# การสร้างมันสำปะหลังเตทราพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

# Production of Tetraploid Cassava via Tissue Culture

*รังษี เจริญสถาพร*[1/] *อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว*[1/]
*โอภาษ บุญเส็ง*[2/]

## บทคัดย่อ

การสร้างมันสำปะหลังเตทราพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้ดำเนินการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง 3 พันธุ์ คือ ระยอง 7 ระยอง 90 และเกษตรศาสตร์ 50 โดยใช้ตาข้างและตายอดอายุ 30-45 วัน เป็น explant ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายเมอร์คิวลิคคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.01% เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS medium ผสมซูโครส 20 ก./ลิตร เป็นเวลา 30-45 วัน ได้ต้นกล้ามันสำปะหลังที่สมบูรณ์และแข็งแรง ซึ่งถูกใช้เป็น explant สำหรับชักนำให้เป็นมันสำปะหลังโพลิพลอยด์ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้สารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.002-0.003% ผสม DMSO 2% ในสภาพปลอดเชื้อ จะได้ explant ที่มีชีวิตรอด จำนวน 33-58% ซึ่งสามารถเจริญและพัฒนาต่อไปเป็นต้นกล้าที่มีลักษณะโพลิพลอยด์ที่มีต้นเตี้ย ข้อถี่ ใบหนา เขียวเข้ม หยักเว้าน้อย การเจริญเติบโตช้า มีรากใหญ่และสั้น รวมทั้งมีปริมาณน้อยกว่าต้นปกติ การคัดเลือกมันสำปะหลังโพลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อโดยวิธีการตัดเป็นข้อๆ ละ 1 ตา ปฏิบัติซ้ำทุก 4-6 ชั่ว จะได้ต้นกล้ามันสำปะหลังโพลิพลอยด์ที่ไม่มีลักษณะ Chimera 100%

## คำนำ

การผลิตมันสำปะหลังทริพลอยด์ (2n=54) เป็นการผสมพันธุ์กันระหว่างมันสำปะหลังพันธุ์เพาะปลูก (cultivated diploid, 2n=36) กับมันสำปะหลังเตทราพลอยด์ (2n=72) ซึ่งจะให้ลักษณะทางการเกษตรที่ดี คือ การเจริญเติบโตดี แข็งแรง ทรงต้นตรง ใบกว้าง และลำต้นแข็งแรง นอกจากนี้ยังพบว่า มีผลผลิตและเปอร์เซ็นต์แป้งสูงกว่ามันสำปะหลังดิพลอยด์ แป้งของมันสำปะหลังทริพลอยด์มีคุณภาพดีเหมาะสมต่อการแปรรูปในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมอื่นๆ และมีการเติมแต่งด้วยสารเคมีน้อย จึงปลอดภัยต่อสุขภาพ

ปัจจุบัน Central Tuber Research Institute, Trivandrum ประเทศอินเดีย ได้ผลิตและขยายพันธุ์มันสำปะหลังทริพลอยด์ครั้งแรกของโลกชื่อว่า Sree Harsha ให้แก่เกษตรกรใช้เพาะปลูก (Sreekumasi, *et al*., 1999)

---

[1/] สถาบันวิจัยพืชไร่

[2/] ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 จังหวัดระยอง

ทั่วไปการชักนำให้มันสำปะหลังดิพลอยด์เป็นเตทราพลอยด์โดยใช้สารละลายโคลชิซีนที่ความเข้มข้น 0.2% หยอดใส่ตาข้างของท่อนมันสำปะหลังดิพลอยด์ ซึ่งจะมีปัญหาลักษณะ Chimera มากและต้องใช้เวลานานในการคัดเลือกให้ได้มันสำปะหลังเตทราพลอยด์ที่สมบูรณ์ (Nassar, 2002) แต่มีรายงานจากพืชหลายชนิด กล่าวว่า การใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับสารละลายโคลชิซีน จะสามารถชักนำให้พืชดิพลอยด์เป็นเตทราพลอยด์ได้ง่ายขึ้นและมีปริมาณมากในระยะเวลาสั้น เช่น การชักนำให้หม่อนดิพลอยด์ด้วยการใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับสารละลายโคลชิซีนที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2% จะหม่อนเตทราพลอยด์ 4.8-39.4% (Chakraborti, *et al*., 1998) และการชักนำ diploid pomegranate ด้วยการใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับสารละลายโคลชิซีนที่ความเข้มข้น 10 ppm จะได้ tetraploid pomegranate 20% (Shao, *et al*., 2003)

ดังนั้นในงานทดลองนี้ จะชักนำให้มันสำปะหลังดิพลอยด์ (2n=36) ด้วยการใช้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับสารละลายโคลชิซีน ให้ได้มันสำปะหลังเตทราพลอยด์ เพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์สำหรับสร้างลูกผสมมันสำปะหลังทริพลอยด์ต่อไป

## วิธีดำเนินการ

**1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง**

**1.1 การเตรียมตัวอย่างพืช (explant) สำหรับใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ** นำท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง 3 พันธุ์ คือ ระยอง 7 ระยอง 90 และเกษตรศาสตร์ 50 มาเพาะในภาชนะในสภาพโรงเรือนปลูกต้นไม้ โดยการควบคุมการให้น้ำและแสงสว่าง เป็นเวลา 30-45 วัน จากนั้นนำส่วนตาข้างของต้นกล้ามาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว 3 วิธี คือ 1) การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอร๊อกที่ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 20 นาที 2) การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอร๊อกที่ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอร๊อกที่ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 10 นาที และ 3) การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายเมอร์คิวลิคคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.01% เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำตัวอย่างทั้งหมดล้างน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง จึงนำไปเพาะบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

**1.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตรต่างๆ** นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วมาเพาะบนอาหารสูตรต่างๆ ที่มีรายงานการชักนำให้ตายอดและตาข้างของมันสำปะหลังเกิดกลุ่มยอด (multiple shoot) ดังต่อไปนี้

- MS medium+NAA 0.2 มก./ลิตร+BAP 0.1 มก./ลิตร+$GA_3$ 0.25 มก./ลิตร (Acedo, 1984)
- MS medium+BAP 10 มก./ลิตร (Konan, *et al*., 1997)
- MS medium+NAA 0.1 มก./ลิตร+BAP 0.1 มก./ลิตร+$GA_3$ 0.1 มก./ลิตร (Danso, *et al*., 1999)
- MS medium+NAA 0.02 มก./ลิตร+BAP 0.05 มก./ลิตร+$GA_3$ 0.04 มก./ลิตร (Danso, *et al*., 1999)
- MS medium+Sucrose 20 ก./ลิตร

จากนั้นนำไปบ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25-28°C และแสงสว่างที่ความเข้มข้น 1,600 ลักซ์ เป็นเวลา 12 ชม./วัน เป็นเวลา 45 วัน แล้วนำมาตรวจสอบจำนวนตัวอย่างพืชที่สร้างกลุ่มยอดและจำนวนตัวอย่างพืชที่สร้างต้นกล้า (plantlet)

**2. การชักนำมันสำปะหลังให้เป็นโพลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้สารโคลชิซีน (Colchicines)**

**2.1 การเตรียมสารละลายโคลชิซีน** ใช้สารโคลชิซีนละลายใน MS medium เหลว โดยเติมตัวทำละลาย DMSO 2% แล้วนำไปผ่านเครื่องกรองแบคทีเรีย ซึ่งทุกขั้นตอนการปฏิบัติต้องทำในตู้ถ่ายเชื้อที่ปลอดจากจุลินทรีย์ โดยให้ความเข้มข้นของสารโคลชิซีน 0,000 0.001 0.002 0.003 0.004 และ 0.005% ตามลำดับ

**2.2 การชักนำส่วนตาข้างและตายอดของ plantlet ด้วยสารละลายโคลชิซีนในสภาพปลอดเชื้อ** นำ plantlet มันสำปะหลังทั้ง 3 พันธุ์ ที่มีอายุ 60 วัน มาตัดเป็นท่อน ยาว 2-3 ซม. (จำนวนตาข้าง 3-4 ตาต่อท่อน) ใส่ภาชนะบรรจุสารละลายโคลชิซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามข้อ 2.1 จากนั้นเพาะเลี้ยงบนเครื่อง Rotary shaker 1,000 รอบต่อนาที ในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25-28$^{o}$C และแสงสว่างที่ความเข้ม 1,600 ลักซ์ นาน 12 ชม./วัน เป็นเวลา 48 ชม. แล้วนำมาล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำท่อนต้นกล้ามันสำปะหลังทั้ง 3 พันธุ์ มาตัดเป็นข้อๆ ละ 1 ตา เพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากข้อ 1.2 และและดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง เป็นเวลา 45-60 วัน

**2.3 การคัดเลือกมันสำปะหลังโพลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ** หลังจากได้ต้นกล้ามันสำปะหลังที่ผ่านกระบวนการชักนำให้เป็นมันสำปะหลังโพลิพลอยด์ด้วยสารละลายโคลชิซีนแล้ว ให้นำต้นกล้ามันสำปะหลังอายุ 45-60 วัน ของ 3 พันธุ์ดังกล่าว มาตัดเป็นข้อๆ ละ 1 ตา นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากข้อ 1.2 ปฏิบัติอย่างน้อย 4-6 ชั่ว (generation) ให้คัดต้นกล้าที่มีลักษณะต้นเตี้ย ข้อถี่ ใบหนาเขียวเข้ม และมีหยักเว้าน้อย ซึ่งเป็นลักษณะของโพลิพลอยด์

## ผลการทดลองและวิจารณ์

**1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง**

**1.1 การเตรียมตัวอย่างพืช (explant) สำหรับใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ** การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของตาข้างและตายอดมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 7 อายุ 30-45 วัน พบว่า การฟอกด้วยสารละลายคลอร๊อกความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 20 นาที ไม่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนได้ ส่วนของตายอดตายทั้งหมด การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอร๊อกความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ผิวที่ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 10 นาที มีแบคทีเรียปนเปื้อนที่ตาข้าง 75% ตายอดและตาข้างมีชีวิตรอด 15 และ 20% ตามลำดับ ส่วนการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายเมอร์คิวลิคคลอไรด์ความเข้มข้น 0.01% เป็นเวลา 20 นาที ตาข้างมีแบคทีเรียและเชื้อราปนเปื้อน 40 และ 10% ตามลำดับ แต่ตายอดและตาข้างมีชีวิตรอด 68 และ 57% ตามลำดับ (ตารางที่ 1) (รูปที่ 1, 2)

**1.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตรต่างๆ** การเพาะเลี้ยงตัวอย่างพืช (explant) ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 7 ระยอง 90 และเกษตรศาสตร์ 50 บนอาหาร 5 สูตร พบว่า พันธุ์ระยอง 7 ระยอง 90 และเกษตรศาสตร์ 50 บนอาหารสูตร MS+NAA+BAP+$GA_3$ ทั้ง 3 สูตร สามารถเกิดกลุ่มยอดได้ โดยอาหารที่ให้จำนวนตัวอย่างพืชที่สร้างกลุ่มยอดสูงสุด คือ สูตร MS medium+NAA 0.02 มก./ลิตร+BAP 0.05 มก./ลิตร+$GA_3$ 0.04 มก./ลิตร กลุ่มยอดมีจำนวนยอด (shoot) 0-5 ยอดต่อ 1 ตัวอย่างพืช แต่มีการเกิดแคลลัสที่ส่วนฐานของกลุ่มยอดทำให้ยอดแต่ละยอดเจริญไม่ดี อ่อนแอ มีสีเหลืองอ่อน และไม่สามารถนำไปชักนำให้เกิดต้นกล้า (plantlet) บนอาหาร MS ไม่มีฮอร์โมนพืชผสมมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50

มีแนวโน้มจะตอบสนองในการชักนำให้จำนวนตัวอย่างพืชที่สร้างกลุ่มยอดสูง บนอาหารทั้ง 3 สูตรดังกล่าว โดยมีจำนวน 25, 20 และ 57% ตามลำดับ

**ตารางที่ 1** การมีชีวิตรอดของตายอดและตาข้างมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 7 จากการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว 3 วิธี

| วิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว | เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนแบคทีเรีย | | เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเชื้อรา | | เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ตายอด | ตาข้าง | ตายอด | ตาข้าง | ตายอด | ตาข้าง |
| 1.สารละลายคลอร๊อกความเข้มข้น 20% เวลา 20 นาที | 0 | 100 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| 2.สารละลายคลอร๊อกความเข้มข้น 10% เวลา 10 นาที ต่อด้วยความเข้มข้น 20% เวลา 10 นาที | 0 | 75 | 0 | 14 | 15 | 20 |
| 3.สารละลายเมอร์คิวลิคคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.01% เวลา 20 นาที | 0 | 40 | 0 | 10 | 68 | 57 |

ตัวอย่างพืชมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 7 ระยอง 90 และเกษตรศาสตร์ 50 สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS+Sucrose 20 g./L. จะได้ต้นกล้า 100% ในเวลา 30-45 วัน โดยส่วนของตัวอย่างพืชในแต่ละพันธุ์จะแตกยอดและรากพร้อมกัน และเจริญเติบโตให้ต้นที่แข็งแรง ใบเขียว ระบบรากแข็งแรง มีรากจำนวนมาก ไม่มีก้อนแคลลัสที่ฐานของส่วนต้นกล้า (ตารางที่ 2) (รูปที่ 3)

**ตารางที่ 2** ผลของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 5 สูตร ต่อการชักนำให้ตัวอย่างพืชของมันสำปะหลัง 3 พันธุ์ สร้างกลุ่มยอด (multiple shoot) และต้นกล้า (plantlet)

| สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ | ระยอง 7 | | ระยอง 90 | | เกษตรศาสตร์ 50 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | จำนวนตัวอย่างพืชที่สร้างกลุ่มยอด (%) | จำนวนตัวอย่างพืชที่ส้างต้นกล้า (%) | จำนวนตัวอย่างพืชที่สร้างกลุ่มยอด (%) | จำนวนตัวอย่างพืชที่ส้างต้นกล้า (%) | จำนวนตัวอย่างพืชที่สร้างกลุ่มยอด (%) | จำนวนตัวอย่างพืชที่ส้างต้นกล้า (%) |
| MS medium+NAA 0.2 mg./L.+BAP 0.1 mg./L.+$GA_3$ 0.25 mg./L. | 20 | 0 | 13 | 0 | 25 | 0 |
| MS medium+BAP 10 mg./L. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MS medium+NAA 0.1 mg./L.+BAP 0.1 mg./L.+$GA_3$ 0.1 mg./L. | 18 | 0 | 16 | 0 | 20 | 0 |
| MS medium+NAA 0.02 mg./L.+BAP 0.05 mg./L.+$GA_3$ 0.04 mg./L. | 46 | 0 | 22 | 0 | 57 | 0 |
| MS+Sucrose 20 g./L. | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |

**2. การชักนำมันสำปะหลังให้เป็นโพลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้สารโคลชิซีน (Colchicines)**

**2.1 การเตรียมสารละลายโคลชิซีนในสภาพปลอดเชื้อ** สารโคลชิซีน 0.05 ก. ละลายในอาหารเหลว MS 100 มล. แล้วทำให้เจือจางที่ความเข้มข้น 0.001 0.002 0.003 0.004 และ 0.005% ตามลำดับ โดยทุกความเข้มข้นผสมด้วยตัวทำละลาย DMSO 2% จากนั้นนำไปกรองผ่านด้วยเครื่องกรองแบคทีเรียทุกขั้นตอนปฏิบัติในสภาพปลอดเชื้อ (รูปที่ 4)

**2.2 การชักนำส่วนตาข้างและตายอดของ plantlet ด้วยสารละลายโคลชิซีนในสภาพปลอดเชื้อ** ส่วนตาข้างและตายอดของต้นกล้ามันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 7 ระยอง 90 และเกษตรศาสตร์ 50 ผ่านการชักนำให้เป็นโพลิพลอยด์ด้วยสารละลายโคลชิซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ส่วนตาข้างและตายอดของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 7 ระยอง 90 และเกษตรศาสตร์ 50 ในสารละลายโคลชิซีนที่ความเข้มข้น 0.002% มีชีวิตรอด 48, 52 และ 58% ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้น 0.003% มีชีวิตรอด 33, 38 และ 41% ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับการมีชีวิตรอดที่ 50% ที่ใช้เป็นความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซีนที่เป็นมาตรฐานสำหรับการชักนำให้ส่วนตายอดและตาข้างของต้นกล้ามันสำปะหลังเป็นโพลิพลอยด์ โดยส่วนยอดและรากที่เจริญจากส่วนตาข้างและตายอดที่ผ่านการชักนำให้เป็นโพลิพลอยด์ด้วยสารโคลชิซีน จะมีการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ ขนาดยอดและรากค่อนข้างใหญ่ หนาและสั้น โดยเฉพาะรากมีจำนวนน้อยกว่าปกติ (ตารางที่ 3) (รูปที่ 5, 6)

**ตารางที่ 3** ผลของสารละลายโคลชิซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการมีชีวิตรอดของตาข้างและตายอดของต้นกล้า (plantlet) มันสำปะหลัง 3 พันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

| พันธุ์มันสำปะหลัง | %การมีชีวิตรอดตายอดและตาข้างของต้นกล้ามันสำปะหลังในสารละลายโคลชิซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0.000% | 0.001% | 0.002% | 0.003% | 0.004% | 0.005% |
| ระยอง 7 | 100 | 67 | 48 | 33 | 0 | 0 |
| ระยอง 90 | 100 | 70 | 52 | 38 | 0 | 0 |
| เกษตรศาสตร์ 50 | 100 | 73 | 58 | 41 | 6 | 0 |

**2.3 การคัดเลือกมันสำปะหลังโพลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ** หลังจากได้ต้นกล้ามันสำปะหลังที่ผ่านกระบวนการชักนำให้เป็นมันสำปะหลังโพลิพลอยด์ อายุ 45-60 วัน นำมาตัดเป็นข้อๆ ละ 1 ตา เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS+sucrose 20 ก./ลิตร ในชั่วที่ 1 ($R_1$) จะได้ต้นเพิ่ม 3-5 เท่าต่อ 1 ต้นกล้า ($R_0$) จะได้ลักษณะต้นกล้า เตี้ย ข้อถี่ ใบหนา เขียว และขอบใบหยักเว้าน้อย เจริญเติบโตช้า จำนวน 1-2 ต้น ทำการขยายต้นกล้าลักษณะดังกล่าว เมื่อต้นกล้าระยะ $R_1$ อายุ 45-60 วัน ทำการตัดเป็นข้อๆ ละ 1 ตา อีก จะได้ต้นกล้าระยะ $R_2$ ซึ่งมีลักษณะต้นกล้า เตี้ย ข้อถี่ ใบหนา เขียว และขอบใบหยักเว้าน้อย เจริญเติบโตช้า จำนวนรากน้อย มีขนาดใหญ่และสั้น จำนวน 2-3 ต้น ทำการขยายต้นกล้าลักษณะดังกล่าว เมื่อต้นกล้าระยะ $R_2$ อายุ 45-60 วัน ทำการตัดเป็นข้อๆ ละ 1 ตาอีก จะได้ต้นกล้าระยะ $R_3$ และคัดเลือกต้นกล้าที่มีลักษณะดังกล่าวมาแล้ว

และทำการขยายต้นกล้าลักษณะดังกล่าวซ้ำๆ อีก จนได้ต้นกล้าระยะ $R_5$-$R_6$ ซึ่งจะมีลักษณะโพลิพลอยด์ 100% ไม่มีลักษณะ Chimera ปะปนมาหรือเรียกว่า Solid polyploid (รูปที่ 7)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของตัวอย่างพืช การใช้สารละลายคลอร๊อกไม่สามารถกำจัดแบคทีเรียปนเปื้อนได้หมด ทำให้ตัวอย่างพืชไม่สามารถเจริญและพัฒนามีชีวิตรอดอยู่ได้ แม้ว่าบางตัวอย่างพืชจะเจริญและพัฒนาเป็นต้นขึ้นมาได้ แต่จะมีส่วนของแบคทีเรียที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อที่เรียกว่า endophytic bacteria ซึ่งในระยะเริ่มต้นจะมีการปนเปื้อนปริมาณน้อยมาก ต่อมาได้ทำการขยายปริมาณต้นกล้า จะทำให้แบคทีเรียดังกล่าวเจริญเติบโตขึ้นมาปนเปื้อนมากขึ้นและเป็นสาเหตุทำให้ต้นตายในที่สุด

การใช้สารละลายเมอร์คิวลิคคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.01% เป็นเวลา 20 นาที จะทำให้ตัวอย่างพืชมีการปนเปื้อนแบคทีเรียชนิดทั้ง epiphytic bacteria และ endophytic bavteria น้อยหรือไม่มีเลย ตัวอย่างพืชจะมีชีวิตรอดและพัฒนาเป็นต้นกล้าได้ในปริมาณที่มาก แม้สารละลายเมอร์คิวลิคคลอไรด์เป็นสารเคมีที่มีการเลิกใช้กันแล้ว เพราะมีผลตกค้างในสิ่งแวดล้อมสูง แต่การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวในการเตรียมตัวอย่างพืชสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ไม่จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างปริมาณมากและมีความถี่ในการใช้น้อย จึงจำเป็นต้องใช้สารละลายเมอร์คิวลิคคลอไรค์ได้บ้าง เพื่อให้ได้ตัวอย่างพืชที่ปลอดจากการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรียเช่นในกรณีของตัวอย่างพืชจากต้นไม้ยืนต้น หรือหัวใต้ดิน ซึ่งมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ค่อนข้างสูงและสลับซับซ้อน

การเพาะเลี้ยงตัวอย่างพืชของมันสำปะหลังบนอาหารสูตรต่างๆ แม้ว่าสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรต่างๆ ที่นำมาทดลองกับมันสำปะหลัง จะสามารถชักนำให้มันสำปะหลังบางพันธุ์พัฒนาและเจริญเป็นกลุ่มยอดและต้นกล้าตามลำดับ ส่วนมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 7 ระยอง 90 และเกษตรศาสตร์ 50 สูตรต่างๆ ดังกล่าว สามารถชักนำให้เกิดกลุ่มยอดได้เช่นกัน แต่จะมีกลุ่มก้อนแคลลัสเกิดขึ้นที่ฐานของกลุ่มยอด ทำให้ยอดไม่เจริญเติบโตและแข็งแรง เมื่อนำไปชักนำให้เป็นต้นกล้าบนอาหารสูตร MS ไม่มีฮอร์โมนพืช ยอดเหล่านี้จะไม่พัฒนาเป็นต้นกล้าได้และตายในที่สุด เช่นเดียวกับ Danso และคณะ (1999) ได้รายงานว่าได้ใช้มันสำปะหลัง 13 สายพันธุ์ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อขยายพันธุ์ซึ่งประสบความสำเร็จเพียง 5 สายพันธุ์เท่านั้น และได้กล่าวไว้ว่าจะประสพความสำเร็จหรือไม่ อาจขึ้นอยู่ความเข้มข้นของ BAP ที่ผสมใน MS medium ซึ่งจะเหมาะสมเฉพาะต่อสายพันธุ์มันสำปะหลังนั้นๆ ซึ่งต้องใช้เวลาในการทดสอบอีกนาน

ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้อาหารสูตร MS ที่ผสม sucrose 20 ก./ลิตร เพราะทำให้ได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์และแข็งแรง ในระยะเวลาสั้นๆ เพื่อใช้สร้างมันสำปะหลังโพลิพลอยด์ต่อไป

การชักนำมันสำปะหลังให้เป็นโพลิพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้สารโคลชิซีนนั้น การเตรียมสารละลายโคลชิซีนที่ผสมด้วยตัวทำละลาย DMSO 2% เนื่องจากตัวทำละลายชนิดนี้ช่วยให้ผนังเซลล์ของพืช (permeability membrane) มีการไหลผ่านเข้าออกของสารละลายโคลชิซีนได้มากขึ้น จึงทำให้ไม่ต้องใช้สารละลายโคลชิซีนที่ความเข้มข้นสูงมากๆ ซึ่งสารโคลชิซีนเป็นสารพิษ โดยสารชักนำให้เกิดเซลล์มะเร็งได้ (Awoleye และคณะ, 1994)

การชักนำมันสำปะหลังให้เป็นโพลิพลอยด์ด้วยสารโคลชิซีนในสภาพปลอดเชื้อ ทำให้ได้มันสำปะหลังโพลิพลอยด์และเพิ่มปริมาณได้มากในระยะเวลาสั้นๆ รวดเร็ว ซึ่งวิธีการนี้ได้ประสพความสำเร็จในพืชหลายชนิด ได้แก่ หม่อน (Chakraborti และคณะ, 1998) และต้น pomegranate (Shao และคณะ, 2003)

การคัดเลือกลักษณะโพลิพลอยด์มันสำปะหลังในสภาพปลอดเชื้อโดยวิธีการตัดเป็นข้อๆ ละ 1 ตา แล้วใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นการคัดเลือกในแต่ละชั่วหรือ generation ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีลักษณะต้นเตี้ย ข้อถี่ ใบหนา เขียวเข้ม หยักเว้าน้อย การเจริญเติบโตช้า รากมีขนาดใหญ่และสั้น มีจำนวนน้อยกว่าปกติจะเป็นลักษณะของโพลิพลอยด์มันสำปะหลัง และพบได้ในชั่วที่ 4-6 ขึ้นไป ($R_4$-$R_6$) ลักษณะสัณฐานวิทยาดังกล่าวตรงกับรายงานของ Nassar (2006) ซึ่งเป็นผู้ปรับปรุงมันสำปะหลังพันธุ์ใหม่ที่ชื่อว่า *Manihot vieiri* Nassar ที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผสมข้าม (Interspecific Hybridization) กับมันสำปะหลังพันธุ์ป่า

## สรุปผลการทดลอง

การสร้างมันสำปะหลังเตทราพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้ดำเนินการตามขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง 3 พันธุ์ คือ ระยอง 7 ระยอง 90 และเกษตรศาสตร์ 50 โดยผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว โดยใช้สารเมอร์คิวลิคคลอไรด์ความเข้มข้น 0.01% เป็นเวลา 20 นาที และเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ผสม sucrose 20 ก./ลิตร เป็นเวลา 30-45 วัน จะได้ต้นกล้า (plantlet) ที่สมบูรณ์และแข็งแรงนำไปชักนำให้เป็นมันสำปะหลังโพลิพลอยด์ โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับสารละลายโคลชิซีนที่ความเข้มข้น 0.002-0.003% ผสมด้วย DMSO 2% จะได้ต้นกล้ามันสำปะหลังที่มีลักษณะต้นเตี้ย ข้อถี่ ใบหนา เขียวเข้ม ใบหยักเว้าน้อย ต้นเจริญเติบโตช้า รากใหญ่และสั้น รวมทั้งมีจำนวนน้อย ซึ่งลักษณะเหล่านี้จะพบได้ตั้งแต่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชั่วที่ 4-6 ขึ้นไป คาดว่าจะเป็นต้นมันสำปะหลังโพลิพลอยด์ที่สมบูรณ์ (Solid Polyploidy)

## การนำไปใช้ประโยชน์

1. ได้วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง สำหรับปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว

2. ได้มันสำปะหลัง Solid Polyploidy ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์มันสำปะหลัง สำหรับใช้เป็นแหล่งพันธุ์ที่ให้ผลผลิตและคุณภาพแป้งสูง รวมทั้งความทนทานต่อโรค แมลง และสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของมันสำปะหลัง

3. ได้วิธีการหรือรูปแบบจำลอง ในการสร้างพันธุ์พืชให้เป็นโพลิพลอยด์หรือเตทราพลอยด์ในระยะเวลาอันสั้นและรวดเร็ว สำหรับใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

# เอกสารอ้างอิง

Acedo, V.Z. 1995. Meristem culture and *In vitro* maintenance of Phillipine cassava. CIAT. V.1: p.202-209.

Awoleye, F., van Duren, M., Dolezel, J. and Novak, F.J. 1994. Nuclear DNA content and *In vitro* induced somatic polyploidization cassava (*Manihot esculenta* Crantz) breeding. Euphytica. V.76 (30): p.195-202.

Chakraborti, S.P., Vijayan, K., Roy, B.N. and Oradri, S.M.H. 1988. *In vitro* of tetraploidy in mulberry. Plant Cell Reports. V. 17: p.799-803.

Danso, K.E., Acheampong, E. and Amoatey, H.M. 1999. Selection and *In vitro* propagation of five cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars. Journal of the Ghana Science Association. V.1 (3)

Nassar, N.M.A. 2002. Cassava, *Manihot esculenta* Crantz. Genetic resources: origin of the crop, its evolution and relationships with wild relatives. Genet. Mol. Res. 1(4): 298-305.

Nassar, N.M.A. 2006. The synthesis of a new cassava-derived species, *Manihot vieiri* Nassar. Genet. Mol. Res. 5(3): 536-541.

Shao, J., hen, C. and Deng, X. 2003. *In vitro* Induction of tetraploid in pomegranate. Plant Cell Tissue and Organ Culture. V. 75: p.241.

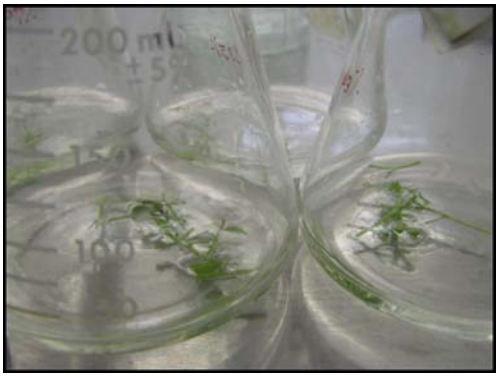
Sreekumari, M.T., Jos, J.S. and Nais, S.G. 1999. "Sree Harsha": A superior triploid hybrid in ca sava. Euphytica. V.106 (v): p.1-6.

**รูปที่ 1** การเตรียมตัวอย่างพืชสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

**รูปที่ 2** ตาข้างที่รอดชีวิตหลังการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว

**รูปที่ 3** การเจริญและพัฒนาตาข้าง ตายอดมันสำปะหลังเป็นต้นกล้า

**รูปที่ 4** การเตรียมสารละลายโคลชิซีนในสภาพปลอดเชื้อ




**รูปที่ 5** การชักนำตาข้าง ตายอดของ plantlet ด้วยสารละลายโคลชิซีน

**รูปที่ 6** ต้นกล้ามันสำปะหลังที่มีลักษณะโพลิพลอยด์หลังจากชักนำด้วยสารโคลชิซีนในสภาพปลอดเชื้อ

**รูปที่ 7** ต้นกล้ามันสำปะหลังโพลิพลอยด์หลังการคัดเลือกในสภาพปลอดเชื้อ