



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาเทคนิคการคัดเลือกเซลล์สำหรับอ้อยทนเค็มร่วมกับการใช้เทคนิคทางอณูวิทยา
Development of cell selection for saline soil tolerant sugarcane in concert
with molecular techniques

นางสาวชนากานต์ ลักษณะ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณพ.ศ. ๒๕๖๒
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ ๕๗๘๓๒
สัญญาเลขที่ ๔.๒/๒๕๖๒

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาเทคนิคการคัดเลือกเซลล์สำหรับอ้อยทนเค็มร่วมกับการใช้เทคนิคทางอณูวิทยา
Development of cell selection for saline soil tolerant sugarcane in concert
with molecular techniques

นางสาวชนากานต์ ลักษณะ
คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา
วิทยาเขตสระแก้ว

ได้รับงบประมาณ เดือนตุลาคม พ.ศ. ๒๕๖๑ – กันยายน พ.ศ. ๒๕๖๒

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 4.2/2562

บทคัดย่อ

อ้อยเป็นพืชที่ไม่ทนต่อดินเค็ม การปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนเค็มโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพจึงช่วยเพิ่มโอกาสที่จะประสบความสำเร็จได้มากขึ้นและเร็วขึ้น งานวิจัยนี้จึงประยุกต์เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการคัดเลือกเซลล์อ้อยให้ทนต่อความเค็ม โดยเพาะเลี้ยงใบอ่อนของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ให้เกิดแคลลัส จากนั้นคัดเลือกแคลลัสบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ความเข้มข้น 0 0.5 0.75 1.0 และ 1.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 เดือน นำแคลลัสที่รอดชีวิตมาชักนำให้เกิดต้น พบว่าสามารถชักนำต้นอ้อยที่ได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือทุกความเข้มข้น จากนั้นนำต้นอ้อยมาคัดเลือกซ้ำอีกรอบโดยการเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl ให้สูงขึ้น โดยเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือกจนกระทั่งต้นอ้อยที่เป็นชุดควบคุมที่เติม NaCl ในทุกความเข้มข้นตาย พบว่าอ้อยที่ใช้จากการคัดเลือกเซลล์สามารถเจริญเติบโต แรกหน่อในอาหารที่เติม NaCl สูงสุด 1.5 เปอร์เซ็นต์ได้

Abstract

Sugarcane is sensitive to salt contaminated soil. Biotechnology was used to accelerate sugarcane breeding for salt tolerance. This research applied plant tissue culture technique to select salt tolerance sugarcane cells from cv.KK3. Calli of the sugarcane were cultured on selective MS medium containing different concentrations of NaCl (0 0.5 0.75 1 and 1.25%) for 2 months. The results revealed that the plants were able to regenerate from calli in all concentrations of NaCl. These plants were reselected on selective medium containing higher concentration of NaCl. They were maintained on the selective medium until the control plants died. It was found that selected sugarcane plants could grow and produce tiller on the selective medium containing 1.5%NaCl

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	10
ผลการวิจัย	13
วิจารณ์ผลการวิจัย	22
สรุปผลการวิจัย	23
ผลผลิต	24
รายงานการเงิน	25
เอกสารอ้างอิง	26
ประวัตินักวิจัยและคณะ	31

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้ออ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3	13
2	ลักษณะของแคลลัสเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 8 สัปดาห์	14
3	การเพิ่มจำนวนต้นต้นอ้อยที่ได้จากการชักนำจากแคลลัสที่ทนเกลือความเข้มข้น 1% และต้นอ้อยที่ได้จากการเพิ่มจำนวนต้น	15
4	ค่าแสดงความยาวรากเฉลี่ยในการทดสอบการทนเค็มของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ความเข้มข้นต่าง	20
5	ค่าแสดงความยาวลำต้นเฉลี่ยในการทดสอบการทนเค็มของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	20
6	ค่าแสดงความยาวใบเฉลี่ยในการทดสอบการทนเค็มของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	21

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจำแนกระดับความเค็มที่มีผลกระทบต่อพืช	5
2	การคัดเลือกต้นอ้อยที่พัฒนาจากแคลัสที่ทนทานต่อเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0 0.6 0.7 0.8 0.9 1 1.1 1.2 1.3 1.4 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์	17

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อ้อยเป็นพืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญของไทยชนิดหนึ่ง เนื่องจากอ้อยเป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล ที่มีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศไทย แต่พบว่าผลผลิตอ้อยของปี 2559/2560 มีผลผลิตเฉลี่ยของประเทศไทยอยู่ที่ 9.40 ตันต่อไร่ ซึ่งถือว่าต่ำเพราะศักยภาพของพันธุ์อ้อยที่ปรับปรุงและส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกสามารถให้ผลผลิตได้มากกว่า 15 ตันต่อไร่ ซึ่งพื้นที่ปลูกอ้อยส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลางและภาคตะวันออก โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคตะวันออกที่มีค่าเฉลี่ยของผลผลิตอ้อยต่ำกว่าค่าเฉลี่ยรวมทั้งประเทศ คือ 9.31 และ 9.1 ตามลำดับ สาเหตุหลักที่ทำให้พื้นที่นี้มีผลผลิตลดลงคือเป็นพื้นที่ที่เป็นดินเค็ม ดินเค็มมีเกลือที่ละลายได้ในปริมาณมากในดิน มีผลกระทบต่อพืช โดยเฉพาะการเจริญเติบโตและปริมาณผลผลิตที่ลดลง การปรับปรุงให้ดินไม่เค็มนั้นมีหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมคือการล้างเกลือและระบายเกลือออกจากดิน โดยให้ความเค็มลดลงจนกระทั่งสามารถปลูกพืชได้ ซึ่งวิธีการนี้มีค่าใช้จ่ายสูงและใช้เวลานาน (สมศรี, 2539) ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์อ้อยที่นิยมปลูกในปัจจุบันให้ทนเค็มจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะเพิ่มผลผลิตที่ง่ายที่สุดและประหยัดที่สุดสำหรับเกษตรกร และในแง่ของนักวิจัยจะใช้งบประมาณและเวลาในการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนเค็มได้ไม่นานนัก การสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) เป็นหนทางหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งวิธีที่ใช้ในการสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมเช่น การชักนำให้ก่อการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสี หรือการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระตุ้นให้เกิดความผันแปรในเนื้อเยื่อที่ได้ทำการเพาะเลี้ยง ซึ่งวิธีการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมเป็นอีกวิธีที่ได้รับความนิยม ซึ่งการใส่สารบางอย่างลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเช่น NaCl PEG สารป้องกันกำจัดวัชพืช หรือเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพที่ไม่เหมาะสมเช่น อุณหภูมิต่ำ หรือสูง ความเข้มข้นของแสง เป็นต้น เซลล์ที่รอดชีวิตในสภาพต่างๆที่ไม่เหมาะสมดังที่กล่าวมานั้นคาดว่าจะเกิดการพัฒนาเป็นต้นได้และสามารถเจริญเติบโตอยู่ในสภาวะเครียดนั้นได้ก็จะได้พืชที่ทนทานต่อสิ่งนั้นๆ ส่งผลให้ได้ผลผลิตของพืชสูงขึ้นด้วย

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

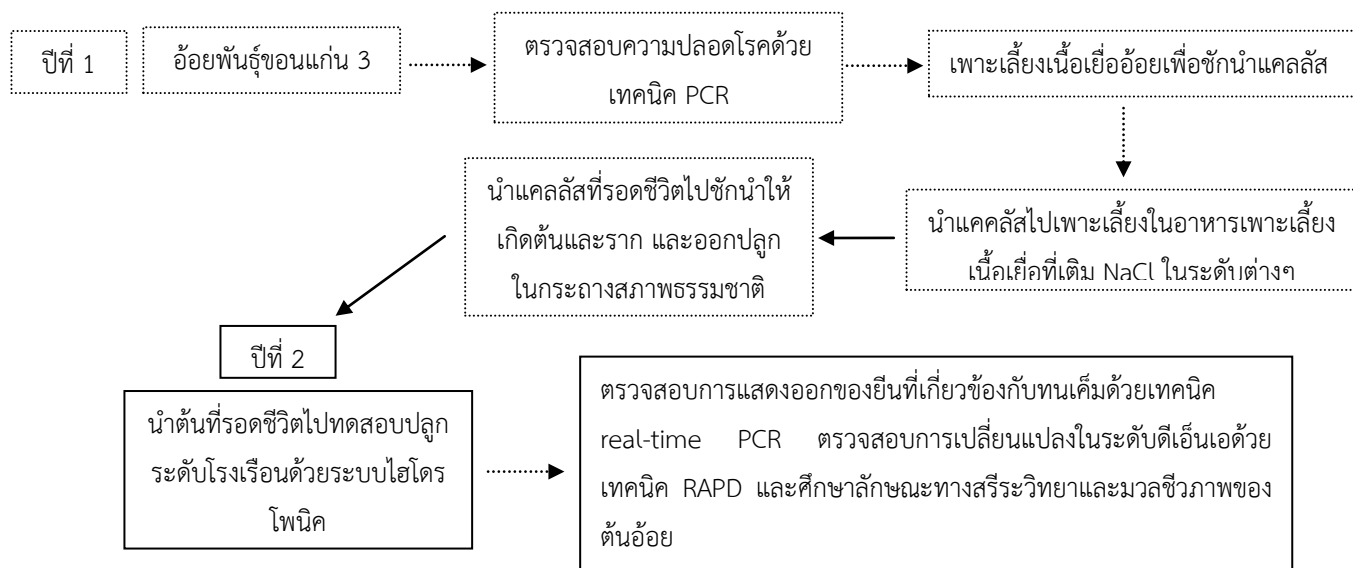
เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์อ้อยพันธุ์ใหม่ให้มีความทนทานต่อดินเค็มมากขึ้น และให้ผลผลิตสูง

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยในปีที่ 1 เป็นการหาเทคนิคที่จะได้ต้นอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ทนเค็ม โดยคัดเลือกต้นอ้อยที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติม NaCl โดยการนำเนื้อเยื่อส่วนใบม้วนอ่อนของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ปลอดโรคมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจนเกิดเป็นแคลลัส หลังจากนั้นย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติม NaCl ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำแคลลัสที่รอดชีวิตไปชักนำให้เกิดต้นและรากพร้อมทั้งนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

การวิจัยในปีที่ 1 เป็นการหาเทคนิคที่จะได้ต้นอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ทนเค็ม โดยคัดเลือกต้นอ้อยที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติม NaCl โดยการนำเนื้อเยื่อส่วนใบม้วนอ่อนของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ปลอดโรคมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจนเกิดเป็นแคลลัส หลังจากนั้นย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติม NaCl ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำแคลลัสที่รอดชีวิตไปชักนำให้เกิดต้นและรากพร้อมทั้งนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

การวิจัยในปีที่ 2 นำต้นที่ได้จากการวิจัยในปีที่ 1 มาทดสอบความทนเค็มในระดับโรงเรือนโดยการปลูกทดสอบในระบบไฮโดรโปนิกส์ที่เติมสารละลายที่มี NaCl ที่ระดับต่างๆ ดูการรอดชีวิต รวมทั้งมีการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนเค็มในอ้อยโดยใช้เทคนิค real-time PCR และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และดูลักษณะการเจริญเติบโต ลักษณะทางสรีระวิทยาและมวลชีวภาพของต้นอ้อยเทียบกับอ้อยพันธุ์เดิมที่ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และอ้อยที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ไม่ได้ผ่านการคัดเลือก



แผนภูมิแสดงขอบเขตและความเชื่อมโยงของขั้นตอนในของการวิจัย

4. ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้อยู่ภายใต้สมมติฐานที่ว่า การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น เป็นเทคนิคหนึ่งของการปรับปรุงพันธุ์พืชในห้องปฏิบัติการให้พืชเป็นลักษณะตามต้องการ การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะตามที่ต้องการนั้นเป็นการใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติของ totipotency ร่วมกับการทำให้เซลล์อยู่ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จะทำให้เซลล์ส่วนใหญ่ตายหรือไม่สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้ มีเพียงเซลล์ที่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมนั้น ๆ เท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนประชากรมากขึ้น และเมื่อนำต้นที่ทนเค็มนี้ไปขยายพันธุ์ก็จะมีลักษณะพันธุกรรมที่คงที่ ดังนั้นถ้านำพันธุ์อ้อยที่นิยมปลูกแต่ต้องการให้มีลักษณะทนเค็มอยู่ด้วยก็สามารถใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการให้ NaCl เพื่อสามารถคัดเลือกต้นอ้อยที่ทนเค็มได้ในห้องปฏิบัติการและนำมาทดสอบในระดับโรงเรือนแล้วเมื่อนำออกปลูกในระดับแปลงที่เป็นดินเค็มก็สามารถที่จะเจริญเติบโตให้ผลผลิตที่สูงกว่าต้นอ้อยที่ไม่ทนเค็ม

5. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากเป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นน้ำตาล ซึ่งประเทศไทยสามารถส่งออกน้ำตาลได้มากเป็นอันดับ 2 ของโลก รวมทั้งสามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้อีกด้วย โดยพื้นที่ปลูกอ้อยในปี 2259/60 มีถึง 10.9 ล้านไร่ โดยพันธุ์อ้อยที่เกษตรกรนิยมปลูกอย่างแพร่หลายเป็นอันดับหนึ่งของประเทศ คือพันธุ์อ้อยของกรมวิชาการเกษตร คือ อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ซึ่งพื้นที่ปลูกได้ขยายตัวครอบคลุมพื้นที่ 60-70% ของพื้นที่ปลูกอ้อยทั้งหมด เนื่องจากมีศักยภาพทั้งด้านการให้ผลผลิตสูง ทำให้เป็นที่ยอมรับและเกษตรกรมีความพึงพอใจมาก ส่งผลให้พื้นที่ปลูกมีแนวโน้มขยายตัวเพิ่มขึ้น ทั้งยังมีความหวานสูงโดยอ้อยปลูกมีความหวาน 14.3 ซีซีเอส อ้อยต่อมีความหวาน 15.9 ซีซีเอส ขึ้นอยู่กับระบบการจัดการดูแล นอกจากนี้ ยังออกดอกช้าทำให้น้ำหนักและความหวานไม่ลดลงช่วงปลายฤดูเก็บ และยังมีกาบใบหลวมช่วยให้เก็บเกี่ยวง่าย ขณะเดียวกันยังมีความต้านทานโรคเส้ดำ และทนแล้งด้วย หากได้รับผลกระทบจากปัญหาภัยแล้งจะฟื้นตัวได้เร็ว แต่ไม่สามารถทนเค็มได้ (วีระพล และคณะ, 2550)

ในอนาคตจะมีพื้นที่ปลูกอ้อยเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากรัฐบาลผลักดันนโยบายบริหารพื้นที่เกษตรกรรมของพืช (Zoning) โดยเปลี่ยนพื้นที่ปลูกข้าวที่อยู่ในพื้นที่ที่ไม่เหมาะสมไปสู่การปลูกพืชชนิดต่างๆรวมทั้งอ้อย ทั้งนี้ อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมให้ชาวนาหันมาปรับเปลี่ยนไร่นาเป็นไร่อ้อย เนื่องจากอ้อยสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วนเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่อุตสาหกรรมที่ต่อเนื่องได้ นอกจากจะผลิตเป็นน้ำตาลทรายแล้ว ยังนำผลพลอยได้จากการผลิตไปเป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอล เพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนและยังสามารถนำกากอ้อยไปเป็นเชื้อเพลิงผลิตกระแสไฟฟ้าหรือนำไปผลิตเป็นเยื่อกระดาษ ทำอาหารสัตว์ โดยพื้นที่ปลูกอ้อยทั้งประเทศในปีการผลิต 2559/2560 มีประมาณ 10.9 ล้านไร่ ซึ่งลดลงจากปี 2558/2559 ลง 0.22% เนื่องจากเกิดผลกระทบจากภัยแล้ง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ปลูกอ้อยมากที่สุดคือ 4,750,671 ไร่ ได้ผลผลิตเฉลี่ย 9.6 ตันต่อไร่ พื้นที่ปลูกรองลงมาคือภาคกลาง

3,061,101 ไร่ ภาคเหนือ 2,571,431 ไร่ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 605,286 ไร่ โดยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีผลผลิตต่อไร่ต่ำสุดคือ 9.10 ไร่ สำหรับใน จ.สระแก้วมีพื้นที่ปลูกอ้อย 406,649 ไร่ หรือคิดเป็น 67% ของพื้นที่ปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สระแก้วจึงนับเป็นจังหวัดที่มีพื้นที่ปลูกอ้อยมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและอันดับต้นๆของประเทศไทย แต่พบว่าผลผลิตต่อไร่อยู่ในระดับต่ำกว่าค่าเฉลี่ยของผลผลิตทั้งประเทศ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2560) สาเหตุที่สำคัญสองประการที่ทำให้ผลผลิตอ้อยในภาคตะวันออกเฉียงเหนืออยู่ในเกณฑ์ต่ำ คือ การขาดแคลนน้ำชลประทาน และพื้นที่ปลูกเป็นดินเค็ม โดยพื้นที่ดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือครอบคลุมพื้นที่ประมาณ 18 ล้านไร่ จัดเป็นพื้นที่ดินเค็มน้อยถึงปานกลางประมาณ 16.3 ล้านไร่ และเค็มจัดไม่สามารถปลูกพืชได้อีกประมาณ 1.5 ล้านไร่ และยังมีพื้นที่ที่มีศักยภาพแพร่กระจายดินเค็มอีกถึง 19.4 ล้านไร่ ซึ่งพื้นที่ดินเค็มเหล่านี้ส่งผลกระทบต่อผลผลิตอ้อยเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเกิดภาวะแห้งแล้งจะยิ่งทำให้ผลผลิตจากดินเค็มเพิ่มมากขึ้นด้วย

ปัญหาดินเค็มมีผลกระทบโดยตรงต่อการเกษตรทำให้การเจริญเติบโต ผลผลิต และคุณภาพของพืชลดลง ดินเค็ม (saline soil) เป็นดินที่มีเกลือที่ละลายน้ำได้ อยู่ในสารละลายดินมากจนมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายดิน (ECe) ที่สกัดจากดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำสูงกว่า 2 เดซีซีเมนต่อเมตร (dS/m) ที่อุณหภูมิ 25°C เปอร์เซ็นต์ของโซเดียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exchangeable Sodium percentage; ESP) น้อยกว่า 15 และ pH มักจะน้อยกว่า 8.5 หรืออยู่ในสภาพเป็นกลาง เกลือที่พบบ่อยเป็นเกลือคลอไรด์และซัลเฟตของโซเดียม แคลเซียม และแมกนีเซียม เนื่องจากผลของสารละลายเกลือในดินที่มีความเข้มข้นสูง จึงทำให้โครงสร้างของดินอยู่ในสภาพดี ทำให้ไม่มีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพต่างๆ ของดิน พืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการทนเค็มต่างกัน โดยมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวเนื่องกับการทนเค็มของพืชเช่น พันธุกรรมของพืช ชนิดของเกลือ สภาพแวดล้อม สภาพของดิน และช่วงระยะการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช พืชส่วนใหญ่มีผลผลิตลดลงเมื่อสารละลายดินมีค่าการนำไฟฟ้า (ECe) มากกว่า 2 dS/m พืชบางชนิดทนเค็มได้ถึง 4-8 dS/m แต่เมื่อระดับความเค็มสูงถึง 15 dS/m พืชเกือบทุกชนิดแสดงอาการที่ได้รับผลกระทบอย่างรุนแรง เมื่อพืชไม่ทนเค็มหรือทนเค็มน้อยได้รับผลกระทบจากความเค็มจะแสดงอาการคล้ายกับการที่พืชขาดน้ำ เช่น ชะงักการเจริญเติบโต ใบห่อลงเพื่อลดการคายน้ำทางปากใบ พืชบางชนิดอาจมีสีเขียวเข้มแกมน้ำเงิน (bluish green) มากกว่าพืชที่ขึ้นในดินปกติที่ปลูกในสภาพคล้ายคลึงกัน สีของใบพืชเปลี่ยนไปโดยจะเข้มกว่าปกติเนื่องจากใบมีคลอโรฟิลล์มาก และมีสารเคลือบใบ (cuticle) หนาเพื่อลดการสูญเสียน้ำ ขณะที่ในบางพืชอาจพบอาการปลายใบไหม้ (tip burn) เกิดจุดประ (mottles) บนใบ ใบม้วนและใบเหลืองเนื่องจากขาดคลอโรฟิลล์ ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ปลายใบและขอบใบแห้งกรอบ (กรมพัฒนาที่ดิน, ม.ป.ป.)

ตารางที่ 1.1 การจำแนกระดับความเค็มที่มีผลกระทบต่อพืช (FAO, 1976)

ค่าการนำไฟฟ้า (dS/m)	ระดับความเค็ม	อาการของพืช
น้อยกว่า 2	ไม่เค็ม	ไม่มีผลกระทบต่อพืช
2 – 4	เค็มน้อย	มีผลกระทบต่ออาการเจริญเติบโตของพืชไม่ทนเค็ม
4 – 8	เค็มปานกลาง	มีผลกระทบต่ออาการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด
8-15	เค็มมาก	เฉพาะพืชทนเค็มเท่านั้นจึงเจริญเติบโตให้ผลผลิตได้
มากกว่า 15	เค็มจัด	เฉพาะพืชทนเค็มจัดจึงเจริญเติบโตให้ผลผลิตได้

เมื่อพืชได้รับสภาพเครียดจากความเค็ม พืชจะมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะเครียดดังกล่าว ซึ่งกลไกที่ทำให้พืชปรับตัวและอยู่รอดได้ในสภาพเค็มในพืชมีหลายรูปแบบ เช่น

1) ความสามารถในการปรับตัวของเซลล์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิด ion homeostasis และการปรับลดค่าแรงดันออสโมติก โดยการสร้างสาร osmolytes เมื่อเผชิญกับความเครียดจากสภาวะเค็ม (Cavaliere, 1983) นอกจากนี้พืชยังมีกลไกการจับเก็บโซเดียมเข้าสู่แวคคิวโอล ต้องอาศัยการทำงานของตัวสูบโปรตรอน ได้แก่ vacuole (V-ATPase), plasma membrane (P-ATPase), vacuolar pyrophosphatase membrane (V-PPase) และ ขบวนการ secondary transport ได้แก่ Na^+/K^+ antiporter และ $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter (CAX)

2) ความสามารถในการควบคุม ซ่อมแซม หรือบรรเทาความเสียหายที่เกิดจากความเครียดจากสภาวะเค็ม ซึ่งมักพบในพืชที่มีถิ่นกำเนิดในสภาพที่เป็นดินเค็มหรือบึงน้ำเค็ม เช่น กลไกการขับเกลือส่วนเกินมาไว้ที่ผิวของใบโดยผ่านกระบวนการ ion exclusion หรือการกระจายเกลือไปเก็บไว้ตามส่วนต่าง ๆ ของพืช หรือการอวบน้ำ (succulent) พืชบางชนิดมี salt regulator ทำให้พืชดูดน้ำพองออก (swell) เมื่อเกลือเข้าไปในพืช ทำให้ความเข้มข้นของเกลือในเซลล์ไม่เพิ่มขึ้น หรือใบพืชมีสารเคลือบผิว (wax) เพื่อลดการสูญเสียน้ำ (Bradley and Morris, 1991)

3) กลไกการหลีกเลี่ยงเกลือ เพื่อให้เกลือเข้าไปในต้นได้น้อยที่สุด เพื่อให้พืชสามารถเจริญเติบโตในพื้นที่ดินเค็มได้ เช่น การยืดเวลาออกหรือเวลาแก่ หยุดกิจกรรมเพื่อการเจริญเติบโตจนกว่าสภาพแวดล้อมจะเหมาะสม (กรมพัฒนาที่ดิน, ม.ป.ป.)

กลไกที่แตกต่างกันเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าพืชมีวิวัฒนาการหลากหลายรูปแบบเพื่อให้สามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะที่มีเกลือสูง และสะท้อนให้เห็นว่ามียีนที่ควบคุมกลไกการทำงานเหล่านี้ด้วยเช่นกัน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย เริ่มต้นที่ฮาวายในปี ค.ศ. 1961 (Nickell, 1964) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพาเรโนโคมาจากลำต้นอ้อยพันธุ์ H50-7209 เพื่อให้เกิดแคลลัส เมื่อนำแคลลัสที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อให้เกิดเป็นเซลล์แขวนลอยแล้วแยกเซลล์แขวนลอยเดี่ยว ๆ มาเพาะเลี้ยงให้เจริญเป็นแคลลัส ปรากฏว่าแคลลัสเหล่านี้มีความแตกต่างกันทั้งการเจริญเติบโตและจำนวนโครโมโซม (Heinz and Mee, 1969) ในเวลาต่อมาจึงทราบว่าเซลล์ของอ้อยดังกล่าวประกอบด้วยเซลล์ที่มีความแปรปรวนในจำนวนโครโมโซม และพบว่าอ้อยพันธุ์ H50-7209 แต่ละต้นประกอบด้วยเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน เรียกว่า chromosome mosaic ซึ่งการค้นพบดังกล่าวเป็นจุดเริ่มต้นของความพยายามที่จะนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปใช้ในการสร้างสายพันธุ์ (subclones) เพื่อปรับปรุงลักษณะของอ้อย (Nickell, 1977)

Heinz and Mee (1969) รายงานว่า สามารถชักนำเนื้อเยื่ออ้อยให้เกิดแคลลัสได้ภายใน 2-4 สัปดาห์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Modified Murashige and Skoog (MS) ที่เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และฮอร์โมน 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่จะไม่มีการพัฒนาเป็นยอดหรือราก ส่วนการกระตุ้นให้แคลลัสเจริญไปเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ ทำได้โดยการย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี 2,4-D (ไพบูลย์และคณะ, 2524; Kharinarin *et al.*, 1996; Cuellar, 1997) โดยกระบวนการชักนำเนื้อเยื่อให้เกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นจะมีโอกาสทำให้อ้อยเกิดความผันแปรทางพันธุกรรมได้ (Larkin and Scowcroft, 1983)

กรีกและคณะ (2534) ทดลองเพาะเลี้ยงปลายยอดอ้อยในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ในสัดส่วนต่าง ๆ วางหลอดทดลองในเครื่องเขย่าชนิด gyratory shaker ที่หมุนด้วยอัตราเร็ว 2 รอบต่อนาทีและได้รับแสงตลอดเวลา พบว่า อาหารเหลวที่เติม BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำปลายยอดอ้อยให้เจริญแตกตาข้างและเริ่มแตกหน่อเล็ก ๆ 4-5 ยอดต่อชิ้นปลายยอด เมื่อหน่ออ้อยอายุ 50 วัน จะถูกตัดแยกไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมเพื่อเพิ่มปริมาณ จากนั้นย้ายลงอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร และ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้ต้นอ้อยแข็งแรง จากนั้นชักนำให้เกิดรากเป็นต้นที่สมบูรณ์ภายในเวลา 4 สัปดาห์บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

Gill *et al.* (2006) เพาะเลี้ยงส่วนใบอ่อนของอ้อยบนอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA, Kinetin และ BA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า อ้อยทั้ง 3 พันธุ์ สามารถพัฒนาเป็นยอดโดยไม่ผ่านแคลลัสบนอาหารที่เติม NAA และอ้อยพันธุ์ Coj83 เกิดยอดมากที่สุด 83.12 % บนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนอาหารที่มีแต่ Kinetin อย่างเดียว ไม่ชักนำให้เกิดยอด ยอดที่ได้จะพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ภายใน 6 สัปดาห์ บนอาหารสูตรเติมต้นอ้อยที่ได้จะถูกเพาะเลี้ยงจนแข็งแรงและย้ายปลูกลงดิน โดยอ้อยมีการเจริญเติบโตรวดเร็วและมีการแตกหน่อที่ดี

Tiel *et al.* (2006) ตัดส่วนลำต้นของอ้อยในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกเป็น 5 ชั้น ยาวขึ้นละประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า การเติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.5 μ M นาน 1 สัปดาห์ ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 61.9 % ซึ่งมากกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ และการเติมผงถ่านจะช่วยลดสารประกอบ phenolic และลดการสะสมของออกซิน ขึ้นส่วนในตำแหน่งที่ 1 และ 2 จากโคนต้น เมื่อชักนำให้เกิดแคลลัสแล้วจะพัฒนาให้ยอดจำนวนมากโดยเฉพาะในตำแหน่งที่ 1 ยอดที่เกิดขึ้นสามารถพัฒนารากและใบได้อย่างปกติ เมื่อนำอ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปปลูก พบว่า มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปกติ

Basnayake *et al.* (2011) ทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับชักนำแคลลัส การเพิ่มปริมาณและการชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ในอ้อย 16 พันธุ์ พบว่า มี 15 พันธุ์ ที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและชักนำแคลลัสให้เกิดต้นได้ และปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำแคลลัส ได้แก่ สภาวะแวดล้อมของการปลูก (ในสภาวะขาดน้ำเมื่อนำอ้อยมาชักนำแคลลัสจะได้ปริมาณแคลลัสเพียง 1.5 กรัมต่อชิ้น แต่ถ้าในสภาวะที่มีน้ำสมบูรณ์จะได้แคลลัสมากกว่า 35 กรัมต่อชิ้น) ควรเปลี่ยนอาหารให้เร็วขึ้นเพื่อลดการเกิดและสะสมสารฟีนอลิก (phenolic) ระดับความเข้มข้นระหว่างการชักนำให้เกิดต้น ความเข้มข้นของ 2,4-D สำหรับสูตรอาหารชักนำให้อ้อยแตกกอ ได้แก่ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.0225 มิลลิกรัมต่อลิตร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อคัดเลือกพืชทนเค็ม

การปรับปรุงพันธุ์ให้พืชมีความทนเค็มสามารถทำได้ทั้งในแปลงทดลองและห้องปฏิบัติการแต่การปรับปรุงพันธุ์พืชในระดับแปลงไม่สามารถควบคุมความสม่ำเสมอของความเค็มและสภาพแวดล้อมได้ การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอีกเทคนิคหนึ่งของการปรับปรุงพันธุ์ในห้องปฏิบัติการให้พืชเป็นลักษณะตามต้องการ การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์ เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะตามที่ต้องการนั้น เป็นการใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติของ totipotency ร่วมกับการทำให้เซลล์อยู่ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จะทำให้เซลล์ส่วนใหญ่ตายหรือไม่สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นได้ มีเพียงเซลล์ที่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมนั้น ๆ ได้เท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนประชากรมากขึ้น และถ้ามีการนำเทคนิคการก่อกลายพันธุ์เข้าร่วมกับการเพาะเลี้ยงเซลล์และการคัดเลือกเซลล์แล้ว จะเป็นการเพิ่มโอกาสที่จะคัดเลือกเซลล์ที่ต้องการได้มากขึ้น โดยประมาณกันว่าเซลล์แขวนลอยของข้าวหรือยาสูบปริมาตร 100 มิลลิลิตรจะมีเซลล์ประมาณ 10^7 - 10^8 เซลล์ที่เดียว และถ้าอัตราการกลายพันธุ์อยู่ในช่วง 10^{-6} - 10^{-7} ต่อเซลล์ ฉะนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะชักนำให้เซลล์เกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะที่ต้องการโดยใช้เซลล์แขวนลอยเพียง 100 มิลลิลิตร เทียบกับการทำให้เกิดการกลายพันธุ์กับเมล็ดซึ่งต้องใช้เมล็ด 10^7 เมล็ด และต้องปลูกในแปลง จึงเป็นการประหยัดทั้งแรงงานและเวลาลงอย่างมาก ยิ่งกว่านั้นการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังสามารถทำได้ตลอดทั้งปี ไม่ขึ้นกับฤดูกาล (Dodds and Roberts. 1982 ; Gamborg, O.L. and G.C. Phillips. 1995)

ธิตาพร และคณะ (2558) การพัฒนาวิธีการคัดพันธุ์อ้อยทนต่อสภาวะขังน้ำและสภาวะดินเค็มอย่างรวดเร็วในหลอดทดลองโดยใช้ต้นกล้าอ้อยพันธุ์ทนเค็ม K88-92 ต้นกล้าถูกเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติไม่มีการขังน้ำ และมีการเติมน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0, 50, 100 และ 150 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าปริมาณโซเดียมไอออนในส่วนต้นและใบเพิ่มขึ้นตามความเค็มของเกลือในสารละลายน้ำขังในขณะที่ปริมาณของโปแตสเซียมไอออนมีปริมาณลดต่ำลงคลอโรฟิลล์รวมในต้นอ้อยที่ได้รับน้ำเกลือมีค่าลดลง ส่งผลกระทบต่อการลดลงของอัตราการสังเคราะห์แสง

Di Cori et al., (2013) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นเมอร์เทิล (*Myrtus communis*) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติมเกลือ 0, 125 และ 250 mM เป็นเวลา 30 วัน พบว่าการเจริญเติบโตของต้นราก และปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับเกลือ

Shankhdhar et al., 2000 ศึกษาการเจริญของแคลลัสของข้าวจำนวน 6 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเติม NaCl ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 และ 2% เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl มากอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสก็จะลดลง และมีอัตราการเกิดต้นลดลงเมื่อเทียบกับแคลลัสที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงใน NaCl

Troncoso et al., 2008 คัดเลือกโอลิฟทนเค็มโดยการนำเอ็มบริโอของโอลิฟมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/3 MS ที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0 68.4 102.6 และ 136.9 mM พบว่าเอ็มบริโอที่ไม่ได้รับ NaCl มีการเติบโตเป็นต้นปกติได้ ส่วนเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม NaCl มีอัตราการเจริญ

เป็นต้นตอแต่ในระดับความเข้มข้นเดียวกันพบว่าการเจริญเติบโตต่างกันเป็นเพราะความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเอ็มบริโอ หลังจากนั้นนำส่วนต่างๆของต้นโอลีฟที่รอดจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม NaCl มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจาก NaCl เพื่อเพิ่มปริมาณต้น แล้วนำไปทดสอบในอาหารที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0, 34.2, 68.4, 102.6, 136.9, 171.1 และ 205.3 mM และนำต้นที่รอดชีวิตจากอาหารที่เติมเกลือ 205.3 mM ไปทดสอบในสภาพโรงเรือนต่อไป

Asad et al., n.d. ได้ปรับปรุงพันธุ์อ้อยและมันฝรั่งทนเค็มในประเทศปากีสถานด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา โดยนำแคลลัสอ้อยไปฉายรังสีที่ 20 40 และ 60 เกย์ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำแคลลัสเป็นเวลา 30 วันแล้วย้ายแคลลัสลงอาหารที่มี NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0 50 100 และ 200 mM เพื่อชักนำต้นพบว่าทุกความเข้มข้น (50 100 และ 200 mM) ถูกยับยั้งการชักนำต้น โดยความเข้มข้น 200 mM ถูกยับยั้งการเจริญของต้นมากที่สุด และเมื่อตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้นปกติกับต้นที่ชักนำได้จากอาหารที่เติม NaCl ด้วยเทคนิค RAPD พบว่าเกิด polymorphism ในส่วนของมันฝรั่งได้นำส่วนของต้นขนาดเล็กไปฉายรังสีที่ 20 เกย์ หลังจากนั้นนำมาชักนำต้นจากตาข้างในอาหารที่เติม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 50 100 150 และ 200 mM พบว่ามีการเกิดยอดใหม่ช้าและที่ความเข้มข้น 200 Mm ยอดตายและปริมาณลดลง

Shomeili et al. (2011) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ embryogenic calluses ของอ้อยพันธุ์ CP48-103 ในอาหารคัดเลือกที่เติม NaCl ที่ระดับ 0 0.2, 0.4, 0.6, และ 0.8% หลังจากนั้นคัดเลือกต้นอ้อยที่สามารถงอกจากแคลลัสมา 4 ต้นมาเพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรโพนิค ที่ความเข้มข้นของเกลือ 0 0.2, 0.4, 0.6, และ 0.8% พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงการเจริญของรากมากกว่าการเจริญของต้น ปริมาณคลอโรฟิลล์มีแนวโน้มลดลง การวิเคราะห์ด้านชีวเคมีพบว่าปริมาณ Cl^- และ Na^+ ในต้นและรากมีปริมาณเพิ่มขึ้น

Munir (2014) นำแคลลัสอ้อย 2 สายพันธุ์คือ SPF 234 และ HSF 240 ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NaCl เข้มข้น 0-160 mM เป็นเวลา 120 วัน พบว่าแคลลัสที่อยู่ในอาหารที่เติม NaCl เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล โดยจำนวนแคลลัสจะเป็นสีน้ำตาลมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ หลังจากนั้นย้ายแคลลัสลงสูตรอาหารชักนำต้น (MS + 8.87 μ M BAP + 0.5 μ M TDZ) แล้วดูเปอร์เซ็นต์ที่งอกเปรียบเทียบกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ พบว่าแคลลัสของพันธุ์ SPF 234 และ HSF 240 ที่เพาะเลี้ยงใน NaCl ความเข้มข้น 100 mM สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 82% และ 75% ตามลำดับ ส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงใน NaCl ความเข้มข้น 120 mM ทั้ง 2 พันธุ์สามารถชักนำให้เกิดต้นเหลือเพียงแค่ 10% และเมื่อตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ peroxidase, catalase and superoxide dismutase ของแคลลัสพบว่ามีค่าสูงกว่าแคลลัสที่ไม่ได้รับเกลือ

วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 (KK3)
2. อุปกรณ์สำหรับการทำเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
 - 2.1 เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ ปีกเกอร์ กระจกบดวง
 - 2.2 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
 - 2.3 ตู้อบ (hot air oven)
 - 2.4 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH - meter)
 - 2.5 เครื่องชั่งสาร (balance)
 - 2.6 เตาไมโครเวฟ (microwave)
 - 2.7 ตู้ laminar flow
 - 2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และเครื่องกวนตะกอน (vortex[®])
 - 2.9 ชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
 - 2.10 เครื่องปรับอากาศ (air conditioner)
 - 2.11 เครื่องเขย่า (shaker)
 - 2.12 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge)
 - 2.13 เครื่อง Thermal Cycler สำหรับทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)
 - 2.14 ชุดเครื่องมือ gel documentation system พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล
 - 2.15 ชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอเล็กโทรโพรสิส
 - 2.16 เครื่อง NanoDrop รุ่น 8000
3. สารเคมีสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
4. สารเคมีสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
5. สารเคมีตามสูตร Hoagland สำหรับการปลูกอ้อยในสารละลายแบบ hydroponic
6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
7. ไพรเมอร์สำหรับยีน *SecA*

วิธีการ

1. การชักนำต้นอ้อยทนมเค็ม

1.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย

นำปลายยอดอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มาตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะยีน *secA* ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยเท่านั้น นำปลายยอดปลอดโรคที่มีอายุ 6-7 เดือน มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายไฮเตอร์ 20 % และ 10% เติม Tween 20 1-2 หยด เขย่านาน 10 และ 5 นาที ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ลอกกาบใบออกจนเหลือใบม้วนชั้นในสุด ตัดเป็นชิ้นยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 10 % โดยปริมาตร pH 5.7 (สูตรชักนำแคลลัส) เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 2 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 15 วัน เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส

1.2 การคัดเลือกอ้อยที่ทนทานต่อดินเค็ม

ย้ายแคลลัสที่ได้จากข้อ 1.1 ลงเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0.5 0.75 และ 1.0% (W/V) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 สัปดาห์ เมื่อครบระยะเวลาในการคัดเลือกเซลล์จึงย้ายแคลลัสที่รอดชีวิตจากการคัดเลือกในอาหารที่มี NaCl ทั้ง 3 ระดับลงเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดต้นและราก

1.3 การชักนำให้เกิดต้น

แยกแคลลัสที่รอดชีวิต มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน เติมซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 10 % โดยปริมาตร pH 5.7 (สูตรชักนำต้น) เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 15-20 วัน บันทึกการเปลี่ยนแปลงทุก 2 สัปดาห์ ประมาณ 6 สัปดาห์จะได้ต้นจำนวนมาก

1.4 การชักนำให้เกิดราก

นำต้นอ้อยที่แข็งแรงมาแยกเป็นกลุ่มเล็ก ๆ ตัดใบออก เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่ปราศจากฮอร์โมน เติมซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร pH 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน (ในกรณีที่สูตรอาหารดังกล่าวไม่สามารถชักนำรากได้ให้ย้ายต้นอ้อยดังกล่าวลงเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) สังเกตจำนวนรากที่เกิดขึ้น โดยใช้ขวดเพาะเลี้ยงทรงสูงขนาดใหญ่ หรือใช้ ขวด 8 ออนซ์ ใส่อาหารเพาะเลี้ยงประมาณ 75 มิลลิตรต่อขวด

1.5 ปรับสภาพต้นอ้อยทนมเค็มสู่สภาพธรรมชาติ

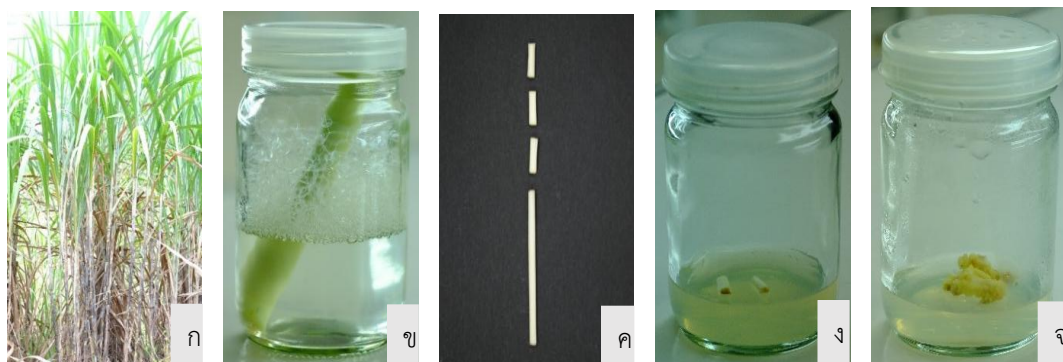
นำสายต้นเค็มที่อยู่ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาออกปลูกในกระถางไว้อย่างน้อยสายต้นละ 5 ต้น (เพื่อใช้สำหรับขยายพันธุ์เมื่อทราบผลการทดสอบการทนเค็มในสภาพ hydroponic แล้ว) รวมทั้งต้นกล้าอ้อยพันธุ์ดั้งเดิมคือ ขอนแก่น 3 ลงปลูกในกระบะเพาะกล้าที่มีวัสดุปลูกเป็นดิน

ผสมขุยมะพร้าว ชี้เถ้า แกลบ และปุ๋ยคอกในอัตราส่วน 1:1:1:1 จนกระทั่งมีอายุประมาณ 1.5 เดือน รดน้ำและให้ปุ๋ยโดยใช้สารละลายธาตุอาหาร Hoagland

ผลการวิจัย

การชักนำแคลลัสจากยอดอ่อนอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3

นำอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (ภาพที่ 1) โดยการนำยอดอ้อยมาลอกกาบใบออก จากนั้นนำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน และนำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลาย ไฮเตอร์® (ความเข้มข้น 20 และ 10 เปอร์เซ็นต์) ที่เติมน้ำยาล้างจาน 1-2 หยด เขย่าเป็นเวลา 10 นาที ทั้ง 2 ความเข้มข้น ล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้งๆ ละ 1-2 นาที ลอกกาบใบให้เหลือเพียงใบอ่อนชั้นในสุด ตัดเป็นชิ้นยาวขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร pH 5.7 และนำไปเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส จากนั้นคัดเลือกแคลลัสที่มีลักษณะสีขาวหรือขาวอมเหลืองเป็นก้อนกลมแน่นขนาดเล็ก ผิวแคลลัสเรียบ (compact callus) ไปใช้ในการคัดเลือกอ้อยทนเค็มต่อไป



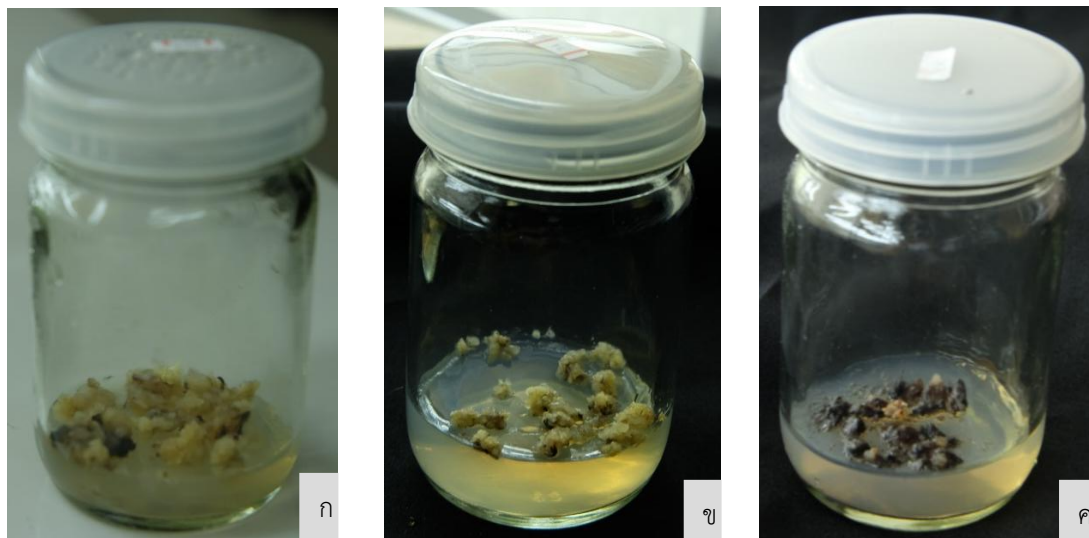
ภาพที่ 1 ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้ออ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3

- ก. ต้นอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่มีลักษณะ แข็งแรง ปราศจากโรคและแมลง
- ข. ยอดอ้อยที่ลอกกาบใบออกเพื่อทำการฟอกฆ่าเชื้อ
- ค. ใบอ่อนชั้นในสุดที่ลอกกาบใบออกและนำมาตัดเป็นชิ้นยาวขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร
- ง. วางใบอ่อนบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จ. แคลลัสที่ได้จากการชักนำจากใบอ่อน หลังเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์

การคัดเลือกแคลลัสอ้อยทนเค็มพันธุ์ขอนแก่น 3

นำแคลลัสที่ได้จากการชักนำ มาชั่งน้ำหนักแคลลัสให้มีก้อนขนาดประมาณ 0.5 กรัม มาคัดเลือกแคลลัสอ้อยทนเค็มโดยการนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร น้ำ

มะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และเติมเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.5 0.75 1 1.25 เปอร์เซ็นต์ และ ไม่เติมเกลือ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเกลือ มีจำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตสูงที่สุดและมีการเพิ่มปริมาณของแคลลัสด้วย ส่วนแคลลัสที่นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆพบว่ายิ่งความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นการรอดชีวิตของแคลลัสมีจำนวนลดลง โดยแคลลัสที่ตายจะเปลี่ยนเป็นสีดำทั้งก้อน



ภาพที่ 2 ลักษณะของแคลลัสเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 8 สัปดาห์

- ก. แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมเกลือ
- ข. แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมเกลือ 0.5 เปอร์เซ็นต์
- ค. แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมเกลือ 1.25 เปอร์เซ็นต์

นำแคลลัสที่รอดชีวิตและมีลักษณะเป็น compact callus มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมชูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และ น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร pH 5.7 เเพาะเลี้ยงในที่มืดสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดต้น (ภาพที่ 3) พบว่าเมื่อนำแคลลัสที่รอดชีวิตและมีลักษณะเป็นสีขาวครีมไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมเกลือ สามารถเจริญเติบโต และเกิดเป็นต้นได้ โดยแคลลัสที่รอดชีวิตจากสูตรอาหารที่ไม่เติมเกลือ สามารถชักนำให้เกิดต้นมากที่สุด ส่วนแคลลัสที่รอดชีวิตจากอาหารที่เติมเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆก็สามารถชักนำให้เกิดต้นได้เช่นกัน แต่ได้ต้นในปริมาณน้อย ดังภาพที่ 2 เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Shankhdhar et al., 2000 ศึกษาการเจริญของแคลลัสของข้าวจำนวน 6 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเติม NaCl ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl มากอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสก็จะลดลง และมีอัตราการเกิดต้น

ลดลงเมื่อเทียบกับแคลลัสที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงใน NaCl และงานวิจัยของ Munir (2014) นำแคลลัสอ้อย 2 สายพันธุ์คือ SPF 234 และ HSF 240 ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เต็ม NaCl เข้มข้น 0-160 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 120 วัน พบว่าแคลลัสที่อยู่ในอาหารที่เติม NaCl เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล โดยจำนวนแคลลัสจะเป็นสีน้ำตาลมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ หลังจากนั้นย้ายแคลลัสลงสูตรอาหารชักนำต้น (MS + 8.87 ไมโครโมลาร์ BAP + 0.5 ไมโครโมลาร์ TDZ) แล้วดูเปอร์เซ็นต์ที่งอกเปรียบเทียบกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ พบว่าแคลลัสของพันธุ์ SPF 234 และ HSF 240 ที่เพาะเลี้ยงใน NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 82 เปอร์เซ็นต์ และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงใน NaCl ความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์ ทั้ง 2 พันธุ์ สามารถชักนำให้เกิดต้นเหลือเพียงแค่ 10 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ peroxidase, catalase and superoxide dismutase ของแคลลัสพบว่ามีความสูงกว่าแคลลัสที่ไม่ได้รับเกลือ

นำแคลลัสที่รอดชีวิตและมีลักษณะเป็น compact callus มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และ น้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร pH 5.7 เพาะเลี้ยงในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดต้น (ภาพที่ 3) พบว่าเมื่อนำแคลลัสที่รอดชีวิตและมีลักษณะเป็นสีขาวครีมไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมเกลือ สามารถเจริญเติบโต และเกิดเป็นต้นได้ โดยแคลลัสที่รอดชีวิตจากสูตรอาหารที่ไม่เติมเกลือสามารถชักนำให้เกิดต้นมากที่สุด ส่วนแคลลัสที่รอดชีวิตจากอาหารที่เติมเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆก็สามารถชักนำให้เกิดต้นได้เช่นกัน แต่ได้ต้นในปริมาณน้อย

4.2.2 การคัดเลือกต้นอ้อยทนเค็มพันธุ์ขอนแก่น 3

นำต้นอ้อยที่ชักนำได้จากแคลลัสที่รอดชีวิตในข้อ 4.2.1 มาเพาะเลี้ยงใน สูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนต้น (ภาพที่ 3, ข) เพื่อนำไปคัดเลือกต้นอ้อยทนเค็มซ้ำ



ภาพที่ 3 การเพิ่มจำนวนต้น

- ก. ต้นอ้อยที่ได้จากการชักนำจากแคลลัสที่ทนเกลือความเข้มข้น 1%
- ข. ต้นอ้อยที่ได้จากการเพิ่มจำนวนต้นใน สูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์เพื่อเพิ่มจำนวนต้น

นำต้นอ้อยที่ได้จากการเพิ่มจำนวนย้ายลงในอาหารสูตร MS ที่เติมชูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และ น้ำมะพร้าว 10 % โดยปริมาตร pH 5.7 และเติมเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ซ้ำ (ดังตารางที่ 1) พบว่านำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือที่ความเข้มข้นที่ 0 เปอร์เซ็นต์ มีการเกิดต้นได้สูง และนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นการชักนำให้เกิดเป็นต้นลดลง แต่สามารถเกิดเป็นต้นได้

ตารางที่ 2 การคัดเลือกต้นอ้อยที่พัฒนาจากแคลลัสที่ทนทานต่อเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0 0.6 0.7 0.8 0.9 1 1.1 1.2 1.3 1.4 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

ความเข้มข้น ของเกลือที่ใช้ คัดเลือก แคลลัสอ้อย ทนเค็ม(%)	ความเข้มข้น ของเกลือที่ใช้ คัดเลือกต้น อ้อยทนเค็ม (%)	ความยาวราก เฉลี่ย	ความยาวลำต้น เฉลี่ย	ความยาวใบ เฉลี่ย	จำนวนต้น เฉลี่ย
0.5	0.6	1.14	3.19	8.6	6.85
	0.7	1.13	3.16	6.84	6.11
	0.8	1.13	2.71	5.67	5.83
0.75	0.8	1.11	2.45	5.05	3.15
	0.9	0.83	1.92	4.58	2.5
	1	0.63	0	2.62	0
1	1.1	0	1.64	2.55	0
	1.2	0.43	1	2.31	0
	1.3	0	0.9375	2.25	0
1.25	1.3	0.31	0.86	1.93	0
	1.4	0	0.75	1.75	2
	1.5	0	0.72	1.67	0

จากผลการทดลองเมื่อนำต้นที่ชักนำได้จากแคลสที่รอดชีวิตแล้วนำมาคัดเลือกซ้ำในอาหารที่เติมเกลือความเข้มข้นต่างๆแล้วนำมาวัดการเจริญเติบโตของราก ลำต้น ใบ และจำนวนกอนที่เกิดขึ้น ความยาวรากมีค่าเฉลี่ยเป็น 0 เนื่องจากนำต้นอ้อยที่ได้จากการคัดเลือกแคลสอ้อยทนเค็ม มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นที่สูงขึ้นจึงทำให้ต้นอ้อยมีการป้องกัน จากการรอดชีวิตจึงไม่มีการสร้างราก

ความยาวราก

จากการคัดเลือกอ้อยทนเค็มรอบที่ 2 นำต้นอ้อยมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมความเข้มข้น เกลือสูงขึ้น ที่ความเข้มข้นต่างๆ 0.6 0.7 0.8 0.9 1 1.1 1.2 1.3 1.4 และ 1.5 เติมซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และ น้ำมะพร้าว 10 % พบว่านำต้นอ้อยมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือความเข้มข้น 0.6 % มีความยาวรากสูงสุด (ภาพที่ 4.5) สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Linand Kao 1996) พบว่าปริมาณ ของโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของรากข้าวโดยทำให้รากข้าวชะงักการเจริญเติบโต และมีการสะสมปริมาณของโพรลีนในรากข้าวเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ (Laloknam et al., 2008) เมื่อ สารละลายในดินมีความเข้มข้นของไอออนสูง พืชจะดูดและสะสมไอออนเหล่านั้นจนถึงระดับเป็นพิษและมี ผลโดยตรงต่อสรีรวิทยาของพืช เมื่อพืชได้รับโซเดียมคลอไรด์ความเค็มของเกลือจะทำให้พืชดูดสะสม ไอออน ผลที่เกิดส่วนใหญ่เกิดจากความเค็มของโซเดียมและคลอไรด์ที่มีมากเกินไปหรือทำให้พืชขาดน้ำ เนื่องจากเกลือเข้าไปมากเกินไปแต่พืชก็จะมีกรรมวิธีในการบรรเทาอาการเป็นพิษจากเกลือโดยการขับ เกลือออกทางรากหรือเก็บไว้ในแวคิวโอล นอกจากนี้การงอกของรากห่อมใหญ่และถั่วเขียวจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้น

ความยาวลำต้น

จากการคัดเลือกอ้อยทนเค็มรอบที่ 2 นำต้นอ้อยมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมความเข้มข้นเกลือสูงขึ้น ที่ความเข้มข้นต่างๆ 0.6 0.7 0.8 0.9 1 1.1 1.2 1.3 1.4 และ 1.5 เติมซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และ น้ำมะพร้าว 10 % พบว่านำต้นอ้อยมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือความเข้มข้น 0.6 % มีความยาวลำต้นสูงสุด (ภาพที่ 4.6) สอดคล้องกับงานวิจัยของ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2539) ความเค็มมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของพืชโดยเมื่อความเค็มเพิ่มขึ้นการของพืชจะลดลง เนื่องจากความเค็มจะมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของพืชในหลายๆ ด้าน เช่น มีผลทำให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชลดลง นอกจากนี้ความเค็มยังมีผลต่อการหายใจของพืชทำให้การเจริญเติบโตของพืชถูกจำกัดเพราะมีการหายใจมากขึ้นหรือมีการใช้สารจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงมากขึ้น และยังพบว่าความเค็มจะทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมเปลี่ยนแปลงไป คือยับยั้งการดูดธาตุอาหารอื่นๆ ซึ่งมีผลต่อสมดุลของประจุที่ทำให้เกิดความเค็ม โดยพบว่าความสมดุลระหว่างธาตุโซเดียมกับโพแทสเซียมในสภาพที่มีความเค็มสูงจะเป็นแบบหักล้างกัน คือเมื่อปริมาณประจุชนิด

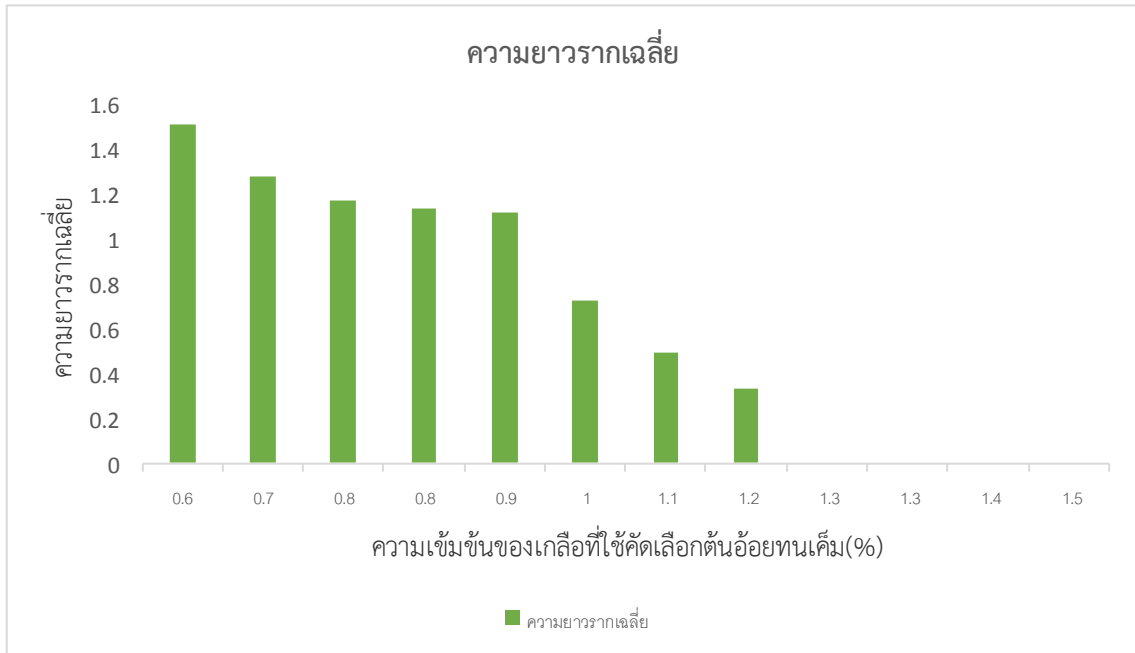
หนึ่งเพิ่มขึ้นจะทำให้การดูดซึมประจุอีกชนิดหนึ่งลดลง เมื่อพืชมีการดูดโซเดียมเข้าไปมากจึงทำให้พืชไม่สามารถใช้โพแทสเซียมได้เต็มที่

ความยาวใบ

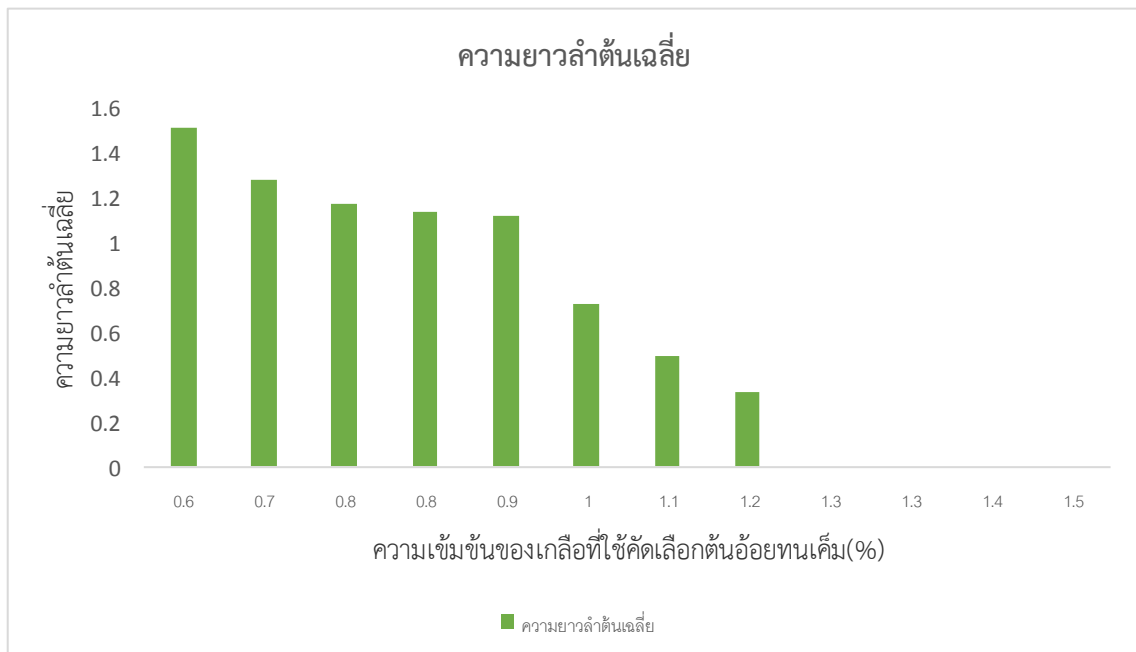
จากการคัดเลือกอ้อยทนเค็มรอบที่ 2 นำต้นอ้อยมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมความเข้มข้นเกลือสูงขึ้น ที่ความเข้มข้นต่างๆ 0.6 0.7 0.8 0.9 1 1.1 1.2 1.3 1.4 และ 1.5 เดิม ซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และ น้ำมะพร้าว 10 % พบว่านำต้นอ้อยมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือความเข้มข้น 0.6 % มีความยาวใบสูงสุด (ภาพที่ 4.7) สอดคล้องกับงานวิจัยของ (McKersie และ Leshem, 1994 และ Taiz และ Zeiger, 1991) นอกจากนี้ไอออนที่สะสมในส่วนต่างๆ ของเซลล์พืชขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ โปรตีน ยับยั้งการแบ่งเซลล์ และการจัดเรียงตัวของเซลล์ ผิดปกติ ปลายยอดไหม้ ใบต่าง ใบไหม้ และต้นพืชตายในที่สุด

จำนวนต้น

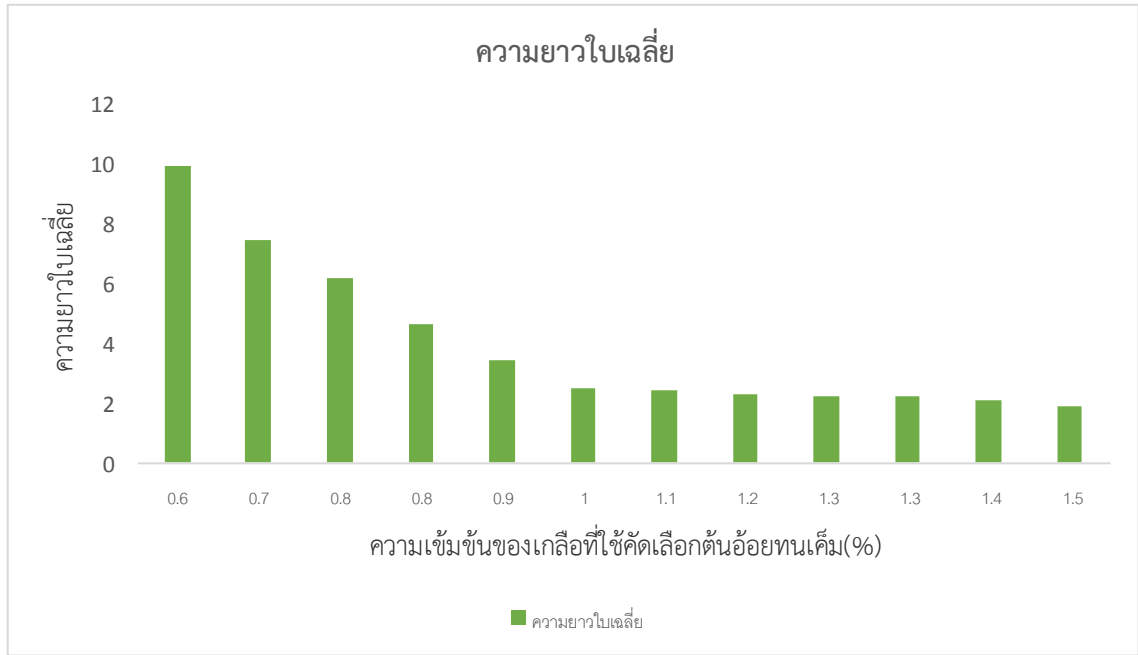
จากการคัดเลือกอ้อยทนเค็มรอบที่ 2 นำต้นอ้อยมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมความเข้มข้นเกลือสูงขึ้น ที่ความเข้มข้นต่างๆ 0.6 0.7 0.8 0.9 1 1.1 1.2 1.3 1.4 และ 1.5 เดิม ซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และ น้ำมะพร้าว 10 % พบว่านำต้นอ้อยมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือความเข้มข้น 0.6 % มีจำนวนต้นสูงสุด (ภาพที่ 4.8) สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Diana et al., 2013) พืชที่อยู่ในภาวะเค็มจะมีการสะสมโซเดียมไอออน และคลอไรด์ไอออน ในลา ต้นปริมาณมากขึ้น ซึ่งจะรบกวนการสะสมธาตุอื่น ๆ ที่จำ เป็นต่อการเจริญเติบโต จากผลการทดลองพบว่าต้นที่เพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นต่างๆจะมีการเจริญเติบโต ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงใน เกลือที่มีความเข้มข้นเกลือสูงแต่ก็พบว่ามีต้นที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่เกลือมีความเข้มข้นสูง



ภาพที่ 4 ค่าแสดงความยาวรากเฉลี่ยในการทดสอบการทนเค็มของอ้อย พันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ความเข้มข้นต่าง



ภาพที่ 5 ค่าแสดงความยาวลำต้นเฉลี่ยในการทดสอบการทนเค็มของอ้อย พันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 6 ค่าแสดงความยาวใบเฉลี่ยในการทดสอบการทนเค็มของอ้อย พันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

วิจารณ์ผลการวิจัย

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย แต่ก็พบว่าพื้นที่ปลูกอ้อยมีปัญหาดินเค็มและอ้อยเป็นพืชที่ไม่ทนต่อดินเค็ม ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนเค็มก็เป็นอีกหนทางในการแก้ปัญหา การคัดเลือกอ้อยทนเค็ม โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพจึงช่วยเพิ่มโอกาสที่จะประสบความสำเร็จได้มากขึ้นและเร็วขึ้น งานวิจัยนี้จึงประยุกต์เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการคัดเลือกเซลล์อ้อยให้ทนต่อความเค็ม โดยเพาะเลี้ยงใบอ่อนของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ให้เกิดแคลลัส จากนั้นคัดเลือกแคลลัสบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ความเข้มข้น 0 0.5 0.75 1.0 และ 1.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 เดือน นำแคลลัสที่รอดชีวิตมาชักนำให้เกิดต้น พบว่าสามารถชักนำต้นอ้อยที่ได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือทุกความเข้มข้น แต่จำนวนการเกิดต้นไม่เท่ากันโดยยังมีความเข้มข้นของเกลือสูงอัตราการเกิดต้นจากแคลลัสก็จะลดน้อยลงเนื่องจากไม่สามารถทนความเค็มได้เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Shankhdhar et al., 2000 ศึกษาการเจริญของแคลลัสของข้าวจำนวน 6 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเติม NaCl ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl มากอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสก็จะลดลง และมีอัตราการเกิดต้นลดลงเมื่อเทียบกับแคลลัสที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงใน NaCl และงานวิจัยของ Munir (2014) นำแคลลัสอ้อย 2 สายพันธุ์คือ SPF 234 และ HSF 240 ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NaCl เข้มข้น 0-160 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 120 วัน พบว่าแคลลัสที่อยู่ในอาหารที่เติม NaCl เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล โดยจำนวนแคลลัสจะเป็นสีน้ำตาลมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ หลังจากนั้นย้ายแคลลัสลงสูตรอาหารชักนำต้น (MS + 8.87 ไมโครโมลาร์ BAP + 0.5 ไมโครโมลาร์ TDZ) แล้วดูเปอร์เซ็นต์ที่งอกเปรียบเทียบกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติ พบว่าแคลลัสของพันธุ์ SPF 234 และ HSF 240 ที่เพาะเลี้ยงใน NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 82 เปอร์เซ็นต์ และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นนำต้นอ้อยมาคัดเลือกซ้ำอีกรอบโดยนำต้นอ้อยที่ได้จากการชักนำจากแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้นต่างๆมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS และเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl ให้สูงขึ้น โดยเพาะเลี้ยงในอาหารคัดเลือกจนกระทั่งต้นอ้อยที่เป็นชุดควบคุมที่เติม NaCl ในทุกความเข้มข้นตาย พบว่าอ้อยที่ใช้จากการคัดเลือกเซลล์สามารถเจริญเติบโตแตกหน่อในอาหารที่เติม NaCl สูงสุด 1.5 เปอร์เซ็นต์ได้ แต่จำนวนต้นที่ได้ก็จะจำนวนลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้น การทดลองต่อไปจะเป็นการนำต้นอ้อยที่รอดชีวิตออกมาปรับสภาพเพื่อออกปลูกในสภาพธรรมชาติ และตรวจสอบการแสดงออกของยีนและลักษณะทางสรีระวิทยา

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลการคัดเลือกแคลลัสและต้นอ้อยทนเค็มจากอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 โดยการนำไปอ่อนไปชักนำให้เกิดแคลลัส แล้วนำแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ความเข้มข้น 0 0.5 0.75 1 1.25 เปอร์เซ็นต์ และไม่เติมเกลือ พบว่าแคลลัสที่รอดชีวิตสามารถนำไปชักนำให้เกิดต้นได้ และเมื่อนำต้นอ้อยที่ชักนำได้จากแคลลัสไปคัดเลือกบนอาหารที่เติมเกลืออีกรอบ โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือให้สูงขึ้นพบว่าต้นสามารถเจริญเติบโตได้ แต่ต้นอ้อยที่นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม NaCl ที่ความเข้มข้นที่ต่ำต้นอ้อยสามารถเจริญได้ดีกว่าต้นอ้อยที่นำไปเลี้ยงในอาหารที่เติม NaCl ที่สูงและยังมีต้นอ้อยที่รอดชีวิตได้

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป -

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติ และนานาชาติ
อยู่ระหว่างการเขียน เรื่อง การคัดเลือกแคลลัสและชักนำให้เกิดต้นอ้อยทนเค็มจากอ้อยพันธุ์
ขอนแก่น 3
2. การจดสิทธิบัตร -
3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ ขาย/ ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดย
ภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป -
4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น) -

รายงานการเงิน

โครงการ สัญญาเลขที่ 4.2/2562 โครงการวิจัยประเภท งบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล
(งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาเทคนิคการคัดเลือกเซลล์สำหรับอ้อยทนเค็มร่วมกับการใช้เทคนิคทางอณูวิทยา

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน อ.ชนากานต์ ลักษณะ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ต.ค. 61 ถึงวันที่ 30 ก.ย. 62

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ต.ค. 61 ถึงวันที่ 30 ก.ย. 62

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 175,050 บาท เมื่อ วันที่ 31 ตุลาคม 2561

งวดที่ 2 (40%) 140,040 บาท เมื่อ วันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2562

งวดที่ 3 (10%) 35,010 บาท ยังไม่ได้รับ

รวม 350,100บาท

รายจ่าย รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	35,010	35,010	-
2. ค่าจ้าง	-	-	-
3. ค่าวัสดุ	128,640	128,640	-
4. ค่าใช้สอย	151,350	151,350	-
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ ค่าธรรมเนียมอุดหนุน สถาบัน (10%)	35,010	35,010	-
รวม	350,100	350,100	-

(นางสาวชนากานต์ ลักษณะ)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาที่ดิน. ม.ป.ป.พืชทนเค็มและพืชชอบเกลือ. แหล่งที่มา
http://www.ddd.go.th/Lddwebsite/web_ord/Technical/pdf/P_Technical03001_3.pdf , 28มกราคม 2557.
- กรีก นฤทุม, เกษม สุขสถาน, วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล, อิศรา สุขสถาน, รงรอง วิเศษสุวรรณ, ศิริวรรณ บุรีคำ, สุภาพร กลิ่นคง และมณฑา สุริยะไชยากร. 2534. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์. รายงานผลการวิจัย สถาบันวิจัยแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 11 น.
- ธิดาพร เกื่อนเกา, คัทรินทร์ ธีระวิทย์, ฐาปนีย์ สามพุ่มพวง, รุจิรา ทิศารัมย์, อุษณีย์ พิษกรรม สุริยันตร์ ฉะอุ่ม และ เฉลิมพล เกิดมณี. 2558. การพัฒนาวิธีการคัดพันธุ์อ้อยทนต่อสภาวะข้งน้ำและสภาวะดินเค็มอย่างรวดเร็วในหลอดทดลอง. *Proceedings of the 9th Botanical Conference of Thailand*.
- ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา, บุญเลิศ โพธิ์เจริญ และอุทัย จารณศรี. 2524. การเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยในสภาพปลอดเชื้อ: I. อิทธิพลของสารเร่งการเจริญเติบโตต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อ. รายงานผลการวิจัย สถาบันวิจัยแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 8 น.
- ภัทรชาติ พิทักษ์พลรัตน์. 2544. การโคลนและวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะในโคลนพันธุ์อ้อยทนเค็ม. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 87 น.
- ภวินท์ พานิชพรพันธุ์. 2554. การโคลน การหาลำดับเบสและการแสดงออกของยีน *SoNHX1* ที่ตอบสนองต่อสภาพสภาวะทนเค็มจากอ้อย. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 93 น.
- วรัญญา สীগัน. 2546. การโคลนและการหาลำดับเบสของยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดจากสภาวะความเครียดในอ้อย. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์ธุรกิจ), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 77 น.
- วีระพล พลรักดี, ทักษิณา ศันสยะวิชัย, เทวา เมลลานนท์, ปรีชา กาเพชร, นฤทัย วรสถิตย์, อิศระ พุทธสีมา, และ อุดม เลียบวัน. 2550. ขอนแก่น 3 :พันธุ์อ้อยที่เหมาะสม สำหรับภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น กรมวิชาการเกษตร.สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2559. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยปีการผลิต 2558/59. แหล่งข้อมูล:
<http://www.ocsb.go.th/upload/OCSBActivity/fileupload/8071-2689.pdf>
- สมศรี อรุณินท์. 2539. ดินเค็มในประเทศไทย. กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2560. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยปีการผลิต 2559/60. แหล่งข้อมูล:
<http://www.ocsb.go.th/upload/OCSBActivity/fileupload/8071-2689.pdf>
- Abdul, W.L., A. Rao and E. Rasul. 1997. Identification of salt tolerance traits in sugarcane lines. *Field Crops Res.* 54: 9-17.
- Asad, S, M.J. iqbal, M. saif-ur-rasheed,y. Zafar, K.A. Malik. N.d. Development of salt tolerant potato and sugarcane through *in vitro* techniques. Plant Biotechnology Division National Institute of Biotechnology and Genetic Engineering Faisalabad, Pakistan.
- Ashraf, M., H.R. Athar, P.J.C. Harris and T.R. Kwon. 2008. Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Adv. Agron.* 97:45-110.
- Ashraf, M. and N.A. Akram. 2009. Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: An analytical comparison. *Biotech. Adv.* 27: 744-752.
- Basnayake, S.W.V., R. Moyle and R.G. Birch. 2011. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. *Plant Cell Rep.* 30: 439-448.
- Bradley, P.M. and J.T. Morris. 1991. Relative importance of ion exclusion, secretion and accumulation in *Spartina alterniflora* Loisel. *J. Exp. Bot.*, 42: 1525–1532.
- Cavaliere, A.J. 1983. Proline and glycine betaine accumulation by *Spartina alterniflora* Loisel in response to NaCl and nitrogen in a control environment. *Oecologia* 57: 20–24.
- Chaugool, J., H. Naito, S. Kasuga and H. Ehara. 2013. Comparison of young seedling growth and sodium distribution among *Sorghum* plants under salt stress. *Plant Prod. Sci.* 16: 261-270.
- Chen, M., Q.Y. Wang, X.G. Cheng, Z.S. Xu, L.C. Li, X. G. Ye, L.Q. Xia and Y.Z. Ma. 2007. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochem. and Biophysic. Res. Com.* 353 : 299–305.
- Cheng, N.H., J.K. Pittman, B.J. Barkla, T. Shigaki and K.D. Hirschi. 2003. The *Arabidopsis cax1* mutant exhibits impaired ion homeostasis, development,

- and hormonal responses and reveals interplay among vacuolar transporters. *The Plant Cell* 15:347–364.
- Cheng, N.H., J.K. Pittman, J.K. Zhu and K.D. Hirschi. 2004. The protein kinase SOS2 activates the Arabidopsis H^+/Ca^{2+} antiporter CAX1 to integrate Ca transport and salt tolerance. *J. Biol. Chem.* 279: 2922–2926.
- Cong, L., T.Y. Chai and Y.X. Zhang. 2008. Characterization of the novel gene *BjDREB1B* encoding a DRE-binding transcription factor from *Brassica juncea* L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371:702–706.
- Cuellar, J.M. 1997. *In vitro* test for the vegetative propagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from young leaves. *Agrono. Mesoamericana*. 8: 74-80.
- Cushman, M.A., D.D. Bufford, M. Fredrickson, A. Ray, I. Akselrod, D. Landrith, L. Stout, J. Macroco and J. Cushman. 1999. An expressed sequence tag (EST) database for the common ice plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* 120: 145-150.
- Diana, K., Rop, B., & Jelte, R. (2013). Salt tolerance in the halophyte *Salicornia dolichostachya* Moss: Growth, morphology and physiology. *Environmental and Experimental Botany*, 92, 32-42.
- Di Cori, P., S. Lucioli, A. Frattarelli, P. Nota, E. Tel-Or, E. Benyamini, H. Gottlieb, E. Caboni, C. Forni. 2013. Characterization of the response of *in vitro* cultured *Myrtus communis* L. plants to high concentrations of NaCl. *Plant Physiology and Biochemistry* 73 (2013) 420e426
- Dodds, J.H and L. w. Roberts. 1982. *Experiment in Plant Tissue Cultures*. Cambridge University Press, London.
- Dubcovsky, J., G.S. Maria, E. Epstein, M.C. Luo and J. Dvorak. 1996. Mapping of the K^+/N^+ discrimination locus *Kna1* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 92: 448-454.
- FAO. n.d. Crop salt tolerance data. Available at <http://www.fao.org/docrep/005/y4263e/y4263e0e.htm>, January 28, 2014.
- Fayez, K.A. and S.A. Bazaid 2014. Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. *J. Saudi Soc. Agri. Sci.*, 13:45 –55.

- Flowers, T.J., M.L. Koyama, S.A. Flowers, C.Suchakar, K.P.Singh and A.R. Yeo. 2000. QTL: Their place in engineering tolerance of rice to salinity. *J. Exp. Bot.* 51: 99-106.
- Fooland, M.R. and F.Q. Chen. 1998. RAPD markers associated with salt tolerance in an inter specific cross of tomato. *Plant Cell Rep.* 17: 306-312.
- Gamborg, O.L. and G.C. Phillips. 1995. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture : Fundamental Methods.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Gill, R., P.K. Malhotra and S.S. Gosal. 2006. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. *Plant Cell Tiss. and Organ Cult.* 84: 227-231.
- Heinz, J.D. and G.W.D. Mee. 1969. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop Sci.* 9: 346-348.
- Kamiya, T. and M. Maeshima. 2004. Residues in Internal Repeats of the Rice Cation/H⁺ Exchanger Are Involved in the Transport and Selection of Cations. *The Journal of Biological Chemistry.* 279: 812–819.
- Kamiya, T., T. Akahori, M. Ashikari and M. Maesshima. 2005. Expression of the vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger, *OsCAX1a*, in rice: cell and age specificity of expression and enhancement by Ca²⁺. *Plant Cell Physiol.* 47:96–106.
- Kharinarain, R.P., Y.I. Dolgikh and Y.L. Guzhov. 1996. Selection of media for mass regeneration of sugarcane plants from callus culture. *Rus. J. Plant Physiol.* 43: 97-100.
- Knight, H., A.J. Trewavas and M.R. Knight. 1997. Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.* 12: 1067–1078.
- Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft. 1983. Somaclonal variation and eyespot toxin tolerance in sugarcane. *Plant Cell Tiss. and Organ Cult.* 2: 111-122.
- Lata, C and M. Prasad. 2011. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *J. Exp. Bot.* 1-18.
- Martins, F., C. C. Conde., M. Sottomayor and H. Gero. 2017. The grapevine VvCAX3 is a cation/H⁺ exchanger involved in vacuolar Ca²⁺ homeostasis Viviana. *Planta.* 246:1083–1096.
- McKersie, B.D. and Y.Y. Leshem, 1994. *Stress and stress coping in cultivated plants.* Kluwer Academic Publishers, Netherland.

- Mendoza, I., F. Rubio, A. Rodriguez-Navarro, and, J.M. Prado. 1994. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269: 8792–8796.
- Munir, N. 2014. Biochemical characterization of *in vitro* salt tolerant cell lines and regenerated plants of sugarcane (*saccharum* spp. *hybrid*). Department of botany university of the Punjab lahore, Pakistan.
- Nickell, L.G. 1964. Tissue and cell culture of sugarcane another research tool. *Hawaii Planters Rec.* 57: 223-229. 1977. Crop improvement in sugarcane studies using *in vitro* method. *Crop Sci.* 17: 717-719.
- Rasi-Caldogno, F., A. Carnelli and M.I. De Michelis. 1995. Identification of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase and of its autoinhibitory domain. *Plant Physiol.* 108: 105-113.
- Senadheera, P., R. K. Singh and F. J. M. Maathuis. 2009. Differentially expressed membrane transporters in rice roots may contribute to cultivar dependent salt tolerance. *J. of Experimental Botany.* 60: 2553–2563.
- Shomeili M., M. nabipour, M. Rbashee, H. Rajabimemari. 2011. Evaluation of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) So;maclonals Tolerance to Salinity Via In Vitro and In Vivo. *HAYATI Journal of Biosciences.* 18(2) : 91-96.
- Xianjun, P., M. Xingyong , F. Weihong , S. Man , C. Liqin , I. Alam , B.H. Lee , Q. Dongmei , S. Shihua and L. Gongshe. 2011. Improved drought and salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* by transgenic expression of a novel DREB gene from *Leymus chinensis*. *Plant Cell Rep.* 30(8):1493-502.
- Yamaguchi-Shinozaki, K and K. Shinozaki. 2009. DREB Regulons in Abiotic-Stress-Responsive Gene Expression in Plants. *Molecular Breeding of Forage and Turf.* 15-28.
- Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 66–71.