

การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสของถั่วเหลือง(*Glycine max* L.)

Plant Regeneration from Callus of Soybean (*Glycine max* L.)

พงศ์ยุทธ์ นวลบุญเรือง¹ วันชัย ดีเอहनามกุล² และสันห์ พนิชยกุล³

Phongyuth Nualbunruang Wanchai De-Ehnamkul and Sanha Panichajakul

ABSTRACT

The procedures for plant regeneration from primary leaf and hypocotyl calli of soybean cv. SJ 4 were developed. The conditions for callus induction from the primary leaf were on B5 medium supplemented with 1-3 mg/l BA, 0.10-0.20 mg/l NAA and 1,650 mg/l NH_4NO_3 . The optimum medium for regenerating primary leaf callus were on B5 medium supplemented with 1 mg/l BA, 0.15 mg/l NAA, 1,650 mg/l NH_4NO_3 and the same medium with 2 mg/l BA, 0.15 mg/l NAA and 1,650 mg/l NH_4NO_3 . For the hypocotyl a piece located 2 mm. lower from the cotyledonary node can be regenerated. The condition for callus induction from hypocotyl were on RV-5 medium supplemented with 0.1-0.4 mg/l IAA and 0.5-3 mg/l BA. The appropriate medium for regenerating hypocotyl callus was RV5 medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 0.2 mg/l IAA.

Key words : soybean, plant regeneration, organogenesis

บทคัดย่อ

ในการวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการกลับคืนเป็นต้นของแคลลัสจากใบคู่แรก และไฮโปคอติลของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 สภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อใบคู่แรก คือทำการเลี้ยงบนอาหาร B5 เสริมด้วย

BA 1-3 มก./ล., NAA 0.10-0.20 มก./ล. อาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้กลับคืนเป็นต้นพืชคืออาหาร B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล., NAA 0.15 มก./ล., NH_4NO_3 1,650 มก./ล. และ B5 เสริมด้วย BA 2 มก./ล., NAA 0.15 มก./ล. และ NH_4NO_3 1,650 มก./ล. สำหรับไฮโปคอติลเฉพาะส่วนที่ต่ำกว่าข้อ

1. สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง อ.เมือง จ.ลำปาง 52000

Lampang Agricultural Research and Training Centre, Lampang 52000, Thailand.

2. ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Dept. of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

3. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Dept. of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, 4002, Thailand.

ใบเลี้ยง 2 มม. เท่านั้นที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้
สภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากไฮโปคอติล
คือ อาหาร RV-5 เสริมด้วย IAA 0.1-0.4 มก./ล.
และ BA 0.5-3 มก./ล. สูตรอาหารที่เหมาะสมใน
การชักนำแคลลัสให้เกิดขึ้นคือสูตร RV-5 เสริมด้วย
BA 0.5 มก./ล. และ IAA 0.2 มก./ล.

คำนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชสำคัญชนิดหนึ่ง เป็นแหล่ง
สำคัญของน้ำมันและโปรตีน วิธีการทางเพาะเลี้ยงเนื้อ
เยื่อ เป็นวิธีหนึ่งที่กำลังจะช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ โดย
ทำให้เกิด somaclonal variation หรือ โดยวิธีส่งถ่ายยีน
(gene transfer) สำหรับการส่งถ่ายยีนนั้นเป็นเทคนิคที่
คาดว่าจะสามารถเพิ่มปริมาณและคุณภาพของไขมันและ
โปรตีนได้ ตลอดจนสามารถช่วยปรับปรุงพันธุ์ให้ด้าน
ทานต่อแมลง ไวรัส และสารกำจัดวัชพืช เพราะฉะนั้น
วิธีการชักนำให้กลับคืนเป็นต้นใหม่ (regeneration) จึง
เป็นวิธีการที่สำคัญและเป็นพื้นฐานสำหรับการนำเทคนิค

ทางเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลือง
สำหรับการชักนำให้กลับคืนเป็นต้นพืชใหม่ของ
เนื้อเยื่อถั่วเหลืองนั้น พบว่าประสบความสำเร็จจากการ
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ เช่น cotyledonary node
หรือ epicotyl (Cheng *et al.*, 1980; Saka *et al.*, 1980;
Kartha *et al.*, 1981) ส่วน hypocotyl (Kimball and
Bingham, 1973; Freytag *et al.*, 1989) และใบคู่แรก
(primary leaf) (Wright *et al.*, 1987) แต่ส่วนที่ประสบ
ความสำเร็จมากที่สุด คือส่วนใบเลี้ยงอ่อนและเอ็มบริโอ
อ่อน (immature cotyledon และ immature embryo)
(Li *et al.*, 1985; Lippmann and Lippmann, 1984;
Finer, 1988)

สำหรับวัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อศึกษา
หาปัจจัยต่างๆ ที่ส่งเสริมการชักนำให้เกิดขึ้นจากเนื้อเยื่อ
ของถั่วเหลืองจากส่วนใบคู่แรก (primary leaf) และ
ไฮโปคอติล (hypocotyl)

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเนื้อเยื่อใบคู่แรกและไฮโปคอติล

ทำการเพาะถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 บนวัน 0.7%
ในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากนั้นจึงนำส่วนใบเลี้ยงคู่แรก
มาตัดให้ได้ขนาด 0.3 x 0.3 ซม. ส่วนไฮโปคอติลนั้น
นำมาตัดตรงที่ต่ำกว่า cotyledonary node ลงมา 2, 4
และ 6 มม. จากนั้นนำส่วนทั้งหมดมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย
clorox 15% ประมาณ 15 นาที

การชักนำให้เกิดขึ้นจากส่วนใบคู่แรก

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบคู่แรกในอาหาร B5
(Gamborg, 1970) เสริมด้วย NH_4NO_3 1,650 มก./ล.
และสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิดคือ BA 1, 2,
3, 4 มก./ล. และ NAA 0.10, 0.15, 0.20 มก./ล.
ทำการ subculture ลงในอาหารชนิดเดิมเมื่อครบ 30
วัน หาเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การ
กลับคืนเป็นต้นใหม่

การชักนำให้เกิดขึ้นจากไฮโปคอติล

นำไฮโปคอติลที่เตรียมไว้มาเลี้ยงในอาหาร
RV-5 (Freytag *et al.*, 1989) เสริมด้วยฮอร์โมน
BA 0.5, 1, 2, 3 มก./ล. และ IAA 0.1, 0.2, 0.3
และ 0.4 มก./ล. ทำการ subculture ลงในอาหารชนิด
เดิมเมื่ออายุ 30 วัน หาเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและ
เปอร์เซ็นต์การกลับคืนเป็นต้นใหม่

ผลและวิจารณ์

การชักนำให้เกิดขึ้นจากใบคู่แรก (primary leaf)

จากการทดลองแปรผันความเข้มข้นของสาร
ควบคุมการเจริญเติบโต โดยใช้ความเข้มข้นของ BA 1-
4 มก./ล. และ NAA 0.10-0.20 มก./ล. พบว่า ใบคู่
แรกของถั่วเหลืองสามารถจะเจริญไปเป็นแคลลัสได้ดีทุก
สูตร สามารถจะสังเกตเห็นการเกิดแคลลัสได้ภายใน 7 วัน

หลังจากเลี้ยงไปได้ประมาณ 30 วัน ลักษณะของแคลลัสต่างๆ ไปจะเป็นแบบ compact มีสีเขียวเข้ม หลังจากนั้นจึงทำการ subculture พบว่า มีอาหารอยู่ 6 สูตรจาก 15 สูตร ที่เกิดต้นใหม่ (Table 1) ในอาหารที่เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. โดยต้นที่ได้ส่วนใหญ่จะมีทั้งแบบที่มีลำต้นยาวประมาณ 1.5 ซม. มีใบ 5-9 ใบและพบว่ามีรากเกิดขึ้นด้วย หรือเกิดเฉพาะใบงอกออกมาจากแคลลัสโดยตรง (Figure 1) ส่วนในอาหารที่มี BA 2 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. จะเกิดเฉพาะใบงอกออกมาจากแคลลัสโดยตรงโดยจะมีใบประมาณ 8-10 ใบต่อแคลลัสหรือเกิดเฉพาะลำต้นและมีใบ 4-5 ใบต่อ 1 ต้น (Figure 2) ส่วนในอาหารที่มี BA 3 มก./ล. NAA 0.15 มก./ล. และ BA มก./ล. NAA 0.20 มก./ล. จะเกิดเฉพาะรากเท่านั้นโดยมีจำนวนรากตั้งแต่ 4-20 รากต่อ 1 แคลลัส

Table 1 Percent callusing and regeneration from primary leaf at various concentration of plant growth regulators.

Type and concentration (mg/l) of plant growth regulators			
BA	NAA	% callusing	% regeneration
1	0.10	80	0
	0.15	90	3
	0.20	96	0
2	0.10	90	0
	0.15	85	5
	0.20	90	0
3	0.10	95	0
	0.15	90	20
	0.20	98	15
4	0.10	97	0
	0.15	95	23
	0.20	95	10

Table 2 Percent callusing and regeneration from hypocotyl (at 2 mm under cotyledonary node) at various concentration of plant growth regulators.

Type and concentration (mg/l) of plant growth regulators		% callusing	% regeneration
BA	IAA		
0.5	0.1	82	0
	0.2	85	17
	0.3	79	3
	0.4	90	0
1	0.1	79	7
	0.2	78	5
	0.3	82	0
	0.4	89	0
2	0.1	80	0
	0.2	85	0
	0.3	77	0
	0.4	95	0
3	0.1	65	0
	0.2	70	0
	0.3	75	0
	0.4	72	0

จากผลการทดลองทำให้ทราบว่าปัจจัยที่ทำให้เกิดความสำเร็จ ในการชักนำให้เกิดต้น ปัจจัยที่สำคัญที่สุดคือ ชนิดและอัตราส่วนที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่ามีเพียง 2 สูตรเท่านั้น ที่ให้ต้นแก้วเหลืองค่อนข้างสมบูรณ์คือ B5 เสริมด้วย BA 1 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. และ B5 เสริมด้วย BA 2 มก./ล. และ NAA 0.15 มก./ล. ส่วนอีก 4 สูตรที่เกิด organogenesis นั้น ก็เกิดเฉพาะรากเท่านั้น ส่วนนอกนั้นอีก 6 สูตรไม่มีต้นหรือรากเกิดขึ้น

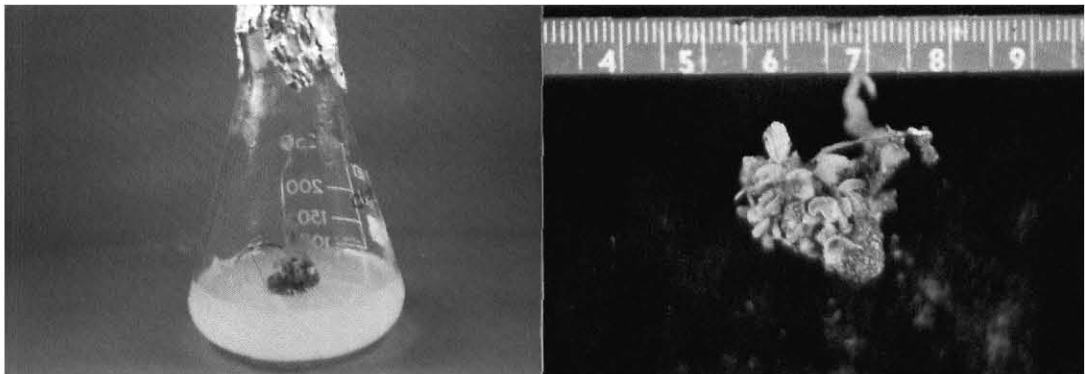


Figure 1 Plant regeneration from primary leaf callus on B5 supplemented with 1 mg/l BA and 0.15 mg/lNAA.



Figure 2 Plant regeneration from primary leaf callus on B5 supplemented with 2 mg/l BA and 0.15 mg/lNAA.



Figure 3 Plant regeneration from hypocotyl callus on RV-5 supplemented with 0.5 mg/l BA and 0.2 mg/lIAA.

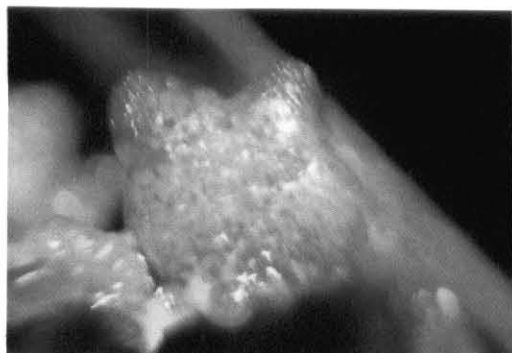


Figure 4 Embryo-like structure in hypocotyl callus on RV-5 supplemented with 0.5 mg/l BA and 0.2 mg/l IAA.

การชักนำให้เกิดต้นจากไฮโปคอติล

จากผลการทดลองพบว่า สามารถกระตุ้นให้ไฮโปคอติลสร้างแคลลัสได้ในอาหารทุกสูตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสได้ดีไม่แตกต่างกันมากนัก (Table 2) แต่ดูเหมือนว่าสูตรที่มี BA สูงถึง 3 มก./ล. หรือมากกว่านี้จะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลง แคลลัสทั่วๆ ไปในทุกสูตรมีลักษณะคล้ายๆ กัน โดยจะมีสีเขียวเข้มเป็นแคลลัสแบบ compact ขนาดทั่วๆ ไปของแคลลัสอยู่ระหว่าง 0.5–1 ซม. หลังจากทำการเลี้ยงไปได้ 45 วัน พบว่ามีเพียง 4 สูตรเท่านั้นที่เกิดเป็นต้นใหม่ได้คือ สูตรที่เสริมด้วย BA 0.5 มก./ล. และ IAA 0.2 มก./ล., BA 0.5 มก./ล. และ IAA 0.3 มก./ล., BA 1 มก./ล. และ IAA 0.1 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. และ IAA 0.2 มก./ล. และไฮโปคอติลที่ต่ำกว่า cotyledonary node เท่านั้นที่สามารถเกิดเป็นต้นใหม่ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ดัง Table 2 โดยสูตร BA 0.5 มก./ล. กับ IAA 0.1 มก./ล. จะให้การเกิดเป็นต้นใหม่สูงที่สุด (17%) โดยลักษณะของต้นที่ได้ส่วนใหญ่จะมีลำต้น 1–3 ลำต้นต่อ 1 แคลลัส มีใบ 2–4 ใบต่อลำต้น (Figure 3, 4)

การที่ไฮโปคอติลที่ต่ำกว่า cotyledonary node 2 มม.เท่านั้น ที่สามารถเกิดเป็นต้นใหม่นั้น อาจ

จะเนื่องมาจากฮอร์โมนที่ตกค้างอยู่ในเนื้อเยื่อไฮโปคอติลตรงบริเวณนั้นมีมากกว่าตรงส่วนอื่นๆ ก็ได้ ซึ่งคล้ายกับงานทดลองของ Kameya and Widholm (1981) ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นจากส่วนไฮโปคอติลของพืชในตระกูล *Glycine* 8 species พบว่า มีเพียง 2 species เท่านั้นที่สามารถกลับมาเป็นต้นได้คือ *G. canescens* และ *G. tomentella* และสอดคล้องกับการทดลองของ Freytag et al. (1989)

สรุป

การชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสที่ได้จากใบคู่แรกและไฮโปคอติล แม้จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นต้นใหม่ น้อยกว่าส่วนใบเลี้ยงอ่อนและเอมบริโออ่อน แต่ก็มีความสำเร็จได้ถ้าใช้ชนิดและอัตราส่วนของสารเร่งการเจริญเติบโตที่เหมาะสม

เอกสารอ้างอิง

- Cheng, T.Y., H. Saka, and T.H. Voqui Dinh. 1980. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. *Plant Science Letter* 19 : 91–99.
- Finer, J.J. 1988. Apical Proliferation of embryogenic tissue of soybean (*Glycine max*). *Plant Cell Reports* 7 : 238–241.
- Freytag, A.H., A.P. Rao-Arelli, S.C. Anand, J.A. Wrather, and L.D. Owens. 1989. Somaclonal variation in soybean plant regenerated from tissue culture. *Plant Cell Reports* 8 : 199–202.
- Gamborg, O.L. 1970. The effects of amino acid and ammonium on the growth of plant cells in suspension. *Plant Physiology* 45 : 372–375.

- Kameya, T. and J. Widholm. 1981. Plant regeneration from hypocotyl sections of *Glycine* species. *Plant Science Letters* 21 : 289-294.
- Kartha, K.K., K. Pahl, N.L. Leung, and L.A. Mroginiski. 1981. Plant regeneration from meristems of grain legumes : soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean. *Canadian Journal of Botany* 59 : 1671-1679.
- Kimball, S.L., and E. T. Bingham. 1973. Adventitious bud development of soybean hypocotyl sections in cultures. *Crop Science* 13 : 758-766.
- Li. B.J., W.H.R. Langridge, and A.A. Szalay. 1985. Somatic embryogenesis and planlet regeneration in the soybean. *Plant Cell Reports* 4 : 344-347.
- Lippmann, B., and G. Lippmann. 1984. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean. *Plant Cell Reports* 3 : 215-218.
- Saka, H., T.H. Voqui-Dinh, and T.Y. Cheng. 1980. Stimulation of multiple shoot formation on soybean stem nodes in culture. *Plant Science Letter*. 19 : 193-201.
- Wright, M.S., D.V. Ward, M.A. Hincsee, M.G. Carnes, and R.J. Kaufman. 1987. Regeneration of soybean from cultured of primary leaf tissue. *Plant Cell Reports* 6 : 83-89.