รายงานแผนงานวิจัย

การศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

Biotechnology Research and Development

ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์

Mrs. Hathairat Urairong

ปี พ.ศ. 2553

คำปรารภ

ประเทศต่างๆ ทั่วโลก ทั้งที่พัฒนาแล้วและกำลังพัฒนาเชื่อว่า เทคโนโลยีชีวภาพเป็นคลื่นลูกที่สี่ในวิวัฒนาการของสังคมมนุษย์เพื่อการพัฒนาประเทศ สืบต่อจากความสำเร็จในการพัฒนาเทคโนโลยีสารสนเทศ โดยที่ทั่วโลกตื่นตัวกับการปฏิวัติยีน (Gene revolution) มีการลงทุนด้านวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อเพิ่มผลผลิตและ เพิ่มศักยภาพการแข่งขัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในยุคที่การผลิตและการค้าโลกเป็นไปอย่างเสรี

ประเทศไทยได้เริ่มพัฒนาความสามารถในการใช้เทคโนโลยีชีวภาพตั้งแต่ ปี 2526 โดยได้จัดตั้งศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) ขึ้นภายใต้กระทรวงวิทยาศาสตร์ สำหรับกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ในปี 2542 คณะรัฐมนตรีได้อนุมัติแผนงาน/โครงการเงินกู้เพื่อปรับโครงสร้างภาคเกษตร แผนงานนี้กรมวิชาการเกษตรได้รับอนุมัติให้จัดสร้างอาคารธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและห้องปฏิบัติการกลางภายใต้แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเกษตร และในปี 2545 กรมวิชาการเกษตรได้มอบหมายให้สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพดูแลธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและห้องปฏิบัติการกลางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ นับเป็นจุดเริ่มต้นของการสนับสนุนและเพิ่มศักยภาพของเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในงานวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ของกรมวิชาการเกษตรอย่างจริงจัง ในปี 2547 กรมวิชาการเกษตรได้อนุมัติให้แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช ขยายพันธุ์พืช พิสูจน์พันธุ์ ตรวจสอบพืช ศัตรูพืช จุลินทรีย์ และการอนุรักษ์พันธุ์ รวมอยู่ใน 10 แผนงานหลัก 23 กรอบโครงการวิจัย ต่อมาในปี 2549 ได้เปลี่ยนชื่อเป็น แผนงานวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งเป็นแผนงานวิจัยเฉพาะสาขา ประกอบด้วย 2 โครงการวิจัย คือ 1) โครงการพัฒนาพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2) โครงการวิจัย ชีวโมเลกุลในการสร้างเอกลักษณ์พันธุกรรมพืช จุลินทรีย์ การปรับปรุงพันธุ์ และการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ ทั้ง 2 โครงการนี้จัดกลุ่มการทดลอง และกิจกรรมตามสาขาวิชาหรือเทคโนโลยีที่ใช้ในการวิจัยฉะนั้นภายใต้กิจกรรมจะประกอบด้วยหลายการทดลองและแต่ละการทดลองก็ดำเนินการในพืชที่ต่างกันไป ปี 2550 ซึ่งเป็นช่วงที่พืชทดแทนพลังงานได้รับความสนใจ แผนงานวิจัยนี้จึงได้เพิ่มโครงการวิจัยที่ 3) ได้แก่ โครงการวิจัยการศึกษาความหลากหลาย และปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งเป็นโครงการที่ศึกษามันสำปะหลังเป็นหลัก โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสาขาต่างๆช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการทดลองซึ่งต่างไปจาก 2 โครงการวิจัยเดิม

เอกสารรายงานแผนงานวิจัย และพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพฉบับสมบูรณ์ ปี 2549–2553 นี้ เป็นการสรุปผลการดำเนินการของแผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ตามรูปแบบที่คณะทำงานจัดทำรายงานผลงานวิจัยตามแผนงานวิจัยและพัฒนาปี 2549-2553 ของกรมวิชาการเกษตรกำหนด ขอขอบคุณผู้มีส่วนร่วมในการจัดทำรายงานฉบับนี้ทุกท่านและหากมีข้อผิดพลาดใดๆในฐานะผู้อำนวยการแผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพต้องขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์
ผู้อำนวยการแผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
31 มีนาคม 2554

กิตติกรรมประกาศ

รายงานแผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ปีงบประมาณ 2549-2553 ฉบับนี้ สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือจากบุคคลหลายท่าน ขอขอบคุณคณะผู้บริหารกรมวิชาการเกษตร ที่จัดสรรงบประมาณสนับสนุนให้แผนงานวิจัยนี้ได้ดำเนินการ

ขอขอบคุณนักวิจัยทุกท่านซึ่งไม่อาจกล่าวนามได้หมด ที่ให้ความร่วมมือส่งผลการทดลองให้หัวหน้าโครงการวิจัยฯ รายงานนี้ไม่อาจเกิดขึ้นได้ถ้าไม่ได้รับความร่วมมือจากทุกท่าน

ขอขอบคุณหัวหน้าโครงการวิจัยฯ ภายใต้แผนงานวิจัยฯ นี้ อันได้แก่ นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ นายกษิดิศ ดิษฐบรรจง และนางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ ที่ได้ประสานงาน รวบรวม และจัดทำสรุปผลการทดลองของนักวิจัยภายในโครงการฯ

ขอขอบคุณ นางสาวกิ่งกาญจน์ พิชญกุล ผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้คำปรึกษาข้อเสนอแนะในการจัดทำรายงานแผนงานวิจัยฉบับนี้

ขอขอบคุณ นางสาวภรณี สว่างศรี ที่ช่วยรวบรวมและจัดพิมพ์รายงาน

สุดท้ายขอขอบคุณ ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ฝ่ายบริหารสำนักฯ บุคลากรของกองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร ที่ช่วยประสานงานในด้านต่างๆ ให้แผนงานนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

หวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางด้าน การเกษตรกรรมของกรมวิชาการเกษตร และของประเทศไทยตามสมควร

นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์
ผู้อำนวยการแผนงานวิจัยฯ

ผู้วิจัย

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ กษิดิศ ดิษฐบรรจง ชยานิจ ดิษฐบรรจง สุภาภรณ์ ภัทรสุทธิ
ธารทิพย์ เพชระบูรณิน มงคล เกษประเสริฐ อำไพ สินพัฒนานนท์ ปาริฉัตร สังข์สะอาด
ภูมรินทร์ วณิชชนานันท์ เบ็ญจมาศ ทรงพระ ชลลดา สามพันพวง สุรกิตติ ศรีกุล
สุภาภรณ์ สาชาติ วิภาดา ทองทักษิณ จงวัฒนา พุ่มหิรัญ ปราโมทย์ ไตรบุญ
ยุพิน กสินเกษมพงษ์ ประภาพร ฉันทานุมัติ รัศมี ทองมา สุปัน ไม้ดัดจันทร์
เสาวนี เขตสกุล วิไลวรรณ สุทนต์ อรรัตน์ วงศ์ศรี อรุณี ใจเถิง
สุทธาชีพ ศุภเกษร ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร กิ่งกาญจน์ พิชญกุล
ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช สุรภี กีรติยะอังกูร อัญชลี เชียงกูล ณัฐหทัย เอพาณิช
ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ มัทนา ศรีหัตถกรรม บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ พยุงศักดิ์ รวยอารี
ประสาน สืบสุข กุหลาบ คงทอง มัลลิกา แก้ววิเศษ เมธินี ศรีวัฒนกุล
สุภาวดี ง้อเหรียญ เบญจมาศ ทรงพระ อัญชลี ศรีสุวรรณ อรุโณทัย ชาววา
อัจฉราพรรณ ใจเจริญ รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล ภรณี สว่างศรี กรกฎ จันทร
จีราพร แก่นทรัพย์ อนุสรณ์ ทองวิเศษ วราพร ไชยมา ธารทิพย์ ภาสบุตร
ภิรัชต์ สมฤทธิ์ สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ ดารุณี ปุญญพิทักษ์ อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์
ศรีสุข พูนผลกุล ศิริพงษ์ คุ้มภัย[3/] บูรณี พั่ววงษ์แพทย ปาริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาศ
พวงทอง บุญทรง ปราสาททอง พรหมเกิด ปิยาณี หนูกาพ อัจฉรา พยัพพานนท์
ไมตรี พรหมมินทร์ สิทธิชัย แสไพศาล เยาวภา ตันติวานิช ณัฏฐพร อุทัยมงคล
ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ชลธิชา รักใคร วงศ์ บุญสืบสกุล พรพิมล อธิปัญญาคม
จรรยา มณีโชติ ศันสนีย์ จำจด จิติมา ยถาภูธานนท์ ภาวนา ลิกขนานนท์
ศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต สมปอง หมื่นแจ้ง ประไพ ทองระอา อารีรัตน์ พระเพชร
สมศักดิ์ ศรีสมบุญ วิวัฒน์ ภานุอำไพ วิไล ปราสาทศรี เฉลิมชัย ปราสาทศรี
รัชนี ศิริยาน เฉลิมชัย ปราสาทศรี รังษี เจริญสถาพร ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล
สมศักดิ์ อิทธิพงษ์ ทักษิณา ศันสยะวิชัย ปรีชา กาเพ็ชร เพียงเพ็ญ ศรวัต
สุพัตรา คลโสภณ สุนี ศรีสิงห์ นฤทัย วรสถิตย์ พิเชษฐ์ กรุดลอยมา
นภาวรรณ เลขะวิพัฒน์ กัลยา ประพาน กรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข สมจินตนา รูเดอร์แมน
พเยาว์ ร่มรื่นสุขารมย์ อารมณ์ โรจน์สุจิตร อรรัตน์ วงศ์ศรี เสริมพร กิ่งพุทธิพงศ์
สาธิต ทยาพัทธ อัจฉราพร ณ ลำปาง พากเพียร อรัญนารถ เกษม สุนทราจารย์
สุดาวรรณ เชยชมศรี ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ผศ.ดร. ธนะบูลย์ สัจจาอนันตกุล
รศ.ดร.ปาริฉัตร หงสประภาส วิภา หงษ์ตระกูล ผศ. ดร. ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์
ดร. อัญชีรา สุขมาก ดร. พนิดา คงสวัสดิ์วรกุล พหล โกสิยะจินดา ภานุ เรืองจันทร์
บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ อัญชลี เชียงกูล หทัยรัตน์ อุไรรงค์ มัทนา ศรีหัตถกรรม
พยุงศักดิ์ รวยอารี ประสาน สืบสุข ภรณี สว่างศรี สุภาวดี ง้อเหรียญ
อัจฉราพรรณ ใจเจริญ อัญชลี ศรีสุวรรณ เบญจมาศ ทรงพระ ชุติกาญจน์ ใจแล
ศุจิรัตน์ สงวนรังษิกุล โอภาส บุญเสิ่ง รังสี เจริญสถาพร ประพิศ วองเทียม
เพียงเพ็ญ ศรวัต เสาวรี ตังสกุล อิสิวัฒน์ บัณฑราภิวัฒน์ อานนท์ มลิวัลย์
จันทร์สว่าง ศรีหาตา พินิจ กัลยาศิลปิน นายเกษมศักดิ์ ผลากร สุชาติ คำอ่อน
สิทธิโชค ตั้งภัครสรเรือง

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

VW	Vacin and Went (1949) media
WPM	Woody Plant media
MS	Murashige and Skoog (1962) media
LS	Linsmaier and Skoog (1965) media
Y3	Eeuwens (1967) media
BA	6-Benzylaminopurine
IAA	Indole-3-acetic acid
NAA	Naphthaleneacetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
w/v	weight by volumn
mg/l	milligram per liter
มก./ล	มิลลิกรัมต่อลิตร
มล./ล	มิลลิลิตร ต่อลิตร
23A8	สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาแฟของ บ. เนสเลย์

DNA = Deoxyribonucleic acid หมายถึง กรดนิวคลีอิก (กรดที่พบในใจกลางของเซลล์ทุกชนิด) ที่พบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ได้แก่ คน, สัตว์, พืช, เชื้อรา, แบคทีเรีย, ไวรัส เป็นต้น ดีเอ็นเอบรรจุข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นไว้ ซึ่งมีลักษณะที่ผสมผสานมาจากสิ่งมีชีวิตรุ่นก่อน ซึ่งก็คือ พ่อและแม่ และสามารถถ่ายทอดไปยังสิ่งมีชีวิตรุ่นถัดไป ซึ่งก็คือ ลูกหลาน

GMOs = Genetically Modified Organisms หมายถึงสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจเป็นพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ ที่ได้รับการถ่ายยีน หรือตัดต่อยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่นโดยกรรมวิธีพันธุวิศวกรรม (ไม่ได้เกิดเองตามธรรมชาติ) เพื่อให้ได้ลักษณะหรือคุณสมบัติตามที่ต้องการ เช่น พืชที่ต้านทานต่อแมลงศัตรูพืช พืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช และพืชที่ต้านทานโรค เป็นต้น

PCR = Polymerase Chain Reaction หมายถึง ปฏิกิริยาชีวเคมีแบบลูกโซ่ในการเพิ่มปริมาณหรือ copy ของ DNA ในหลอดทดลองโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase ปฏิกิริยา PCR นี้เป็นที่รู้จักกันมานับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1987 เป็นต้นมา จนถึงปัจจุบันนี้ เทคนิค PCR ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับการตรวจหายีนหรือชิ้น DNA เป้าหมายจากแหล่งต่างๆ เช่น จุลินทรีย์ พืช และอาหาร เป็นต้น ปฏิกิริยา PCR ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA เป้าหมายได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น ชิ้น DNA ใดๆ ก็ตามสามารถนำมาวิเคราะห์และดัดแปลงลำดับเบสของมันได้ด้วยเทคนิค PCR นี้เช่นกัน

Real-time PCR = Real-time Polymerase Chain Reaction หมายถึง การนำเอาเทคโนโลยีฟลูออเรสเซนส์ผสมผสานกับการทำ Thermal cycling แบบ Rapid PCR ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมไปกับการคำนวณ และวิเคราะห์ผลในเวลาเดียวกันภายในหลอดทดลอง โดยตรวจผลจากสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้นระหว่างทำ PCR

RAPD = Random Amplified Polymorphic DNA หมายถึง การตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอซึ่งถูกทำให้เพิ่มปริมาณโดยปฏิกริยาลูกโซ่จำลองตัว (Polymerase Chain Reaction; PCR) แบบสุ่ม เราสามารถทำให้สารพันธุกรรมจำลองตัวเองได้ในหลอดทดลอง (in vitro) โดยมี

องค์ประกอบสำคัญคือ เอ็นไซม์จำลองตัวชนิดทนความร้อน (Taq DNA polymerase), สารพันธุกรรมต้นแบบ (DNA template), ชิ้นดีเอ็นเอรหัสเริ่มต้นจำลองตัว (primer), และองค์ประกอบย่อยของดีเอ็นเอ (deoxynucleotide; dNTPs) เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้เป็นรหัสเริ่มต้นมีขนาดที่สั้น (ประมาณ 10 เบส) จึงสามารถเข้าคู่กับสารพันธุกรรมต้นแบบได้หลายตำแหน่งโดยสุ่ม หากการเข้าคู่นั้นเกิดขึ้นในทิศทางที่เหมาะสมก็จะทำให้เกิดการจำลองตัวของชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งความแตกต่างของสารพันธุกรรมนี้ได้ก่อให้เกิดความแตกต่างในความสามารถของการเกิดการจำลองตัวและขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกจำลองตัว

RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism หมายถึง การตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอหลังจากถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) สารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์กันย่อมมีลำดับเบสที่แตกต่างกันไม่มากก็น้อย ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) ตามธรรมชาติ ซึ่งมีผลให้ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอ็นไซม์เปลี่ยนแปลงไป โดยหลักการเข้าคู่ (hybridization) ของเส้นดีเอ็นเอคู่สม (complementary) โดยอาศัยชิ้นดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) เราสามารถตรวจพบความเปลี่ยนแปลงนั้นได้

AFLP = Amplified Fragment Length Polymorphism หมายถึง การตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะซึ่งตรวจสอบได้โดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว เป็นการรวมหลักการของ RFLP และ RAPD เข้าด้วยกัน สารพันธุกรรมจะถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดที่มีตำแหน่งจดจำแตกต่างกัน ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะถูกต่อเข้ากับชิ้นดีเอ็นเอสังเคราะห์ทราบรหัส (adapter) 2 ชนิด จากนั้นปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวจะเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางชิ้นโดยอาศัยชิ้นดีเอ็นเอรหัสเริ่มต้นจำลองตัวที่จำเพาะกับชิ้นดีเอ็นเอสังเคราะห์ทราบรหัสและเบสคัดเลือก (N) ในชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย ข้อดีของ AFLP คือมีความแน่นอนของผลการตรวจสอบสูงเหมือน RFLP และสามารถตรวจสอบความหลากหลายได้หลายตำแหน่งภายในสารพันธุกรรมเหมือน RAPD

SSLP = Simple Sequence Length Polymorphism หมายถึง การตรวจสอบความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอจำลองที่เกิดจากความแตกต่างของจำนวนชุดของลำดับเบสซ้ำ (simple sequence repeat) ซึ่งพบกระจายตัวอยู่ภายในสารพันธุกรรมของข้าว ชนิดของเบสซ้ำ ได้แก่ ซ้ำสองเบส (di-nucleotide repeat) เช่น AT, ซ้ำสามเบส (Tri- nucleotide repeat) เช่น AAC และ ซ้ำสี่เบส (tetra-nucleotide repeat) เช่น GTAC เป็นต้น โดยทั่วไปเบสซ้ำเหล่านี้มักมีลำดับเบสที่จำเพาะอยู่บริเวณรอบๆ ซึ่งเราสามารถสร้างชิ้นดีเอ็นเอรหัสเริ่มต้นจำลองตัวที่เข้าคู่ได้กับเบสจำเพาะเหล่านี้ ผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวเพื่อเพิ่มปริมาณของลำดับเบสซ้ำเหล่านั้นคือชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ซึ่งแสดงถึงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของข้าวได้ SSLP นับเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้รับการพัฒนาล่าสุด สามารถตรวจสอบความหลากหลายได้มากกว่า RFLP ทั้งยังตรวจสอบผลได้ง่าย และใช้สารพันธุกรรมเริ่มต้นเพียงปริมาณน้อย ดังนั้นจึงนับเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความเหมาะสมที่สุดในการทำเอกลักษณ์พันธุกรรม

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของแผนงานวิจัย

แผนงานวิจัยนี้สอดคล้องกับยุทธศาสตร์การวิจัยของกรมวิชาการเกษตร 2549-2553 ในมิติที่ 3 คือ การอนุรักษ์เพื่อใช้ประโยชน์ในการวิจัยและพัฒนาและสอดคล้องกับยุทธศาสตร์ และแผนงานวิจัยแบบบูรณาการระยะปานกลาง (พ.ศ. 2548-2550) ในหัวข้อยุทธศาสตร์การปรับโครงสร้างเศรษฐกิจให้สมดุลและแข่งขันได้ ยุทธศาสตร์การขจัดความยากจน ยุทธศาสตร์การบริหารจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ยุทธศาสตร์การต่างประเทศและเศรษฐกิจระหว่างประเทศ ยุทธศาสตร์การรองรับการเปลี่ยนแปลงพลวัตโลก โดยรัฐบาลกำหนดเป้าหมายระดับชาติที่สำคัญคือการใช้เทคโนโลยีชีวภาพช่วยให้ประเทศไทยเป็นครัวของโลกด้วย

เทคโนโลยีชีวภาพ มีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มขีดความสามารถในการวิจัย และพัฒนาวิทยาการด้านต่างๆ ให้เจริญก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว กรมวิชาการเกษตรจึงได้ส่งเสริมให้มีการใช้เทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการศึกษาวิจัยและพัฒนาด้านการเกษตร เพื่อเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันของประเทศ เพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืนและให้เกษตรกรมีรายได้ดีขึ้น รัฐบาลได้เล็งเห็นประโยชน์ของการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการพัฒนาประเทศ จึงได้กำหนดกรอบนโยบายการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพของประเทศไทย (พ.ศ. 2547–2554) โดยมีเป้าหมายระดับชาติที่สำคัญคือการใช้เทคโนโลยีชีวภาพช่วยให้ประเทศไทยเป็นครัวของโลก ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องเร่งพัฒนาการเกษตรของไทยเพื่อยกระดับประสิทธิภาพการผลิต และเพิ่มผลผลิตทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณไปพร้อมๆ กัน โดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่เข้ามาช่วยเป็นปัจจัยเสริมในด้านการปรับปรุงพันธุ์ การขยายพันธุ์ การพิสูจน์พันธุ์ และการตรวจสอบพืช ศัตรูพืชและ จุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นวิธีการที่สามารถลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้รวดเร็วกว่าวิธีการปกติ (conventional breeding) การใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขยายพันธุ์พืช เพื่อให้มีคุณภาพและปริมาณมากตามความต้องการของตลาด ประกอบกับสามารถใช้เทคนิคนี้สร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคต นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคโนโลยีชีวภาพด้านชีวโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและแม่นยำสำหรับการตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ การตรวจวิเคราะห์พืชดัดแปรพันธุกรรมและผลิตภัณฑ์ และการตรวจสอบเชื้อโรคพืชเพื่อการเฝ้าระวังการระบาดของโรคพืชและการรับรองคุณภาพสินค้าเกษตรส่งออก และควบคุมการนำเข้าสินค้าเกษตร สนับสนุนภารกิจด้านกักกันพืช และคุ้มครองพันธุ์พืชของกรมวิชาการเกษตร นอกจากนั้นยังพบว่าการวิจัยและพัฒนาในปัจจุบันที่มีการเปลี่ยนแปลงในหลายๆด้าน นักวิจัยจะดำเนินการตามแบบเดิมไม่ได้อีกแล้ว เนื่องจากงานวิทยาศาสตร์มีมิติอื่นๆที่เกิดขึ้นมากมายเช่น การผลิตและการค้าเสรี ด้านกฎหมายซึ่งเริ่มเข้ามามีบทบาทอย่างมากโดยเฉพาะด้านสิทธิบัตรการแบ่งปันผลประโยชน์ ดังนั้นถ้านักวิจัยของประเทศไทยยังใช้วิธีการวิจัยแบบเดิมๆไม่นำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วย ในอนาคตเกษตรกรไทยอาจต้องลงทุนเพิ่มในการจ่ายค่าลิขสิทธิ์ที่ประเทศอื่นเป็นเจ้าของ

วัตถุประสงค์ของ แผนงานวิจัย

1. ศึกษาเทคนิคเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน โดยการเลี้ยงในอาหารเหลว และศึกษาผลของ polyamine และ silver nitrate ต่อเพิ่มปริมาณแคลลัสและการพัฒนาเป็น somatic embryo และต้นอ่อน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. ขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณปาล์มน้ำมันชนิด pisiferra สำหรับใช้เป็น germ plasm เพื่อคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่ดีในการผลิตลูกผสม และผลิตผลส่งโรงงาน

3. ขยายพันธุ์และพัฒนาให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม ในรองเท้านารีและ ศึกษาผลของโคลชิซินในการชักนำให้เกิดเป็นต้นโพลีพลอยด์

4. เพื่อศึกษาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์พืชหายากใกล้สูญพันธุ์ 4 ชนิด ได้แก่ เทียนนกแก้ว กล้วยไม้กุหลาบกระบี่ กล้วยไม้เขาพระวิหาร และตาเหินสมุย

ระเบียบวิธีการวิจัย

เทคโนโลยีชีวภาพเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการพัฒนาการเกษตรของไทยให้มีศักยภาพและประสิทธิภาพการผลิตสูงขึ้น และให้ผลในเชิงพาณิชย์ ตลอดจนเป็นแนวทางเพิ่มความสามารถในการแข่งขันของสินค้าเกษตรไทย เพื่อเป็นการตอบสนองแนวทางในการพัฒนาการเกษตร และเป็นไปตามกรอบนโยบายทิศทางการวิจัยและพัฒนาการเกษตร กรมวิชาการเกษตรซึ่งเป็นหน่วยงานหลักในการวิจัยและพัฒนาพืชและจุลินทรีย์ได้ตระหนักถึงความจำเป็นในการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการเพิ่มขีดความสามารถและประสิทธิภาพงานวิจัย โดยเฉพาะด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช การเพิ่มผลผลิต การทดสอบความปลอดภัยทางชีวภาพให้เป็นไปตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 จึงมีความจำเป็นต้องระดมทรัพยากรทุกด้านไม่ว่าจะเป็นบุคลากร เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ เพื่อค้นคว้าทางด้านวิจัยเทคโนโลยีทางชีวภาพภาพเพื่อนำเอาความหลากหลายของทรัพยากรที่มีอยู่มาใช้ให้เกิดประโยชน์มากที่สุดเป็นระบบครบวงจร โดยดำเนินการวิจัยด้านต่างๆ ดังนี้

โดยมีประเด็นวิจัยคือ

- การใช้เทคโนโลยีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขยายพันธุ์พืชต่างๆให้ได้ปริมาณมากและสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรม

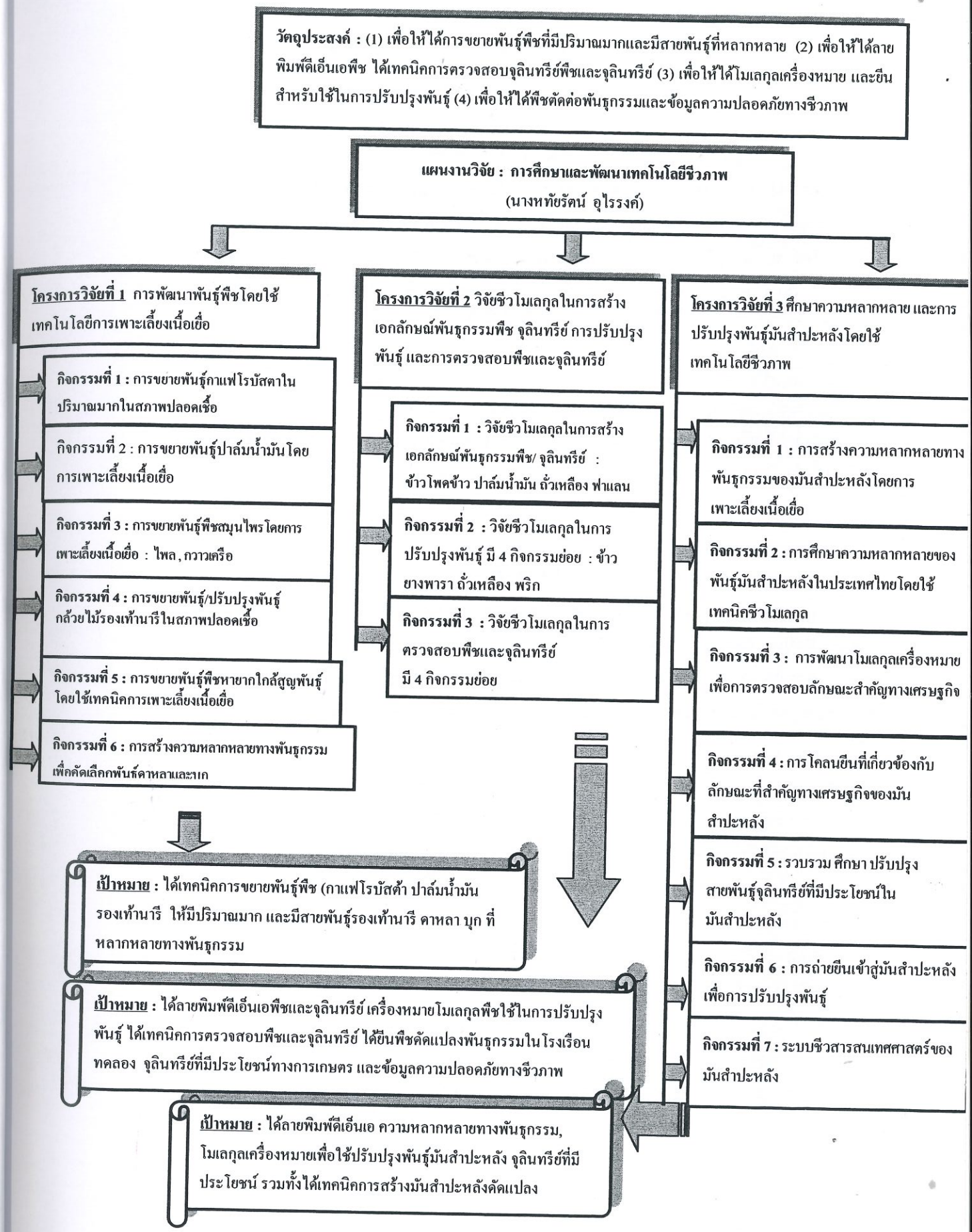
- การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SCAR, AFLP, ISSR และอื่นๆ ในการสร้างเอกลักษณ์พันธุกรรมพืชจุลินทรีย์

- การค้นหาและใช้โมเลกุลเครื่องหมายชนิดต่างๆ ช่วยในการปรับปรุงพันธุและสร้างแผนยีนของพืชสำคัญต่างๆ

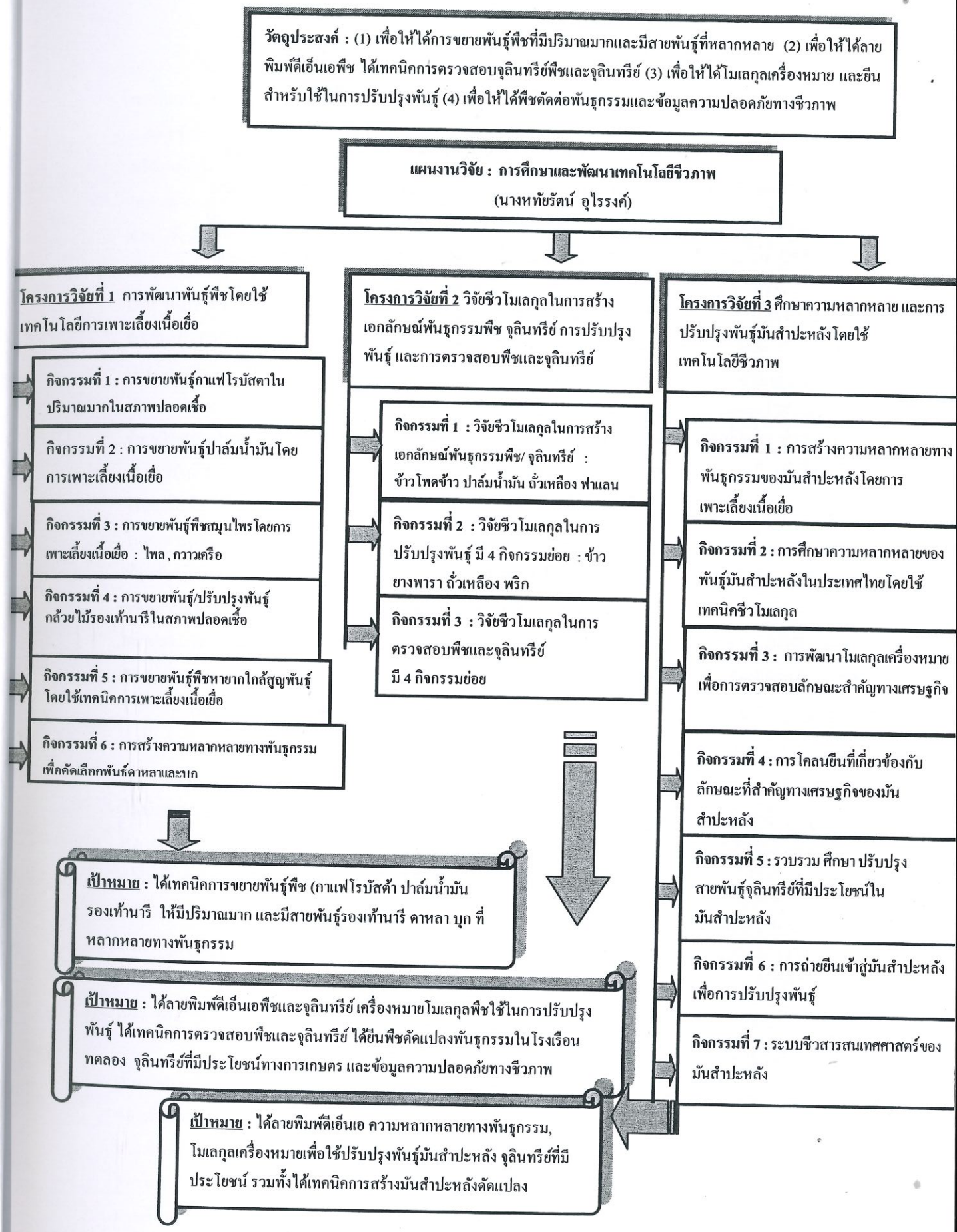
- การวิจัยชีวโมเลกุลในการตรวจสอบพืชเช่น พืชGMO และจุลินทรีย์ เพื่อการกักกันโรคพืชและช่วยคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน

- การโคลนยีนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ การสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรม ตลอดจนการทดสอบความปลอดภัยทางชีวภาพ

จากประเด็นวิจัยต่างๆดังกล่าวด้านบนนี้ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการ ของสถาบัน/ศูนย์วิจัย เครือข่ายต่างๆของกรมวิชาการเกษตร ตั้งแต่ปี พ.ศ.2549-2553 โดยที่แต่ละการทดลองอาจมีระยะเวลาการเริ่มต้นและสิ้นสุดไม่พร้อมเพรียงกัน แต่ทั้งหมดอยู่ในช่วงปีงบประมาณ 2549-2553 ทั้งสิ้น สำหรับวิธีดำเนินงานวิจัยนั้น เนื่องจากแผนงานนี้มี 3 โครงการวิจัย ที่แตกต่างกัน ซึ่งมีรายละเอียดในการดำเนินการเนินงานมาก หากสนใจดูรายละเอียดได้จากแต่ละโครงการวิจัยซึ่งอยู่หน้าถัดๆไป สำหรับความเชื่อมโยงของแต่ละโครงการวิจัย และสรุปกิจกรรมภายใต้โครงการ สามารถดูได้จาก ภาพที่ 1 โดยโครงการที่1 และ 2 เป็นโครงการเฉพาะสาขาวิชา จะมีพืชหลากหลายที่ทำวิจัยภายใต้ 2 โครงการนี้ ต่างจากโครงที่ 3 ซึ่งเป็นโครงการพืช คือมันสำปะหลังอย่างเดียว แต่ทำการทดลองในหลายกิจกรรมที่แตกต่างกันไป



ภาพที่ 1 ความเชื่อมโยงของวัตถุประสงค์โครงการวิจัยและเป้าหมายของแผนงานวิจัย



ภาพที่ 1 ความเชื่อมโยงของวัตถุประสงค์โครงการวิจัยและเป้าหมายของแผนงานวิจัย

โครงการวิจัยที่ 1.
การพัฒนาพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Plant Tissue Culture for Variety Improvement

กษิดิศ ดิษฐบรรจง ชยานิจ ดิษฐบรรจง ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ สุภาภรณ์ ภัทรสุทธิ
ธารทิพย์ เพชระบูรณิน ปาริฉัตร สังข์สะอาด อำไพ สินพัฒนานนท์ ชลลดา สามพันพวง
เบ็ญจมาศ ทรงพระ นายมงคล เกษประเสริฐ ยุพิน กสินเกษมพงษ์ ประภาพร ฉันทานุมัติ
รัศมี ทองม สุปัน ไม้ดัดจันทร์ สุภาภรณ์ สาชาติ จงวัฒนา พุ่มหิรัั วิภาดา ทองทักษิณ
เสาวนี เขตสกุล วิไลวรรณ สุทนต์ อรรัตน์ วงศ์ศรี อรุณี ใจเถิง สุรกิตติ ศรีกุล
ปราโมทย์ ไตรบุญ สุทธาชีพ ศุภเกษร

คำสำคัญ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โซมาติกเอมบริโอเจเนซิส เทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ การกลายพันธุ์ กาแฟ
ปาล์มน้ำมัน ไพล กวาวเครือขาว กล้วยไม้รองเท้านารี กล้วยไม้กุหลาบกระบี่ กล้วยไม้เขาพระวิหาร
เทียนนกแก้ว ตาเหินสมุย ดาหลา บุก,

Keywords

tissue culture, somatic embryogenesis, temporary bioreactor, mutation, Robusta coffee, oil palm, *Zingiber cassumunar* Roxb., *Pueraria candollei* Grah. Ex Benth., *Paphiopedilum* sp, *Aerides krabiensis* Seidenf., *Vandopsis lissochiloides* (Gaud.) Pfitz), *Impatiens psittacina* Hook.f., *Hedychium samuiense* sirirugsa & K. Larsen, *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith, *Amorphophallus rivieri* Durieu cv. Konjac

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์พืชต่างๆ ได้แก่ (1) การขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจ คือ กาแฟและปาล์มน้ำมัน พบว่า ชิ้นส่วนใบของกาแฟสายพันธุ์ FRT17 ซึ่งจะเสนอเป็นกาแฟพันธุ์แนะนำของกรมวิชาการเกษตร มีแนวโน้มจะสร้างกลุ่มเนื้อเยื่อได้ดีกับอาหารสูตร Peirson et. al. (1983) ที่เติม IBA 5 mg/l และ 2iP 1 mg/l โดยสร้างกลุ่มเนื้อเยื่อมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ และสามารถผลิตต้นอ่อนกาแฟโรบัสต้าเชิงพาณิชย์ด้วยระบบ Temporary Immersion Bioreactor (TIB) ได้เฉลี่ย 1,400 ต้นต่ออาหาร 2 ลิตร ส่วนในปาล์มน้ำมันพบว่าสามารถชักนำชิ้นส่วนคัพภะอ่อน ช่อดอกอ่อน และ leaf primoediaของปาล์มน้ำมัน ลูกผสม tenera พันธุ์สุราษฎร์ธานี 3 ให้เกิดแคลลัส แคลลัสเพิ่มปริมาณและพัฒนาเป็น somatic embryo บนอาหารสูตร Y3 + NAA 10 µM + abscisic acid 2 µM และสามารถเจริญเป็น polyembryony 2-3 ต้นมียอดและรากที่สมบูรณ์ หรือเจริญเป็นยอดขนาดเล็ก 4-5 ยอด (embryo derived shoot) ติดกันเป็นกลุ่มไม่มีราก แต่สามารถชักนำให้เกิดรากได้เมื่อเลี้ยงบนอาหาร ½ MS ที่มี NAA 15 -45 µM โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 28-31 % เมื่อศึกษาผลของ silver nitrate และ polyamine ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส การไม่ใส่ silver nitrate จะได้น้ำหนักแคลลัสมากกว่าการใส่ silver nitrate ทุกระดับ ส่วนการเลี้ยงแคลลัสในสูตรอาหาร MS ร่วมกับสารกลุ่ม Polyamine คือ spermidine 10 µM จะให้ค่าน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสสูงสุด และสูตรอาหาร MS ที่ไม่มีสารกลุ่ม polyamine จะมีค่าน้ำหนักสดเฉลี่ยของแคลลัสน้อยที่สุด การเพิ่มปริมาณ Embryogenic callus พบว่า เอมบริโอจินิคแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติม 2,4-D 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพิ่มปริมาณได้ 3.84 เท่า เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารแข็ง MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นโซมาติกเอมบริโอที่สมบูรณ์ได้ สำหรับการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันชนิด fertile pisifera ผลการทดลองพบว่าคัพภะอ่อน และช่อดอกอ่อนตัวเมีย เกิดแคลลัสได้ 62.4-69.6 เปอร์เซ็นต์ และ 16.0–18.4 เปอร์เซ็นต์ บนอาหาร MS ที่เติม dicamba 5-10 µM และอาหาร MS ที่เติมdicamba 10–15 µM ตามลำดับ และสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัส ได้ 6.9-7.2 เท่า และ 3.8 เท่าตามลำดับ เมื่อใช้ dicamba 2-4 µM

(2) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสมุนไพร ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) และกวาวเครือขาว (*Pueraria candollei* Grah.ex Benth. Var. mirifica) เพื่อการขยายพันธุ์ เหง้าไพลที่เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 mg/l เกิดยอดรวมเฉลี่ย 2.27 ยอด *In vitro* microshoot ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมเฉลี่ย 4.32 ยอดเมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 mg/l ภายใน 3 เดือน เมื่อนำต้นกล้าไพลปลูกในสภาพธรรมชาติ พบว่ามีอัตราการรอดตาย 98.33 เปอร์เซ็นต์ จำนวนต้นเฉลี่ยต่อกอของต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็น 14.20 ซึ่งมากกว่าต้นจากเหง้าในสภาพธรรมชาติถึง 8.50 ต้นต่อกอ ส่วนการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของกวาวเครือขาว พบว่า หลังการเพาะเลี้ยง 1-2 เดือน บนอาหารสูตร MS+2,4-D 2.21 มก./ลิตร+kinetin 0.48 มก./ลิตร และสูตร MS+NAA 1.25 มก./ลิตร+BA 0.125 มก./ลิตร ให้เปอร์เซนต์แคลลัสสูง 55% และ 65% ตามลำดับ เมื่อนำแคลลัสไปชักนำให้เกิดยอดอ่อนโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร 10 สูตร พบว่าหลังการเพาะเลี้ยง 3 เดือน ทุกสูตรไม่มีการเกิดยอด

(3) การขยายพันธุ์รองเท้านารีพันธุ์พื้นเมือง 7 ชนิด ได้แก่ กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน เหลืองกาญจน์ เมืองกาญจน์ อินทนนท์ อินทนนท์ลาว ฝาหอย และดอยตุง พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเมล็ดและเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน คือ สูตรอาหารจิตราพรรณ II และจิตราพรรณ III ในกล้วยไม้รองเท้านารี อินทนนท์ อินทนนท์ลาว ฝาหอย และดอยตุง สูตรอาหาร ½ จิตราพรรณ II มีความเหมาะสมต่อการเพาะเมล็ด และสูตรอาหารดัดแปลงซึ่งประกอบด้วย ¾ macronutrients ของ VW และ ¾ micronutrients ของอาหาร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 75 มล./ล. เนื้อมะเขือเทศสดบด 50 ก./ล. เห็ดหูหนูบดละเอียด 12.5 ก./ล. และกล้วยหอมบด 25 ก./ล. เหมาะในการเจริญเป็นต้นและราก ส่วนรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ เมืองกาญจน์ไม่สามารถผสมให้ติดฝักได้ นอกจากนั้นยัง

Abstracts

Somatic embryogenesis of Robusta coffee, strain FRT17, was employed using leaf as explants. The experiment was conducted using 2 kinds of media, 23A8 and Peirson et al. (1983) supplemented with various concentrations of auxin and cytokinin. The explants showed better response on Peirson et al. (1983) media + 5 mg/l IBA + 1 mg/l 2ip (20 % response). In addition, temporary Immersion Bioreactor (TIB) was used in *in vitro* pre-germination stage of mass propagation of Robusta Coffee via Somatic Embryogenesis. Advantage of TIB are to reduced labor cost and media can be changed easily. Two experiments of TIB were used: (1) TIB are glass made using with air pressure pump, (2) TIB are polyethylene made using without air pressure pump. TIB (1) were renewed media once a month, while TIB (2) were filled 0.5 L of liquid media. Cotyledon embryos were produced on the average 1,400 embryos per system by TIB (1). TIB (2) produced on the average 1,000 embryos per system.

The study of plant tissue culture for micropropagation was employed for good oil palm planting material. Tissue culture of oil palm (tenera type),Surat-thani 3 had been done using immature embryo, immature inflorescence and young leaf primordia surrounding the cabbage as explants. Explants had been cultured on MS and Y3 media supplemented with various concentrations of dicamba for callus induction. Immature embryo showed the highest callus percentage at 83.30% on MS media supplemented with 10 µM dicamba .Immature influrescense and young leaf primordia showed the highest callus percentage at 15.8% on Y3 media supplemented with 15 µM dicamba, and 24.63% on MS media supplemented with 15 µM dicamba, respectively. Callus proliferation ability of immature embryo, immature inflorescence and young leaf primordia were 7.02 x, 3.87x ,and 9.13x, on MS media supplemented with 1 µM, 3 µM and 1 µM of dicamba, respectively. The percentage of embryogenic callus induction from the original callus were 50.01% 20.04% and 46.76% from immature embryo , immature inflorescence and young leaf primordia respectively on Y3 media supplemented with NAA 10 µM and abscisic acid 2 µM. In addition, the development of somatic embryo from embryogenic callus of each explant parts were 40.08%, 13.36%, and 33.34%, respectively on the same media of embryogenic callus induction. Development of somatic embryo can be observed in diverse types, normal plantlets, polyembryony with 2-3 shoots and normal root, or embryo derived shoot without root. However, these shoots can be rooted on root induction media, ½ MS supplemented with NAA 15-45 µM, percentage of rooting can be obtained at 28-31 %.

The study of the effect of polyamine and silver nitrate for callus proliferation was employ using embryogenic callus as starting material. Callus was culture on MS media supplemented with silver nitrate and 2ip (2-isopentyladenine) at 0.1 mg/l. MS media without silver nitrate showed the higher callus proliferation compare to the media with silver nitrate. The other experiment was done using polyamine, putrescine, spermidine, and spermine at 0, 1, 10, 100 uM each. After 3 months of culture, MS media supplemented with spermidine 10 uM displayed the highest callus proliferation (1.19 gm.). Yellow and green friable callus was emerged from the starting material. In contrast, MS media without polyamine showed the lowest callus proliferation.

Callus proliferation in liquid media was done using opaque embryogenic callus as starting material (0.15-0.2 gm.). After 4 months of culture, MS media supplemented with 50 mg/l 2,4-D showed the highest callus proliferation (3.84 times compare to the starting fresh weight). Callus was then transferred on MS media without plant growth regulator. However, development of callus proliferated in liquid media was lower than that of callus proliferated on solid media. Somatic embryo, obtained from liquid culture callus, has haustorium shape and unable to develop to normal embryo.

บทนำ

ปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งในด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐาน เกษตรกรรม การแพทย์ และอุตสาหกรรม สามารถขยายพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะเวลาสั้น โดยอาศัยสูตรอาหาร สังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิด การนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ขยายพันธุ์ จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจและมีความเป็นไปได้สูง โดยเฉพาะพืชที่มีปัญหาการขยายพันธุ์ตามวิธีปกติ ด้วยเมล็ด หรือส่วนขยายพันธุ์ เช่น กาแฟ การขยายพันธุ์วิธีเสียบยอดเพื่อให้ตรงตามพันธุ์ จำเป็นต้องใช้ต้นแม่พันธุ์จำนวนมาก ดังนั้นหากต้องการผลิตพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากและตรงตามพันธุ์ที่กำหนดในเวลาจำกัด การเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเซลล์ร่างกายให้พัฒนาจนเป็นต้นอ่อนหรือตัวอ่อนโดยไม่มีเซลพันธุกรรมมาเกี่ยวข้อง (somstic embrygenesis) หรือศึกษาเทคนิคในการขยายพันธุ์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้นำมาใช้ในการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าในปัจจุบัน

การขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ดปาล์มน้ำมัน ต้นปาล์มน้ำมันที่ได้จะมีลักษณะที่ต่างจากต้นแม่เดิม ซึ่งพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ไม่ดีจะส่งผลเสียต่อเกษตรกรผู้ปลูก ทำให้ผลผลิตปาล์มน้ำมันต่อไร่ของไทยอยู่ในเกณฑ์ต่ำเมื่อเทียบกับประเทศเพื่อนบ้าน นอกจากนี้การนำเข้าเมล็ดพันธุ์หรือต้นกล้าปาล์มน้ำมันอาจเสี่ยงต่อโรคและแมลงที่ติดมา อีกทั้งยังต้องคำนึงถึงพันธุ์ที่สั่งเข้ามาเคยปลูกในสภาพแวดล้อมเหมือนกับประเทศไทยหรือไม่ ดังนั้นการขยายปาล์มน้ำมันพันธุ์ดีออกสู่เกษตรกรเป็นสิ่งที่จำเป็น การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันชนิดเทเนราที่ให้ผลผลิตสูง ทำให้ได้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะเหมือนต้นแม่เดิม ดังนั้นกรมวิชาการเกษตรจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์ต้นที่ให้ผลผลิตสูงและปาล์มชนิด fertile pisifera

ในส่วนของสมุนไพรบางชนิดที่มีสารสำคัญที่เป็นประโยชน์ทางการแพทย์ เช่นไพล การขยายพันธุ์โดยใช้เหง้า จะมีปัญหาโรคที่ติดมากับหัวพันธุ์ เช่น โรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียและเชื้อรา เมื่อนำไปปลูกจะเกิดการระบาดและก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิต และกวาวเครือที่ต้องการต้นพันธุ์ดีให้ได้ปริมาณมากในเวลารวดเร็ว

จากการสำรวจรวบรวมพันธุ์พืชตามพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยของนักวิชาการ กลุ่มวิจัยพันธุ์พืช กองคุ้มครองพันธุ์พืช พบว่า มีพืชหลายชนิดที่นำมาศึกษาด้านอนุกรมวิธานพืช จัดเป็นพืชหายากและมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เนื่องจากการขยายตัวของความเจริญ การถูกทำลายโดยภัยธรรมชาติและมนุษย์ เช่นกล้วยไม้รองเท้านารี ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อมาใช้ในการเพิ่มปริมาณกล้วยไม้รองเท้านารี แต่ผลสำเร็จในการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิดพันธุ์ของกล้วยไม้ตลอดจนสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเมล็ดรองเท้านารีที่ใกล้สูญพันธุ์ในเขตภาคต่างๆ นอกจากนี้ ได้ทำการศึกษาการขยายพันธุ์โดยใช้ส่วนอื่นนอกจากการเพาะเมล็ด โดยการแยกหน่อ

พืชบางชนิดเพิ่งถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในประเทศไทยหรือเป็นพันธุ์ไม้ชนิดใหม่ของโลก ได้แก่เทียนนกแก้ว เอื้องกุหลาบกระบี่ กล้วยไม้เขาพระวิหาร ตาเหินสมุย ซึ่งเป็นพืชเฉพาะถิ่นพืช ปัจจุบันมีเหลืออยู่น้อยมาก มีโอกาสที่จะนำมาพัฒนาศักยภาพเพื่อการใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ในวันข้างหน้า หากมีการนำมาศึกษาประเมินคุณค่าการใช้ประโยชน์ พืชหลายชนิดที่มีอยู่ในประเทศไทยแต่คนไทยไม่เคยทราบถึงประโยชน์และสรรพคุณ ทำให้ประเทศอื่นๆ ที่มีอำนาจในการลงทุนในการศึกษา ค้นคว้า พัฒนาการใช้ประโยชน์จนสามารถนำไปจดสิทธิบัตร จึงต้องขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณให้มาก สามารถนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาช่วยในการขยายพันธุ์ได้

การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถสร้างความแปรปรวนให้เกิดขึ้น เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะที่แตกต่างไปจากเดิม เช่น สายพันธุ์ที่ทนทาน ต่อแสงแดดในบุก การสร้างต้นเตตราพลอยด์ ในคาหลา เพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผลิต triploid ที่มีคุณภาพดี ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธี conventional breeding ทำได้ยากและใช้เวลานาน หรือแม้กระทั่งการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation) โดยใช้รังสีหรือสารเคมี ในการคัดเลือกสายพันธุ์คาหลาที่

มีลักษณะแปลกใหม่ของสีสัน ทรงต้น ขนาดดอก ก้านดอก ตามความต้องการของตลาด และการใช้สารโคลชิซิน สามารถใช้ปรับปรุงพันธุ์ขมิ้นชันที่มีเหง้าขนาดเล็กและเนื้อในเหง้ามีสารสีเหลืองคือเคอร์คิวมิน (Curcumin) และน้ำมันหอมระเหยหลายชนิด ที่มีสรรพคุณเป็นยาแต่มีปริมาณน้อย คาดว่าจะมีผลทำให้ขนาดของเหง้าใหญ่ขึ้น ซึ่งจะช่วยทำให้มีปริมาณสารเคอร์คิวมินและน้ำมันหอมระเหยมากขึ้นไปด้วย โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์(1) ศึกษาเทคโนโลยีในการขยายพันธุ์กาแฟ เชิงการค้า (2) ศึกษาเทคนิคเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน(3) ขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันชนิด pisiferra สำหรับใช้เป็น พ่อพันธุ์ที่ดีในการผลิตลูกผสม และผลิตผลส่งโรงงาน (4) ขยายพันธุ์และพัฒนาให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม ดาหลา บุก รองเท้านาร (5) ศึกษาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการขยายพันธุ์พืชหายากใกล้สูญพันธุ์

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาเทคโนโลยีในการขยายพันธุ์กาแฟ เชิงการค้า
2. ศึกษาเทคนิคเบื้องต้นและเทคนิคเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน โดยการเลี้ยงในอาหารเหลว และศึกษาผลของ polyamine และ silver nitrate ต่อเพิ่มปริมาณแคลลัสและการพัฒนาเป็น somatic embryo และต้นอ่อน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
3. ขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณปาล์มน้ำมันชนิด pisiferra สำหรับใช้เป็น germ plasm เพื่อคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่ดีในการผลิตลูกผสม และผลิตผลส่งโรงงาน
4. ขยายพันธุ์และพัฒนาให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม ในดาหลา บุก รองเท้านารี
5. เพื่อศึกษาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์พืชหายากใกล้สูญพันธุ์ 4 ชนิด ได้แก่ เทียนนกแก้ว กล้วยไม้กุหลาบกระบี่ กล้วยไม้เขาพระวิหาร และ ตาเหินสมุย

การวิจัยประกอบด้วย 6 กิจกรรมวิจัย แยกตามชนิดหรือกลุ่มพืช ซึ่งมีวิธีการวิจัยตามหัวข้อหลัก ดังนี้

1. การขยายพันธุ์พืชทาง vegetative จากต้นที่ให้ผลผลิตสูง หรือการขยายพันธุ์พืชที่มีปัญหาในการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดตามธรรมชาติ หรือต้องการเพิ่มปริมาณในเวลารวดเร็ว ซึ่งสามารถทำได้โดยการนำชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชได้แก่เมล็ด ราก ใบ ดอก ตายอด ตาข้าง ส่วนยอด (apical meristem) มาเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งมีสูตรอาหารและมีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในพืชแต่ละชนิด โดยการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ผ่านขบวนการ organogenesis หรือ ผ่านขบวนการ embryogenesis รวมทั้ง ปัจจัยต่างๆที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและมีการปรับสภาพบางอย่างเพื่อให้มีการพัฒนาความอยู่รอดในสภาพแปลงปลูกในเปอร์เซ็นต์ที่สูงเท่าที่สามารถทำได้
2. สร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมให้เกิดขึ้นในเซลล์ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยทำให้เกิด somaclonal variation การสร้างต้น tetraploid การใช้สารเคมีก่อการกลายพันธุ์ การฉายรังสีแคลลัส สามารถคัดเลือกได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะตามความต้องการ หรือเป็นสายพันธุ์ที่จะนำไปใช้เป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ที่ดีในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้

มีลักษณะแปลกใหม่ของสีสัน ทรงต้น ขนาดดอก ก้านดอก ตามความต้องการของตลาด และการใช้สารโคลชิซิน สามารถใช้ปรับปรุงพันธุ์ขมิ้นชันที่มีเหง้าขนาดเล็กและเนื้อในเหง้ามีสารสีเหลืองคือเคอร์คิวมิน (Curcumin) และน้ำมันหอมระเหยหลายชนิด ที่มีสรรพคุณเป็นยาแต่มีปริมาณน้อย คาดว่าจะมีผลทำให้ขนาดของเหง้าใหญ่ขึ้น ซึ่งจะช่วยทำให้มีปริมาณสารเคอร์คิวมินและน้ำมันหอมระเหยมากขึ้นไปด้วย โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์(1) ศึกษาเทคโนโลยีในการขยายพันธุ์กาแฟ เชิงการค้า (2) ศึกษาเทคนิคเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน(3) ขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันชนิด pisiferra สำหรับใช้เป็น พ่อพันธุ์ที่ดีในการผลิตลูกผสม และผลิตผลส่งโรงงาน (4) ขยายพันธุ์และพัฒนาให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม ดาหลา บุก รองเท้านารี (5) ศึกษาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการขยายพันธุ์พืชหายากใกล้สูญพันธุ์

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาเทคโนโลยีในการขยายพันธุ์กาแฟ เชิงการค้า
2. ศึกษาเทคนิคเบื้องต้นและเทคนิคเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน โดยการเลี้ยงในอาหารเหลว และศึกษาผลของ polyamine และ silver nitrate ต่อเพิ่มปริมาณแคลลัสและการพัฒนาเป็น somatic embryo และต้นอ่อน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
3. ขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณปาล์มน้ำมันชนิด pisiferra สำหรับใช้เป็น germ plasm เพื่อคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่ดีในการผลิตลูกผสม และผลิตผลส่งโรงงาน
4. ขยายพันธุ์และพัฒนาให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม ในดาหลา บุก รองเท้านารี
5. เพื่อศึกษาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์พืชหายากใกล้สูญพันธุ์ 4 ชนิด ได้แก่ เทียนนกแก้ว กล้วยไม้กุหลาบกระบี่ กล้วยไม้เขาพระวิหาร และ ตาเหินสมุย

การวิจัยประกอบด้วย 6 กิจกรรมวิจัย แยกตามชนิดหรือกลุ่มพืช ซึ่งมีวิธีการวิจัยตามหัวข้อหลัก ดังนี้

1. การขยายพันธุ์พืชทาง vegetative จากต้นที่ให้ผลผลิตสูง หรือการขยายพันธุ์พืชที่มีปัญหาในการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดตามธรรมชาติ หรือต้องการเพิ่มปริมาณในเวลารวดเร็ว ซึ่งสามารถทำได้โดยการนำชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชได้แก่เมล็ด ราก ใบ ดอก ตายอด ตาข้าง ส่วนยอด (apical meristem) มาเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งมีสูตรอาหารและมีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในพืชแต่ละชนิด โดยการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ผ่านขบวนการ organogenesis หรือ ผ่านขบวนการ embryogenesis รวมทั้ง ปัจจัยต่างๆที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและมีการปรับสภาพบางอย่างเพื่อให้มีการพัฒนาความอยู่รอดในสภาพแปลงปลูกในเปอร์เซ็นต์ที่สูงเท่าที่สามารถทำได้
2. สร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมให้เกิดขึ้นในเซลล์ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยทำให้เกิด somaclonal variation การสร้างต้น tetraploid การใช้สารเคมีก่อการกลายพันธุ์ การฉายรังสีแคลลัส สามารถคัดเลือกได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะตามความต้องการ หรือเป็นสายพันธุ์ที่จะนำไปใช้เป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ที่ดีในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. การขยายพันธุ์กาแฟโรบัสตาในปริมาณมากในสภาพปลอดเชื้อ กิจกรรมวิจัยเรื่องนี้แบ่งการดำเนินงานเป็น 2 การทดลองได้แก่

1. ศึกษาการเพิ่มปริมาณ somatic embryogenic callus ของกาแฟโรบัสต้าสายพันธุ์ FRT17

1.1 นำใบอ่อนกาแฟสายพันธุ์ FRT17 จากต้นแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในเรือนกระจก มาทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อ แล้วตัดส่วนเส้นใบและขอบใบออก และตัดแต่งให้ได้ขนาด 3x3 มิลลิเมตร วางชิ้นส่วนใบที่ตัดแต่งเรียบร้อยแล้วลงบนอาหารแข็งในจานเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้ในแต่ละกรรมวิธี ทำการทดลองจำนวน 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 เดือน ธ.ค. 2548 และครั้งที่ 2 เดือนมกราคม 2550 โดยในแต่ละกรรมวิธีใช้ใบกาแฟใบเดียวกันเป็นซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม อาหาร สูตร 23A8

กรรมวิธีที่ 2 Peirson basis + 2iP 1 mg/l + IBA 5 mg/l

กรรมวิธีที่ 3 Peirson basis + BAP 1 mg/l + IBA 5 mg/l

กรรมวิธีที่ 4 Peirson basis + 2iP 1 mg/l + IAA 5 mg/l

กรรมวิธีที่ 5 Peirson basis + BAP 1 mg/l + IAA 5 mg/l

กรรมวิธีที่ 6 Peirson basis + 2iP 1 mg/l + NAA 5 mg/l

กรรมวิธีที่ 7 Peirson basis + BAP 1 mg/l + NAA 5 mg/l

ในแต่ละกรรมวิธี ใช้ชิ้นส่วนใบจำนวน 250 ชิ้น 5 ชิ้น ต่อ จานเพาะเลี้ยง

1.2 นำจานเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีชิ้นส่วนใบไปเก็บไว้ในที่มือ อุณหภูมิประมาณ 26 องศาเซลเซียส

1.3 ทำการเปลี่ยนอาหารตราแต่ละกรรมวิธี ทุก 8 สัปดาห์

1.4 บันทึกข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนใบ

2. การทดสอบการใช้ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ Temporary Immersion Bioreactor ในการผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้าจากวิธี Somatic Embryogenesis

2.1 แบ่งการทดสอบระบบการเลี้ยงแบบ Temporary Immersion Bioreacter กับกาแฟโรบัสต้าเป็น 2 ส่วน

2.1.1 ระบบ Temporary Immersion Bioreacter แบบใช้เครื่องปั้มอากาศ เป็นระบบการเลี้ยงที่ใช้เครื่องปั้มอากาศเป็นเครื่องให้แรงดันอากาศกับขวดใส่อาหาร

2.1.2 ระบบ Temporary Immersion Bioreacter แบบไม่ใช้เครื่องปั้มอากาศ เป็นระบบที่ไม่ใช้เครื่องปั้มอากาศ แต่ใช้การต่างของระดับน้ำเป็นตัวให้อาหาร

2.2 ผลิต torpedo embryos จาก somatic callus โดยใช้อาหารสูตร 23MSBAP0 จนได้ torpedo embryos เพียงพอต่อการย้ายไปเลี้ยงในทุกระบบ โดยในแต่ละระบบจะใช้ torpedo embryos ประมาณ 10 กรัม

2.3 จัดเตรียมระบบ Temporary Immersion Bioreacter ทั้งสองแบบ โดยระบบที่ทำด้วยแก้วฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และระบบที่ทำจากพลาสติก ฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมม่าที่ 50 kgray นาน 24 ชั่วโมง

2.4 เตรียมอาหาร DES 1 ใส่ในทั้งสองระบบ

2.5 ทดสอบการปนเปื้อนเชื้อของทั้งสองระบบ โดยการวางไว้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไม่น้อยกว่า 2 สัปดาห์

2.6 ใส่ torpedo embryos ลงในระบบที่ทดสอบการปนเปื้อนแล้ว ให้อาหารวันละ 2 ครั้งๆ 10 นาที หลังการเลี้ยง 1 เดือนแรก เปลี่ยนอาหารเป็นสูตร DES2 และเปลี่ยนอาหารสูตร DES2 ทุกๆเดือนจน embryos พัฒนาเป็นต้นอ่อนกาแฟที่มีใบเลี้ยง

เกิดจากการเพาะเลี้ยงยอดหน่อ/หน่ออ่อน มาเพิ่มปริมาณ โดยนำมาเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช BA 5 μM (กษิดิศ และคณะ, 2549)

3.ศึกษาระยะที่เหมาะสมในการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง

ทำการศึกษาเบื้องต้นของระยะห่างและปริมาณรังสีที่ทำให้เกิดการตายประมาณ 50 % (LD_{50}) นำไปฉายรังสีแกมมาชนิดเรื้อรัง ที่ระยะ 1.5 , 2.5 ,3.5 4.5 และ 5.5 เมตร นาน 14 วัน ซึ่งเป็นช่วงระยะเวลานานที่สุดที่ทางศูนย์ฉายรังสี ได้กำหนดไว้ ใช้ตัวอย่างพืช ระยะละ 35 ชิ้น หรือก้อนแคลลัส

บันทึก อัตราการรอดชีวิต ปริมาณรังสีที่ได้รับ (total dose rate) ภายหลังจากนำออกไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ นาน 2 เดือน

4. ผลของรังสีปริมาณที่เหมาะสมต่อการกลายพันธุ์ของบุก

ทำการเพิ่มปริมาณแคลลัส และ microshoot แล้วนำบุกไปฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง ที่ระยะ 4.5 และ 5.5 เมตร นาน 12 วัน ใช้ชิ้นส่วนพืช ระยะ 50 ชิ้น หรือก้อนแคลลัส บันทึกอัตราการรอดชีวิต ภายในห้องปฏิบัติการในขวด และลักษณะการเจริญเติบโต ภายหลังจากนำออกไปเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ ระยะเวลาให้แสง 20 ชั่วโมง ต่อวัน นาน 3 เดือน

อัตราการรอดชีวิตในโรงเรือน ความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 28 ± 5 องศาเซลเซียส และนอกโรงเรือน

ผลการวิจัย

1. การขยายพันธุ์กาแฟโรบัสตาในปริมาณมากในสภาพปลอดเชื้อ

1.1 ศึกษาการเพิ่มปริมาณ somatic embryogenic callus ของกาแฟโรบัสต้าสายพันธุ์ FRT17

จากการทดลองเพิ่มปริมาณแคลลัสในกาแฟสายพันธุ์ FRT17 ครั้งที่ 1 หลังจากทำการทดลอง 3 เดือนแรก ทำการเปลี่ยนอาหาร โดยใช้อาหารสูตรเดิมตามแต่ละกรรมวิธีพบว่า ในช่วง 3 เดือนแรกชิ้นส่วนใบยังไม่มีการสร้าง somatic embryogenic callus (แคลลัส) ในทุกกรรมวิธี แต่ในกรรมวิธีที่มีการเติมฮอร์โมน คือกรรมวิธี 2 – 7 ชิ้นส่วนมีการสร้างกลุ่มเซลสีขาวขึ้นมาในขณะที่กรรมวิธีควบคุมชิ้นส่วนพืชไม่มีการเปลี่ยนแปลงและชิ้นส่วนพืชเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม หลังจากทำการทดลอง 7 เดือน (โดยเปลี่ยนอาหารหลัง 3 เดือนแรก ทุกๆ 2 เดือน) พบว่า ชิ้นส่วนพืชในอาหารกรรมวิธีที่ 2 สามารถสร้างแคลลัสได้ คิดเป็น 22 เปอร์เซนต์ของชิ้นส่วนทั้งหมด (ตารางที่ 1) โดยชิ้นส่วนที่มีการสร้างแคลลัสจากกรรมวิธีนี้นั้นเป็นชิ้นส่วนใบจากใบเดียวกัน

การทดลองครั้งที่ 2 (ธันวาคม 49) หลังการทดลอง 3 เดือน (เปลี่ยนอาหารครั้งแรก) พบว่าชิ้นส่วนใบในทุกกรรมวิธียกเว้นกรรมวิธีควบคุม มีการเปลี่ยนแปลงโดยบริเวณขอบของชิ้นส่วนเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมขาว และขอบหยักไปมา ในขณะที่ชิ้นส่วนใบในกรรมวิธีควบคุม เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและขอบเรียบ อย่างไรก็ตามในทุกกรรมวิธียังไม่มีชิ้นส่วนใบใดมีการสร้างแคลลัส

หลังจากทำการทดลอง 10 เดือน (หลังเปลี่ยนอาหารครั้งแรก ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 เดือน โดยใช้สูตรอาหารตามกรรมวิธี) พบว่า ชิ้นส่วนใบในกรรมวิธีที่ 2 มีการสร้างแคลลัสมากที่สุดคิดเป็น 20.4 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 3, 4 และ 5 ตามลำดับ (14.8, 12.4 และ 5.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีที่ 6 และ 7 ชิ้นส่วนใบมีมีการสร้างแคลลัส (ตารางที่ 1) เมื่อนำเอาแคลลัสจากทุกกรรมวีที่ ไปผลิต torpedo embryos พบว่าแคลลัสที่ได้จากทุกกรรมวิธีสามารถพัฒนาไปเป็น torpedo embryos ได้

มากเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน พบว่า ในการทดลองทั้งสองครั้ง การปนเปื้อนในทุกกรรมวิธีต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นผลมาจากการต้นแม่พันธ์มีการเลี้ยงในอาคารเรือนกระจก ซึ่งมีการป้องกันกำจัดโรคและแมลงอย่างสม่ำเสมอทำให้ใบที่เก็บมาทำการเพาะเลี้ยงมีเชื้อปนเปื้อนน้อย

ในการทดลองครั้งที่ 2 มีการใช้ใบกาแฟในการทดลองจำนวน 6 ใบ พบว่าการสร้างแคลลัสของใบกาแฟแต่ละใบในแต่ละสูตรอาหารมีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 2) โดยในบางใบสามารถสร้างแคลลัสได้ในหลายสูตรอาหาร ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความสมบูรณ์และความแก่อ่อนของใบกาแฟที่นำมาใช้อาจไม่มีความเท่ากัน

จากการทดลองการเพิ่มปริมาณแคลลัสของกาแฟโรบัสต้าสายพันธ์ FRT17 ทั้งสองครั้งพบว่า ชิ้นส่วนใบของกาแฟสายพันธ์นี้ จะตอบสนองได้ดีในสูตรอาหารที่มีการเติมไซโตไคนิน (cytokinin)ทั้ง 2iPและ BAP แต่ตอบสนองต่อ 2iP ได้ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Pierson *et al.* (1983) และ Hatanaka *et. al.* (1991) ที่พบว่า ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของ *Coffea canephora* การใช้ 2iP ทำให้ชิ้นส่วนใบมีการสร้างแคลลัสมากกว่าการใช้ BAP โดยปริมาณ 2iPและ BAP ที่มีการใช้ในการทดลองทั้งคู่นั้นคือ 5 µM

ผลของการตอบสนองของชิ้นส่วนใบกาแฟสายพันธ์ FRT17 ต่อออกซินพบว่าในการทดลองครั้งแรกชิ้นส่วนใบมีการสร้างแคลลัสเฉพาะในสูตรอาหารที่มี IBA แต่ในการทดลองครั้งที่สองชิ้นส่วนใบมีการสร้างแคลลัสทั้งในสูตรอาหารที่มีการเติม IBA และ IAA ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Staritsky and Hasselt (1980), Pierson *et. al.* (1983) และ Hatanaka *et. al.* (1991) ที่พบว่าชิ้นส่วนใบของ *C. canephora* สามารถสร้างแคลลัสได้ดีในสูตรอาหารที่มีการเติม IBA และ IAA โดยสร้างแคลลัสได้ดีที่สุดในสูตรอาหารที่มีการเติม IBA 5 µM (Hatanaka *et. al.* , 1991) และ 5 mg/l (Staritsky and Hasselt , 1980) นอกจากนี้ในการทดลองของ Hatanaka *et. al.* (1991) ยังพบว่า NAA และ 2,4-D มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้างแคลลัสใน *C. canephora* แต่มีคุณสมบัติกระตุ้นการสร้างแคลลัสใน *C. arabica* ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่าในสูตรอาหารที่มีการเติม NAA ชิ้นส่วนใบไม่มีการสร้างแคลลัสในการทดลองทั้งสองครั้ง

ตารางที่ 1 เปอร์เซนต์การปนเปื้อนและการสร้างแคลลัสของใบกาแฟโรบัสต้าสายพันธุ์ FRT 17

กรรมวิธี	% ปนเปื้อน		% การสร้างแคลลัส	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่2
ควบคุม (23A8)	3	2	0	0
2 (Peirson basis + 2iP 1 mg/l + IBA 5 mg/l)	2	1	22	20.4
3 (Peirson basis + BAP 1 mg/l + IBA 5 mg/l)	3	1	0	14.8
4 (Peirson basis + 2iP 1 mg/l + IAA 5 mg/l)	2	2	0	12.4
5 (Peirson basis + BAP 1 mg/l + IAA 5 mg/l)	0	1	0	5.2
6 (Peirson basis + 2iP 1 mg/l + NAA 5 mg/l)	2	2	0	0
7 (Peirson basis + BAP 1 mg/l + NAA 5 mg/l)	3	2	0	0

ตารางที่ 2 จำนวนชิ้นใบกาแฟที่มีการสร้างแคลลัสของกาแฟสายพันธุ์ FRT17 ในการทดลองครั้งที่ 2 (ธันวาคม 49)

ใบที่	จำนวนชิ้นส่วนใบกาแฟที่มีการสร้างแคลลัส (ชิ้น)						
	กรรมวิธี 1	กรรมวิธี 2	กรรมวิธี 3	กรรมวิธี 4	กรรมวิธี 5	กรรมวิธี 6	กรรมวิธี 7
1	0	9	9	8	11	0	0
2	0	14	0	0	0	0	0
3	0	0	16	9	2	0	0
4	0	28	8	0	0	0	0
5	0	0	0	5	0	0	0
6	0	0	4	9	0	0	0
รวม	0	51	37	31	13	0	0

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. การขยายพันธุ์กาแฟโรบัสตาในปริมาณมากในสภาพปลอดเชื้อ

1.1 ศึกษาการเพิ่มปริมาณ somatic embryogenic callus ของกาแฟโรบัสต้าสายพันธุ์ FRT17

สูตรอาหารที่มีความเหมาะสมในการใช้ในการผลิตแคลลัสของกาแฟโรบัสต้าสายพันธุ์ FRT 17 คือสูตรอาหารที่ใช้สูตรอาหารพื้นฐานของ Pierson et al. (1983) และมีการเติมไซโตไคนิน คือ 2iP หรือ BAP และเติมออกซิน IBA หรือ IAA gv, เอมบริโอจินิค แคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็น torpedo embryos ได้

1.2. การพัฒนาระบบ Temporary Immersion Bioreactor เพื่อใช้กับการผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้าโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ระบบแบบใช้เครื่องปั้มอากาศมีแนวโน้มที่จะพัฒนาเพื่อใช้ในการผลิตในปริมาณมากได้ดีกว่าระบบไม่ใช้เครื่องปั้มอากาศ สามารถผลิตกล้ากาแฟได้ 11.900 ต้นอ่อน อย่างไรก็ตามยังต้องมีการพัฒนาระบบนี้ให้เหมาะสมกับการนำมาใช้กับการผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้าในปริมาณมากต่อไป

2. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1. ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนต่างๆ ของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 3 คัพภะอ่อนเกิดแคลลัสได้สูงสุด 83.30 % เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม dicamba 10 µM นาน 4 เดือน ช่อดอกอ่อนตัวเมียเกิดแคลลัสได้สูงสุด 15.80 % บนอาหารสูตร Y3 ที่เติม dicamba 15 µM เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 10 เดือน และใบอ่อน (young leaf primordia)ที่ฝังตัวอยู่ข้างในส่วนยอดของปาล์มน้ำมันเกิดแคลลัสได้ 24.63 % บนอาหาร MS ที่เติม dicamba 15 µM เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 6 เดือน ทำการเพิ่มปริมาณแคลลัสที่เกิดขึ้น โดยนำแคลลัสจากชิ้นส่วนต่างๆ เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม dicamba ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า แคลลัสจากคัพภะอ่อนเพิ่มปริมาณได้สูงสุด 7.02 เท่า บนอาหาร MS ที่เติม dicamba 1 µM แคลลัสจากช่อดอกอ่อน เพิ่มได้สูงสุด 3.87 เท่า เมื่อเติม dicamba 3 µM และแคลลัสจากใบอ่อนที่อยู่ภายในยอด เพิ่มปริมาณได้ 9.13 เท่า เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติม dicamba 1 µM

2.2. ศึกษาการเกิด embryogenesis ภายหลังการเลี้ยงแคลลัสนาน 4 เดือน แคลลัสจากคัพภะอ่อนช่อดอกอ่อนและใบอ่อน สามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอจินิคแคลลัส สูงสุด 50.10% 20.04% และ 46.76 % ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Y3 + NAA 10 µM + abscisic acid 2 µM และเอมบริโอจินิคแคลลัสที่เกิดจากคัพภะอ่อน ช่อดอกอ่อน และใบอ่อน จะมีพัฒนาการเป็น somatic embryo ในระยะต่างๆ ได้แก่ ระยะ nodular shape ระยะ heart หรือ torpedo shape ระยะ globular shape และระยะ haustorium shape คิดเป็น 40.08% 13.36% และ 33.34 % ตามลำดับ บนอาหาร Y3 + NAA 10 µM + abscisic acid 2 µM จากนั้น somatic embryo จะเจริญเติบโตเป็น polyembryony 2-3 ต้นอยู่รวมเป็นกระจุกมียอดและรากที่สมบูรณ์ หรือเจริญเป็นยอดขนาดเล็ก 4-5 ยอด ติดกันเป็นกลุ่มไม่มีรากแต่สามารถชักนำให้เกิดรากได้บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 15-45 µM โดยมีอัตราการเกิดราก 28.8 - 31.09 % หลังจากการเลี้ยงในอาหารชักนำนาน 4 เดือน

2.3. ในการศึกษาเทคนิคเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เอมบริโอจินิคแคลลัสระยะเริ่มต้นที่มีสีขาวขุ่น สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ในอาหารเหลว 2กลุ่ม คือ อาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4 – D และ อาหารสูตร Y3 เติม Picloram โดยสามารถเพิ่มปริมาณได้มากที่สุด 3.84 เท่า และ 3.21 เท่า เมื่อเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหาร Y3 ที่เติม Pichoram 10 µM ตามลำดับ ภายในเวลา 4 เดือน เอมบริโอจินิคแคลลัสที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวทั้ง 2 ชนิด เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารแข็ง MS ที่ปราศจากสารกระตุ้นการเจริญเติบโต นาน 4 เดือน สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอมบริโอในระยะที่มีรูปร่างเรียวแหลม (haustorium shape) และไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นโซมาติกเอมบริโอที่สมบูรณ์ได้ แต่สามาถเจริญเป็นยอดที่มีลักษณะปกติได้บ้าง แต่ส่วนใหญ่จะมีการเติบโตพัฒนาเป็นรากเพียงอย่างเดียวและเป็นการพัฒนาที่ผิดปกติ

ข้อเสนอแนะ

1. สามารถนำเทคนิคไปประยุกต์ใช้กับพืชหายากหรือใกล้สูญพันธุ์ในกล้วยไม้ชนิดใกล้เคียงกันได้
2. สามารถใช้เป็นแหล่งเชื้อพันธุกรรมสำหรับแลกเปลี่ยน และปรับปรุงพันธุ์

6. การสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อคัดเลือกพันธุ์ดาหลาและบุก

6.1. การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในดาหลา พบว่า เมื่อนำยอดอ่อนดาหลาพันธุ์บัวแดงใหญ่ บานเย็น และแดงอินโด เลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติม BA 10 µM ร่วมกับโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.03 0.06 และ 0.09% (w/v) และ DMSO 2% (v/v) นาน 1 2 และ 3 วัน ในรุ่น M1V1 อัตราการรอดชีวิตจะค่อยๆลดลงตามความเข้มข้นและระยะที่เลี้ยงร่วมกับโคลชิซินที่เพิ่มขึ้น และจะมีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ เช่น เติบโตช้า เตี้ย ใบบิดม้วน ใบขาวซีด ใบเล็ก หรือใบสีเขียวเข้ม เมื่อทำการวัดระดับชุดของโครโมโซมในรุ่น M1V2 โดยใช้วิธี flow cytometry พบว่ามีจำนวน mixoploid (2n + 4n) ในพันธุ์บัวแดงใหญ่ 60.71% บานเย็น 43.47% และแดงอินโด 39.28% เมื่อนำยอดที่มีปริมาณพื้นที่ของ 4n มากกว่า 60% ของทั้ง 3 พันธุ์ ไปเพิ่มปริมาณจนถึงรุ่น M1V4 คัดเลือกต้นที่มีลักษณะใบหนาเป็นมัน สีเขียวเข้ม ไปวัดชุดโครโมโซมด้วยเครื่อง flow cytometer อีกครั้ง พบว่าในพันธุ์บัวแดงใหญ่มีระดับชุดโครโมโซมเป็น 4n (เตตราพลอยด์) จำนวน 5 ต้น จากการใช้โคลชิซิน ความเข้มข้น 0.06% (w/v) นาน 2 และ 3 วัน ส่วนพันธุ์บานเย็นและแดงอินโด ยังคงพบระดับโครโมโซมเป็น mixoploid ไม่สามารถคัดเลือกพันธุ์ที่เป็นเตตราพลอยด์ได้

6.2. ผลของรังสีต่ออัตรารอดชีวิต และการเจริญเติบโต เมื่อฉายรังสีที่ระยะ 4.5 และ5.5 เมตร ได้รับปริมาณรังสีแกมมาเรื้อรัง 4.3 และ 2.9 krad มีการรอดชีวิต 35 และ 52 % ซึ่งในจำนวนที่รอดชีวิต เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญ และสภาพความเข้มข้นแสงประมาณ 3000 ลักซ์ จะมีทั้งส่วนที่เจริญเติบโตปกติ และผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการฉาย ส่วนลักษณะที่เจริญเติบโตผิดปกตินั้น การแตกกอ จะแตก microshoot เล็กๆมาก ด้านความสูงส่วนใหญ่จะแคระแกรน และความผิดปกติของใบ พบใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่างมากกว่าใบด่าง และคัดเลือกต้นที่มีความทนทานต่อแสงแดดจัดในสภาพเรือนทดลองได้ 1 ต้น แต่ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้

ข้อเสนอแนะ/การนำไปใช้ประโยชน์

สามารถนำดาหลาพันธุ์บัวแดงใหญ่ที่มีโครโมโซม 4n ไปใช้ประโยชน์เป็นฐานพันธุกรรมของดาหลาได้ ขณะนี้อยู่ระหว่างการปลูกทดสอบที่ศูนย์วิจัยพืชสวนยะลา และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชนบูรณ์ เพื่อศึกษาลักษณะการเติบโต การแตกกอ รวมทั้งลักษณะของดอก

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. ได้เทคโนโลยีการผลิตกาแฟเชิงการค้า

การชักนำชิ้นส่วนใบกาแฟโรบัสต้าเพื่อการผลิตต้นอ่อน ด้วยวิธี Somatic embryogenesis ทำการเปรียบเทียบอาหาร ที่สัดส่วนของออกซินและไซโตไคนินแตกต่างกัน พบว่าชิ้นส่วนใบมีแนวโน้มสร้างเนื้อเยื่อได้ดีกับอาหารสูตร Peirson et. al. (1983) ที่เติม IBA 5 mg/l และ 2iP 1 mg/l การขยายพันธุ์กาแฟอีกวิธีการหนึ่งคือใช้ ระบบ Temporary Immersion Bioreactor (TIB) ทำการทดลองการเลี้ยงด้วยวิธีนี้ 2 ระบบคือ (1) แบบใช้เครื่องปั้มอากาศที่ทำจากแก้ว สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้และ (2) แบบไม่ใช้เครื่องปั้มอากาศที่ทำจากพลาสติก สามารถผลิตต้นอ่อนกาแฟโรบัสต้าจากระบบ (1) เฉลี่ย 1,400 ต้นต่ออาหารจำนวน 2 ลิตร และจากระบบ (2) เฉลี่ย 1,000 ต้นต่ออาหารจำนวน 2 ลิตร

2.ได้เทคโนโลยีการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สามารถขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมัน tenera type พันธุ์สุราษฎร์ธานี 3 โดยนำชิ้นส่วนคัพภะอ่อน ช่อดอกอ่อน และใบอ่อนที่ฝังตัวอยู่ภายในยอด (young leaf primoedia) มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ Y3 ที่เติม dicamba ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าคัพภะอ่อนที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม dicamba 10 µM มีอัตราการเกิดแคลลัสสูงสุด ช่อดอกอ่อนมีอัตราการเกิดแคลลัสสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Y3 เติม dicamba 15 µM ส่วนใบอ่อนมีอัตราการเกิดแคลลัสสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เติม dicamba 15 µM ในการศึกษากระบวนการ embryogenesis พบว่า แคลลัสจากคัพภะอ่อน ช่อดอกตัวเมีย และใบอ่อน มีอัตราการพัฒนาเป็น embryogenic callus บนอาหาร Y3 + NAA 10 µM+ abscisic acid 2 µM และมีอัตราการพัฒนาเป็น somatic embryo บนอาหารสูตรเดิม somatic embryo สามารถชักนำให้เกิดรากได้เมื่อเลี้ยงบนอาหาร ½ MS ที่มี NAA 15-45 µM

เมื่อทำการศึกษาผลของ polyamine และ silver nitrate ต่อเพิ่มปริมาณแคลลัสปาล์มน้ำมัน โดยเลี้ยงแคลลัสในสูตรอาหาร MS ร่วมกับ silver nitrate และ 2ip (2-isopentyladenine) ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/l การไม่ใส่ silver nitrate จะได้น้ำหนักแคลลัสมากกว่าการใส่ silver nitrate ส่วนการเลี้ยงแคลลัสในสูตรอาหาร MS ร่วมกับสารกลุ่ม Polyamine พบว่า สูตรอาหาร MS ร่วมกับ spermidine 10 µM ให้ค่าน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสสูงสุด การศึกษาเทคนิคเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันอีกวิธีการหนึ่งคือการเพิ่มปริมาณ Embryogenic callus ในอาหารเหลว นำเอมบริโอจินิคแคลลัส ที่มีลักษณะขาวขุ่นเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าเอมบริโอจินิคแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถเพิ่มปริมาณได้ 3.84 เท่าภายในเวลา 4 เดือน เมื่อนำเอมบริโอจินิคแคลลัสที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว มาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารแข็ง MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตนาน 4 เดือน สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอมบริโอในระยะที่มีรูปร่างเรียวแหลม (haustorium shape) แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นโซมาติกเอมบริโอที่สมบูรณ์ได้

นำเทคนิคที่ได้มาขยายผลโดยทำการการขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันชนิด fertile pisifera พบว่าคัพภะอ่อน และช่อดอกอ่อนตัวเมีย สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีบนอาหาร MS ที่เติม dicamba คัพภะอ่อนเกิดแคลลัสได้เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม dicamba 5 -10 µM และช่อดอกอ่อนตัวเมียเกิดแคลลัสได้บนอาหาร MS ที่เติม dicamba 10–15 µM และสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัส ได้ เมื่อใช้ dicamba 2-4 µM ส่วนการพัฒนาเป็นต้นอ่อนจะดำเนินการในปี 2554-2555 ต่อไป

3. ได้เทคนิคการขยายพันธุ์ไพล ปลอดโรค แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นในกวาวเครือขาว

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) และกวาวเครือขาว (*Pueraria candollei* Grah.ex Benth. Var. mirifica) โดยนำเหง้าไพลมาเพาะเลี้ยง อาหาร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 mg/l ชักนำให้เกิดยอดรวมสูงที่สุดเฉลี่ย 2.27 ยอด *In vitro* microshoot สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 4.32 ยอดต่อเมื่อเลี้ยงในอาหาร LS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 mg/l เมื่อนำต้นกล้าไพลปลูกในสภาพธรรมชาติ พบว่าต้นกล้ามีอัตราการรอดตายสูงถึง 98.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของกวาวเครือขาว ในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า หลังการเพาะเลี้ยง 1 -2 เดือน สูตร MS+2,4-D 2.21 มก./ลิตร+kinetin 0.48 มก./ลิตร และสูตรอาหาร

ภาคผนวก

ยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของมันสำปะหลัง

ตารางที่ 1 แสดงคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ของยีน Sucrose Phosphate Synthase (SPS)

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ความยาว
SPS13 (forward)	CAA CTC TCC CAT TCC GTC CCC CGA TCT CG	29
SPS13 (reverse)	CGT TGG CTT GGG TGT GGA AAC AGA AGC TC	29
SPSXbaI (forward)	CAC TCT AGA ATG GCG GGC AAC GAC AAC TGG ATC AAC	36
SPSKpnI (reverse)	CAC GGT ACC TTA TTG TGT GAG TAT ACC CAT CTG CTG C	37
NOS (forward)	GTT TGA ACG ATC GGG GAA ATT CGA GCT C	28
35SCaMV (reverse)	CAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA CAA GCT GAC	30

```
gb|AB001338.1| Saccharum officinarum SoSPS2 premature mRNA for sucrose-phosphate
synthase, complete cds
Length=3267

Score = 5194 bits (5760),  Expect = 0.0
Identities = 2932/2961 (99%), Gaps = 4/2961 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query  1    ATGGCGGGCAACGACAACTGGATCAACAGCTACCTCGACGCTATCCTAGACGCCGGAAAG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  38   ATGGCGGGCAACGACAACTGGATCAACAGCTACCTCGACGGCATCCTAGATGCCGGAAAG  97

Query  61   GCCGCCATCGGCGGCGACCGGCCCTCCCTCCTCCTCCGCGAGCGCGGCCATTTCTCCCCC  120
            ||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  98   GCCGCCATCGGCGGGAACCGGCCCTCCCTCCTCCTCCGCGAGCGCGGCCATTTCTCCCCC  157

Query  121  GCGCGCTACTTCGTCGAGGAGGTCATCACCGGCTACGACGAGACCGACCTCTACAAGACA  180
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  158  GCGCGCTACTTCGTCGAGGAGGTCATCACCGGGTACGACGAGACCGACCTCTACAAGACA  217

Query  181  TGGCTACGCGCGAACGCCATGCGGAGCCCGCAGGAGAGGAACACGCGGCTCGAGAACATG  240
            |||||||||||||||||||| |||| ||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  218  TGGCTACGCGCGAACGCCATGCGGAGCC-GCAG-AGAGGAACACGCG-CTCGAGAACATG  274

Query  241  ACGTGGAGGATCTGGAACCTTGCAAGGAAGAAGAAGGAGTTCGAGAAAGAAGAAGCTTGT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  275  ACGTGGAGGATCTGGAACCTTGCAAGGAAGAAGAAGGAGTTCGAGAAAGAAGAAGCTTGT  334

Query  301  CGTTTGTCAAAACGCCAGCCAGAAACTGAGAAAACACGAGCTGACGCTACTGCAGATATG  360
            |||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  335  CGTTTGTCAAAACGCCAGCCAGAAACTGAGAAAACACGAGCTGATGCTACTGCAGATATG  394

Query  361  TCTGAAGATCTCTTTGAAGGTGAAAAGGGAGAAGATGCTGGTGATCCATCTGTTGCATAT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  395  TCTGAAGATCTCTTTGAAGGTGAAAAGGGAGAAGATGCTGGTGATCCATCTGTTGCATAT  454

Query  421  GGGGACAGCACCACAGGGAGCTCACCTAAGACAAGTTCAATTGACAAGCTATACATAGTA  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  455  GGGGACAGCACCACAGGGAGCTCACCTAAGACAAGTTCAATTGACAAGCTATACATAGTA  514

Query  481  TTGATCAGTTTACATGGTCTGGTCCGTGGTGAGAATATGGAGCTTGGCCGAGATTCAGAT  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  515  TTGATCAGTTTACATGGTCTGGTCCGTGGTGAGAATATGGAGCTTGGCCGAGATTCAGAT  574

Query  541  ACGGGTGGCCAGGTCAAATATGTGGTTGAACTTGCTAAAGCACTAAGTTCATCTCCTGGA  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  575  ACGGGTGGCCAGGTCAAATATGTGGTTGAACTTGCTAAAGCACTAAGTTCATCTCCTGGA  634

Query  601  GTTTACCGGGTTGATCTGCTAACAAGACAAATATTAGCACCAAATTTTGATCGTAGTTAT  660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  635  GTTTACCGGGTTGATCTGCTAACAAGACAAATATTAGCACCAAATTTTGATCGTAGTTAT  694

Query  661  GGTGAACCTGCAGAATTATTGGTTTCAACAAGTGGTAAAAATTCTAAACAAGAAAAAGGA  720
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  695  GGTGAACCTGCAGAATTATTGGTTTCAACAAGTGGTAAAAATTCTAAACAAGAAAAAGGA  754

Query  721  GAAAATAGTGGCGCATATATAATTCGGATACCATTTGGTCCAAAAGATAAGTATCTAGCT  780
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  755  GAAAATAGTGGCGCATATATAATTCGGATACCATTTGGTCCAAAAGATAAGTATCTAGCT  814

Query  781  AAAGAACATCTATGGCCTTTCATTCAAGAATTTGTTGATGGTGCACTCAGCCATATTGTG  840
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  815  AAAGAACATCTATGGCCTTTCATTCAAGAATTTGTTGATGGTGCACTCAGCCATATTGTG  874

Query  841  AGGATGTCAAAAGCCATAGGTGAAGAAACTGGCCGCGGGCATCCAGTATGGCCTTCTGTG  900
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  875  AGGATGTCAAAAGCCATAGGTGAAGAAACTGGCCGCGGGCATCCAGTATGGCCTTCTGTG  934

Query  901  ATTCATGGGCATTATGCCAGTGCAGGAATTGCTGCTGCTTTACTTTCTGGAGCACTTAAC  960
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  935  ATTCATGGGCATTATGCCAGTGCAGGAATTGCTGCTGCTTTACTTCTTGGAGCACTTAAC  994
```

ภาพผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ alignment ระหว่างลำดับเบสของยีน Sucrose Phosphate Synthase (SPS) ของอ้อยที่ accession number AB001338 กับ ลำดับเบสของยีน SPS ที่โคลนได้

บรรณานุกรม

โครงการวิจัยที่ 1

กษิดิศ ดิษฐบรรจง, มงคล เกษประเสริฐ, ชยานิจ ดิษฐบรรจง และ เสาวนี เขตสกุล.2549. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบุกเพื่อการขยายพันธุ์. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2548, สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ, กรมวิชาการเกษตร. หน้า 184-191.

กรมวิชาการเกษตร.2550. พรรณไม้แห่งแผ่นดิน เฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เนื่องในโอกาสมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 80 พรรษา 2550, โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด, กรุงเทพฯ, 133 น.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับงานขยายพันธุ์พืช. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด, กรุงเทพฯ, 180 น.

กรรณิการ์ กริมสวัสดิ์. 2550. ผลของสูตรอาหารและวัสดุปลูกต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เหลืองโคราช. การวิจัยปริญญาตรี. ภาควิชาเทคโนโลยีและการอุตสาหกรรม. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, ปัตตานี. 44 น.

เกษนันท์ ศรีเกษม. 2538. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการงอกของเมล็ดและการพัฒนาโปรโตคอร์มของรองเท้านารีฝาหอย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, เชียงใหม่.

กล้วยไม้ : เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต : http://www.powow.com/4592010225/html/Prawat.html

กล้วยไม้ป่าไทย : ในวันที่ฟ้ายังอึมครึม เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต : http://www.oknation.net/blog/print.php?id=104532

กล้วยไม้สกุลต่างๆ [ออนไลน์] [อ้างถึง กันยายน 2550] เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต : http://www.plc.rmutl.ac.th/html/ThaiOrchid/File_html/A.htm (ก.ย. 2550))

จิตราพรรณ พิลึก. 2533. การทดลองเพื่อพัฒนาเทคนิคการเพาะเมล็ดอ่อนของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี. http://www.orchidcenter.org

จิตราพรรณ พิลึก. 2536. การเพาะเมล็ดและเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้. ภาควิชาพืชสวน, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 82 น.

ชยานิจ ดิษฐบรรจง, กษิดิศ ดิษฐบรรจง, ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์, อรรัตน์ วงศ์ศรี และอรุณี ใจเถิง. 2552. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน. เรื่องเต็มการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 47 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, เล่ม 1 สาขาพืช. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 664 หน้า. ISBN 978-974-660-328-7

ฐิติพร ผลธรรมพิทักษ์. 2540. *การขยายโคลนกล้วยไม้รองเท้านารีในสภาพปลอดเชื้อ*.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ. 65 หน้า.

ทวีพงศ์ สุวรรณโร. 2528. การขยายพันธุบุกโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ณรงค์ อัศกุลโกวิท. 2519. การใช้ถ่านในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนในขวดเพาะ. ปัญหา พิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ณัชชา วิสุทธิเทพกุล. 2548. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหายากใกล้สูญพันธุ์. ใน รายงานการประชุมความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้และสัตว์ป่า "ความก้าวหน้าผลงานวิจัยและกิจกรรมปี 2548" ณ. โรงแรมรีเจนท์ชะอำ เพชรบุรี วันที่ 21-24 สิงหาคม 2548, หน้า 368-374

ณัชชา วุ้ยยื้อ และ อัครสัทธิ์ บุญส่งแท้. 2553. การศึกษาการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้ากล้วยไม้สกุลแวนด้าสายพันธุ์ป่าในสภาพปลอดเชื้อ.