright และคณะ (1986) ได้ศึกษาการเกิดออร์แกโนเจเนซิสของถั่วเหลือง จากส่วนข้อใบเลี้ยง (cotyledonary node) พบว่าการใส่ BA ในขณะที่เพาะเมล็ดนั้นจำเป็นมากต่อการเกิด multiple shoot และ shoot bud formation ความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ และการใช้ซูโครสและฟรุกโตส ไม่ค่อยจะมีผลต่อการเกิด shoot bud ในขณะที่ BA จะมีผลมากที่สุด

การแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

สำหรับการเลี้ยงโปรโตพลาสต์นั้น มนุษย์ได้เริ่มสนใจมาตั้งแต่สมัยที่ Klercher (1892) แยกโปรโตพลาสต์ออกมาโดยวิธีใช้มีดกรีดตัดเซลล์แล้วแช่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงให้โปรโตพลาสต์แยกออกมา แต่ในระยะนั้นไม่ประสบความสำเร็จมากนักจนกระทั่ง Cocking (1960) ได้ใช้เอนไซม์ cellulase แยกโปรโตพลาสต์จากปลายรากของมะเขือเทศ และสามารถเลี้ยงให้สร้างผนังเซลล์กลับมาใหม่ได้ จนมีการพัฒนาการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิดร่วมกัน คือเอนไซม์เซลลูเลสและเพคติเนส จนปัจจุบันได้ประสบความสำเร็จในการแยกและเลี้ยงได้ในพืชหลายชนิด ซึ่งได้นำเทคนิคเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช การศึกษาทางด้านชีวเคมี และการหาความสัมพันธ์กับเชื้อสาเหตุของโรคพืช โดยเฉพาะไวรัสมากมาย จนกระทั่งในปัจจุบันความก้าวหน้าได้มาจนถึงจุดที่ มนุษย์สามารถที่จะตัดต่อ DNA เฉพาะส่วนที่ต้องการใส่เข้าไปในโปรโตพลาสต์ เพื่อให้ได้พืชใหม่ที่มีคุณสมบัติตามที่ผู้ศึกษาต้องการมากที่สุด (ประสาทพร, 2528)

สำหรับการศึกษาและวิจัยทางด้านการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ถั่วเหลืองนั้นได้รับความสนใจมากมายเช่นกัน Schwenk และคณะ (1981)สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบคู่แรกได้ โดยวิธีหั่นใบและแช่ในสารละลายเอนไซม์ คือ cellulase R10 กับ Pectolyase Y23 โดยมี mannitol เป็นสารปรับความดันออสโมติกและ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ เพื่อปรับสภาพของ cell membrane ต่อมา Xu และคณะ (1982) สามารถที่จะแยกและเลี้ยงโปรโตพลาต์จากรากถั่วเหลืองได้โดยเลี้ยงจากโปรโตพลาสต์จนสร้างเป็นแคลลัส โดยใช้อาหาร B5 เสริมด้วย CPA และ BA และใช้ mannitol 7% และอีกสูตรหนึ่งคือ MSB เสริมด้วย glucose,

sorbitol, mannitol, และ casein hydrolysate พบว่าจะได้แคลลัส มีลักษณะสีเขียวและสร้างรากแต่ไม่สร้างยอด ต่อมา Gamborg และคณะ (1983) ได้ทำการทดลองเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของพืชในตระกูล Glycine พบว่า G. max, G. soja และ G. tabacina สามารถที่จะเลี้ยงให้สร้างผนังเซลล์ แบ่งเซลล์ และเกิดเป็นโครงสร้างที่เหมือนกับเอมบริโอ(embryo-like structure)ได้นอกจากนี้ Chowhury และ Widholm (1985) ก็สามารถที่จะทำให้โปรโตพาสต์เจริญขึ้นเป็นแคลลัสได้เช่นกัน และเมื่อนำแคลลัสที่ได้ไปหาจำนวนโครโมโซมก็พบว่าจำนวนโครโมโซมมีปริมาณปรกติ แต่ไม่สามารถพัฒนาให้กลับเป็นต้นถั่วเหลืองได้

สำหรับการพัฒนาจากโปรโตพลาต์เป็นต้นได้สำเร็จนั้น มีรายงานผลการวิจัยที่สำเร็จเป็นรายแรกคืองานของ Newell และ Luu (1985) โดยสามารถแยกและเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ Glycine canescens ซึ่งเป็น wild type ของถั่วเหลืองได้โดยเลี้ยงในอาหารที่ใช้ agarose ต่อมา Wei และ Xu (1988) ก็สามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์ของถั่วเหลืองพัฒนาไปเป็นต้นได้สำเร็จจากใช้โปรโตพลาต์ที่แยกได้จากใบเลี้ยงวัยอ่อนและเลี้ยงในอาหารสูตร KP8 เสริมด้วย 2,4-D NAA และ zeatin เมื่อได้แคลลัสแล้วจึงย้ายไปลงในอาหารชนิดแข็ง แล้วชักนำให้เกิดยอดโดยใช้อาหาร MSB เสริมด้วย NAA BA kinetin zeatin และ casein hydrolysate สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 4 พันธุ์จาก 6 พันธุ์

สำหรับการชักนำให้เกิดต้นจากโปรโตพลาสต์ ของเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นมีรายงานว่า Myer และคณะ (1989) ได้แยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลืองพันธุ์ wild type 2 พันธุ์คือ G.canescens และ G. clandestina โดยใช้อาหารMSBเสริมด้วย BA zeatin kinetin และ NAA พบว่าโปรโตพลาสต์ใน G. canescens สามารถแบ่งตัวประมาณ 48% และ G. clandestina

G. clandestina แบ่งได้ประมาณ 11%

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพของเซลล์พืช เพื่อใช้ในแง่การปรับปรุงพันธุ์พืชมีความก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว เทคนิคเหล่านี้ เช่น การส่งถ่ายยีน (gene - transfer) การรวมโปรโตพลาสต์(protoplast fusion) เป็นเทคนิคที่จะเพิ่มศักยภาพและประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่างๆได้เป็นอย่างดี สำหรับในถั่วเหลืองนั้นมีรายงานว่าได้มีการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีทางเซลล์พืชมาบ้างแล้ว เช่นปี 1977 Kao ได้ทำการรวมโปรโตพลาสต์ของถั่วเหลืองกับ Nicotiana glauca โดยใช้ polyethyleneglycol และสามารถที่จะเลี้ยง fusant ที่ได้ให้แบ่งตัวและเพิ่มจำนวนเป็นหลายล้านเซลล์ได้ภายใน 2-3 เดือน นอกจากนี้แล้วยังมีการศึกษาเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองโดยเทคนิคการทำ electroporation และ hypotonic shock Cutler และ Saleem (1987) พบว่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสม ในการกระตุ้นโปรโตพลาสต์โดยทั่วไปนั้นใช้ประมาณ 400 volts per centimeter pulses และ 50 milliseconds และ โปรโตพลาต์สามารถอยู่รอดได้ถึง 78 % นอกจากนั้นยังมีการวิจัยและพัฒนาที่กำลังนำไปสู่ความสามารถในการส่งถ่ายยีนโดยใช้Agrobacterium tumefaciens เป็นตัวกลางในการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัส ลำต้น และโปรโตพลาสต์ของถั่วเหลืองได้ด้วย(Pedersen และคณะ 1983,Owens และ Smigocki 1988, Hinchee และคณะ 1988, และ McCabe และคณะ 1988)เป็นต้น

วัตถุประสงค์

เพื่อหาสภาวะและองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง ที่ชักนำให้เกิดต้น

018206

(plant regeneration) จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (callus) และเซลล์ไร้ผนัง (protoplast) ของถั่วเหลืองโดยอาศัยขั้นตอนดังต่อไปนี้

ขั้นตอนของการวิจัยมีดังต่อไปนี้

1. ศึกษาวิธีการชักนำให้เกิด และศึกษาสภาวะ ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากส่วนต่าง ๆ ของถั่วเหลือง
2. ศึกษาวิธีการ การชักนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงเกิด embryogenesis และ organogenis จากอาหารชนิดต่างๆ ที่สามารถทำให้เกิดต้นได้
3. ศึกษาหาสภาวะที่มีผลให้เกิดการกลับเป็นต้นใหม่ (plant regeneration) จากแคลลัสของส่วนต่าง ๆ ที่ชักนำให้เกิดขึ้น
4. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงต่างๆ
5. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงโปรโตรพลาสต์ให้กลับคืนเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย