รายงานโครงการวิจัย

การขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Plant Tissue Culture for Propagation and Crop Improvement

ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์

Phummarin Wanichananan

ปี 2560

รายงานโครงการวิจัย

การขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Plant Tissue Culture for Propagation and Crop Improvement

ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์

Phummarin Wanichananan

ปี 2560

คำปรารภ

โครงการวิจัยการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการศึกษาวิจัยและพัฒนาในเรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยระบบ Temporary Immersion Bioreactor (TIB) เพื่อการขยายพันธุ์พืชในเชิงพาณิชย์ โครงการนี้ประกอบด้วย 2 กิจกรรม คือ

กิจกรรมที่ 1 การขยายพันธุ์พืชเชิงพาณิชย์ มี 3 การทดลอง ได้แก่

การทดลองที่ 1.1 การขยายพันธุ์ขมิ้นชัน (Curcuma longa Linn.) โดยเทคนิค Temporary Immersion Bioreactor

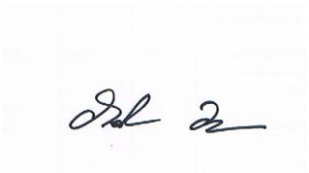
การทดลองที่ 1.2 การชักนำให้เกิดยอดรวมในอ้อย (*Saccharum* spp.) ที่ปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้ชิ้นส่วนของใบอ่อน

การทดลองที่ 1.3 การขยายพันธุ์มันฝรั่งโดยใช้ระบบ Temporary Immersion Bioreactor

กิจกรรมที่ 2 ศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจ มี 1 การทดลอง ได้แก่

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาเทคนิคและปัจจัยเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

ทั้ง 4 การทดลองเริ่มดำเนินงานเดือนตุลาคม 2559 และยุติการทดลองเดือนกันยายน 2560 ระยะเวลาดำเนินงาน 2 ปี และได้จัดทำรายงานโครงการสิ้นสุดเล่มนี้ หวังเป็นอย่างยิ่งว่า ข้อมูลจากรายงานฉบับนี้จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาต่อไป ให้กับนักวิชาการของกรมวิชาการเกษตรและหน่วยงานอื่น รวมทั้งผู้สนใจ ได้นำไปใช้ประโยชน์ต่อไป



นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์
หัวหน้าโครงการ
มีนาคม 2561

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
ผู้วิจัย	2
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	5
บทนำ	6
บทคัดย่อ	8
1. การขยายพันธุ์ขมิ้นชัน (Curcuma longa Linn.) โดยเทคนิค Temporary Immersion Bioreactor	12
2. การชักนำให้เกิดยอดรวมในอ้อย (*Saccharum* spp.) ที่ปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้ชิ้นส่วนของใบอ่อน	31
3. การขยายพันธุ์มันฝรั่งโดยใช้ระบบ Temporary Immersion Bioreactor	44
4. การศึกษาเทคนิคและปัจจัยเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน	59
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	80
บรรณานุกรม	81
ภาคผนวก	85

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับความร่วมมือจากคณะผู้วิจัย การบริหารจัดการ การจัดสรรงบประมาณ การให้คำแนะนำ กลั่นกรอง และช่วยเหลือแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ จากคณะกรรมการที่ปรึกษาวิชาการ คณะกรรมการบริหารงานวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะกรรมการที่ปรึกษาด้านวิชาการกรมวิชาการเกษตร คณะกรรมการบริหารงานวิจัยและพัฒนากรมวิชาการเกษตรและการสนับสนุนงบประมาณให้ดำเนินการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณหน่วยงานต่างๆ ประกอบด้วย ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง, ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี, ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น, ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ และเกษตรกรที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างพืชมาใช้ในการวิจัยนับเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำงานวิจัย

สุดท้ายขอขอบคุณบุคลากรทั้งหลายของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ช่วยเหลือสนับสนุนโครงการนี้

ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์
หัวหน้าโครงการ

ผู้วิจัย

โครงการวิจัย การขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยผู้วิจัย ดังนี้

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์

ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการ

หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 1 การขยายพันธุ์พืชปลอดโรคเชิงพาณิชย์

การทดลองที่ 1.1 การขยายพันธุ์ขมิ้นชัน (Curcuma longa Linn.) โดยเทคนิค Temporary Immersion Bioreactor

หัวหน้าการทดลอง

นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์

ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการ

หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมงาน

นางศุภลักษณ์ อริยภูชัย

ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการ

หน่วยงาน ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง กรมวิชาการเกษตร

น.ส.อำไพ สินพัฒนานนท์

ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ

หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2 การชักนำให้เกิดยอดรวมในอ้อย (*Saccharum* spp.) ที่ปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้ชิ้นส่วนของใบอ่อน

หัวหน้าการทดลอง

นายกษิดิศ ดิษฐบรรจง

ตำแหน่ง ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านเทคโนโลยีชีวภาพด้านการเกษตร

หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมงาน

นางชยานิจ ดิษฐบรรจง
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ
หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

นายวีระพล พลรักดี
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ
หน่วยงาน ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น กรมวิชาการเกษตร

นายไพฑูรย์ บุปผาดา
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ
หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.3 การขยายพันธุ์มันฝรั่งโดยใช้ระบบ Temporary Immersion Bioreactor

หัวหน้าการทดลอง

นางชยานิจ ดิษฐบรรจง
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ
หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมงาน

นายกษิดิศ ดิษฐบรรจง
ตำแหน่ง ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านเทคโนโลยีชีวภาพด้านการเกษตร
หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

นางสาวศิริลักษณ์ อินทะวงศ์
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
หน่วยงาน ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ กรมวิชาการเกษตร

นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

นายไพฑูรย์ บุปผาดา
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ
หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2 ศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจ

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาเทคนิคและปัจจัยเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

หัวหน้าการทดลอง

นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมงาน

นางสาวเตือนจิตร เพ็ชรรุณ
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
หน่วยงาน ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี กรมวิชาการเกษตร

นางนัยเนตร ทานากะ เจริญสันติ
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ
หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

MS	Murashige and Skoog
BA	6-Benzyladenine
2-ip	N^6-(2-Isopentenyl)adenine
TDZ	Thidiazuron
NAA	1-Naphthaleneacetic acid
GA3	Gibberellin acid
CCC	Chlorochorine chloride
PEG	Polyethylene glycol
CRD	Completely Randomized Design

บทนำ

ปัจจุบันการเกษตรได้ใช้ประโยชน์จากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในหลายๆ ด้าน ได้แก่ การขยายพันธุ์พืชให้เพิ่มปริมาณมากที่มีความสม่ำเสมอในระยะเวลาอันสั้น การผลิตพืชที่ปราศจากเชื้อโรค (Disease-free plant production) ตลอดจนการปรับปรุงหรือพัฒนาพันธุ์พืช (Plant improvement) สามารถสร้างพันธุ์พืชต่าง ๆ ได้ตามความประสงค์ ซึ่งมีหลายวิธีการ เช่นการเพาะเลี้ยงเอมบริโอหรือคัพภะ (embryoculture) สามารถช่วยชีวิตพืชพันธุ์ต่าง ๆ ให้รอดชีวิต (embryo rescue) การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร และละอองเกสรของพืช (anther และ pollen culture) ตลอดจนการ ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (somaclonal variation) และการสร้างพืชโพลีพลอยด์ (Polyploidization)

ในพืชสำคัญที่มีมูลค่าการผลิตเพื่อการบริโภคและส่งออก เช่น **ขมิ้นชัน** ซึ่งจัดเป็นพืชเศรษฐกิจภายใต้แผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2530-2534) มีปริมาณไม่เพียงพอต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม และมีโรคที่สำคัญ คือ โรคหัวเน่า โรคเหง้า และรากเน่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย โรคใบจุด เกิดจากเชื้อรา ที่ติดมากับเหง้าพันธุ์ เมื่อนำไปปลูก (อรนุช, 2550 ; จินตกานต์, 2555) **อ้อย** พืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่ใช้เป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล มีมูลค่าการส่งออก 20,000-30,000 ล้านบาทต่อปี มีปัญหาท่อนพันธุ์อ้อยที่ใช้ปลูกปนเปื้อนด้วยเชื้อไฟโตพลาสมา ทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตและผลผลิตลดลงอย่างมาก ส่วน**มันฝรั่ง**ไทยผลิตได้ปีละประมาณ 5,500 ตัน ขณะที่มีความต้องการสูงถึง 20,000 ตัน/ปี และยังมีปัญหาการติดเชื้อไวรัสในหัวพันธุ์ ซึ่งทำความเสียหายรุนแรงต่อผลผลิต (วงศ์, 2550) การนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการผลิตหัวพันธุ์หรือส่วนขยายพันธุ์ที่ปลอดโรค นับเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถใช้แก้ปัญหาและช่วยเพิ่มผลผลิตให้กับเกษตรกรได้ นอกจากนี้การนำ Temporary Immersion Bioreactor (TIB) มาใช้เป็นเครื่องมือในการขยายพันธุ์ จะสามารถขยายพันธุ์ชิ้นส่วนที่ปลอดโรค ซึ่งสามารถทำได้ในปริมาณมากภายในเวลาสั้น และยังช่วยประหยัดเวลาและแรงงานได้

สำหรับ**ปาล์มน้ำมัน** พืชน้ำมันอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งในระดับโลกและของประเทศไทย สามารถผลิตได้เฉพาะในเขตพื้นที่จำกัดประเภทร้อนชื้นเท่านั้น จัดเป็นพืชผสมข้าม เมื่อปรับปรุงจนได้พันธุ์ดีแล้วการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้จะสามารถขยายพันธุ์ได้ในปริมาณมากและมีลักษณะเหมือนต้นเดิม การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันได้มีการศึกษาวิจัยมาระยะหนึ่งแล้ว แต่การใช้ส่วนยอดมีโอกาสทำให้ต้นปาล์มตาย และยังมีความจำเพาะต่อพันธุ์ค่อนข้างมาก (พีรเดช, 2556) การนำชิ้นส่วนเช่น ใบ ยอดจากต้นที่ให้ผลผลิตสูง หรือคัพภะอ่อนจากคู่ผสมที่มีประวัติการให้ผลผลิตสูงในรุ่นลูกมาใช้เป็นชิ้นส่วนในการขยายพันธุ์ก็จะสามารเพิ่มปริมาณพันธุ์ดีให้มากได้ แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของปัจจัยต่างๆที่มีความเหมาะสมในแต่ละพันธุ์ เช่น ชนิดและความเข้มของแสง ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และสารที่มีผล

ต่อการเกิดแคลลัส จึงได้นำปัจจัยต่างๆเหล่านี้ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์ให้มากขึ้น มาศึกษากับปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 และ 2 ซึ่งเป็นพันธุ์แนะนำของกรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์พืชปลอดโรคเชิงพาณิชย์จำนวน 3 ชนิด ประกอบด้วย ขมิ้นชัน, อ้อย และมันฝรั่ง จากการศึกษาผลของไซโตไคนิน 4 ชนิด ประกอบด้วย BA, kinetin, 2-ip และ TDZ ต่อการชักนำยอดขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 1 และตรัง 2 พบว่า การใช้ไซโตไคนินทั้ง 4 ชนิดสามารถชักนำให้เกิดยอดของขมิ้นชันทั้ง 2 พันธุ์ได้ไม่แตกต่างทางสถิติ โดยพันธุ์ขมิ้นชันตรัง1 การใช้ kinetin ความเข้มข้น 2 mg/l จะทำให้เกิดต้นยอดใหม่จำนวนเฉลี่ยสูงสุด 5.2 ยอด และขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 2 พบว่า การใช้สาร TDZ ความเข้มข้น 1 mg/l ทำให้เกิดค่าเฉลี่ยยอดใหม่สูงสุด 8.4 ยอด และเมื่อศึกษาปริมาณน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาเหง้าของขมิ้นชันทั้ง 2 พันธุ์ พบว่าบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 mg/l ที่มีน้ำตาลซูโครส 30 และ 60 g/l จะมีการสร้างเหง้าที่เห็นได้ชัดเจน สำหรับการชักนำให้เกิดยอดรวม (multiple shoot formation) ในอ้อยที่ปลอดเชื้อไฟโตพลาสมา โดยใช้ส่วนใบอ่อนจากยอดที่ยังไม่คลี่สามารถทำได้บนอาหารกึ่งแข็งในระบบ temporary immersion bioreactor (TIB) สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมสูงสุด ได้แก่สูตรอาหารที่ประกอบด้วย อาหาร MS ที่เติม 3-6 μM benzyladenine (BA) และ 2 μM naphthalene acetic acid (NAA) ได้ 47.5-51.6 ยอดอ่อน/ชิ้นส่วนพืช ภายในระยะเวลา 2 เดือน สำหรับการใช้ระบบ TIB สูตรอาหารที่ให้จำนวนยอดสูงสุด คือ อาหาร MS ที่เติม 3-6 μM BA and 2 μM NAA ได้ 22.1-16.2 ยอดอ่อน/ชิ้นส่วนพืช ภายในระยะเวลา 1 เดือน ซึ่งระบบ TIB สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้เร็วกว่าและยอดอ่อนมีขนาดใหญ่กว่าการใช้อาหารกึ่งแข็ง ยอดอ่อนที่ได้สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีบนอาหารสูตร ½MS+4-8 μM indole-3-butyric acid (IBA) ต้นอ่อนที่มีรากที่สมบูรณ์สามารถย้ายปลูกลงในเวอร์มิคูไลท์เพื่อปรับสภาพและปลูกในโรงเรือนระบบปิด โดยมีอัตราการอยู่รอดสูงกว่า 80% การขยายพันธุ์มันฝรั่งปลอดโรค ให้ได้ส่วนขยายพันธุ์ปลอดโรค พัฒนาหาสูตรอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิด micro shoot โดยใช้ระบบ Temporary Immersion Bioreactor (TIB) เพื่อผลิตส่วนขยายพันธุ์มันฝรั่งที่ปลอดโรคในเชิงพาณิชย์ ใช้ apical meristem ขนาด 0.1 - 0.2 เซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ร่วมกับ BA 5 μM สามารถชักนำให้มีการพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ยอด ในพันธุ์แอตแลนติก 36 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์สปุนตา 24 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ PVY ด้วยวิธีเซรุ่มวิทยา พบการปลอดโรค 90 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดรวมในระบบ TIB เทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว มันฝรั่งแอตแลนติกและสปุนตา สามารถเพิ่มปริมาณยอดรวมได้สูง 5.2 ยอด และ4.2 ยอด ต่อ 1ชิ้นส่วนพืช ตามลำดับ และมีความสูงของยอดในเกณฑ์ปกติ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มี GA3 0.1 mg/l และ NAA 0.1 mg/L ส่วนในระบบ TIB สามารถให้ปริมาณยอดรวมสูงสุด 4.8 ยอดและ 3.6 ยอด ตามลำดับในอาหารสูตรเดียวกัน โดยให้อาหาร 8 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 10 นาที เมื่อศึกษาผลของ BA และน้ำตาลซูโครสต่อการเกิด micro tubers ในอาหารเหลว พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 40 μM และน้ำตาลซูโครส ร่วมกับ 6 -8 เปอร์เซ็นต์ Chlorocholine chloride (CCC) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิด micro

tubers ได้มากที่สุดในพันธุ์แอตแลนติก ส่วนพันธุ์ สปุนต้า อาหารเหลว MS ที่เติม BA 20 µM และน้ำตาลซูโครส 8 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิด micro tubers ได้ดีที่สุด

การศึกษาผลของปัจจัยภายนอกต่อการชักนำและพัฒนาแคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 โดยใช้สภาพแสง 4 ชนิด คือ LED สีขาว, LED สีแดง, LED สีน้ำเงิน และ Grow lux พบว่า ปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสโดยมีค่าน้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด ในสภาพแสง LED สีขาว การพัฒนา embryogenesis callus พบได้ดีในสภาพแสงชนิด Grow lux สำหรับปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 2 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสโดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด ในสภาพแสง Grow lux และมีการพัฒนาของแคลลัสได้ดีในสภาพแสง LED สีแดง การชักนำแคลลัสจากใบอ่อนในสภาพที่มืดจะทำให้เกิดแคลลัสได้จากสูตรอาหาร MS ร่วมกับ dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ระยะเวลา 2.5 เดือน และสูตรอาหาร MS ร่วมกับ picloram ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ระยะเวลา 6 เดือน ทำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะกลมมีสีน้ำตาลอ่อนเกิดขึ้นที่บริเวณขอบใบ

Abstract

The study of commercially disease-free propagation of 3 plant species including turmeric, sugarcane, and potato has been carried out. The study revealed that effects of 4 cytokinin plant growth regulators (PGRs) consisting of BA, kinetin, 2-ip, and TDZ on shoot formation of 2 turmeric cultivars (Trung 1 and Trung 2) were not significantly different. The highest average number of new shoots of Trung 1 cultivar treated with 2 mg/l kinetin and Trung 2 cultivar treated with 1 mg/l TDZ was 5.2 and 8.4 respectively. Moreover, the effects of sucrose concentration on microrhizome formation of the 2 turmeric cultivars were studied. It was found that the MS media supplemented with 3 mg/l BA, and 30 and 60 g/l of sucrose showed the most obvious microrhizome formation. In the study of phytoplasma-free sugarcane, multiple shoot formation was observed in the explants derived from the unexpanded, immature leaf cultured on semi solid media and under temporary immersion bioreactor (TIB) system. The highest number of multiple shoots found on the semi solid media MS media supplemented with 3-6 µM benzyladenine (BA) and 2 µM naphthalene acetic acid (NAA) was 47.5-51.6 shoots per explant within 2 months. For the culture using TIB system, the MS media supplemented with 3-6 µM BA and 2 µM NAA exhibited the highest number of multiple shoots of 22.1-16.2 shoots per explant within 1 month. The TIB system used shorter time for multiple shoot

formation and showed larger shoots than ones cultured on the semi-solid media. The obtained shoots demonstrated well-developed root formation on the ½MS media supplemented with 4-8 µM indole-3-butyric acid (IBA). The plantlets with well-developed roots were transferred into vermiculite to allow for the adjustment in a closed greenhouse. The survival rate was higher than 80%. The third study was on micropropagation of disease-free potatoes to investigate the effects of various media and conditions on micro shoot formation using TIB system in order to commercially produce the disease-free potato plantlets. Apical meristems in the length of 0.1 - 0.2 cm were cultured on solid MS medium supplemented with 5 µM BA. Thirty six and twenty four percent of the explants of Atlantic and Spunta cultivar respectively were well developed in plant regeneration process. The contamination test for potato virus Y (PVY) using serology techniques was performed showing 90 % of disease-free plantlets as a result. Moreover, multiple shoot propagation using TIB system was compared to conventional liquid media. Atlantic and Spunta cultivars regenerated 5.2 and 4.2 multiple shoots respectively per 1 explants with the regular shoot length when cultured on liquid MS media supplemented with 0.1 mg/l GA3 and 0.1 mg/L NAA while TIB system regenerated 4.8 and 3.6 multiple shoots respectively using the same medium composition fed into the explants for 10 min, 8 times per day. The study on the effect of BA and sucrose concentration on micro tuber formation in liquid medium revealed that the MS media supplemented with 40 µM BA, 6-8 % sucrose, and 500 mg/l Chlorocholine chloride (CCC) induced the highest number of micro tubers for Atlantic cultivar while the MS media supplemented with 20 µM BA and 8 % sucrose induced the highest number of micro tubers for Spunta cultivar.

Effect of environmental and cultural conditions on callus induction and callogenesis of 2 oil palm cultivars: Surat Thani 1 and Surat Thani 2 was investigated. Four light conditions including white LED, red LED, blue LED, and Grow lux were employed. The result revealed that callus, with the highest fresh weight, was induced in white LED condition and embryogenic callus formation was observed in Grow lux condition for Surat Thani 1 cultivar. For Surat Thani 2, callus, with the highest fresh weight, was induced in Grow lux condition and callus induction and callogenesis were well developed in red LED condition. Successful callus formation on young leaves was observed on MS media supplemented with 1 mg/l dicamba, cultured in the dark condition for 2.5 months. Globular, light brown callus was

observed around the edge of young leaves when cultured on MS media supplemented with 3 mg/l picloram for 6 months.

การขยายพันธุ์ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) เชิงการค้า ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยเทคนิคไบโอรีแอคเตอร์

Development of System for Micropropagation of Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) using Tissue Culture Technique.

ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ Phummarin Wanichananan
ศุภลักษณ์ อริยภูชัย Suppaluck Ariyaphuchai
อำไพ สินพัฒนานนท์ Amphai Sinpatananon

คำสำคัญ (Key words)

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.), 6-Benzylaminopurine (BA), Kinetin, N6-(2-Isopentenyl)adenine (2-ip), Thidiazuron (TDZ), 1-Naphthaleneacetic acid (NAA)

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของไซโตไคนิน 4 ชนิด ประกอบด้วย BA, kinetin, 2-ip และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 mg/l ต่อการชักนำยอดขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 1 และตรัง 2 พบว่า การใช้ไซโตไคนินทั้ง 4 ชนิดสามารถชักนำให้เกิดยอดของขมิ้นชันทั้ง 2 พันธุ์ได้ไม่แตกต่างทางสถิติ โดยพันธุ์ขมิ้นชันตรัง1 การใช้ kinetin ความเข้มข้น 2 mg/l จะทำให้เกิดต้นยอดใหม่จำนวนเฉลี่ย 5.2 ต้น ในขณะที่การใช้ BA ความเข้มข้น 1 mg/l จะทำให้เกิดยอดใหม่เฉลี่ย 5 ต้น ส่วนการใช้ kinetin ความเข้มข้น 1 mg/l จะทำให้เกิดยอดใหม่เฉลี่ยน้อยที่สุด 3.00 ต้น ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติ ส่วนความสูงของต้นใหม่ พบว่า การใช้ kinetin 1 mg/l จะให้ต้นที่มีความสูงเฉลี่ยสูงสุด 16.10 เซนติเมตร รองลงมาคือ การใช้ 2-ip ความเข้มข้น 2 mg/l ต้นใหม่มีความสูงเฉลี่ย 16 เซนติเมตร และการใช้ TDZ ความเข้มข้น 2 mg/l จะมีความสูงเฉลี่ยของต้นใหม่น้อยที่สุดคือ 5.5 เซนติเมตร โดยมีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ความยาวรากที่เกิดขึ้น พบว่า การใช้ 2-ip ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/l จะทำให้เกิดความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 9.75 เซนติเมตร และการใช้สาร TDZ ที่ความเข้มข้น 2 mg/l จะให้ผลความยาวรากเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 1 เซนติเมตร ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ขมิ้นชันตรัง 2 พบว่า การใช้สาร TDZ ความเข้มข้น 1 mg/l ทำให้เกิดค่าเฉลี่ยยอดใหม่สูงสุด 8.4 ต้น และรองลงมา คือ การใช้สาร TDZ ความเข้มข้น 2 mg/l ทำให้เกิดยอดเฉลี่ย 7 ต้น ส่วนการใช้ 2-ip ความเข้มข้น 1 mg/l ทำให้เกิดยอดเฉลี่ยน้อยที่สุด 2.25 ต้น ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ความสูงของต้นใหม่ที่เกิดขึ้นซึ่งให้ผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ในอาหารที่มี kinetin ความเข้มข้น 1 mg/l จะให้ค่าเฉลี่ยความสูงต้นใหม่มากที่สุด 15.60 เซนติเมตร และการใช้ TDZ ความเข้มข้น 3 mg/l จะให้ค่าเฉลี่ยความสูงต้นใหม่น้อยที่สุด 5.25 เซนติเมตร ความยาวของ

รากของขมิ้นชันตรัง 2 พบว่า อาหารสูตรเปรียบเทียบ (control) จะทำให้เกิดค่าเฉลี่ยความยาวรากมากที่สุด 11.90 เซนติเมตร และในอาหารที่มี TDZ ความเข้มข้น 3 mg/l จะให้ค่าเฉลี่ยความยาวรากน้อยที่สุด 2.50 เซนติเมตร ซึ่งให้ผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษาปริมาณน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาเหง้าของขมิ้นชันที่ 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร พบว่า พันธุ์ขมิ้นชันตรัง 1 เมื่อทดสอบบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 mg/l ที่มีน้ำตาลซูโครส 30 และ 60 g/l มีค่าเฉลี่ยการเกิดเหง้าเท่ากับ 1.70 และ 0.80 หัว มีการสร้างเหง้าที่เห็นได้ชัดเจน สำหรับพันธุ์ขมิ้นชันตรัง 2 พบว่า อาหาร MS ร่วมกับการเติม BA ความเข้มข้น 3 mg/l NAA ความเข้มข้น 1 mg/l ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 30 g/l จะทำให้ค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดใหม่เท่ากับ 3.77 ต้น มีความสูงของต้นใหม่เฉลี่ย 17.41 เซนติเมตร มีการเกิดรากเฉลี่ย 15.55 ราก และมีค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 1.50 หัว โดยรากจะมีขนาดใหญ่

ABSTRACT

The research aimed to study effect of cytokinin containing BA, kinetin, 2-ip and TDZ at 0, 1, 2, 3 mg/l for inducing Turmeric shoot cv. Trang 1 and Trang 2. The result showed that ther was no significant difference among the 4 treatment in number of shoot in Trang 1. TRANG1 with treatment of culturing in MS media with 2 mg/l kinetin gave the highest number of shoot (5.2 shoots). However there was highly significant difference when Trang1 was treated with MS media containing 1 mg/l kinetin giving the highest shoot of 16.10 centimeters. The media containing 2-ip gave longest root. Trang 2 showed highest number of shoot (8.4 shoots) when be cultured in MS media contain 1 mg/l TDZ. They gave highest shoot of 15.60 centimeters in MS media containing 1 mg/l kinetin while MS medium (control) gave longest root of 11.90 centimeters. In study of effect of sucrose for development of microrhizome the result showed that sucrose could inducing microrhizome *in vitro* in Trang 1 and Trang 2. They gave microrhizome in MS medium contain 3 mg/l BA and 3%, 6% sucrose.

บทนำ (Introduction)

ปัจจุบันพืชสมุนไพรจัดเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ต่างประเทศกำลังหาทางลงทุนและคัดเลือกสมุนไพรไทยไปสกัดหาตัวยาเพื่อรักษาโรคบางโรคและมีหลายประเทศที่นำสมุนไพรไทยไปปลูกและทำการค้าขายแข่งกับประเทศไทย สมุนไพรหลายชนิดที่เราส่งออกเป็นรูปของวัตถุดิบคือ กระวาน ขมิ้นชัน เร่ว เปล้าน้อยและมะขามเปียก เป็นต้น ซึ่งสมุนไพรเหล่านี้ตลาดต่างประเทศยังคงมีความต้องการอีกมาก และในปัจจุบันกรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ให้ความสนใจในการศึกษาเพิ่มขึ้นและมีโครงการวิจัยบรรจุไว้ในแผนพัฒนาระบบการผลิต การตลาดและการสร้างงานในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2530-2534) เพื่อหาความเป็นไปได้ในการพัฒนาคุณภาพและแหล่งปลูกสมุนไพรเพื่อส่งออก โดยกำหนดชนิดของสมุนไพรที่มีศักยภาพ 13 ชนิด คือ มะขามแขก กานพลู เทียนเกล็ดหอย ดองดึง เร่ว กระวาน ชะเอมเทศ ขมิ้น จันทร์เทศ ใบพลู พริกไทย ดีปลี และน้ำผึ้ง

ขมิ้นเป็นพืชที่สามารถปลูกได้ทั่วไปในภูมิภาคต่างๆ ของโลก ที่สำคัญได้แก่ ประเทศอินเดีย บังคลาเทศ จีน ไต้หวัน เปรู อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ จาไมกา และเอลซาวาดอร์ โดยอินเดียเป็นประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ของโลก แต่ส่งออกเพียงร้อยละ 5 เนื่องจากความต้องการใช้ภายในประเทศสูงมาก สำหรับประเทศไทยสามารถปลูกได้ดีทั่วทุกภาคของประเทศ ส่วนใหญ่ปลูกเป็นพืชรองหรือพืชเสริมรายได้ แต่ในขณะนี้มีการส่งเสริม การใช้ประโยชน์จากขมิ้นมากขึ้น จึงทำให้เกษตรกรปลูกในลักษณะพืชเดี่ยวมากขึ้น และมีรายได้สูงด้วย สำหรับผลผลิตเฉลี่ยในประเทศไทยประมาณ 2 ตัน/ไร่ ขมิ้นที่จำหน่าย ในประเทศไทยเป็นขมิ้นสด ส่วนใหญ่จะเป็นแง่งนิ้วมือ ราคาอยู่ในระหว่าง 15-20 บาท/กิโลกรัม (จินตน์กานต์, 2555)

โดยทั่วไป เกษตรกรมักขยายพันธุ์ขมิ้นชันโดยการแยกเหง้าปลูก ซึ่งจะทำได้เพียงปีละครั้งเท่านั้น ปริมาณขมิ้นชันพันธุ์ดีจึงไม่เพียงพอต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม และขมิ้นชันมีโรคที่สำคัญ คือ โรคหัวเน่า โรคเหง้า และรากเน่า เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย โรคใบจุด เกิดจากเชื้อรา ซึ่งโรคที่เกิดขึ้นนี้มักจะติดมากับเหง้าพันธุ์ เมื่อนำไปปลูกจะทำให้เกิดโรคระบาด ก่อให้เกิดความสูญเสียของผลผลิต นอกจากนี้ยังทำให้คุณภาพของ สรรพคุณทางยาลดลงอีกด้วย

แนวทางในการแก้ไขปัญหาจึงเริ่มจากการคัดสายพันธุ์ขมิ้นชันที่ให้ปริมาณสารสำคัญสูง แล้วจึงนำมาขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้ต้นกล้าที่มีความสม่ำเสมอทางพันธุกรรมจำนวนมากภายในเวลาอันสั้น เมื่อนำต้นขมิ้นชันดังกล่าวไปปลูกภายใต้การจัดการสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมจะทำให้ได้วัตถุดิบขมิ้นชันที่มีปริมาณสารสำคัญสูง และมีความแปรผันของปริมาณสารสำคัญต่ำ อันจะส่งผลให้ผลิตภัณฑ์จากขมิ้นชันมีคุณภาพสูง และมีมาตรฐานสารออกฤทธิ์ที่สม่ำเสมอ ดังนั้นจึงได้นำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์ใช้ในการผลิตขมิ้นชันที่ปลอดโรคและเพื่อขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมาก

ระบบไบโอรีแอคเตอร์ (Bioreactor) (กาญจน, 2549)

Bioreactor คือ เครื่องมือชนิดหนึ่งซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีในหมู่นักจุลินทรีย์วิทยาและนักเภสัชวิทยา เดิมที Bioreactor ถูกนำมาใช้เพิ่มปริมาณสิ่งมีชีวิตพวกจุลินทรีย์ให้มีจำนวนมากขึ้นในช่วงเวลาอันสั้น ในแง่ของเภสัชวิทยาการเพิ่มปริมาณของสิ่งมีชีวิตดังกล่าวจะช่วยให้มนุษย์ได้รับสารต่าง ๆ ที่จะเป็นประโยชน์ในทางยาได้เร็วและมากยิ่งขึ้น

Bioreactor เริ่มเปิดตัวครั้งแรกเมื่อประมาณ ค.ศ. 1990 (พ.ศ. 2533) แต่เริ่มจะเป็นที่รู้จักจริง ๆ เนื่องจากสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการค้าได้ เมื่อปีพ.ศ. 2543 ประเทศที่นำระบบ Bioreactor เข้ามาใช้กับการขยายพันธุ์พืชเป็นการค้าและเปิดตัวไปแล้วคือ บราซิล พืชหลักที่นำมาเข้าระบบนี้ได้แก่ กาแฟ สับปะรด และกล้วย ซึ่งล้วนแล้วแต่เป็นพืชเศรษฐกิจด้วยกันทั้งสิ้น สำหรับประเทศไทยบริษัท เทพวงศ์ฯ นำมาทดสอบในปี พ.ศ. 2549 เพื่อการผลิตต้นกล้ากล้วยไม้ฟาแลนอปซิสส่งออกไปญี่ปุ่น และอเมริกา

การขยายพันธุ์พืชด้วยระบบของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ระบบการเพาะเลี้ยงแบบ Conventional Solid Culture มีข้อดีตรงที่เนื้อเยื่อพืชจะไม่ค่อยเกิดความเสียหายจากปัญหาการฉ่ำน้ำ (hyperhydricity) แต่มีข้อเสียคือต้นพืชโตช้าและจะต้องเปลี่ยนอาหารใหม่โดยการย้ายเนื้อเยื่อจากขวดเก่าไปยังขวดใหม่ (Subculture) เพราะฉะนั้นโอกาสที่จะทำให้เกิดการปนเปื้อน (Contamination) จึงมีเปอร์เซ็นต์สูงมากสำหรับการขยายพันธุ์ด้วยระบบ Conventional ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ Liquid Culture มีข้อดีกว่าระบบการเพาะเลี้ยงแบบแรกตรงที่พืชจะโตได้เร็วกว่าแต่มีข้อเสียตรงที่เนื้อเยื่อพืชมักเกิดปัญหาฉ่ำน้ำบ่อยครั้งเพราะต้องแช่ในอาหารเหลวตลอดเวลา สำหรับปัญหาการปนเปื้อนก็มีเปอร์เซ็นต์สูงเช่นกัน

ข้อดีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระบบ TIB (Temporary Immersion Bioreactor)

1. สามารถเพิ่มปริมาณพืชได้จำนวนมาก

2. โอกาสรอดของการเพาะเลี้ยงแบบเป็นต้นกลุ่มจะมีมากกว่าการเลี้ยงแบบต้นเดี่ยว และการปนเปื้อนเกิดได้น้อยกว่า

3. เป็นวิธีที่ทำได้สะดวกและรวดเร็วเนื่องจากการเปลี่ยนอาหารทำได้ง่าย ลดขั้นตอนการ Subculture ไปได้เลย โอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนก็จะลดลงทันที

4. ลดค่าใช้จ่ายในส่วนของค่าแรงไปได้มาก สำหรับงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช “ค่าแรง” ถือเป็นต้นทุนที่สูงที่สุดตกประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนทั้งหมด

5. ลดพื้นที่ในห้องเพาะเลี้ยง (Culture Room) ลงไปได้เกือบ 80 เปอร์เซ็นต์เพราะการปลูกเลี้ยงให้พืชเติบโตในแนวตั้งใช้เนื้อที่น้อยกว่าการปลูกเลี้ยงพืชซึ่งเติบโตในแนวนอนซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบดั้งเดิม

6. ลดต้นทุนสำหรับวัสดุที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงได้หลายชนิด เช่น ไม่ต้องใช้เครื่องเขย่า (Shaker) อีกต่อไป ใช้ขวดน้อยลง ไม่ต้องใช้วุ้นเป็นส่วนประกอบของอาหาร

Archana และคณะ (2014) ศึกษาการผลิต microrhizome และ minirhizome ของขมิ้นสายพันธุ์ Alleppey Supreme ในสภาพปลอดเชื้อ โดยการทดสอบในสภาพอาหารแข็งและอาหารเหลว ร่วมกับการทดสอบขนาดของภาชนะที่ใช้จำนวน 4 ชนิด พบว่า อาหารเหลวที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 80 กรัมต่อลิตร ในภาชนะชนิด Planton culture vessel. มีการเกิดยอด 3.67 - 5.5 ยอด

Solomon และ Ehirim (2013) ศึกษาผลของความเข้มข้นของ BAP (Benzylaminopurine) ต่ออัตราการเพิ่มปริมาณยอดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้น Turmeric (*Curcuma longa* L.) จากการทดสอบความเข้มข้นของ BAP ที่ระดับ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 mg/L พบว่า อัตราการเกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.96 ยอด เมื่อใช้ความเข้มข้นของ BAP ที่ความเข้มข้น 8 mg/L การเกิดใบเฉลี่ย 8.2 ใบ เมื่อใช้ความเข้มข้นของ BAP ที่ความเข้มข้น 4 mg/L

Anchalee (2012) ศึกษาผลของ NAA BA และ Sucrose ในการชักนำยอดและการเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วโดยการผ่ายอดของขมิ้น โดยการนำชิ้นส่วนยอดของขมิ้นมาทดสอบบนอาหาร MS ร่วมกับ BA ที่ระดับ 0, 1, 2, 3 และ 4 mg/l และ NAA ที่ระดับ 0, 0.5, and 1 mg/l พบว่า อาหาร MS ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 mg/l และ BA ความเข้มข้น 2 หรือ 3 mg/l ทำให้เกิดยอดใหม่ 2.4 และ 2.6 ยอด ตามลำดับ มีจำนวนใบ 5.4 ใบ มีจำนวนราก 2.6 รากต่อต้น และต้นที่ได้มีความสูง 4.5 เซนติเมตร ส่วนในอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 mg/l มีจำนวนการเกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.6 ยอดและมีจำนวนใบเฉลี่ย 5.4 ใบ และการศึกษาการผ่าชิ้นส่วนตามยาว จำนวน 2 และ 3 ส่วน พบว่า การผ่าชิ้นส่วนเป็น 2 ส่วน ทำให้เกิดยอดใหม่สูงสุด 4.3 ยอด และเมื่อนำชิ้นส่วนมาทดสอบในอาหาร MS ร่วมกับน้ำตาล 0, 3, 4, 5, 6 และ 7 กรัมต่อลิตร พบว่า ปริมาณน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร ทำให้เกิดค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดและจำนวนใบต่อยอดสูงที่สุด และความยาวราก ขนาดของรากมีขนาดใหญ่ที่สุด

อนุพันธ์ และวีระชน (2548) ศึกษาผลของแสง น้ำตาล และสารชะลอการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดเหง้าจิ๋วของขมิ้นชันในหลอดทดลอง โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นของขมิ้นชัน อายุ 60 วัน บนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) (1962) ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลซูโครส 4 ระดับ คือ 30, 60, 90 และ 120 กรัมต่อลิตร และนำไปเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ให้แสง 0, 8 และ 24 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และเลี้ยงภายใต้แสง 8 ชั่วโมงต่อวัน สามารถชักนำให้เกิดเหง้าจิ๋วในหลอดทดลองได้สูงสุด 85 เปอร์เซ็นต์และจากการทดลองเลี้ยงชิ้นส่วนต้นบนอาหารสูตร MS (1962) ดัดแปลงที่เติมสารชะลอการเจริญเติบโตในกลุ่มพาโคลบิวทราโซล (paclobutrazol) ยูนิโคนาโซล (uniconazole) และแอนไซมิโดล (ancymidol) ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร และวางเลี้ยงภายใต้แสง 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม uniconazole ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร ให้ ร้อยละของการชักนำให้เกิดเหง้าจิ๋วได้สูงสุดร้อยละ 75.8

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์ขมิ้นชันด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบ Temporary Immersion Bioreactor ให้ได้ปริมาณมาก

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์

1. ขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 1 (ขมิ้นทอง) และขมิ้นชันตรัง 2 (ขมิ้นด้วง)
2. สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS)(1962), Phytagel, น้ำตาล
3. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น คีมคีบ (forcept), มีดผ่าตัด, จานเพาะเลี้ยง (Petri dish)
4. สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น 6-Benzylaminopurine (BA), Kinetin, N6-(2-Isopentenyl)adenine (2-ip), Thidiazuron (TDZ), 1-Naphthaleneacetic acid (NAA)

วิธีการ

รวบรวมตัวอย่างขมิ้นชันตรัง 1(ขมิ้นทอง) และขมิ้นชันตรัง 2 (ขมิ้นด้วง) (ภาพที่ 1) จากพื้นที่ จ.นครศรีธรรมราช และ ศวส.ตรัง

ภาพที่ 1 ลักษณะของขมิ้นชันตรัง 1 (ขมิ้นทอง) และ ขมิ้นชันตรัง 2 (ขมิ้นด้วง)

นำเหง้าของขมิ้นชันมาปลูกและดูแลในโรงเรือน ณ สทช. จ.ปทุมธานี เพื่อจะนำยอดมาใช้ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 2 ยอดอ่อนของต้นขมิ้นชัน

1) ศึกษาผลของไซโตไคนิน : BA, kinetin, 2-ip และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 mg/l ต่อการชักนำยอดขมิ้นชัน จำนวน 13 กรรมวิธี ดังนี้

1. MS = control
2. MS + BA 1 mg/l
3. MS + BA 2 mg/l
4. MS + BA 3 mg/l
5. MS + kinetin 1 mg/l
6. MS + kinetin 2 mg/l
7. MS + kinetin 3 mg/l
8. MS + 2-ip 1 mg/l
9. MS + 2-ip 2 mg/l
10. MS + 2-ip 3 mg/l
11. MS + TDZ 1 mg/l
12. MS + TDZ 2 mg/l
13. MS + TDZ 3 mg/l

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 20 rep /กรรมวิธี

2) ศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาของขมิ้นชันที่ระดับต่างๆ 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร จำนวน 4 กรรมวิธี ดังนี้

1. MS + Sucrose 30 g/l = control
2. MS + Sucrose 40 g/l
3. MS + Sucrose 50 g/l
4. MS + Sucrose 60 g/l

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 20 rep / กรรมวิธี

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาทำการทดลอง เดือนตุลาคม 2558 – เดือนกันยายน 2562

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
อาคารทรัพยากรพันธุกรมพืชสิรินธร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

ผลและอภิปรายผล (Results and Discussion)

1) **ผลของไซโตไคนิน : BA, kinetin, 2-ip และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 mg/l ต่อการชักนำยอดขมิ้นชัน**

นำชิ้นส่วนยอดอ่อนที่แตกจากเหง้าของขมิ้นชันมาศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อโดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) Haiter ® ที่ความเข้มข้น 20% ระยะเวลา 20 นาที ในครั้งที่ 1 และ ใช้ความเข้มข้น 5% ระยะเวลา 20 นาที ในครั้งที่ 2 จากนั้นนำส่วนขมิ้นชันที่ปลอดเชื้อมาทดสอบเลี้ยงในอาหารที่มีไซโตไคนิน : BA, kinetin, 2-ip และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 mg/l จำนวน 13 สูตร เพื่อทดสอบการชักนำให้เกิดยอดขมิ้นชัน พบว่า ในการทดสอบกับขมิ้นชันตรัง1 การใช้ kinetin ความเข้มข้น 2 mg/l จะทำให้เกิดต้นยอดใหม่จำนวนเฉลี่ย 5.2 ต้น ในขณะที่การใช้ BA ความเข้มข้น 1 mg/l จะทำให้เกิดยอดใหม่เฉลี่ย 5 ต้น ส่วนการใช้ kinetin ความเข้มข้น 1 mg/l จะทำให้เกิดยอดใหม่เฉลี่ยน้อยที่สุด 3.00 ต้น แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 1) ส่วนความสูงของต้นที่เกิดขึ้นใหม่โดยวัดจากต้นที่สูงที่สุด พบว่า ให้ผลทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยการใช้ kinetin 1 mg/l จะให้ต้นที่มีความสูงเฉลี่ยสูงสุด 16.10 เซนติเมตร รองลงมาคือ การใช้ 2-ip ความเข้มข้น 2 mg/l ต้นใหม่มีความสูงเฉลี่ย 16 เซนติเมตร และการใช้ TDZ ความเข้มข้น 2 mg/l จะมีความสูงเฉลี่ยของต้นใหม่น้อยที่สุดคือ 5.5 เซนติเมตร (ตารางที่ 1) เนื่องจาก TDZ มีผลให้เกิดยอดใหม่ลักษณะการแตกกอ (ภาพที่ 3) ส่วนผลการทดสอบความยาวรากที่เกิดขึ้น พบว่า ให้ผลที่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยการใช้ 2-ip ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 mg/l จะทำให้เกิดความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 9.75 เซนติเมตร และการใช้สาร TDZ ที่ความเข้มข้น 2 mg/l จะให้ผลความยาวรากเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 1 เซนติเมตร (ตารางที่ 1)

สำหรับผลการทดสอบการใช้ไซโตไคนิน 4 ชนิด ในการชักนำให้เกิดยอดใหม่ของขมิ้นชันตรัง 2 พบว่า การชักนำให้เกิดยอดใหม่ การใช้สาร TDZ ความเข้มข้น 1 mg/l ทำให้เกิดค่าเฉลี่ยยอดใหม่สูงสุด 8.4 ต้น และรองลงมา คือ การใช้สาร TDZ ความเข้มข้น 2 mg/l ทำให้เกิดยอดเฉลี่ย 7 ต้น ส่วนการใช้ 2-ip ความเข้มข้น 1 mg/l ทำให้เกิดยอดเฉลี่ยน้อยที่สุด 2.25 ต้น และเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 2) จากอาหารที่ใช้ทดสอบพบว่า ความสูงของต้นใหม่ที่เกิดขึ้นซึ่งให้ผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ในอาหารที่มี kinetin ความเข้มข้น 1 mg/l จะให้ค่าเฉลี่ยความสูงต้นใหม่มากที่สุด 15.60 เซนติเมตร และการใช้ TDZ ความเข้มข้น 3 mg/l จะให้ค่าเฉลี่ยความสูงต้นใหม่น้อยที่สุด 5.25 เซนติเมตร (ตารางที่ 2) เช่นเดียวกับขมิ้นชันตรัง 1 เนื่องจาก TDZ มีผลให้เกิดยอดใหม่ลักษณะการแตกกอ (ภาพที่ 3) จากผลการวิเคราะห์ความยาวของรากที่เกิดขึ้นของขมิ้นชันตรัง 2 ในอาหารทดสอบทั้ง 13 สูตร พบว่า อาหารสูตรเปรียบเทียบ (control) จะทำให้เกิดค่าเฉลี่ยความยาวรากมากที่สุด 11.90 เซนติเมตร และในอาหารที่มี TDZ ความเข้มข้น 3 mg/l จะให้ค่าเฉลี่ยความยาวรากน้อยที่สุด 2.50 เซนติเมตร ซึ่งให้ผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2)

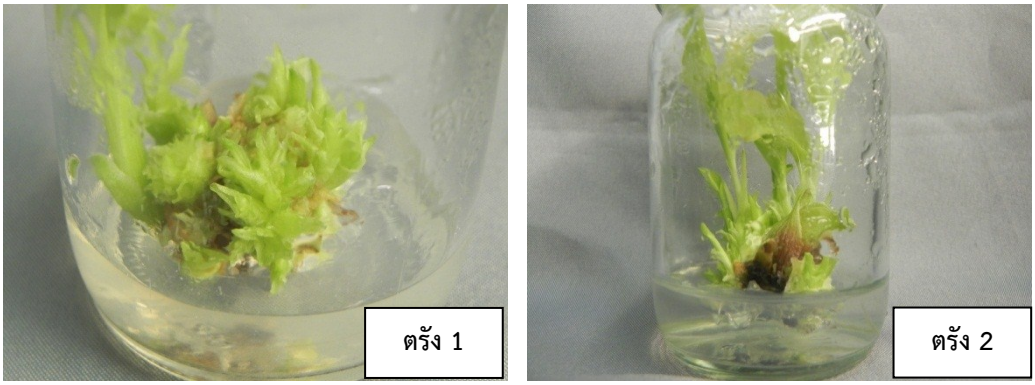
ตารางที่ 1 ผลการทดสอบการใช้ไซโตไคนิน 4 ชนิดต่อการเกิดยอดใหม่ ความสูงต้น และความยาวรากของขมิ้นชันตรัง 1

สูตรอาหาร	จำนวนยอดใหม่ (ต้น)	ความสูงต้น (ซม.)	ความยาวราก (ซม.)
MS (control)	4.40	13.00 ab [1/]	8.80 ab
MS + BA 1 mg/l	5.00	12.30 ab	5.27 bc
MS + BA 2 mg/l	3.40	11.90 abc	5.60 bc
MS + BA 3 mg/l	4.40	10.50 a-d	5.52 bc
MS + kinetin 1 mg/l	3.00	16.10 a	9.60 a
MS + kinetin 2 mg/l	5.20	14.00 ab	7.64 abc
MS + kinetin 3 mg/l	3.75	11.92 abc	7.12 abc
MS + 2-ip 1 mg/l	3.25	12.62 ab	9.75 a
MS + 2-ip 2 mg/l	4.50	16.00 a	9.75 a
MS + 2-ip 3 mg/l	4.60	11.40 abc	7.90 ab
MS + TDZ 1 mg/l	4.60	6.70 cd	3.78 cd
MS + TDZ 2 mg/l	4.60	5.5 d	1.00 d
MS + TDZ 3 mg/l	4.80 a	9.66 bcd	1.52 d
F-test	**ns**	****	****
c.v.(%)	**44.04**	**31.06**	**40.48**

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Ducan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3 ลักษณะการแตกกอของขมิ้นชันตรัง1 และขมิ้นชันตรัง 2 เมื่อใช้สารไซโตไคนินชนิด TDZ

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบการใช้ไซโตไคนิน 4 ชนิดต่อการเกิดยอดใหม่ ความสูงต้น และความยาวรากของขมิ้นชันตรัง 2

สูตรอาหาร	จำนวนยอดใหม่ (ต้น)	ความสูงต้น (ซม.)	ความยาวราก (ซม.)
MS (control)	3.00 bc [1/]	9.20 bcd	11.90 a
MS + BA 1 mg/l	4.00 abc	10.00 bcd	7.75 abc
MS + BA 2 mg/l	4.75 abc	11.62 abc	8.00 abc
MS + BA 3 mg/l	5.00 abc	9.75 bcd	9.375 abc
MS + kinetin 1 mg/l	4.40 abc	15.60 a	8.40 abc
MS + kinetin 2 mg/l	6.00 abc	15.20 a	8.30 abc
MS + kinetin 3 mg/l	6.33 abc	12.83 ab	7.33 abc
MS + 2-iP 1 mg/l	2.25 c	11.87 abc	9.625 ab
MS + 2-iP 2 mg/l	4.00 abc	8.70 bcd	8.70 abc
MS + 2-iP 3 mg/l	5.75 abc	10.00 bcd	7.375 abc
MS + TDZ 1 mg/l	8.40 a	7.40 cd	5.70 bcd
MS + TDZ 2 mg/l	7.00 ab	5.50 d	4.40 cd
MS + TDZ 3 mg/l	5.00 abc	5.25 d	2.50 d
F-test	**ns**	**	*
c.v.(%)	**52.26**	**30.08**	**38.19**

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Ducan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2) **ผลของปริมาณน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาของขมิ้นชันที่ระดับต่างๆ 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร**

นำต้นขมิ้นชันตรัง 1 ที่ปลอดเชื้อมาทดสอบปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ปริมาณ 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตรเพื่อการพัฒนาส่วนรากของขมิ้นชันตรัง 1 ให้มีการสร้างเหง้า (rhizome) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยทดสอบบนสูตรอาหารที่มีการเติม BA ความเข้มข้น 3 mg/l หรือ TDZ ความเข้มข้น 2 mg/l และทุกสูตรอาหารมีการเติม NAA ความเข้มข้น 1 mg/l พบว่า สูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 mg/l ที่มีน้ำตาลซูโครส 60 g/l ให้ค่าเฉลี่ยของการเกิดจำนวนรากสูงสุด คือ 13.50 ราก และมีการสร้างเหง้าเฉลี่ย 0.80 หัว (ตารางที่ 3) และมีการสร้างเหง้าที่เห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 3) ตรงกับการรายงานของ Sangamitra และ Pradeep (2006) ได้รายงานถึงการผลิตเหง้าจิ๋วในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้นชัน โดยการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีการเติม BA ความเข้มข้น 13.3 mM และ น้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเลี้ยงในสภาพที่มีการให้แสงระยะเวลา 4 ชั่วโมงต่อวัน ทำให้เกิดการสร้างเหง้าจิ๋วได้ในระยะเวลา 30 วัน สอดคล้องกับการรายงานของ Anchalee (2012) ศึกษาผลของ NAA BA และ Sucrose ในการชักนำยอดและการเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วโดยการผ่ายอดของขมิ้น โดยการนำชิ้นส่วนยอดของขมิ้นมาทดสอบบนอาหาร MS ร่วมกับ BA ที่ระดับ 0, 1, 2, 3 และ 4 mg/l และ NAA ที่ระดับ 0, 0.5, and 1 mg/l พบว่า ปริมาณน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร ทำให้เกิดค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดและจำนวนใบต่อยอดสูงที่สุด และความยาวราก ขนาดของรากมีขนาดใหญ่ที่สุด จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่า สูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 mg/l ที่มีน้ำตาลซูโครส 30 g/l ที่มีค่าเฉลี่ยการเกิดเหง้าเท่ากับ 1.70 หัว (ตารางที่ 3) และมีการสร้างเหง้าที่เห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 4 และ ภาพที่ 5)

ตารางที่ 3 ผลของปริมาณน้ำตาลน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาของขมิ้นชันตรัง 1

สูตรอาหาร	จำนวนยอด (ต้น)	ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนราก (ราก)	ความยาวราก (ซม.)	Rhizome (หัว)
MS (control)	1.90 de [1/]	14.79 a	6.20 b	7.75 a	1.10 ab
MS+BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l + S 30 g/l	3.10 abc	16.08 a	6.20 b	5.06 bc	1.70 a
MS+TDZ 2 mg/l + NAA 1 mg/l + S 30 g/l	2.70 b-e	7.47 c	1.10 d	2.13 e	0.90 ab
MS+BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l + S 40 g/l	1.80 e	7.60 c	4.90 bc	3.17 cde	0.70 b
MS+TDZ 2 mg/l + NAA 1 mg/l + S 40 g/l	4.00 a	4.48 d	1.90 d	3.08 de	1.00 ab
MS+BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l + S 50 g/l	2.00 cde	3.91 d	2.37 d	2.77 de	1.12 ab
MS+TDZ 2 mg/l + NAA 1 mg/l + S 50 g/l	3.00 a-d	5.28 cd	2.40 d	3.33 cde	1.20 ab
MS+BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l + S 60 g/l	3.60 ab	11.35 b	13.50 a	5.27 b	0.80 ab
MS+TDZ 2 mg/l + NAA 1 mg/l + S 60 g/l	2.25 cde	6.43 cd	1.64 cd	4.38 bcd	1.25 ab
F-test	**	**	**	**	ns
c.v.(%)	**40.73**	**31.51**	**52.64**	**46.08**	**81.33**

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Ducan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

MS (Control)

MS +BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l+ S 30 g/l

MS +TDZ 2 mg/l + NAA 1 mg/l+ S 30 g/l

MS +BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l+ S 40 g/l

MS +TDZ 2 mg/l + NAA 1 mg/l+ S 40 g/l

MS +BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l+ S 50 g/l

MS +TDZ 2 mg/l + NAA 1 mg/l+ S 50 g/l

MS +BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l+ S 60 g/l

MS +TDZ 2 mg/l + NAA 1 mg/l+ S 60 g/l

<u>ภาพที่ 4</u> การเลี้ยงทดสอบการพัฒนาการเกิดเหง้าของขมิ้นชันตรัง 1 ในอาหารที่มี BA 3 mg/L หรือ TDZ 2 mg/L และ NAA 1 mg/L ในระดับปริมาณน้ำตาลซูโครส 30, 40, 50 และ 60 g/l

ภาพที่ 5 การเกิดเหง้าในสภาพปลอดเชื้อของขมิ้นชันตรัง 1 บนสูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 mg/l ที่มีน้ำตาลซูโครส 30 g/l

นำขมิ้นชันตรัง 2 ทดสอบบนอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตรเพื่อการพัฒนาส่วนราก ให้มีการสร้างเหง้า (rhizome) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยทดสอบบนสูตรอาหารที่มีการเติม BA ความเข้มข้น 3 mg/l หรือ TDZ ความเข้มข้น 2 mg/l และทุกสูตรอาหารมีการเติม NAA ความเข้มข้น 1 mg/l พบว่า อาหาร MS ร่วมกับการเติม BA ความเข้มข้น 3 mg/l NAA ความเข้มข้น 1 mg/l ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 30 g/l จะทำให้ค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดใหม่เท่ากับ 3.77 ต้น มีความสูงของต้นใหม่เฉลี่ย 17.41 เซนติเมตร มีการเกิดรากเฉลี่ย 15.55 ราก และมีค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 1.50 หัว (ตารางที่ 4) โดยรากจะมีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 6)

ตารางที่ 4 ผลของปริมาณน้ำตาลน้ำตาลซูโครสต่อการพัฒนาของขมิ้นชันตรัง 2

สูตรอาหาร	จำนวนยอด (ต้น)	ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนราก (ราก)	ความยาวราก (ซม.)	Rhizome (หัว)
MS (control)	1.90 bc [1/]	14.20 b	9.70 b	5.99 a	0.60 a
MS+BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l + S 30 g/l	3.77 a	17.41 a	15.55 a	5.50 ab	1.11 a
MS+TDZ 2 mg/l + NAA 1 mg/l + S 30 g/l	3.55 a	6.36 cd	3.00 c	4.53 ab	0.88 a
MS+BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l + S 40 g/l	1.75 bc	5.41 d	4.62 c	3.75 b	0.75 a
MS+TDZ 2 mg/l + NAA 1 mg/l + S 40 g/l	2.80 ab	4.66 de	2.70 c	3.87 b	0.90 a
MS+BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l + S 50 g/l	2.00 bc	3.27 e	2.66 c	3.68 b	1.33 a
MS+TDZ 2 mg/l + NAA 1 mg/l + S 50 g/l	2.11 bc	3.23 e	1.77 c	5.56 ab	1.33 a
MS+BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l + S 60 g/l	2.40 bc	7.48 c	9.40 b	5.02 ab	1.10 a
MS+TDZ 2 mg/l + NAA 1 mg/l + S 60 g/l	1.50 c	4.65 de	3.00 c	4.56 ab	1.50 a
F-test	**	**	**	ns	ns
c.v.(%)	**47.67**	**27.15**	**56.59**	**41.28**	**96.23**

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Ducan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

MS (Control)

MS +BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l+ S 30 g/l

MS +TDZ 2 mg/l + NAA 1 mg/l+ S 30 g/l

MS +BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l+ S 40 g/l

MS +TDZ 2 mg/l + NAA 1 mg/l+ S 40 g/l

MS +BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l+ S 50 g/l

MS +TDZ 2 mg/l + NAA 1 mg/l+ S 50 g/l

MS +BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l+ S 60 g/l

MS +TDZ 2 mg/l + NAA 1 mg/l+ S 60 g/l

<u>ภาพที่ 6</u> การเลี้ยงทดสอบการพัฒนาการเกิดเหง้าของขมิ้นชันตรัง 2 ในอาหารที่มี BA 3 mg/L หรือ TDZ 2 mg/L และ NAA 1 mg/L ในระดับปริมาณน้ำตาลซูโครส 30, 40, 50 และ 60 g/l

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การเพิ่มปริมาณยอดของขมิ้นชันทั้ง 2 พันธุ์ คือ ขมิ้นชันตรัง1 และ ขมิ้นชันตรัง 2 สามารถเลือกใช้สาร ไซโตไคนินได้ทั้ง 4 ชนิด เนื่องจากให้ผลทางสถิติที่ไม่ต่างกัน แต่ควรพิจารณาราคาของสารเคมีเพื่อลดต้นทุนสำหรับการผลิตทางพาณิชย์ จึงแนะนำการใช้ BA ที่มีราคาถูก และสามารถใช้ต่อเนื่องในขั้นตอนการชักนำให้เกิดเหง้าในสภาพปลอดเชื้อได้ด้วย

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สูตรอาหารที่ได้สำหรับการชักนำให้เกิดยอดและการสร้างเหง้าในสภาพปลอดเชื้อ สามารถนำไปพัฒนาต่อในขั้นตอนของการผลิตโดยการใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์ เพื่อลดระยะเวลาการผลิตต้นพันธุ์ และต้นพันธุ์ที่ได้ปลอดเชื้อเกษตรกรสามารถนำไปปลูกในสภาพแปลงปลูกได้ ช่วยลดปัญหาการสะสมของเชื้อโรคในท่อนพันธุ์ได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชสวนตรังที่อนุเคราะห์ตัวอย่างขมิ้นชันตรัง 1 และ ขมิ้นชันตรัง 2 รวมทั้งคำแนะนำต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง (References)

กาญจน สุทธิกุล. 2549. ไบโอรีแอคเตอร์ (Bioreactor) เขี้ยวเล็บใหม่ในวงการขยายพันธุ์พืชของไทย. วารสารเคหการเกษตร. ปีที่ 30 ฉบับที่ 2 เดือนกุมภาพันธ์. : 93-99.

งามผ่อง คงคาทิพย์. 2548. การวิจัยและพัฒนาขมิ้นชันแบบครบวงจร หน่วยปฏิบัติการวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและเคมีอินทรีย์สังเคราะห์ (NPOS). นิทรรศการวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ “เกษตรนำชาติ ศาสตร์ที่ยั่งยืน คืนทรัพยากรสู่ชุมชน” ในงานวันเกษตรแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2548, กรุงเทพฯ.

จินตน์กานต์ งามสุทธา. 2555. ขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 1 และ 84-2. นสพ.กสิกร ปีที่ 85 ฉบับที่ 4 กรกฎาคม-สิงหาคม. กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. : 108-111 หน้า.

อนุพันธ์ กงบังเกิด และ วีระชน ยานะฝั่น. 2548. ผลของแสง น้ำตาล และสารชะลอการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดเหง้าจิ๋วของขมิ้นชันในหลอดทดลอง. NU Science Journal. 2(1): 73 – 86.

Anchalee Jala . 2012. Effects of NAA BA and Sucrose on Shoot Induction and Rapid Micropropagation by Trimming Shoot of Curcuma longa L. Thammasat International Journal of Science and Technology, 17 (4) : 54-60.

Archana C., G.S. Pillai and I. Balachandran. 2014. In vitro microrhizome and minirhizome production in turmeric (*Curcuma longa* L.) cultivar Alleppey Supreme and its comparative anatomical and histochemical analysis. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 3(3): 535-542

Sanghamitra N. and P. Kumar Naik. 2006. Factors Effecting *In Vitro* Microrhizome Formation and Growth in *Curcuma longa* L. and Improved Field Performance of Micropropagated Plants. ScienceAsia (32) : 31-31.

Solomon C.U. and E. B.Odii. 2013. Shoot Proliferation of *In vitro* Turmeric (*Curcuma longa* L.) Affected by Different Concentrations of Benzylaminopurine (BAP). World J Agr Sci 9 (3): 227-230.

การชักนำให้เกิดยอดรวมในอ้อย (*Saccharum* spp.) ที่ปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้ชิ้นส่วนของใบอ่อน

Multiple shoot formation in phytoplasma-free sugarcane (*Saccharum* spp.) using immature leaf roll.

กษิดิศ ดิษฐบรรจง	Karsedis Distabanjong
ชยานิจ ดิษฐบรรจง	Chayanit Distabanjong
ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์	Phummarin Wanichananan
ไพฑูรย์ บุปผาดา	Phaitun Bupphada
วีระพล พลรักดี	Werapon Ponragdee

คำสำคัญ (Key words)

อ้อย (*Saccharum* spp.), Benzyladenine (BA), Naphthalene acetic acid (NAA), Temporary Immersion Bioreactor (TIB), Indole-3-butyric acid (IBA)

บทคัดย่อ

การชักนำให้เกิดยอดรวม (multiple shoot formation) ในอ้อย (*Saccharum* spp.) ที่ปลอดเชื้อไฟโตพลาสมา โดยใช้ส่วนใบอ่อนจากยอดที่ยังไม่คลี่ (immature leaf roll) สามารถทำได้บนอาหารกึ่งแข็ง (semi solid media) และในระบบ temporary immersion bioreactor (TIB) ในระบบกึ่งแข็งสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมสูงสุด ได้แก่สูตรอาหารที่ประกอบด้วย อาหาร MS ที่เติม 3-6 µM benzyladenine (BA) และ 2 µM naphthalene acetic acid (NAA) ได้ 47.5-51.6 ยอดอ่อน/ชิ้นส่วนพืช ภายในระยะเวลา 2 เดือน สำหรับการใช้ระบบ TIB สูตรอาหารที่ให้จำนวนยอดสูงสุด คือ อาหาร MS ที่เติม 3-6 µM BA and 2 µM NAA ได้ 22.1-16.2 ยอดอ่อน/ชิ้นส่วนพืช ภายในระยะเวลา 1 เดือน ซึ่งระบบ TIB สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้เร็วกว่าและยอดอ่อนมีขนาดใหญ่กว่าการใช้อาหารกึ่งแข็ง ยอดอ่อนที่ได้สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีบนอาหารสูตร ½MS+4-8 µM indole-3-butyric acid (IBA) ต้นอ่อนที่มีรากที่สมบูรณ์สามารถย้ายปลูกลงในเวอร์มิคูไลท์เพื่อปรับสภาพและปลูกในโรงเรือนระบบปิด โดยมีอัตราการอยู่รอดสูงกว่า 80%

Abstract

The multiple shoot formation in sugarcane (*Saccharum* spp.), that free from phytoplasma, has been done using immature leaf roll as explants. The induction was employed in two processes, on semi solid media and in temporary immersion bioreactor (TIB). In semi solid media, the highest number of shoots was obtained on MS basal media supplemented with 3-6 µM benzyladenine (BA) and 2 µM naphthalene acetic acid (NAA), 47.5-51.6 microshoots/explant within 2 months. For TIB system, the highest number of shoots was found in MS liqiud media supplemented with 3-6 µM BA and 2 µM NAA (22.1-16.2 microshoots/explant within 1 month) that was faster than those obtained on the semi solid media. Microshoots produced in the TIB system also displayed larger size than on semi solid media. Successful rooting of the microshoots was obtained in ½MS+4-8 µM indole-3-butyric acid (IBA). Plantlets were transferred in closed-system greenhouse with above 80% survival.

บทนำ (Introduction)

ปัจจุบันการเกษตรได้ใช้ประโยชน์จากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในหลายๆ ด้าน ได้แก่ การขยายพันธุ์พืชให้เพิ่มปริมาณมากและมีความสม่ำเสมอ (uniformity) ในระยะเวลาสั้น การผลิตพืชที่ปราศจากเชื้อโรค (disease-free plants) ตลอดจนการปรับปรุงหรือพัฒนาพันธุ์พืช (crop improvement) สามารถสร้างพันธุ์พืชต่างๆได้ตามความประสงค์ อ้อย (*Saccharum* spp.) เป็นพืชสำคัญที่มีมูลค่าการผลิตเพื่อการบริโภคและส่งออกที่สำคัญ ใช้เป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล มีมูลค่าการส่งออก 20,000-30,000 ล้านบาทต่อปี การปลูกอ้อยมีปัญหาเรื่องท่อนพันธุ์อ้อยที่ใช้ปลูกปนเปื้อนด้วยเชื้อไฟโตพลาสมา (phytoplasma) ทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตและผลผลิตลดลงอย่างมาก

งานวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยส่วนมากนำชิ้นส่วนพืช (explant) มาชักนำให้เกิดแคลลัส (callus) ก่อน ตามด้วยการเพิ่มปริมาณแคลลัส จากนั้นจึงชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอดอ่อน (microshoot) หรือ somatic embryo (Distabanjong et al., 2012) ซึ่งวิธีการดังกล่าวโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ (somaclonal variation) สูง เนื่องจากระยะที่เซลล์เป็นแคลลัสเป็นระยะที่ง่ายต่อการกลายพันธุ์ ดังนั้นจึงควรหลีกเลี่ยงขั้นตอนของการเกิดแคลลัส ปัญหาในปัจจุบันนี้ส่วนขยายพันธุ์อ้อย ได้แก่ ท่อนพันธุ์ มีการปนเปื้อนจากเชื้อไฟโตพลาสมา สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพร่วมกับศูนย์โคเปียประจำประเทศไทย (KOPIA Thailand Center) ได้ทำการ

คัดเลือกต้นอ้อยปลอดไฟโตพลาสมาโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้นำลงปลูกในเรือนทดลองปิด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนซ้ำ (reinfection)

งานวิจัยเรื่องนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อขยายพันธุ์อ้อยปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยไม่ผ่านขั้นตอนของการเกิดแคลลัส (direct shoot formation/direct organogenesis) และนำระบบ temporary immersion bioreactor (TIB) มาใช้เป็นเครื่องมือช่วยการขยายพันธุ์ สามารถเพิ่มปริมาณส่วนขยายพันธุ์อ้อยที่ปลอดโรคนี้ สามารถทำได้ในปริมาณมากภายในเวลาสั้นและยังช่วยประหยัดเวลาและแรงงานได้

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์

1. ต้นอ้อยพันธุ์ ขอนแก่น 3 และ อู่ทอง 12 ที่คัดเลือกแล้วว่าไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาที่ได้จากโครงการวิจัยอ้อยไทย-เกาหลี ในปี พ.ศ. 2555-2557 (ค.ศ. 2012-2014)
2. สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
   benzyladerine (BA), naphthalene acetic acid (NAA)

วิธีการ

งานวิจัยเรื่องการชักนำให้เกิดยอดรวม (multiple shoot formation) ได้นำชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อโรค phytoplasma ที่ได้จากโครงการวิจัยอ้อยไทย-เกาหลี (KOPIA-DOA Sugarcane Project) ระหว่างปี ค.ศ. 2012-2014 ผลสำเร็จของโครงการสามารถได้ต้นอ้อยที่ปลอดเชื้อ phytoplasma โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับชีวโมเลกุล ทั้งนี้การปลูกอ้อยปลอดโรคทำให้อ้อยเจริญเติบโตเร็ว แข็งแรง สามารถให้ผลผลิตสูง (Sood et al., 2006)

การชักนำให้เกิดยอดรวม แบ่งเป็น 2 การทดลอง

การทดลองที่ 1 เป็นการทดลองโดยชักนำให้เกิดยอดรวมบนอาหารกึ่งแข็ง (semi solid media) ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ คือ ใบอ่อนจากยอดที่ยังไม่คลี่ (immature leaf roll) ของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 เตรียมชิ้นส่วนพืชโดยตัดส่วนยอดอ่อนของอ้อย ลอกใบด้านนอกออกจนเหลือยอดอ่อนที่ติดกับข้อแรกของต้น จากนั้นนำไปล้างน้ำ 30 นาที แล้วฆ่าเชื้อภายนอกด้วยไฮเตอร์® (Haiter®;sodium hypochlorite 6% w/w as available chlorine) ความเข้มข้น 20% (v/v) นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเพื่อล้างไฮเตอร์® ออกจากผิวชิ้นส่วนพืช นำชิ้นส่วนทั้งหมดแช่ในสารปฏิชีวนะ nystatin (Sigma) ความเข้มข้น 250 มก./ล. เพื่อกำจัดเชื้อรา และ cefotexime (Sigma) ความเข้มข้น 250 มก./ล.เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย นาน 1 ชั่วโมง นำส่วนยอดอ่อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อภายนอกและแช่ในสารปฏิชีวนะแล้ว (ซึ่งมีความยาวประมาณ 10 ซม.) มาตัดตามขวาง (transverse section) หนาชิ้นละประมาณ 1-2 มม. ตำแหน่งที่ตัดอยู่ที่เหนือข้อแรกของยอดอ่อน อาหารเลี้ยงชิ้นส่วนพืชประกอบด้วย อาหารสูตร MS (Muashige and Skoog, 1962) casein hydrolysate (CH) 500

มก./ล. (Ali et al., 2012) น้ำตาลซูโครส (sucrose) 30 ก./ล. และ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) 2 ชนิด คือ benzyladerine (BA) และ naphthalene acetic acid (NAA) อาหารเลี้ยงพืชปรับ pH ที่ 5.7 ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ

สูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดยอดรวม

1. MS
2. MS+3μM BA
3. MS+6μM BA
4. MS+9μM BA
5. MS+3μM BA+2μM NAA
6. MS+6μM BA+2μM NAA
7. MS+9μM BA+2μM NAA

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 4 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลอง (treatment) มี 32 ชิ้นส่วนพืช (explant) เลี้ยงชิ้นส่วนพืชในสภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อุณหภูมิ 25^{O}C ภายใต้สภาพแสง 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง ทำการบันทึกข้อมูล 2 เดือนหลังเลี้ยงและเปลี่ยนอาหารทุก 3 สัปดาห์เมื่อพบอาการ browning ในอาหารหรือบนชิ้นส่วนพืช

การทดลองที่ 2 เป็นการทดลองโดยชักนำให้เกิดยอดรวมในอาหารเหลวระบบ temporary immersion bioreactor (TIB)

นำชิ้นส่วนใบอ่อนจากยอดที่ยังไม่คลี่ (immature leaf roll) ของอ้อยพันธุ์ ขอนแก่น 3 โดยการเตรียมชิ้นส่วนพืชเหมือนกับการทดลองที่ 1 มาเลี้ยงในขวดเลี้ยงระบบ TIB ชนิด RITA® สูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดยอดรวมในระบบ TIB ประกอบด้วย อาหาร MS น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. CH 500 มก./ล. (Ali et al., 2012) สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่

1. MS
2. MS+3μM BA
3. MS+6μM BA
4. MS+9μM BA
5. MS+3μM BA+2μM NAA
6. MS+6μM BA+2μM NAA
7. MS+9μM BA+2μM NAA

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 4 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลอง มี 24 ชิ้นส่วนพืช เลี้ยงชิ้นส่วนพืชในสภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อุณหภูมิ 25^{O}C ภายใต้สภาพแสง 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง ทำการบันทึกข้อมูล 1 เดือนหลังเลี้ยง การทดลองนี้ให้อาหารเหลวกับชิ้นส่วน

พืชทุก 3 ชั่วโมง (ซึ่งเท่ากับ 8 ครั้ง/วัน) แต่ละครั้งให้อาหารเหลวนาน 3 นาที (Distabanjong et al., 2018)

การชักนำให้เกิดราก

นำยอดอ่อนที่ได้จากการเพิ่มปริมาณความสูงประมาณ 5-8 ซม. มาเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดรากที่ประกอบด้วย อาหาร ½MS น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. และ indole-3-butyric acid (IBA) ความเข้มข้นต่างๆ 0, 2, 4, 6 และ 8 µM วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 4 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลองมี 48 ยอดอ่อน (microshoot) เลี้ยงชิ้นส่วนพืชในสภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อุณหภูมิ 25^{O}C ภายใต้สภาพแสง 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง บันทึกจำนวนรากต่อยอดอ่อนหลังเลี้ยง 1 เดือน

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 **(2 ปี)**

สถานที่ดำเนินงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

ผลการวิจัยและอภิปรายผล (Results and Discussion)

ก่อนทำการทดลองในระบบ TIB ได้ทำการทดลองชักนำให้เกิดยอดรวมบนอาหารกึ่งแข็งเพื่อทราบแนวโน้มและความเป็นไปได้ของการเกิดยอดรวมโดยไม่ผ่านการเกิดแคลลัส พบว่าการชักนำให้เกิดยอดรวมบนอาหารกึ่งแข็งสามารถชักนำได้ดีบนอาหาร MS ที่เติม 3-6 µM BA และ 2 µM NAA (47.5-51.6 ยอดอ่อน/ชิ้นส่วนพืช, ภาพที่ 1) การใช้ NAA ร่วมกับ BA สามารถเพิ่มจำนวนการเกิดยอดรวมได้สูงกว่าการใช้ BA เพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ali et al. (2012) ที่รายงานว่า NAA ช่วยส่งเสริมการเกิดยอดรวมและทำให้ยอดอ่อนมีการยืดตัว เป็นการตอบสนองแบบบวก (positive effect) ของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสอง เมื่อทำการทดลองในระบบ TIB พบว่า การชักนำให้เกิดยอดรวมสามารถชักนำได้ในอาหาร MS ที่เติม 3-6 µM BA และ 2 µM NAA (22.1-16.2 ยอดอ่อน/ชิ้นส่วนพืช, ตารางที่ 2) เป็นจำนวนยอดที่น้อยกว่าที่ได้จากอาหารกึ่งแข็ง แต่ระบบ TIB สามารถชักนำให้เกิดได้ภายในระยะเวลาที่น้อยกว่าการชักนำบนอาหารแข็ง ระบบ TIB สามารถชักนำได้ภายในระยะเวลา 1 เดือนหลังการเลี้ยง ส่วนในอาหารกึ่งแข็งสามารถชักนำได้ 2 เดือนขึ้นไป นอกจากนี้ต้นอ่อนที่ได้ในระบบ TIB จะมีความแข็งแรงและขนาดต้นสูงกว่าต้นอ่อนที่ได้จากอาหารกึ่งแข็ง (ภาพที่ 2) ชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอดอ่อนของการทดลองนี้ใช้ใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ ซึ่งได้ผลดีเช่นเดียวกับผลการวิจัยที่ผ่านมา (Ali et al., 2012, Gill et al., 2006, Snyman et al., 2008)

ตารางที่ 1. จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชบนอาหารกึ่งแข็ง (semi solid) สูตรต่างๆ

สูตรอาหาร	# ยอด/ชิ้นส่วนพืช[1]	% ชิ้นส่วนพืชที่ตอบสนอง[2]
1. MS	2.2 d	28
2. MS+3μM BA	10.8 c	60
3. MS+6μM BA	14.4 c	60
4. MS+9μM BA	19.2 bc	66
5. MS+3μM BA+2μM NAA	**47.5 a**	**70**
6. MS+6μM BA+2μM NAA	**51.6 a**	**82**
7. MS+9μM BA+2μM NAA	25.2 b	76

[1] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างที่ระดับ 5 % โดย DMRT

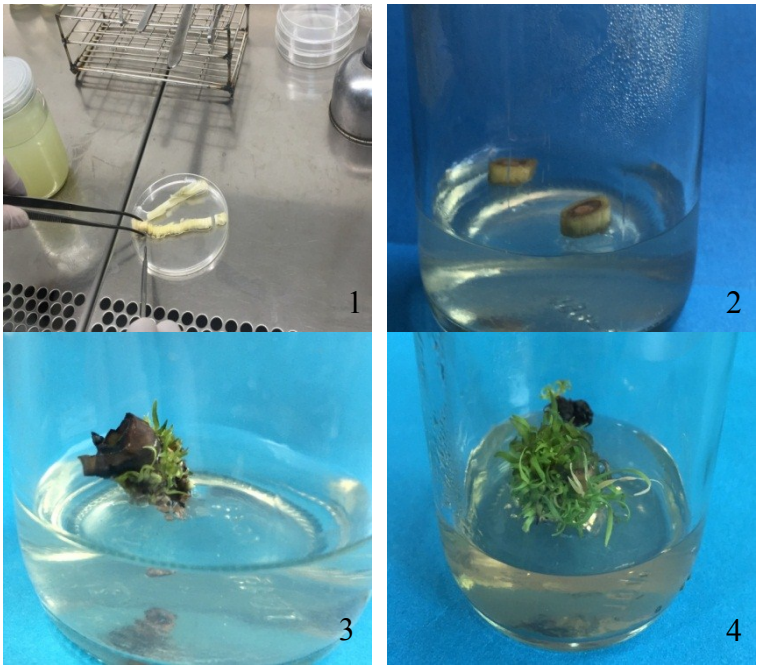
[2] จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชบันทึกเฉพาะยอดที่มีขนาดยาวกว่า 0.5 ซม. **บันทึกข้อมูล 2 เดือนหลังเลี้ยง**

ตารางที่ 2. จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชในอาหารเหลวสูตรต่างๆโดยระบบ temporary immersion bioreactor (TIB)

สูตรอาหาร	# ยอด/ชิ้นส่วนพืช[1]	% ชิ้นส่วนพืชที่ตอบสนอง[2]
1. MS	2.4 d	25
2. MS+3μM BA	3.6 cd	56
3. MS+6μM BA	6.4 bc	54
4. MS+9μM BA	8.2 b	59
5. MS+3μM BA+2μM NAA	**22.1 a**	**74**
6. MS+6μM BA+2μM NAA	**16.2 a**	**71**
7. MS+9μM BA+2μM NAA	11.4 b	69

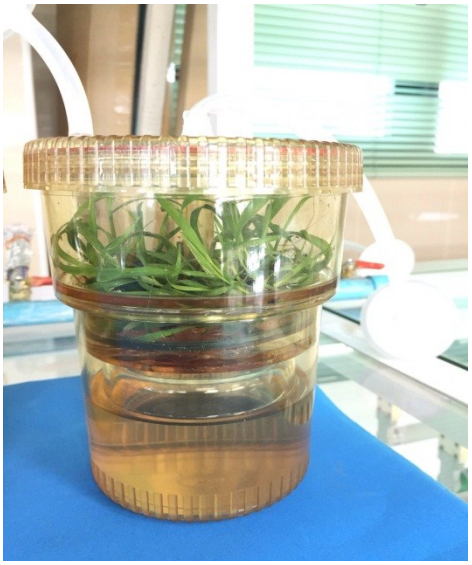
[1] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างที่ระดับ 5 % โดย DMRT

[2] จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชบันทึกเฉพาะยอดที่มีขนาดยาวกว่า 0.5 ซม.**บันทึกข้อมูล 1 เดือนหลังเลี้ยง**



ภาพที่ 1. การเกิดยอดรวมจากชิ้นส่วนใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ (immature leaf roll) เลี้ยงบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย 6 µM BA และ 2 µM NAA

1. ชิ้นส่วนใบอ่อนอ้อย ความยาวประมาณ 10 ซม.
2. ใบอ่อนตัดตามขวาง (transverse section) เลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดยอด
3. เกิดยอดรวม (multiple shoot) บนรอยตัด
4. ยอดรวมพัฒนาสมบูรณ์



ภาพที่ 2. การชักนำให้เกิดยอดรวมในระบบ TIB ในอาหาร MS+6 µM BA+2 µM NAA

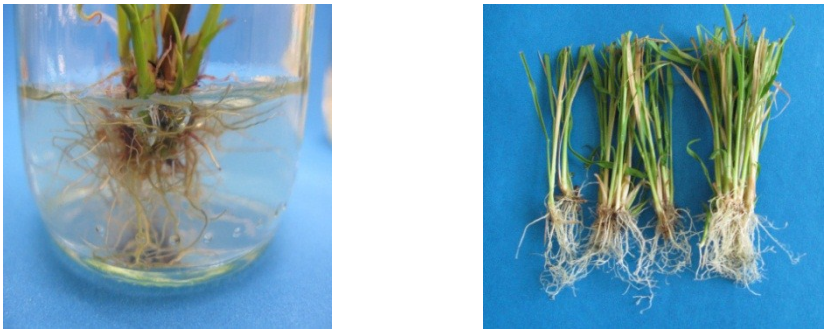
การชักนำให้เกิดรากโดยใช้ IBA พบว่า สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้ได้จำนวนราก/ยอดอ่อนสูงสุด คือ อาหารสูตร ½MS + 4-8 µM IBA (ตารางที่ 3 และภาพที่ 3) แต่ที่ความเข้มข้นของ IBA 8 µM รากจะมีลักษณะบวมและไม่ยืดยาว ไม่เหมาะสำหรับการย้ายปลูก ดังนั้นความเข้มข้นของ IBA ที่เหมาะสมควรเป็น 4-6 µM ต้นอ่อนที่มีรากที่สมบูรณ์สามารถย้ายปลูกในเวอร์มิคูไลท์เพื่อปรับสภาพและปลูกในโรงเรือนระบบปิด โดยมีอัตราการอยู่รอดสูงกว่า 80% (ภาพที่ 4) สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มออกซิน (auxin) สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี NAA สามารถชักนำให้เกิดรากในอ้อยได้ดี (Ali et al. 2012, Ali et al. 2010) แต่ในการทดลองนี้ใช้ IBA ชักนำให้เกิดราก ซึ่งจะได้รากที่มีขนาดเล็กเป็นฝอยละเอียด (ภาพที่ 3) และมีปริมาณมากกว่าเมื่อใช้ NAA (ไม่ได้แสดงผล)

ตารางที่ 3. การชักนำให้เกิดรากในอาหารที่มี IBA ความเข้มข้นต่างๆ

IBA (µM)	จำนวนราก/ยอดอ่อน	
	ขอนแก่น 3	**อู่ทอง 12**
0	9 b	14 b
2	13 b	16 b
4	21 a	26 a
6	28 a	25 a
8	26 a	29 a

[1] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างที่ระดับ 5 % โดย DMRT

[2] จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชบันทึกเฉพาะยอดที่มีขนาดยาวกว่า 0.5 ซม.**บันทึกข้อมูล 1 เดือนหลังเลี้ยง**



ภาพที่ 3. การเกิดรากของยอดอ่อนอ้อยในอาหาร ½ MS+4 µM indole-3-butyric acid (IBA)

ภาพที่ 4. การย้ายปลูกต้นอ่อนอ้อยในโรงเรือนระบบปิด (closed-system green house)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การชักนำให้เกิดยอดรวมในอ้อย สามารถทำได้บนอาหารกึ่งแข็งและในระบบ TIB การใช้ TIB สามารถได้ยอดอ่อนในระยะเวลาที่สั้นกว่าการชักนำบนอาหารแข็ง แต่ระบบ TIB ชักนำให้เกิดยอดอ่อนได้ในปริมาณที่น้อยกว่าบนอาหารแข็ง (16.2-22.1 vs 47.5-51.6 ยอด/ชิ้นส่วนพืช) นอกจากนี้ควรทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อไฟโตพลาสมาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้แน่ใจว่าต้นพันธุ์ (stock plant) ปลอดโรค (ภาพผนวกที่ 1 และภาพผนวกที่ 2)

การนำเสนอผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยเรื่องนี้ได้นำเสนอในชื่อเรื่อง Production of phytoplasma-free plants in sugarcane (*Saccharum* spp.) using temporary immersion bioreactor โดยนำเสนอ oral presentation ใน **International Symposia on Tropical and Subtropical Horticulture** ที่เมือง Cairn เครือรัฐออสเตรเลีย ระหว่างวันที่ 20-25 พฤศจิกายน 2559 เรื่องเต็มได้ผ่านการตรวจจาก editorial board และจะลงตีพิมพ์ใน Acta Horticulturae ปี 2018.

คำขอบคุณ (ถ้ามี)

ขอขอบคุณศูนย์โคเปียประจำประเทศไทย (KOPIA Thailand Center) สำหรับการสนับสนุนทางด้านวิชาการ โดยส่งผู้เชี่ยวชาญสาขาต่างๆ มาฝึกอบรมเกี่ยวกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อกำจัดเชื้อไวรัส และไฟโตพลาสมา

เอกสารอ้างอิง (References)

Ali, S. M.S. Khan and J. Iqbal. 2012. In vitro direct plant regeneration from cultured young leaf segment of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). J. Animal & Plant Sci. 22 (4) : 1107-1112.

Ali, S., J. Iqbal and M.S. Khan. 2010. Genotype independent in vitro regeneration system in elite varieties of sugarcane. Pakistan J. Bot., 42 (6) : 3783-3790.

Distabanjong, C., K. Distabanjong, J.-G. Woo and S.-W. Jang. 2018. Production of phytoplasma-free plants in sugarcane (*Saccharum* spp.) using temporary immersion bioreactor. Acta Hort. (in press).

Distabanjong, K., C. Distabanjong, P. Wanichchananan, W. Polrakdee and S.-W. Jang. 2012. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Khon Kaen Agri. J. (Suppl.). 40 : 214-221.

Gill, R, P.K. Malhotra and S.S. Gosal. 2006. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 84 : 227-231.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497.

Snyman, S.J., G.M. Meyer, M. Banasiak, T.L. Nicholson,T. van Antwerpen, P. Naidoo and J.D. Erasmus. 2008. Micropropagation of sugarcane via NovaCane® : Preliminary steps in commercial application. Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass. 81 : 513-516.

Sood N., P. K. Srivastava and S. S. Gpsal. 2006. Micropppropagated and conventionally propagated sugarcane plants. Plant Tissue Cult. and Biotech. 16 (1) : 25-29.

ภาคผนวก (Appendix)

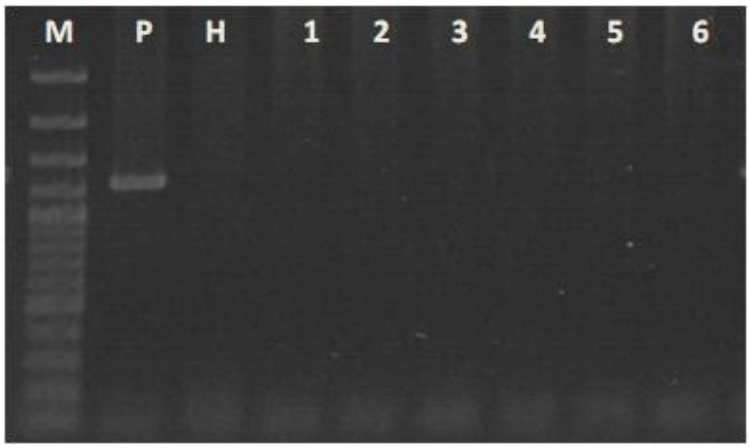
ภาพผนวกที่ 1. การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นอ้อยที่ปลูกในโรงเรือนระบบปิด เพื่อใช้เป็นชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเทคนิค nested-polymerase chain reaction (nested-PCR) ใช้ 2 primers คือ R16mF2/R16mR1 และ R16F2/R16R2

Lane 1-20 – **ไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา**

W – น้ำกลั่น N – ต้นอ้อยปกติไม่มีเชื้อไฟโตพลาสมา P – positive control (1,250 bp)

M – 100 bp DNA ladder plus, Fermentas

ผล : ไม่พบการติดเชื้อซ้ำ (reinfection)



ภาพผนวกที่ 2. การตรวจสอบซ้ำในต้นอ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบ TIB โดยเทคนิค nested-polymerase chain reaction (nested-PCR) ใช้ 2 primers คือ R16mF2/R16mR1 และ R16F2/R16R2

M – 100 bp DNA ladder plus, Fermentas P – positive control (1,250 bp)

H – พืชปกติไม่เป็นโรค (healthy plant)

ผล : ไม่พบการติดเชื้อ

การขยายพันธุ์มันฝรั่งโดยใช้ระบบ Temporary Immersion Bioreactor

Mass of Potato Propagated Materials using Temporary Immersion Bioreactor

ชยานิจ ดิษฐบรรจง	Chayanit Distabanjong
กษิดิศ ดิษฐบรรจง	Karsedis Distabanjong
ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์	Phummarin Wanichananan
ไพฑูรย์ บุปผาดา	Phaitun Bupphada
ศิริลักษณ์ อินทวงศ์	Siriluck Inthawong

คำสำคัญ (Key words)

มันฝรั่ง, Potato, Temporary Immersion Bioreactor (TIB), Chlorocholine chloride (CCC), Benzyladenine (BA), Naphthaleneacetic acid (NAA), Gibberellic acid (GA3)

บทคัดย่อ

ดำเนินการศึกษาการขยายพันธุ์มันฝรั่งปลอดโรค โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมันฝรั่งให้ได้ส่วนขยายพันธุ์ปลอดโรค พัฒนาหาสูตรอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิด micro shootโดยใช้ระบบ Temporary Immersion Bioreactor (TIB) เพื่อผลิตส่วนขยายพันธุ์มันฝรั่งที่ปลอดโรคในเชิงพาณิชย์ ดำเนินการระหว่างปี 2559-2560 ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเพื่อให้ปลอดโรค การใช้ apical meristem ขนาด 0.1 - 0.2 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ร่วมกับ BA 5 µM สามารถชักนำให้มีการพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ยอด ในพันธุ์แอตแลนติก 36 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์สปุนตา 24 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ PVY ด้วยวิธีเซรุ่มวิทยา พบการปลอดโรคสูงถึง ได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดรวมในระบบ TIB เทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว มันฝรั่งแอตแลนติกและสปุนตา สามารถเพิ่มปริมาณยอดรวมได้สูง 5.2 ยอด และ4.2 ยอด ต่อ 1ชิ้นส่วนพืช ตามลำดับและมีความสูงของยอดในเกณฑ์ปกติ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มี GA3 0.1 mg/l และ NAA 0.1 mg/L ส่วนในระบบ TIB สามารถให้ปริมาณยอดรวมสูงสุด 4.8 ยอดและ3.6 ยอด ตามลำดับในอาหารสูตรเดียวกัน โดยให้อาหาร 8 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 10 นาที เมื่อศึกษาผลของ BA และน้ำตาลซูโครสต่อการเกิด micro tubers ในอาหารเหลว พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 40 µM และน้ำตาลซูโครส ร่วมกับ 6 -8 เปอร์เซ็นต์ Chlorocholine chloride (CCC) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิด micro tubers ได้มากที่สุดในพันธุ์แอตแลนติก ส่วนพันธุ์สปุนต้า อาหารเหลว MS ที่เติม BA 20 µM และน้ำตาลซูโครส 8 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิด micro tubers ได้ดีที่สุด แต่ในระบบ TIB ยังไม่สามารถ

สรุปได้ เนื่องจากทั้งแผนงานวิจัยถูกระงับการดำเนินงาน และยังมีปัจจัยที่ต้องศึกษาอีก เช่น ระยะเวลาการให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช และ ความเข้มข้นของ CCC

Abstracts

Masspropagation of disease-free potato has been done using temporary immersion bioreactor (TIB) during 2016-2017. Excised apical meristem explants, 0.1-0.2 cm, have been cultured on MS basal media supplemented with 5 µM benzyladenine (BA) for induction of microshoot (36% in Atlantic and 24% in Spunta). Serology investigation of PVY virus displayed 90% elimination. Multiple shoot formation in liquid culture, MS basal media containing 0.1 mg/l gibberellic acid (GA3) and 0.1 mg/l naphthaleneacetic acid (NAA), resulted in 5.2 microshoots/explant in Atlantic and 4.2 microshoots/explant in Spunta with normal height. In the TIB system, the highest number of shoots was obtained from the similar media composition (4.8 microshoots/explant in Atlantic and 3.6 microshoots/explant in Spunta). The explants have received liquid media 8 times/day or every 3 hours with 10 minutes each time. For production of micro tuber of Atlantic in liquid media, the best media composition was MS basal media supplemented with 40 µM BA, 6-8% (w/v) sucrose and 500 mg/l chlorocholine chloride (CCC). In addition, the best media composition for micro tuber production in Spunta was MS media containing 20 µM BA, 8% (w/v) sucrose and 500 mg/l chlorocholine chloride (CCC). Unfortunately, research on TIB system has not been finished due to the official termination of research program. Various types of factors, including feeding frequency and CCC concentration etc, need further investigation.

บทนำ (Introduction)

มันฝรั่งจัดเป็นพืชที่เศรษฐกิจที่สำคัญในภาคเหนือ เป็นที่นิยมเพื่อการบริโภคและใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการแปรรูป ปัจจุบันความต้องการมันฝรั่งเพื่อป้อนโรงงานสูงถึงปีละหนึ่งแสนสองหมื่นตัน แต่การปลูกมันฝรั่งในประเทศไทยยังต้องนำเข้าหัวพันธุ์มาจากต่างประเทศ คิดเป็นมูลค่ากว่า 75 ล้านบาทต่อปี (http://www.komchadluek.net/2008/11/27/xagi b001_233276.php?news_id=233276) เนื่องจากไทยผลิตได้ไม่เพียงพอกับความต้องการทั้งหัวพันธุ์มันฝรั่งและหัวมันฝรั่งสดเพื่อการแปรรูป โดยเฉพาะหัวพันธุ์มันฝรั่งประเทศไทยสามารถผลิตได้ปีละ ประมาณ 5,500 ตัน ขณะที่เกษตรกร

ต้องการใช้หัวพันธุ์เพื่อเพาะปลูกสูงถึง 20,000 ตัน/ปี ถึงแม้ว่าจะมีการขยายพื้นที่ปลูก มีการวิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิต ตลอดจนการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งที่มีคุณภาพภายในประเทศ แต่ก็ยังไม่เพียงพอต่อปริมาณความต้องการ และยังมีปัญหาสำคัญในการผลิตหัวพันธุ์ที่มีคุณภาพคือการติดเชื้อและการเกิดโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส ซึ่งทำความเสียหายรุนแรงต่อผลผลิต และการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง ที่สำคัญคือเมื่อเป็นโรคแล้วยังไม่มีวิธีการใดที่สามารถควบคุมการระบาดของโรคได้ (วงศ์, 2550)

แนวทางหนึ่งที่สามารถใช้ในการป้องกันโรคและเพิ่มผลผลิตของมันฝรั่งก็คือ การใช้หัวพันธุ์ที่ปลอดจากเชื้อสาเหตุโรค การผลิตหัวพันธุ์ที่ปลอดโรคและนำไปให้เกษตรกรเพาะปลูก เป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตให้กับเกษตรกรได้ นอกจากนี้การใช้เทคนิค Temporary Immersion Bioreacter ขยายพันธุ์มันฝรั่ง

ในปริมาณมากจะช่วยประหยัดเวลาแรงงาน และพื้นที่ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์ มันฝรั่งในสภาพปลอดเชื้อเชิงพาณิชย์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมันฝรั่งให้ได้ส่วนขยายพันธุ์ปลอดโรค พัฒนาหาสูตรอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิด multiple shootsโดยใช้ระบบ Temporary Immersion Bioreacter เปรียบเทียบกับการชักนำให้เกิด multiple shoots ในอาหารเหลวรวมทั้งมีการปรับสภาพบางอย่างเช่นการชักนำให้เกิด micro tuber ก่อนลงปลูก เพื่อให้มีการพัฒนาความอยู่รอดในสภาพแปลงปลูกในเปอร์เซ็นต์ที่สูงเท่าที่สามารถทำได้

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเพื่อให้ปลอดโรค

นำส่วนของ ปลายยอด (apical meristem) ของมันฝรั่งพันธุ์แอตแลนติก และพันธุ์สปุนต้า ขนาดประมาณ 0.1 -0.2 เซนติเมตรชนิดละ 50 ยอด มาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหาร MS ที่เติม BA หรือ kinetin 5 µM เพื่อชักนำให้เกิด shoot แล้วนำต้นอ่อนที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส PVY โดยใช้ วิธีทางเซรุ่มวิทยา

2. ศึกษาการเพิ่มปริมาณ multiple shoots ในอาหารเหลว

นำต้นอ่อนที่ปราศจากเชื้อไวรัส ที่มีข้อ 3 -4 ข้อ มาเลี้ยงในอาหารแข็งพื้นฐาน MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 0.1 mg/l และ NAA 0.1 mg/l และ combination ของ GA และ NAA เปรียบเทียบกับไม่เติม วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ 4 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 อาหาร MS

กรรมวิธีที่ 2 อาหาร MS + GA_3 0.1 mg /l

กรรมวิธีที่ 3 อาหาร MS + NAA 0.1 mg

กรรมวิธีที่ 4 อาหาร MS + GA_3 0.1 mg / l + NAA 0. 1 mg/L

โดยทุกกรรมวิธีเติม gelrite 0.3 % sucrose 3 % pH 5.7 เลี้ยงในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

บันทึกผล 1. อัตราการเพิ่มปริมาณ multiple shoots

2. ความสูงของ multiple shoots

3. ศึกษาการเพิ่มปริมาณ multiple shoots ในระบบ TIB

3.1 จัดตั้งระบบ TIB

3.2 ศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดรวม (multiple shoots)ในระบบ TIB โดยใช้สูตรอาหารของการทดลองในอาหารเหลว นำไปทดลองเลี้ยงในระบบ TIB โดยใช้อาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ดังกล่าวข้างต้น ให้อาหารสัมผัสเนื้อเยื่อพืช วันละ 8 ครั้ง ๆ ละ3นาที เลี้ยงในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมง และไม่เปลี่ยนอาหารเลย วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 3 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลอง (treatment) มีชิ้นส่วนพืช 12 ชิ้น (6 ยอด)

วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ 4 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 อาหาร MS

กรรมวิธีที่ 2 อาหาร MS + GA_3 0.1 mg /l

กรรมวิธีที่ 3 อาหาร MS + NAA 0.1 mg/l

กรรมวิธีที่ 4 อาหาร MS + GA_3 0.1 mg / l + NAA0.1 mg/L

โดยทุกกรรมวิธีเติม sucrose 3 % pH 5.7 เลี้ยงในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

บันทึกผล 1. อัตราการเพิ่มปริมาณ multiple shoots

2. ขนาดและความสูงของ multiple shoots

4. ศึกษาการเกิด micro tubers

4.1 ศึกษาผลของ BA และ น้ำตาลซูโครสต่อการสะสมแป้งในรากในระบบอาหารเหลวและระบบ TIB

นำมันฝรั่ง ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณยอดอ่อนในอาหาร เหลว MS เติม + GA_3 0.1 mg + NAA 0.1 mg/L นาน 4-6 สัปดาห์ จำนวน 10 ยอดต่อกรรมวิธี (ขวด)มาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มี BAและน้ำตาล ในปริมาณที่เหมาะสมในการเกิด ราก ร่วมกับสารช่วยกระตุ้นให้เกิดการสะสมแป้งในราก ได้แก่ Chlorocholine chloride (CCC) 500 mg/l ซึ่งมีผลทำให้เกิดหัวขนาดเล็ก (micro tubers) ร่วมกับราก นำมาเลี้ยงในที่มืด และที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 8 กรรมวิธี 4 ซ้ำ กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่1. MS + sucrose 60 gm

กรรมวิธีที่2. MS + sucrose 80 gm

กรรมวิธีที่3. MS+ BA 20 µM + sucrose 60 gm

กรรมวิธีที่4. MS+ BA 20 µM + sucrose 80 gm

กรรมวิธีที่5. MS+ BA 40 µM + sucrose 60 gm

กรรมวิธีที่6. MS+ BA 40 µM + sucrose 80 gm

กรรมวิธีที่7. MS+ BA 60 µM + sucrose 60 gm

กรรมวิธีที่8. MS+ BA 60 µM + sucrose 80 gm

บันทึกข้อมูล - ปริมาณการเกิด micro tubers

ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย (ให้ระบุขั้นตอนอย่างละเอียด)

ระยะเวลา : ตุลาคม 2558 – กันยายน 2561

ผลการวิจัยและอภิปรายผล (Results and Discussion)

1. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเพื่อให้ปลอดโรคโดยวิธี meristem culture

หัวพันธุ์มันฝรั่งพันธุ์แอตแลนติกและสปุนต้า จาก ศวพ.เชียงใหม่ เมื่อนำมาเพาะให้งอกในสภาพโรงเรือน แล้วโดยนำยอดที่งอกออกมายาวประมาณ 3 -5 ซม. ฟอกฆ่าเชื้อภายนอกด้วยคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ตัดชิ้นส่วนปลายยอด (apical meristem) ขนาดประมาณ 1-2 มม. ซึ่งมีความจำเป็นต้องดำเนินการใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ปลายยอดมันฝรั่งสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารแข็ง ที่เติม BA ทั้ง 2 ระดับ คือที่ความเข้มข้น 1 และ 5 µM ในพันธุ์แอตแลนติก 18 ยอด คิดเป็น 38 % ของยอดที่นำมาเพาะเลี้ยง และ สปุนต้า 12 ยอด คิดเป็น 24% ของยอดที่นำมาเพาะเลี้ยง และเมื่อเลี้ยงต่อไปจนกระทั่งยอดมีการเติบโต สูงประมาณ 6-8 ซม. ตัดใบไปตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ PVY ด้วยวิธีเซรุ่มวิทยาแบบ indirect elisa จำนวนพันธุ์ละ 10 ตัวอย่าง (10ยอด) อ่านค่า OD. 405 นาโนเมตร ที่เวลา 30 และ 60 นาที พบการปนเปื้อนเชื้อ PVY ในมันฝรั่งสปุนตา เพียง 1 ตัวอย่างคือในตัวอย่างที่7 ซึ่งมีค่า OD. 405 นาโนเมตรเฉลี่ยสูงกว่าค่าเฉลี่ยของ positive PVY ในขณะที่พันธุ์แอตแลนติค มีค่า OD ต่ำกว่าค่าเฉลี่ย positive PVY ซึ่งแสดงว่าไม่มีโรคไวรัส (ตารางที่ 1)

การทดลองด้วยวิธี meristem culture ครั้งนี้ให้ผลดี ตามหลักการ เชื้อไวรัสไม่สามารถเคลื่อนย้ายไปสู่เนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตได้ เพราะเนื้อเยื่อดังกล่าวเป็นเพียงกลุ่มเซลล์ ยังไม่มีการพัฒนาเป็น vascular system และนอกจากนี้บริเวณ apical meristem จะมีออกซินสูงซึ่งจะช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสได้ (Morel และ Martin. 1952) อย่างไรก็ตาม apical meristem ยิ่งมีขนาดเล็กจะยิ่งได้ชิ้นส่วนที่ปลอดโรค แต่ยิ่งเล็กเท่าไรโอกาสที่จะเจริญเป็นยอดก็มีน้อยลงมาก จากการทดลองเพาะเลี้ยง apical meristem พันธุ์ละ 50 ชิ้น มีการเติบโตเป็นยอดระหว่าง 12 – 18 ยอดคิดเป็น 24-36 % เท่านั้น และในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของไวรัส ตรวจเฉพาะเชื้อ PVY เนื่องจากว่าเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงในมันฝั่งทางภาคเหนือของไทยซึ่งทำให้ใบมันฝรั่งเสียคลอโรฟิลล์ ทำให้ผลผลิตเสียหายมากถึง 80 % ในขณะที่เชื้อ PVX ทำความเสียหายให้ผลผลิตเพียง 20 %

ตารางที่1 ผลการตรวจไวรัส PVY ในมันฝรั่ง แสดงค่า OD. 405 นาโนเมตรที่เวลา 30 และ 60 นาที

sample	ค่า OD. 405 นาโนเมตร ที่เวลา 30 นาที				ค่า OD. 405 นาโนเมตร ที่เวลา 60 นาที			
	rep 1	rep 2	average	result	rep 1	rep 2	average	result
#สปุน 1	0.17	0.16	0.16	N	0.22	0.21	0.21	N
#สปุน 2	0.14	0.15	0.15	N	0.17	0.17	0.17	N
#สปุน 3	0.14	0.14	0.14	N	0.17	0.17	0.17	N
#สปุน 4	0.13	0.14	0.13	N	0.16	0.16	0.16	N
#สปุน 5	0.13	0.14	0.14	N	0.16	0.16	0.16	N
#สปุน 6	0.13	0.14	0.14	N	0.16	0.17	0.16	N
#สปุน 7	1.4	1.33	1.37	P	2.40	2.47	2.43	P
#สปุน 8	0.14	0.14	0.14	N	0.18	0.17	0.18	N
#สปุน 9	0.15	0.14	0.14	N	0.18	0.17	0.17	N
#สปุน 10	0.15	0.13	0.14	N	0.17	0.16	0.16	N
#แอต 1	0.14	0.13	0.13	N	0.16	0.15	0.15	N
#แอต 2	0.15	0.15	0.15	N	0.19	0.18	0.18	N
#แอต 3	0.14	0.14	0.14	N	0.16	0.16	0.16	N
#แอต 4	0.14	0.14	0.14	N	0.16	0.16	0.16	N
#แอต 5	0.14	0.14	0.14	N	0.17	0.16	0.16	N
#แอต 6	0.14	0.13	0.14	N	0.16	0.16	0.16	N
#แอต 7	0.14	0.14	0.14	N	0.18	0.17	0.17	N
#แอต 8	0.14	0.14	0.14	N	0.17	0.17	0.17	N
#แอต 9	0.14	0.14	0.14	N	0.17	0.17	0.18	N
#แอต10	0.13	0.14	0.14	N	0.18	0.18	0.18	N
Positive PVY	1.1	1.19	1.14		1.93	2.05	1.99	
H มันฝรั่ง	0.14	0.13	0.13		0.15	0.15	0.15	
bf	0.12	0.12	0.12		0.13	0.13	0.13	
cut off	0.26				0.30			

2. ศึกษาการเพิ่มปริมาณ multiple shoots และ micro tubers ในอาหารเหลว

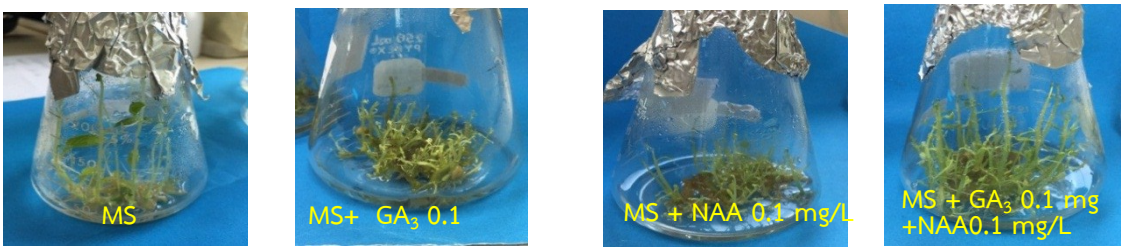
2.1 การเพิ่มปริมาณ multiple shoots

เมื่อนำยอดอ่อนที่ปราศจากเชื้อไวรัส ที่มีข้อ 3 ข้อของมันฝรั่งสปุนต้า และแอตแลนติค ทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวพื้นฐาน MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ GA_3 0.1 mg / l และ NAA 0.1 mg / l และ combination ของ GA_3 และ NAA เปรียบเทียบกับไม่เติม

ผลการทดลองพบว่าในมันฝรั่งแอตแลนติคเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญ เติบโต ให้จำนวนยอดรวมน้อยสุด แต่ยอดมีการเจริญยืดยาวขึ้น โดยจะที่มีสร้าง micro shoot 1.8 ยอดต่อ 1ชิ้นส่วน โดยยอดมีความสูงเฉลี่ย 3.8 ซม ส่วนการเติม GA_3 0.1 mg/L ให้จำนวนยอดรวมสูงสุด 5.8 ยอด ต่อ 1ชิ้นส่วนแต่ยอดไม่ยืดยาว มีความสูงเฉลี่ยเพียง 2.4 ซม. การเติม NAA 0.1 mg/l มีจำนวนยอด 4.2 ยอด ความสูงเฉลี่ย 2.8 ซม. ในขณะที่การเติม GA_3 0.1 mg / l และ NAA 0.1 mg / l ลงในอาหารให้ผลดีที่สุด มีการแตก Microshoot เพิ่มขึ้น 5.2 ยอด ต่อ 1 ชิ้นส่วน และความสูงของยอดอยู่ในเกณฑ์ปกติ ไม่แตกต่างกับการใช้อาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ภาพที่1 และ ตารางที่2)

มันฝรั่งพันธุ์สปุนตาก็ให้ผลในทำนองเดียวกันคือการเลี้ยงในอาหารทีมี GA_3 0.1 mg + NAA 0.1 mg/L ให้ผลดีที่สุด ได้ยอด 4.2 ยอด ความสูง 2.8 ซม.ถึงแม้จำนวนยอดที่ได้จะน้อยกว่าการเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี GA_3 เพียงอย่างเดียวเล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ความสูงเฉลี่ยมากกว่าและแตกต่างทางสถิติอย่างชัดเจน

ในการวิจัยครั้งนี้ ใช้อาหาร MS เนื่องจากเป็นอาหารพื้นฐานที่ใช้ได้ผลดีในการขยายพันธุ์มันฝรั่ง โดยทั่วไปจะใช้อาหารแข็ง แต่ในกรณีที่ต้องการเพิ่มปริมาณยอดเป็นจำนวนมากมักจะใช้อาหารเหลว นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณยอดและการเจริญเติบโตยังขึ้นกับอุณหภูมิที่เหมาะสม คือที่ 22-25 องศาเซลเซียส และได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน (Wang and Hu .1982) นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มปริมาณยอดของมันฝรั่ง โดยเฉพาะ combination ที่เหมาะสม NAA ที่ใช้เป็นสารควบคุมการเจริญประเภทออกซินซึ่งมีผลส่งเสริมกระตุ้นการแบ่งเซลล์หรือการแตกหน่อ ส่วน GA_3 ช่วยส่งเสริมให้ยอดยืดยาวขึ้น อย่างไรก็ตามยังมีความแปรปรวนขึ้นอยู่กับ genotype และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของมันฝรั่งด้วย (Abbott and Belcher,1986)



ภาพที่ 1. แสดงการเพิ่มปริมาณยอดรวมมันฝรั่งแอตแลนติค ในอาหารชนิดต่างๆ

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบสูตรอาหารเหลว ในการเพิ่มปริมาณยอดรวม

สูตรอาหาร	แอดแลนติค		สปุนตา	
	จำนวนยอดเฉลี่ย / ยอด	ความสูง ซม.	จำนวนยอดเฉลี่ย / ยอด	ความสูง ซม.
1. MS	1.8 c	3.8 a	1.2 c	2.9 a
2. MS+ GA_3 0.1 mg/L	5.8 a	2.4 b	4.4 a	1.8 c
3.MS + NAA 0.1 mg/L	4.2 b	2.8 b	3.2 b	2.2 bc
4.MS + GA_3 0.1 mg + NAA0.1 mg/L	5.2 ab	3.7 a	4.2 a	2.8 ab
cv	21	24	26	23

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

2.2 ศึกษาการชักนำให้เกิด micro tubers ในอาหารเหลว

ทำการศึกษาผลของ BA และน้ำตาลซูโคลส ต่อการเกิด micro tubers นำมันฝรั่ง ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณยอดอ่อนในอาหาร เหลว MS เติม + GA_3 0.1 mg + NAA 0.1 mg/L นาน 4-6 สัปดาห์ จำนวน 5 ยอดต่อกรรมวิธี (ขวด) มาทดสอบสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิด micro tuber โดยศึกษาความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาล ระหว่าง 60 – 80 กรัม ต่อลิตร และ ความเข้มข้น BA ระหว่าง 20 -60 µM ร่วมกับ Chlorocholine chloride (CCC) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงในที่มืด นาน 8 สัปดาห์ พบว่าในการเลี้ยงระยะ 3-4- สัปดาห์แรกในทุกสูตรอาหารมีการพัฒนาเพิ่มปริมาณยอดขึ้น เป็นผลของ BA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ต่อจากนั้นจึงเริ่มมีพัฒนาการเป็นหัวขนาดเล็ก (micro tuber) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 5 เป็นต้นไป และเมื่อวัดผลในสัปดาห์ที่8 พบว่า ในพันธุ์แอตแลนติก การเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 40 µM และน้ำตาล 8 เปอร์เซ็นต์ ได้ micro tubers เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 8.6 หัว น้ำหนักรวม 5.1 กรัม แต่ก็ไม่ต่างทางสถิติกับอาหารที่เติม BA 40 µM และน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารที่ไม่เติม BA จำนวน micro tubers ที่เกิดขึ้นจะน้อยที่สุด ในขณะที่พันธุ์สปุนตา มีการสร้าง micro tubers ในอาหาร MS ที่เติม BA 20 µM และน้ำตาล 8 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนหัวเฉลี่ยต่อขวดมากสุดเท่ากับ 7.1 หัว จะเห็นได้ว่าน้ำตาลในปริมาณความเข้มข้นสูง จะมีแรงดันออสโมซิสเพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลให้พืชเข้าสู่ระยะ maturity และเข้าสู่ระยะสร้าง micro tubers (Hassain et al,. 2006) นอกจากนี้ในการทดลองดังกล่าวข้างต้น ได้เติม Chlorocholine chloride 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสารประกอบ compound ที่นิยมใช้ในการเลี้ยงพืชในสภาพปลอดเชื้อจะมีส่วนช่วยให้มันฝรั่งมีการ

สร้าง micro tubers โดยจะช่วยควบคุมการเจริญของพืชทางด้าน vegetative ส่งเสริมให้มีการสะสมแป้งในราก (Neerja et al.,1998)

ตารางที่ 3 . ผลของ BA และน้ำตาลซูโครส ต่อการชักนำให้เกิด micro tubers ในอาหารเหลว

สูตรอาหาร	แอตแลนติก		สปุนตา	
	จำนวนหัว *	นน. รวม กรัม *	จำนวนหัว *	นน.รวม กรัม.*
1. MS + sucrose 60 gm	1.6 d	0.6 d	1.1 e	0.2 e
2. MS + sucrose 80 gm	3.2 c	1.2 c	2.8 d	1.8 d
3. MS+ BA 20 µM + sucrose 60 gm	6.8 b	3.6 b	6.8 ab	4.2 a
4. MS+ BA 20 µM + sucrose 80 gm	7.4 b	4.2 ab	7.1 a	3.9 a
5. MS+ BA 40 µM + sucrose 60 gm	8.2 a	4.3 ab	5.3 bc	3.8 ab
6. MS+ BA 40 µM + sucrose 80 gm	8.6 a	5.1 a	4.8 c	2.9 bc
7. MS+ BA 60 µM + sucrose 60 gm	6.3 b	4.1 b	2.9 d	2.3 cd
8. MS+ BA 60 µM + sucrose 80 gm	7.6 ab	4.7 a	3.1 d	1.9 d
CV	24	30	29	31

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

* ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ยจำนวนหัว และน้ำหนักต่อ 1 กรรมวิธี (ขวด)

ภาพที่ 2 ลักษณะและการชักนำให้เกิด micro tubers ของมันฝรั่งแอตแลนติก

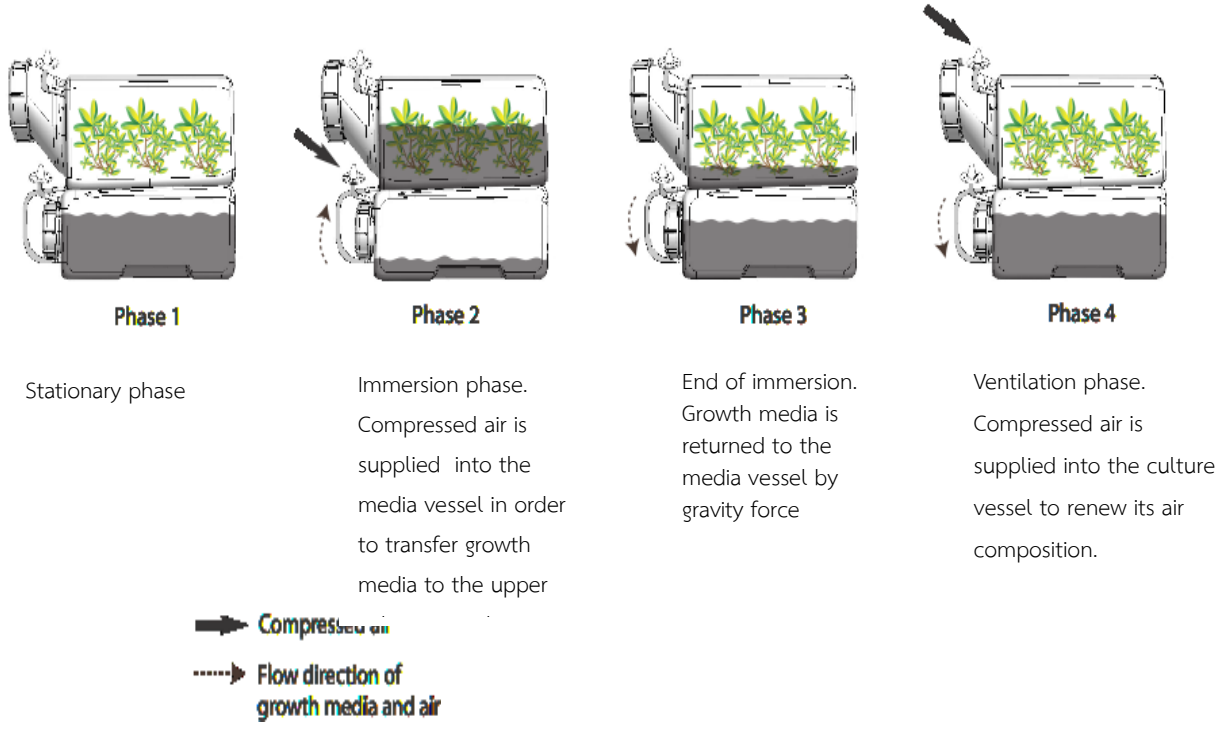
ภาพที่ 3 mini tuber ที่ได้นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อ break dormancy เป็นเวลา 3 เดือนแล้วนำไปปลูกในกระถางเพื่อทดสอบความงอก พบว่า มีอัตราการงอกเฉลี่ย 83 % ตามภาพ

4. การชักนำให้เกิด multiple shoots และ micro tubers ในระบบ TIB

4.1 จัดตั้งระบบการเลี้ยงแบบ Temporary immersion Bioreacter ใช้ระบบ SETIS™

ประกอบด้วยขวดแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 3000 ml. 12 คู่

Air pump	1 ชุด
Cellulose nitrate filter	24 ตัว
วาลว์ปรับระดับอากาศ	12 ตัว
Standing	1 ตัว
สายซิลิโคน	



ภาพที่ 4 ระบบTIB ที่ประกอบด้วยขวดแก้วขนาดความจุ 3 ลิตร

ระบบ Temporary Immersion Bioreactor (TIB) เป็นวีการหนึ่งที่ใช้เลี้ยงต้นอ่อนเพื่อเพิ่มปริมาณในสภาพปลอดเชื้อ เป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวทั้งหมด ระบบการเลี้ยงแบบนี้ประกอบด้วย ขวดใส่พืช (plant vessel) และขวดใส่อาหาร (medium vessel) ซึ่งขวดทั้งสองจะเชื่อมต่อกันทางสายยาง โดยขวดที่ใส่อาหารเหลวจะอยู่ในระดับต่ำกว่า เมื่อต้องการจะให้อาหารชิ้นส่วนพืชจะทำการอัดแรงดันลมผ่านไปทางขวดใส่อาหาร โดยใช้แรงดันอากาศ ตั้งแต่ 1 – 30 นาที ขึ้นกับชนิดพืช และปริมาณอาหาร แรงดันลมจะดันอาหารให้ไหลขึ้นไปยังขวดใส่ชิ้นส่วนพืช โดยในขั้นตอนนี้อากาศที่อยู่ในขวดใส่ชิ้นส่วนพืชจะถ่ายเทออกไปด้วย และเมื่อครบกำหนดเวลาที่ให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช ทำการปิดแรงลม อาหารที่อยู่ในขวดใส่ชิ้นส่วนพืช จะไหลกลับมายังขวดใส่อาหารตามแรงโน้มถ่วง ดังนั้นอาหารจะเคลือบอยู่บนผิวของชิ้นส่วนพืช ซึ่งพืชจะใช้ในการเจริญเติบโตต่อไป

เมื่อจัดตั้งระบบ TIB แล้ว ทำการทดสอบประสิทธิภาพของระบบ ในการเพิ่มยอดรวมมันฝรั่งทั้ง 2 ชนิด ดังนี้

4.1 ศึกษาการเพิ่มปริมาณ ยอดรวมของมันฝรั่งสปุนตา และแอตแลนติกในระบบ TIB

การศึกษาครั้งนี้ใช้อาหารสูตรที่ใช้ในการทดลองอาหารเหลวเพื่อทำการเปรียบเทียบ คือ MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ GA_3 0.1 mg / l และ NAA 0.1 mg / l และ combination ของ GA_3 และ NAA และให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช วันละ 8 ครั้ง ๆละ 10 นาที ปริมาณอาหารต่อขวดเท่ากับ 1.5 ลิตร

จากการศึกษาหลังการเลี้ยงในระบบ นาน 8 สัปดาห์ พบว่ามันฝรั่งแอตแลนติก สามารถเพิ่มจำนวนยอดรวมสูงสุด 5.2 ยอด ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น เมื่อใช้อาหาร MS+ GA0.1 mg/L รองลงมาได้แก่อาหาร MS+ GA_3 0.1 mg + NAA 0.1 mg/L ได้จำนวนยอดรวม 4.8 ยอดต่อชิ้นส่วน แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่อาหาร MS+ GA_3 0.1 mg/l + NAA 0.1 mg/Lนี้ยอดมันผรั่งเจริญเติบโตตามปกติ มีความสูง 3.2 ซม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารที่เติม GA อย่างเดียว ในมันฝรั่งสปุนตาก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน การเลี้ยงในอาหาร MS เติม GA_3 0.1 mg/L และ MS ที่มีส่วนผสมของ GA_3 0.1 mg และ NAA 0.1 mg/L จะให้จำนวนยอด 3.8 และ 3.6 ยอด โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่อาหารที่มีส่วนผสมของ GA_3 0.1 mg และ NAA 0.1 mg/ ยอดจะมีความสูง 2.9 ซม มากกว่าในอาหาร ที่เติม GA_3 เพียงอย่างเดียว (ตารางที่4)

ตารางที่ 4 ผลของ GA และ NAA ต่อจำนวนยอดรวมและความสูงของยอดในระบบ TIB

สูตรอาหาร	แอตแลนติก		สปุนตา	
	จำนวนยอดเฉลี่ย / ชิ้นส่วน	ความสูง ซม.	จำนวนยอดเฉลี่ย / ชิ้นส่วน	ความสูง ซม.
1. MS	1.5 c	3.6 a	1.4 c	2.8 a
2. MS+ GA_3 0.1 mg/L	5.2 a	2.2 b	3.8 a	1.8 b
3.MS+ NAA 0.1 mg/L	3.9 b	2.4 b	2.7 b	3.1 a
4.MS+ GA_3 0.1 mg + NAA 0.1 mg/L	4.8 a	3.2 a	3.6 a	2.9 a
cv	25	24	29	30

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเพิ่มปริมาณยอดรวมในอาหารเหลว และในระบบ TIB จะเห็นว่าปริมาณยอดรวมในระบบTIB น้อยกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว ทั้งนี้เนื่องจาก ในระบบ TIB ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายอาหาร และระยะเวลาที่ให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช นอกจากนี้การปั้มอาหารเหลวให้สัมผัสชิ้นส่วนพืชวันละ 8 ครั้งละ 10 นาที ชิ้นส่วนมันฝรั่งไม่ได้สัมผัสอาหารตลอดเวลาเหมือนกับการเลี้ยงในอาหารเหลว อาจจะยังไม่เพียงพอสำหรับความต้องการธาตุอาหาร จำเป็นจะต้องปรับสูตรอาหารในระบบ TIB ใหม่ ให้มีปริมาณความเข้มข้นของสารอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโต รวมทั้งระยะเวลาในการให้อาหารให้นานขึ้นกว่าเดิม ซึ่งจะต้องทดลองต่อไป แต่ไม่สามารถดำเนินการได้เนื่องจากการทดลองไม่ได้รับงบประมาณสนับสนุนจาก วช.

การเพิ่มปริมาณ ยอดรวมด้วยระบบ TIB เป็นการรวมข้อดีของการเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลวเข้าด้วยกัน โดยที่ในระบบอาหารแข็ง ชิ้นส่วนพืชจะสัมผัสกับอากาศแต่ไม่สัมผัสอาหารทั้งชิ้นส่วน ส่วนในอาหารเหลวพืชจะสัมผัสอาหารอยู่ตลอดเวลา ไม่สัมผัสอากาศ จึงทำให้เกิดการบวมหรือฉ่ำน้ำ (Smith and Spoomer,1995 ; Aitken et al. 1995) ส่วนการขยายพันธุ์ในระบบ TIB วิธีการนี้เป็นการให้อาหารพืชอย่างต่อเนื่อง มีการให้ชิ้นส่วนสัมผัสอาหารอย่างทั่วถึงเป็นเวลา

ข้อดีของการขยายเพิ่มปริมาณยอดรวมด้วยระบบ TIB สามารถลดแรงงานและเวลาในการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ต้นอ่อนที่ได้จะใช้เวลาในการเจริญเติบโตเร็วกว่าอาหารแข็ง (Etienne and Berthouly, 2002) นอกจากนี้ยังสามารถลดจำนวนขวดและพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง รวมทั้งลดการ Sub –culture อีกด้วย (Chu , 1995) แต่อย่างไรก็ตาม ยังคงมีข้อจำกัด วิธีนี้จะง่ายต่อการปนเปื้อนของเชื้อในระบบ เนื่องจากมีรอยรั่วบริเวณฝาปิด และการเชื่อมต่อสายยางซิลิโคน แรงดันลมสูงเกินไป

การดำเนินการจึงต้องใช้ความระมัดระวังเป็นพิเศษ และในพืชแต่ละชนิดจะต้องศึกษาสารอาหารและช่วงเวลาที่เหมาะสมในการให้อาหาร นอกจากนี้ การปรับระดับความดันอากาศที่จะเข้าสู่ขวดแต่ละขวด ต้องมีความเหมาะสม แรงดันที่สูงเกินไปอาจไปลดประสิทธิภาพ ของ Air filter จะทำให้ปนเปื้อนง่ายขึ้น

4.2 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งขนาดจิ๋วด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว

ทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาล ร่วมกับ CCC และ BA ต่อการชักนำให้เกิด micro tubesr ในการให้อาหารของระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว (SETIS) โดยใช้ชิ้นส่วนของ micro shoot ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว MS เติม NAA 0.1 µM GA_3 0.1 µM ใช้ชิ้นส่วนกรรมวิธีละ 50 ยอด

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design or CRD) โดยทำการศึกษาในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว (SETIS) โดยทำการทดลอง 3 กรรมวิธี ๆละ 4 ซ้ำ กรรมวิธีได้แก่ ความเข้มข้นของน้ำตาล 3 ระดับ คือ 60 70 และ 80 กรัม ต่อลิตร ในแต่ละกรรมวิธี ใช้อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA 40 µM ร่วมกับ CCC 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนครั้งในการให้อาหาร คือ 8 ครั้งต่อวัน แต่ละครั้งนาน 10 นาที ทำการเลี้ยงในที่มืด นาน 8 สัปดาห์

ผลการทดลอง เกิดการปนเปื้อนในระบบ TIB จำนวน 3 คู่ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ผลทางสถิติได้ แต่ในส่วนที่เหลือพบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยการใช้ ความเข้มข้นของน้ำตาล ทั้ง 3 ระดับ คือ 60 70 และ 80 กรัม ต่อลิตร ให้ผลในการเกิด micro tubers น้อยกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมน้ำตาลในทุกระดับ ตามภาพที่5 แต่จะมีการเจริญเป็นยอดมากกว่า อย่างไรก็ตามจำเป็นที่จะต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยศึกษาระยะเวลาในการให้อาหารสัมผัสกับชิ้นส่วนพืช ร่วมกับความเข้มข้นของน้ำตาล และความเข้มข้นของ CCC

ภาพที่ 5 เปรียบเทียบการเกิด micro tubers ในระบบอาหารเหลว (A) และระบบ TIB (B) และ (C)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

1. ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเพื่อให้ปลอดโรค การใช้ apical meristem ขนาด 0.1 - 0.2 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ร่วมกับ BA 5 µM สามารถชักนำให้มีการพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ยอด ในพันธุ์แอตแลนติก 36 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์สปุนตา 24 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ PVY ด้วยวิธีเซรุ่มวิทยา พบการปลอดโรคสูงถึง ได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์

2. การเพิ่มปริมาณยอดรวม (multiple shoots) ในอาหารเหลว และระบบTIB

มันฝรั่งแอตแลนติกและสปุนตา สามารถเพิ่มปริมาณยอดรวมได้สูง 5.2 ยอด และ4.2 ยอด ต่อ 1ชิ้นส่วนพืช ตามลำดับและมีความสูงของยอดในเกณฑ์ปกติ เฉลี่ยเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มี GA3 0.1 mg/l และ NAA 0.1 mg/L ส่วนในระบบ TIB สามารถให้ปริมาณยอดรวมสูงสุด 4.8 ยอด และ3.6 ยอด ตามลำดับ ในอาหารสูตรเดียวกัน

3. เมื่อศึกษาผลของ BA และน้ำตาลซูโครสต่อการเกิด micro tubers ในอาหารเหลว พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 40 µM และน้ำตาลซูโครส 6-8 เปอร์เซนต์ร่วมกับ Chlorocholine chloride (CCC) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิด micro tubers ได้มากสุด ในพันธุ์แอตแลนติก ส่วนพันธุ์สปุนต้าอาหารเหลว MS ที่เติม BA 20 µM และน้ำตาลซูโครส 8 เปอร์เซนต์ สามารถชักนำให้เกิด micro tubers ได้ดีที่สุดแต่ในระบบ TIB ยังไม่สามารถสรุปได้ มีปัจจัยที่ต้องศึกษาอีก เช่น ระยะเวลาการให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช และ ความเข้มข้นของ CCC

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้หัวพันธุ์มันฝรั่งปลอดโรค PVY ขนาดเล็ก (micro tubers) สำหรับนำไปขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณต่อได้

2. ได้เทคโนโลยีการชักนำให้เกิด micro tubers ในระบบอาหารเหลว

เอกสารอ้างอิง (References)

วงศ์ บุญสืบสกุล. 2550. การควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง ใน น.ส.พ. กสิกร. 80(4): 96-97.

Abbott, A.J. and R. Belcher.1986. Potato tuber formation *in vitro*. In: Plant Tissue Culture and Its Agriculture Application. Lobdon: Butt Worth. 113 -132.

Aitken-Christie J, Kozai T, Takayama S. 1995. Automation in plant tissue culture – General introduction and over view. In : Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp1-18.

Chu I.1995. Economic analysis of automated micropropagation . In: Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp19-27

Etienne H and Berthouly M. 2002. Temporary immersion system in plant micro propagation . Plant Cell, Tissue Org . Culture. 69:215 -231 .

Hussain I., Chaudhry Z.,Muhamma A., Asghar R., Naqvi S.M.S. and Rashid H. Effect of chlorocholine chloride , sucrose and BAP on In vitro tuberlization in Potato Micro Tubers Induction. Pak.J.Bot.,38(2) 275-282

Morel,G. and C. Martin. 1952. Guerison de dahlias atteints d'une maladie a virus. Comptes

Rendus de l' Académie des . Sciences, 235: 1324-1325

Neerja,S.,N.Kaur and Anil K. Gupta.1998. Effect of chlorocholine chloride sprays on the carbohydrate composition and activities of sucrose metabolizing enzyme in potato. Plant growth Regulation . Volumn 26,Issue 2, pp 97-103

Smith MA. and Spoomer LA.1995 . Vessels, gels, liquid media and support systems. In: Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp371-405

Wang,P.J. and C.Y. Hu.1982 . In vitro mass tuberization and virus free seed potato production in Taiwan. AMPotato J. 59:33-39

Zuraida AR,Nurul Shahnadz AH, Harteeni A, Che Radziah CMZ and Sreeramanan S. 2011.

A novel approach for rapid micropropagation of Maspine pineapple (Ananas comosus L.)

Affican Journal of Biotechnology Vol.10(19), pp. 3859-3866.

การศึกษาเทคนิคและปัจจัยเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

Study of technique and factors in effecting to *In Vitro* of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)

ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ Phummarin Wanichananan
เตือนจิตร เพ็ชรรุณ Tuenjit Petchrrun
นัยเนตร ทานากะ เจริญสันติ Naiyanate Jaroensanti TANAKA

คำสำคัญ (Key words)

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.), LED, Grow lux, dicamba, picloram

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของปัจจัยภายนอกต่อการชักนำและพัฒนาแคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 โดยใช้สภาพแสง 4 ชนิด คือ LED สีขาว, LED สีแดง, LED สีน้ำเงิน และ Grow lux พบว่า ปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสโดยมีค่าน้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด คือ 0.053 กรัมเมื่อเลี้ยงนาน 4 เดือน และ น้ำหนักสดแคลลัสเฉลี่ย 0.224 กรัมเมื่อเลี้ยงนาน 6 เดือน ในสภาพแสง LED สีขาว การพัฒนา embryogenesis callus พบว่า ปัจจัยชนิดของแสงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อการพัฒนาและน้ำหนักของแคลลัส โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดแคลลัสสูงที่สุดในการเลี้ยงในแสงชนิด Grow lux เท่ากับ 2.65 กรัม และรองลงมาคือ แสง LED สีขาว เท่ากับ 2.32 กรัม ส่วนแสง LED สีน้ำเงินจะให้ค่าเฉลี่ยของแคลลัสน้อยที่สุด เท่ากับ 1.92 กรัม ปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 2 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสโดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 0.064 กรัมเมื่ออายุแคลลัส 4 เดือนเลี้ยงในสภาพแสง LED สีน้ำเงิน และเมื่อเลี้ยงนาน 6 เดือนจะให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดแคลลัสสูงสุดในสภาพแสง Grow lux เท่ากับ 0.214 กรัม โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ สำหรับการทดสอบการพัฒนาของแคลลัส พบว่า ปัจจัยของชนิดแสงให้ผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อการพัฒนาของค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของแคลลัสเมื่อเลี้ยงในสภาพแสง LED สีแดงจะทำให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดแคลลัสสูงที่สุด เท่ากับ 1.75 กรัม รองลงมาคือในสภาพแสง Grow lux เท่ากับ 1.64 กรัม และให้ค่าเฉลี่ยน้อยที่สุดเมื่อเลี้ยงในสภาพแสง LED สีขาว เท่ากับ 1.13 กรัม สำหรับปัจจัยด้านสูตรอาหาร และปัจจัยร่วมกันของชนิดแสงและสูตรอาหารไม่มีความแตกต่างทางสถิติในปาล์มน้ำมันทั้ง 2 พันธุ์ การชักนำแคลลัสจากใบอ่อนในสภาพที่มืดจะทำให้เกิดแคลลัสได้จากสูตรอาหาร MS ร่วมกับ dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ระยะเวลา 2.5 เดือน และสูตรอาหาร MS ร่วมกับ picloram ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ระยะเวลา 6 เดือน ทำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะกลมมีสีน้ำตาลอ่อนเกิดขึ้นที่บริเวณขอบใบ

Abstracts

Effect of factor in inducing and development callus in oil palm cv. Suratthani 1 and Suratthani 2 using 4 type of Light containing LED white color, red color, blue color and Grow lux. Suratthani 1 cultured in LED white color showed high fresh weight callus of 0.053 grams for 4 months and 0.224 grams for 6 months. Factor of light were high significant difference for development embryogenesis callus. Grow lux light gave highest fresh weight callus of 2.65 grams. Suratthani 2 showed no significant difference when be cultured in LED blue color. It gave high fresh weight callus of 0.064 grams for 4 months after callus gave high fresh weight 0.214 grams for 6 months in Grow lux. Embryogenesis callus can developed in LED red color. They gave high fresh weight callus of 1.75 grams. Factor of media and combination factor between light and media showed no significant difference in oil palm. Study of inducing callus from young leaves showd that oil palm was induced to be callus from MS media containing 1 mg/l dicamba for 2.5 months and MS media containing 3 mg/l picloram for 6 months. Callus had globular shape and light brown color.

บทนำ (Introduction)

สำหรับปาล์มน้ำมัน พืชน้ำมันอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งในระดับโลกและของประเทศไทย สามารถผลิตได้เฉพาะในเขตพื้นที่จำกัดประเภทร้อนชื้นเท่านั้น จัดเป็นพืชผสมข้าม เมื่อปรับปรุงจนได้พันธุ์ดีแล้วการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้จะสามารถขยายพันธุ์ได้ในปริมาณมากและมีลักษณะเหมือนต้นเดิม การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมันได้มีการศึกษาวิจัยมาระยะหนึ่งแล้ว แต่การใช้ส่วนยอดมีโอกาสทำให้ต้นปาล์มตาย และยังมีความจำเพาะต่อพันธุ์ค่อนข้างมาก (พีรเดช, 2556) การนำชิ้นส่วนเช่น ใบ ยอดจากต้นที่ให้ผลผลิตสูง หรือคัพภะอ่อนจากคู่ผสมที่มีประวัติการให้ผลผลิตสูงในรุ่นลูกมาใช้เป็นชิ้นส่วนในการขยายพันธุ์ก็จะสามารเพิ่มปริมาณพันธุ์ดีให้มากได้ แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของปัจจัยต่างๆที่มีความเหมาะสมในแต่ละพันธุ์ เช่น ชนิดและความเข้มของแสง ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และสารที่มีผลต่อการเกิดแคลลัส จึงได้นำปัจจัยต่างๆเหล่านี้ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์ให้มากขึ้นมาศึกษากับปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานี 1 และ 2 ซึ่งเป็นพันธุ์แนะนำของกรมวิชาการเกษตร

ปัจจัยทางกายภาพที่มีอิทธิพลต่อชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (คำนูณ, 2542)

<u>แสง</u> ช่วงความยาวแสง (day length) ชนิดแสง (light quality) และความเข้มแสง (light intensity) ล้วนมีความสำคัญต่อพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลอง และเป็นปัจจัยที่ซับซ้อน ผลของช่วงความยาวแสงต่อการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองยังไม่ทราบกันดีนัก ช่วงความยาวแสงที่เลือกใช้โดยทั่วไปคือ 14-16 ชั่วโมง แต่บางครั้งอาจมีการให้แสงตลอดเวลาหรือให้มืดตลอดเวลา

ความเข้มแสงที่ใช้โดยทั่วไปที่พอเหมาะและนิยม คือ 100-400 แรงเทียน หรือ 1,000 – 4,000 ลักซ์ (lux) หลอดไฟที่ใช้กันทั่วไปคือ หลอดฟลูออเรสเซนซ์ที่เป็นแบบคูลไวต์ (cool white type) ในบางครั้งพบว่า หลอดไฟแบบพิเศษ เช่น หลอดไฟที่มีชื่อทางการค้าว่า ซุปเปอร์โกร (super-grow) หรือโกรลักซ์ ให้ผลการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชดีกว่า เนื่องจากมีสัดส่วนของแสงสีแดงและน้ำเงินสูง และพืชสามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์แสงได้โดยตรง

ชนิดของแสงสีต่างๆ มีความสำคัญต่อการเจริญของพืชที่เลี้ยง เช่น การเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นยาสูบในอาหารที่มี IAA พบว่า ถ้านำไปเก็บเลี้ยงภายใต้แสงสีแดง และเขียว จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อได้ดีกว่าแสงสีน้ำเงิน เนื่องจาก IAA จะถูกทำลายโดยแสงสีน้ำเงิน ทำให้การเจริญเติบโตถูกจำกัด สำหรับการเกิดยอดหรือรากจากแคลลัสยาสูบ พบว่าแสงสีน้ำเงินและม่วงส่งเสริมการเกิดยอดในขณะที่แสงสีแดงส่งเสริมการเกิดราก เป็นต้น

การปรับตัวของพืชที่ตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมภายนอก (Plant responses to the external environment) (ชุมพล, 2549)

พืชที่เจริญเติบโตในถิ่นอาศัย (habitat) แบบใดได้ ย่อมจะต้องมีลักษณะที่มีความเหมาะสมในการมีชีวิตอยู่ในปัจจัยแวดล้อมแบบนั้น หรือสามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่เป็นอยู่นั้นได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามสภาพแวดล้อมหรือปัจจัยทางกายภาพต่างๆ ก็ไม่ได้มีความคงตัวหรืออยู่ในระดับที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชที่อยู่ในถิ่นอาศัยตลอดไป ในบางช่วงเวลาหรือบางฤดูกาลพืชจะต้องเผชิญกับภาวะของสิ่งแวดล้อมหรือปัจจัยทางภายภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เรียกภาวะนี้ว่า ภาวะเครียด (stress) ซึ่งอาจเกิดจากความเข้มแสง อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำและความชื้นที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น ซึ่งพืชแต่ละชนิดจะมีระดับการตอบสนองหรือความไวต่อภาวะเครียดที่ได้รับแตกต่างกัน รวมทั้งการปรับตัวในรูปแบบและวิธีการที่แตกต่างกันไปด้วย

เมื่อพืชได้รับภาวะความเครียด ระบบเมตาโบลิซึมต่างๆ ของฮอร์โมนภายในพืชมักจะเป็นสิ่งแรกที่มีการเปลี่ยนแปลงในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมที่เกิดขึ้น ซึ่งหากภาวะเครียดดำเนินไปในช่วงระยะเวลาสั้นๆ การเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ที่ตามมาอาจเกิดขึ้นเพียงในระดับของกระบวนการทางชีวเคมี หรือกระบวนการเมตาโบลิซึม แต่หากภาวะเครียด

เกิดติดต่อกันเป็นระยะเวลานานๆ อาจพบการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับลักษณะทางสัณฐาน (morphological character) หรือลักษณะทางภายวิภาค (anatomical character) ของพืชเพื่อลดภาวะความเครียด และทำให้พืชนั้นสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้

การสร้างสภาวะเครียดของพืชในห้องปฏิบัติการทำได้โดยใช้สารละลาย PEG (polyethylene glycol) เป็นตัวควบคุมให้พืชอยู่ในสภาวะเครียดในระดับต่างๆ ตามที่ต้องการ PEG มีชื่อทางการค้าว่า Carbowaxes มีสูตรโครงสร้าง $HOCH_2(OCH2CH)_nOH$ มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันตั้งแต่ 300-20,000 (Jackson, 1962) เป็นสารที่มีพิษต่อคนและสัตว์น้อยมาก (Smyth et al., 1955) PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 6000 นั้น ไม่สามารถซึมผ่านเมมเบรนได้ สารละลาย PEG 6000 ที่มีความเข้มข้นสูงมีผลทำให้ osmotic potential ลดลงทำให้พืชได้รับสภาวะเครียด

สมปอง และคณะ (2530) ทำการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนราจากต้นกล้าอายุ 195 วัน หลังการเพาะเลี้ยงโดยตัดใบอ่อนสีขาวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรดด่าง 5.7 พบว่า สามารถชักนำแคลลัสที่เจริญเติบโตช้า (slow growing callus) บริเวณรอยตัดขอบใบ 40 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

อาสลัน (2545) ศึกษาการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนราที่ให้ผลผลิตดีจากแหล่งปลูกที่สำคัญของของภาคใต้เพื่อการขยายพันธุ์ โดยศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากใบอ่อน คือ ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต อุณหภูมิที่เพาะเลี้ยง ตำแหน่งของทางใบและสูตรอาหารที่เหมาะสม และชนิดของสารแอนติออกซิแดนท์ พบว่า ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสของปาล์มน้ำมัน คือ dicamba เข้มข้น 1-5 มิลลิกรัม/ลิตร (ชักนำแคลลัสได้เฉลี่ย 9.11 เปอร์เซ็นต์) การเพาะเลี้ยงใบอ่อนบนอาหารเติม NAA ส่งเสริมให้ชิ้นส่วนเกิดราก อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสคือ 28±0.5 องศาเซสเซียส ทางใบที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสคือทางใบที่ 6-8 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสคือ สูตร MS การเติมกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ dicamba เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ชิ้นส่วนสร้างแคลลัสสูงสุด 11.2 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS เติม dicamba เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเคซีนไฮโดรไลเสทเข้มข้น 1,000 มิลลิลิตรต่อลิตร

อมรรัตน์ (2549) ศึกษาผลของไดโอดเปล่งแสงและสูตรอาหารต่อการพัฒนาของกล้วยไม้ฟาแลนนอพซิสในสภาพปลอดเชื้อ การทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ฟาแลนนอพซิสลูกผสม โดยการปักชำก้านช่อดอก พบว่า ภายใต้สภาพแสง LEDs สีแดง 90% กับสีน้ำเงิน 10% ก้านช่อดอก

พัฒนาไปเป็นยอดได้ดีที่สุด ร้อยละ 63.6 เมื่อนำปลายยอดที่ได้มาชักนำให้เกิด PLBs ปรากฏว่า ภายใต้แสง LEDs สีแดง และสีน้ำเงิน เกิด PLBs ได้ดีที่สุดร้อยละ 42.8 โดยภายใต้แสงฟลูออเรสเซนส์นั้นเกิด PLBs เพียงร้อยละ 12.5

ชยานิจ และคณะ (2552) ได้รายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนคัพภะอ่อน ช่อดอกอ่อน และใบอ่อนของปาล์มน้ำมันลูกผสม tenera พันธุ์สุราษฎร์ธานี 3 บนอาหารสูตร MS และ Y3 ที่เติม dicamba ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้ชิ้นส่วนสร้างแคลลัส พบว่า คัพภะอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม dicamba 10 µM มีอัตราการเกิดแคลลัสสูงสุด 83.30% ช่อดอกอ่อนมีอัตราการเกิดแคลลัสสูงสุด 15.8% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y3 เติม dicamba 15 µM ส่วนใบอ่อนมีอัตราการเกิดแคลลัสสูงสุด 24.63% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม dicamba 15 µM เมื่อนำแคลลัสที่ได้มาเพิ่มปริมาณ แคลลัสที่เกิดจากคัพภะอ่อน ช่อดอกอ่อนและใบอ่อน เพิ่มปริมาณได้สูงสุด 7.02 เท่า 3.87 เท่า และ 9.13 เท่า บนอาหารสูตร MS ที่เติม dicamba 1 µM, 3 µM และ 1 µM ตามลำดับ ในการศึกษากระบวนการ embryogenesis พบว่า แคลลัสจากคัพภะอ่อน ช่อดอกตัวเมีย และใบอ่อนมีอัตราการพัฒนาเป็น embryogenic callus สูงสุด 50.01% 20.04% และ 46.67% ตามลำดับ บนอาหารสูตร Y3+NAA 10 µM+abscisic acid 2 µM และมีอัตราการพัฒนาเป็น somatic embryo เท่ากับ 40.08% 13.36% และ 33.34% ตามลำดับ บนอาหารสูตรเดิม somatic embryo ที่เกิดขึ้น สามารถเจริญเป็น polyembryony 2-3 ต้น มียอดและรากที่สมบูรณ์หรือเจริญเป็นยอดขนาดเล็ก 4-5 ยอด ติดกันเป็นกลุ่มไม่มีราก

Ravindra และ Nataraja (2007) ศึกษาการใช้ 24-epibrassinolide ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ซิมบิเดียม (*Cymbidium elegans*) ด้วยชิ้นส่วนตายอด พบว่า สามารถชักนำให้เกิด Plbs 91 เปอร์เซ็นต์โดยการใช้ 24-epibrassinolide ความเข้มข้น 4 µM ภายในระยะเวลา 12 สัปดาห์

Paulo และคณะ (2013) ศึกษาการขยายพันธุ์อ้อยโดยใช้แสงจากหลอด LEDs และปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยสายพันธุ์ RB 872552 จากชิ้นส่วนตา ภายใต้สภาพควบคุมจากการให้แสงจากแหล่งต่างๆ คือ LEDs สีน้ำเงิน, LEDs สีแดง, LEDs สีเขียว, หลอด Growlux และหลอดฟลูออเรสเซนส์ ร่วมกับปริมาณน้ำตาลซูโครส 0, 15, 30 และ 45 กรัมต่อลิตร ระยะเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 °C พบว่า การใช้หลอด LEDs ทั้งสามสี ให้ผลดีต่อการเพิ่มปริมาณและการเกิดรากของอ้อยร่วมกับการเติมน้ำตาลซูโครสซึ่งมีความจำเป็นในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำและการพัฒนาของแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์ สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 ที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเพื่อศึกษาปัจจัยของแสงและการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะเครียดในการชักนำให้เกิดยอดของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์

1. เมล็ดปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอรา (tenera type) พันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2
2. สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS)(1962), Phytagel, น้ำตาลsucrose
3. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น คีมคีบ (forcept), มีดผ่าตัด, จานเพาะเลี้ยง (Petri dish)
4. สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) , 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) , 4-amino-3,5,6-trichloror-2-pyridineccarboxylic acid (picloram), 1-Naphthaleneacetic acid (NAA)

วิธีการ

เลือกทะลายปาล์มน้ำมันของพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 จากศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ซึ่งอยู่ในระยะที่เนื้อด้านในยังมีลักษณะเป็นวุ้นกึ่งแข็งกึ่งเหลวมาใช้สำหรับการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อก่อนนำไปชักนำให้เกิดแคลลัส ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ (ภุมรินทร์และคณะ, 2554)

1) นำเมล็ดปาล์มน้ำมันล้างด้วยสารซักล้าง (Detergent) Teepol® จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง
2) นำเมล็ดปาล์มน้ำมันมาแช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
3) นำเมล็ดปาล์มน้ำมันมาจุ่มด้วย แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปลนไฟฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงผ่าเมล็ดเพื่อนำเอมบริโอไปเลี้ยงบนอาหารชักนำแคลลัส

1. การศึกษาผลของปัจจัยภายนอกต่อการชักนำและพัฒนาแคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2

1) นำ embryo ของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 มาชักนำให้เกิดแคลลัส

2) ศึกษาชนิดของแสงต่อการชักนำการเกิดและการพัฒนาของแคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 โดยนำแคลลัสที่ชักนำมาจากขั้นตอนที่ 1 มาทดสอบชนิดของแสง ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 LEDs สีแดง

กรรมวิธีที่ 2 LEDs สีน้ำเงิน

กรรมวิธีที่ 3 Grow lux

กรรมวิธีที่ 4 LED สีขาว = control

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 4 กรรมวิธี จำนวน 10 ซ้ำ

3) ศึกษาความเข้มข้นของสาร Polyethylene glycol (PEG) และน้ำตาล Sorbitol เพื่อการกระตุ้นให้แคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 มีการพัฒนาเกิดยอด และการเลี้ยงในสภาพแสง 4 ชนิด คือ LED สีขาว, LED สีแดง, LED สีน้ำเงิน และ Grow lux ร่วมกับสูตรอาหารจำนวน 6 สูตร ประกอบด้วย

สูตรอาหารที่ 1 สูตรอาหาร MS (control)

สูตรอาหารที่ 2 สูตรอาหาร MS + Sorbitol 0.1 M

สูตรอาหารที่ 3 สูตรอาหาร MS + Sorbitol 0.2 M

สูตรอาหารที่ 4 สูตรอาหาร MS + Sorbitol 0.3 M

สูตรอาหาร5 สูตรอาหาร MS + PEG 5 %

สูตรอาหาร6 สูตรอาหาร MS + PEG 10%

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD 4 X 6 กรรมวิธี จำนวน 10 ซ้ำ

2. <u>การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบและยอดของปาล์มน้ำมัน</u>

1) นำชิ้นส่วนใบอ่อน และ ยอด ของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 มาศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ชนิด (dicamba, picloram และ brassinolide) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 สูตรอาหาร MS = control

กรรมวิธีที่ 2 สูตรอาหาร MS + dicamba 1 mg/l

กรรมวิธีที่ 3 สูตรอาหาร MS + dicamba 2 mg/l

กรรมวิธีที่ 4 สูตรอาหาร MS + dicamba 3 mg/l

กรรมวิธีที่ 5 สูตรอาหาร MS + picloram 1 mg/l

กรรมวิธีที่ 6 สูตรอาหาร MS + picloram 2 mg/l

กรรมวิธีที่ 7 สูตรอาหาร MS + picloram 3 mg/l

กรรมวิธีที่ 8 สูตรอาหาร MS + brassinolide 1 mg/l

กรรมวิธีที่ 9 สูตรอาหาร MS + brassinolide 2 mg/l

กรรมวิธีที่ 10 สูตรอาหาร MS + brassinolide 3 mg/l

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 10 กรรมวิธี จำนวน 10 ซ้ำ

การบันทึกข้อมูล บันทึกผลของน้ำหนักแคลลัส และต้น
ร้อยละของการเกิดแคลลัส และการเกิดยอด
จำนวนยอด จำนวนราก

<u>เวลาและสถานที่</u>

<u>ระยะเวลาทำการทดลอง</u> เดือนตุลาคม 2558 – เดือนกันยายน 2564

<u>สถานที่ทำการทดลอง</u> สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
อาคารทรัพยากรพันธุกรมพืชสิรินธร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

ผลการวิจัยและอภิปรายผล (Results and Discussion)

1. <u>การศึกษาผลของปัจจัยภายนอกต่อการชักนำและพัฒนาแคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และพันธุ์สุราษฎร์ธานี 2</u>

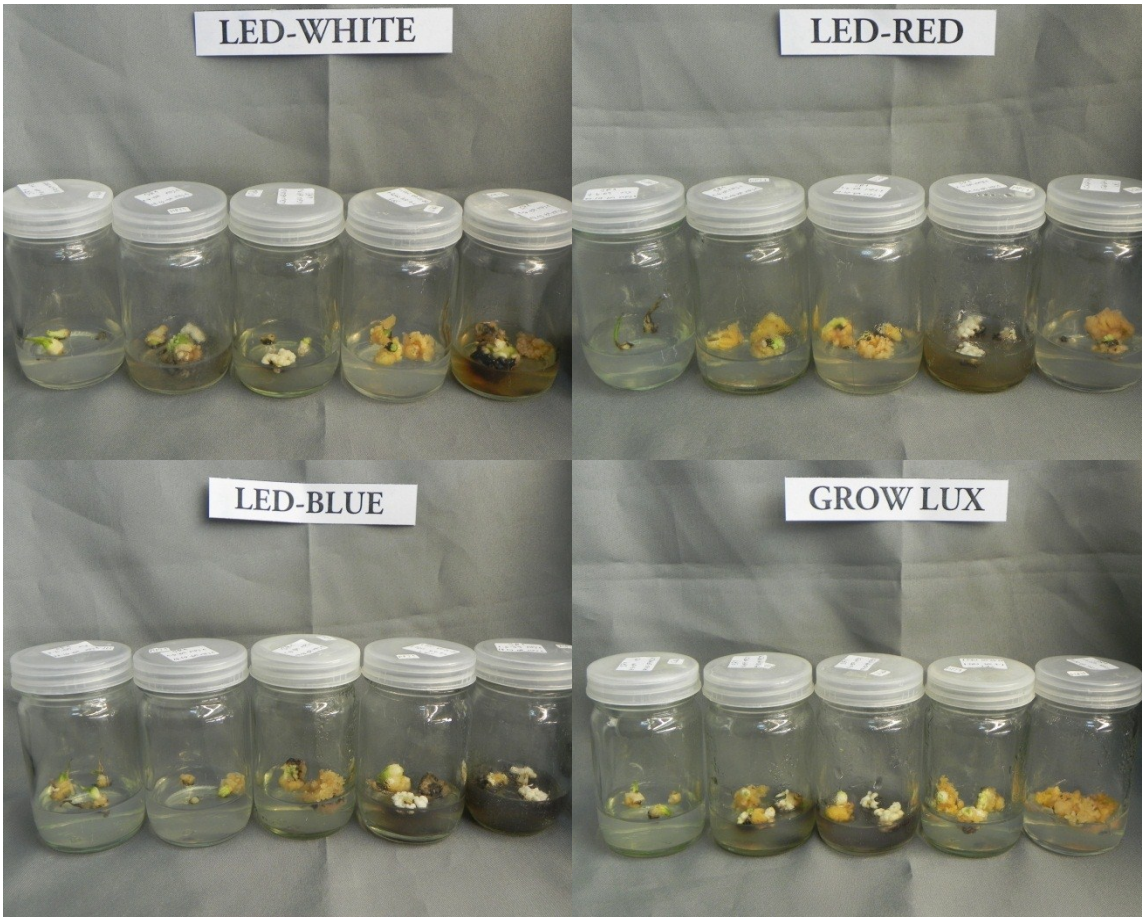
การชักนำให้เกิดแคลลัสของปาล์มน้ำมันจำนวน 2 พันธุ์ ประกอบด้วย ปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1, และปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 2 โดยพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 นำเอมบริโอมาชักนำให้เกิดแคลลัสบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต picloram ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และพันธุ์สุราษฎร์ธานี 2 ใช้สูตรอาหาร MS ร่วมกับ picloram ความเข้มเข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาเลี้ยงทดสอบในสภาพแสง 4 ชนิด ประกอบด้วย LED สีขาว (control), LED สีแดง, LED สีน้ำเงิน และ หลอด Grow lux เพื่อชักนำการเกิดแคลัส พบว่า ปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสโดยมีค่าน้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด คือ 0.053 กรัมเมื่อเลี้ยงนาน 4 เดือน และ น้ำหนักสดแคลลัสเฉลี่ย 0.224 กรัมเมื่อเลี้ยงนาน 6 เดือน ในสภาพแสง LED สีขาวซึ่งใช้เป็นแสงเปรียบเทียบ (control) (ตารางที่ 1, ภาพที่ 1) และพันธุ์สุราษฎร์ธานี 2 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสโดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 0.064 กรัมเมื่ออายุแคลลัส 4 เดือนเลี้ยงในสภาพแสง LED สีน้ำเงิน และเมื่อเลี้ยงนาน 6 เดือนจะให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดแคลลัสสูงสุดในสภาพแสง Grow lux เท่ากับ 0.214 กรัม โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 1, ภาพที่ 2) จากรายงานที่ว่าปัจจัยทางกายภาพที่มีอิทธิพลต่อชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ กล่าวว่า หลอดไฟที่มีชื่อทางการค้าว่า ซุปเปอร์โกร (super-grow) หรือโกรลักซ์ ให้ผลการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชดีกว่าเนื่องจากมีสัดส่วนของแสงสีแดงและน้ำเงินสูง และพืชสามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์แสงได้โดยตรง (คำนูณ, 2542) สอดคล้องกับ Paulo และคณะ (2013) ศึกษาการขยายพันธุ์อ้อยโดยใช้แสงจากหลอด LEDs และปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยสายพันธุ์ RB 872552 จากชิ้นส่วนตา ภายใต้สภาพควบคุมจากการให้แสงจากแหล่งต่างๆ คือ

LEDs สีน้ำเงิน, LEDs สีแดง, LEDs สีเขียว, หลอด Growlux และหลอดฟลูออเรสเซนส์ ร่วมกับปริมาณน้ำตาลซูโครส 0, 15, 30 และ 45 กรัมต่อลิตร ระยะเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 °C พบว่า การใช้หลอด LEDs ทั้งสามสี ให้ผลดีต่อการเพิ่มปริมาณและการเกิดรากของอ้อยร่วมกับการเติมน้ำตาลซูโครสซึ่งมีความจำเป็นในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย

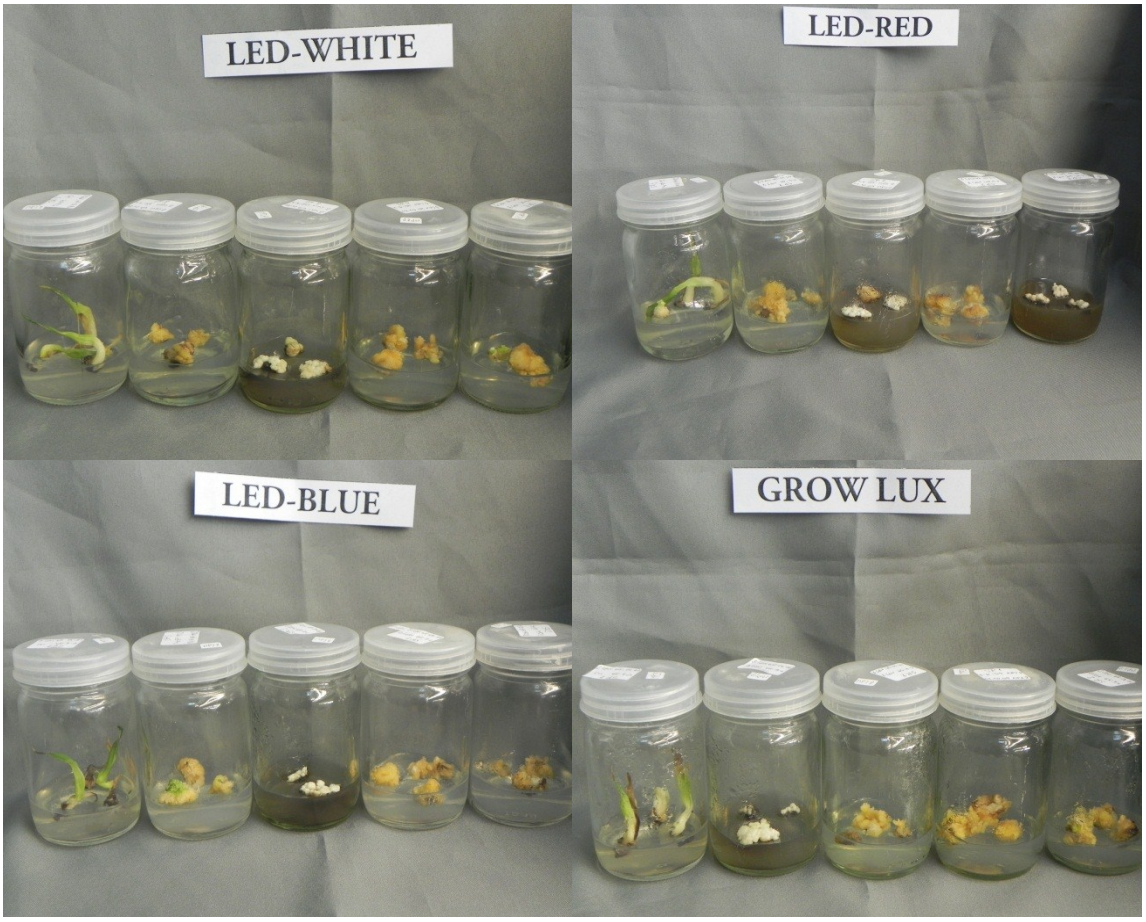
ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดแคลลัสของปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1 และ 2 ในสภาพแสง 4 ชนิด

ชนิดแสง	น้ำหนักสดแคลลัส (กรัม)			
	พันธุ์ สฎ 1		พันธุ์ สฎ 2	
	เดือนที่ 4	เดือนที่ 6	เดือนที่ 4	เดือนที่ 6
LED สีขาว (control)	0.053	0.224	0.054	0.191
LED สีแดง	0.044	0.222	0.060	0.203
LED สีน้ำเงิน	0.050	0.201	0.064	0.188
Grow lux	0.046	0.221	0.062	0.214
F-test	ns	ns	ns	ns
c.v.(%)	95.44	87.28	75.04	70.43

ns : ไม่แตกต่างทางสถิติ



<u>ภาพที่ 1</u> การชักนำให้เกิดแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 ในสภาพแสง 4 ชนิด



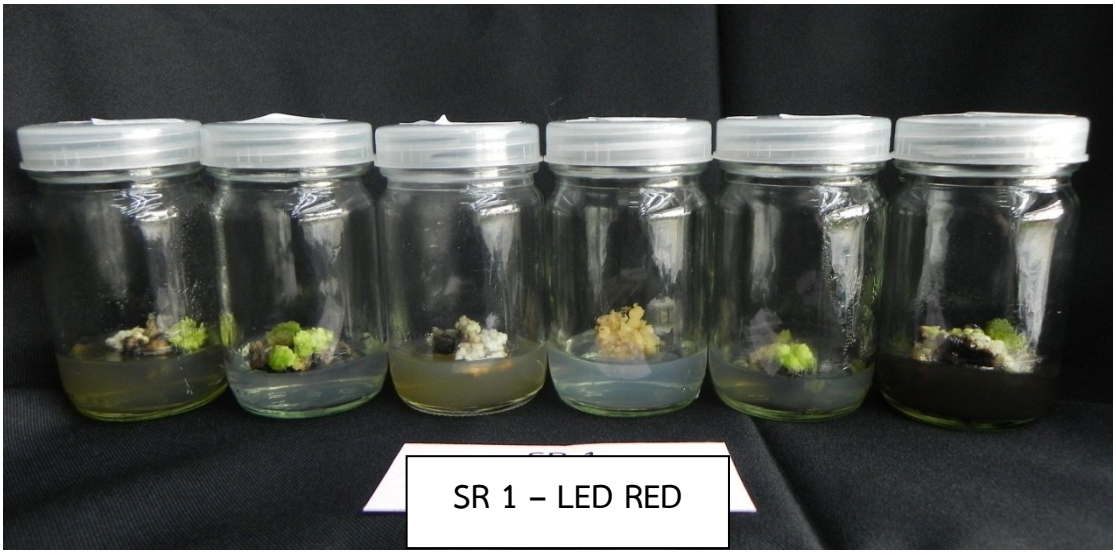
ภาพที่ 2 การชักนำให้เกิดแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 2 ในสภาพแสง 4 ชนิด

นำแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 มากระตุ้นให้แคลลัสมีการพัฒนาผ่านกระบวนการ embryogenesis เพื่อให้มีการพัฒนาเป็นยอด โดยการศึกษาการพัฒนาในสูตรอาหารที่มีการเติม Polyethylenglycol (PEG) ความเข้มข้น 5% และ 10% ร่วมกับน้ำตาล sucrose หรือ sorbitol นำไปเลี้ยงบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีสภาพแสง 4 ชนิด ประกอบด้วย LED สีขาว (control), LED สีแดง, LED สีน้ำเงิน และ หลอด Grow lux พบว่า พันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1 ผลของปัจจัยชนิดของแสงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อการพัฒนาและน้ำหนักของแคลลัส โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดแคลลัสสูงที่สุดในการเลี้ยงในแสงชนิด Grow lux เท่ากับ 2.65 กรัม และรองลงมาคือ แสง LED สีขาว เท่ากับ 2.32 กรัม ส่วนแสง LED สีน้ำเงินจะให้ค่าเฉลี่ยของแคลลัสน้อยที่สุด เท่ากับ 1.92 กรัม (ตารางที่ 3) ในขณะที่ปัจจัยด้านสูตรอาหาร และปัจจัย 2 ชนิดร่วมกันของชนิดแสงและสูตรอาหารไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 2 และ 4)

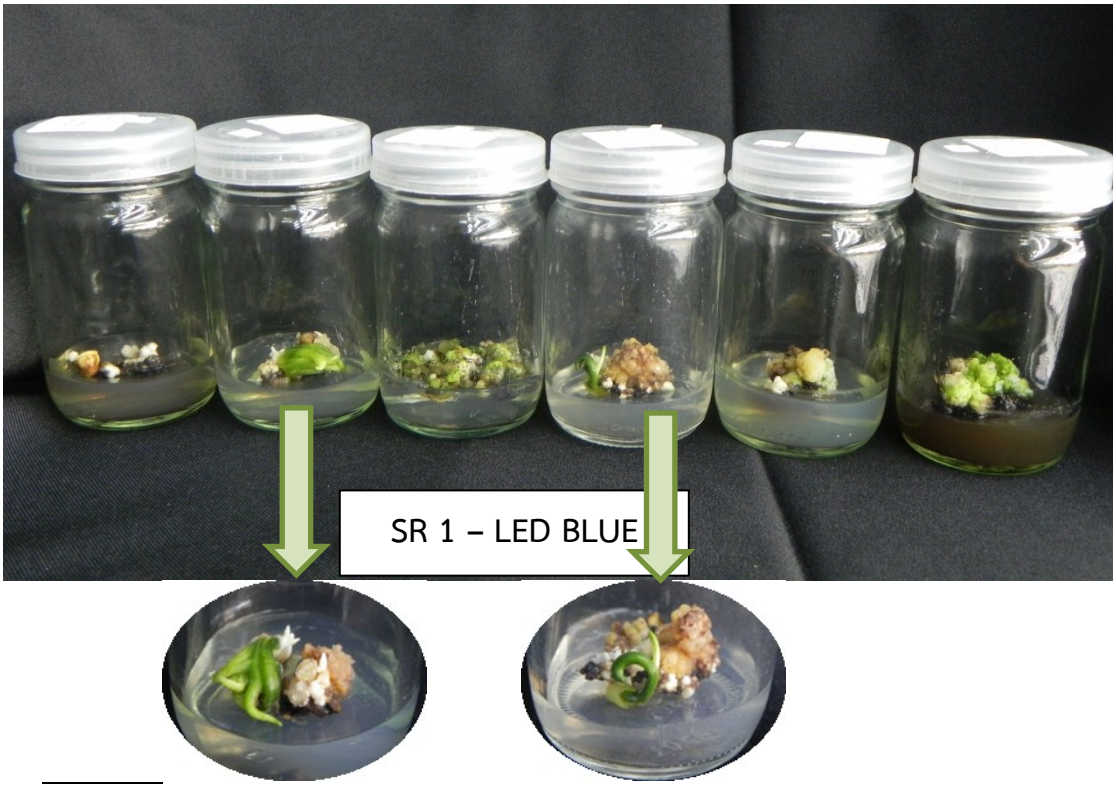
การพัฒนาของแคลลัสซึ่งเกิดจาก embryo ของปาล์มน้ำมันพันธุ์พันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 พบว่า ในสภาพแสง LED สีขาว แคลลัสที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะ compact callus ที่มีการเกาะกันแน่น และจะมีสีเขียว (ภาพที่ 3) สภาพแสง LED สีแดง พบว่า แคลลัสจะมีลักษณะ compact

callus ที่มีลักษณะเป็นก้อนกลมสีขาวที่มีการเกาะกันแบบหลวมๆ และแคลลัสที่มีการเกาะกันแน่นสีเขียว ในอาหารทดสอบที่มีปริมาณ sorbitol 0.2 M จะพบแคลลัสที่มีลักษณะ friable callus มีสีน้ำตาลเกิดขึ้น (ภาพที่ 4) สภาพแสง LED สีน้ำเงิน แคลลัสที่มีแนวโน้มการเกิดยอดพบได้ในอาหารทดสอบที่มี sorbitol 0.1 M และ sorbitol 0.3 M (ภาพที่5) สภาพแสงสีม่วง Growlux แคลลัสที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็น compact callus สีขาวและสีเขียว แคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลจำนวนมากเมื่อเปรียบเทียบกับสภาพแสงอื่นๆ และพบการพัฒนาเกิดราก (ภาพที่ 6)

ภาพที่ 3 การพัฒนาของแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 ในสภาพแสงสีขาว (control)



ภาพที่ 4 การพัฒนาของแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 ในสภาพแสง LED สีแดง



ภาพที่ 5 การพัฒนาของแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 ในสภาพแสง LED สีน้ำเงิน

ภาพที่ 6 การพัฒนาของแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 ในสภาพแสง Growlux

สำหรับการทดสอบการพัฒนาของแคลลัสในปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 2 พบว่า ปัจจัยของชนิดแสงให้ผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อการพัฒนาของค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของแคลลัสเมื่อเลี้ยงในสภาพแสง LED สีแดงจะทำให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดแคลลัสสูงที่สุด เท่ากับ 1.75 กรัม รองลงมาคือในสภาพแสง Grow lux เท่ากับ 1.64 กรัม และให้ค่าเฉลี่ยน้อยที่สุดเมื่อเลี้ยงในสภาพแสง LED สีขาว เท่ากับ 1.13 กรัม (ตารางที่ 3 และ 5) สำหรับปัจจัยด้านสูตรอาหาร และปัจจัยร่วมกันของชนิดแสงและสูตรอาหารไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 5)

การพัฒนาของแคลลัสในสภาพแสง LED สีขาว พบการพัฒนาของแคลลัสเกิดเป็นยอดในอาหารทดสอบที่มีการเติม PEG 5% (ภาพที่ 7) ในสภาพแสง LED สีแดงจะพบแคลลัสทั้ง 2 แบบ คือ compact callus สีขาวและสีเขียว ส่วน friable callus จะมีสีน้ำตาล (ภาพที่ 8) สภาพแสง LED สีน้ำเงินแคลลัสส่วนใหญ่จะเป็น compact callus มีสีเขียวเกาะกันแน่น และบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 9) การพัฒนาของแคลลัสในสภาพแสงสีม่วง Growlux พบว่ามีการพัฒนาส่วนยอดเกิดขึ้นในอาหารทดสอบที่มี sorbitol 0.1 M (ภาพที่ 10)

ตารางที่ 2 แสดงปัจจัยของชนิดแสงและสูตรอาหารต่อการพัฒนาของแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1

SOV	df	SS	MS	Pr > F	
Treatment	23	38.0049	1.65	0.28	ns
ชนิดแสง	3	12.0704	4.02	0.04	*
สูตรอาหาร	5	1.0025	0.20	0.98	ns
แสง X อาหาร	15	24.9320	1.66	0.29	ns
Error	120	169.5048	1.41		
Total	143	207.5098			
c.v (%)	53.41				

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 3 แสดงปัจจัยชนิดแสงต่อค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของแคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2

ชนิดแสง	น้ำหนักแคลลัส (กรัม)	
	พันธุ์สุราษฎร์ธานี 1	พันธุ์สุราษฎร์ธานี 2
LED สีขาว	2.32 ab [1/]	1.13 c
LED สีแดง	1.99 b	1.75 a
LED สีน้ำเงิน	1.92 b	1.24 bc
Grow lux	2.65 a	1.64 ab
F-test	*	*
c.v (%)	53.41	63.45

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Ducan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4 แสดงปัจจัยสูตรอาหารต่อค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของแคลลัสปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2

ชนิดแสง	น้ำหนักแคลลัส (กรัม)	
	พันธุ์สุราษฎร์ธานี 1	พันธุ์สุราษฎร์ธานี 2
MS (control)	2.16	1.72
MS+sorbitol 0.1 M	2.20	1.48
MS+sorbitol 0.2 M	2.39	1.53
MS+sorbitol 0.3 M	2.26	1.31
MS+PEG 5%	2.15	1.35
MS+PEG 10%	2.17	1.27
F-test	ns	ns
c.v (%)	53.41	63.45

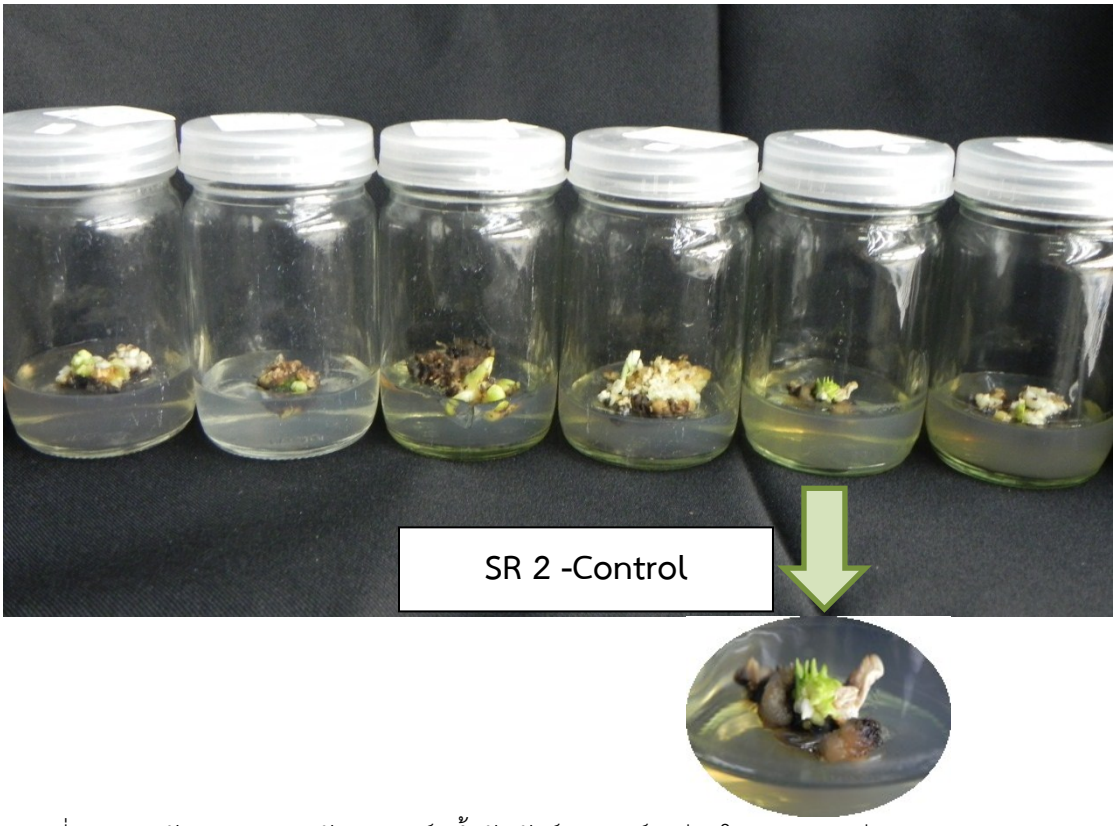
ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 5 แสดงปัจจัยของชนิดแสงและสูตรอาหารต่อการพัฒนาของแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 2

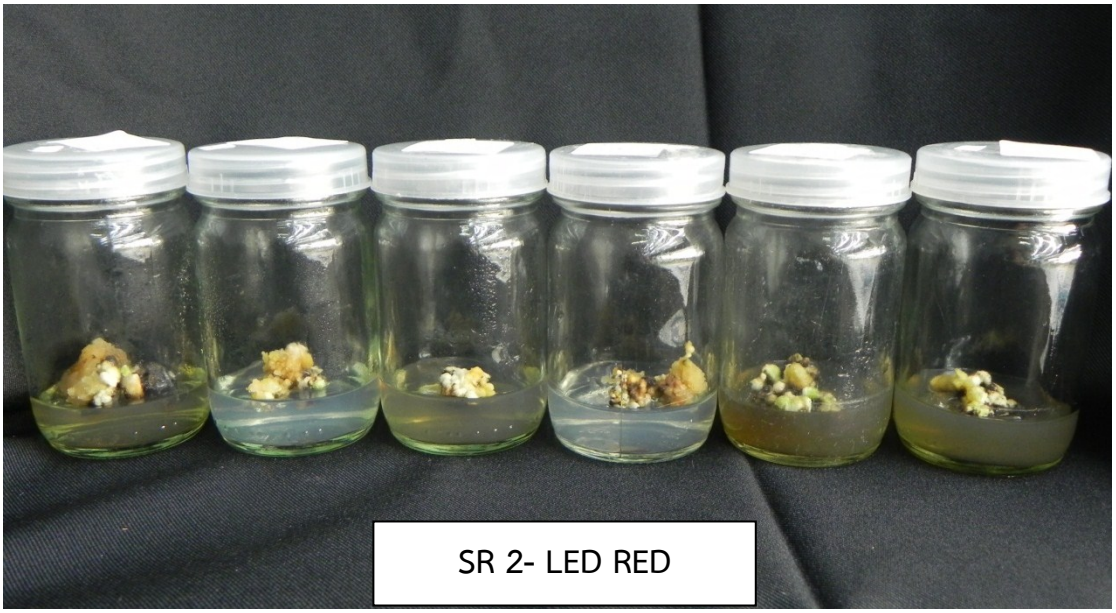
SOV	df	SS	MS	Pr > F	
Treatment	23	19.0898	0.82	0.48	ns
ชนิดแสง	3	8.2310	2.74	0.02	*
สูตรอาหาร	5	2.8301	0.56	0.64	ns
แสง X อาหาร	15	8.0286	0.53	0.83	ns
Error	96	80.7844	0.84		
Total	119	99.8741			
c.v (%)	63.45				

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

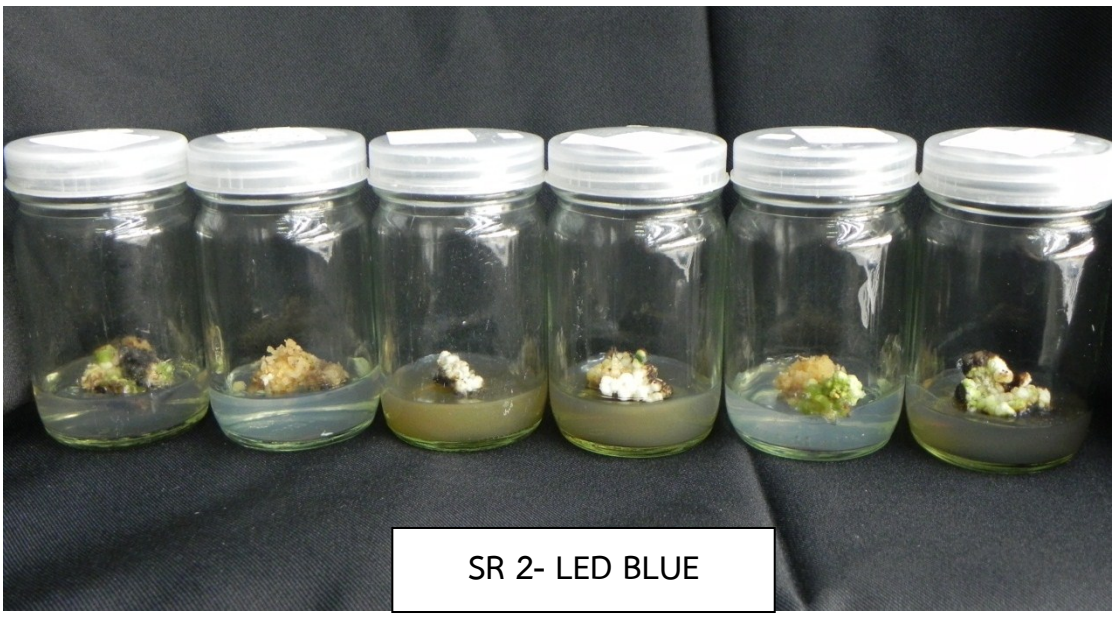
ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



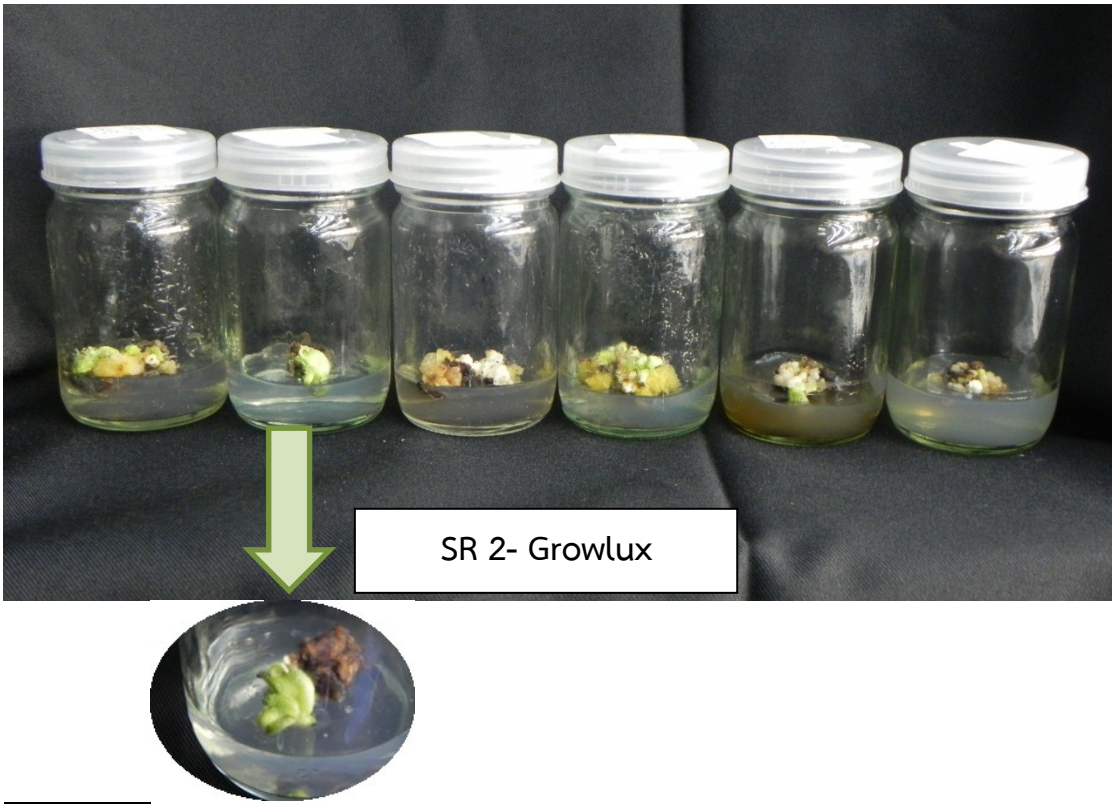
ภาพที่ 7 การพัฒนาของแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 2 ในสภาพแสงสีขาว (control)



ภาพที่ 8 การพัฒนาของแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 2 ในสภาพแสง LED สีแดง



ภาพที่ 9 การพัฒนาของแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 2 ในสภาพแสง LED สีน้ำเงิน

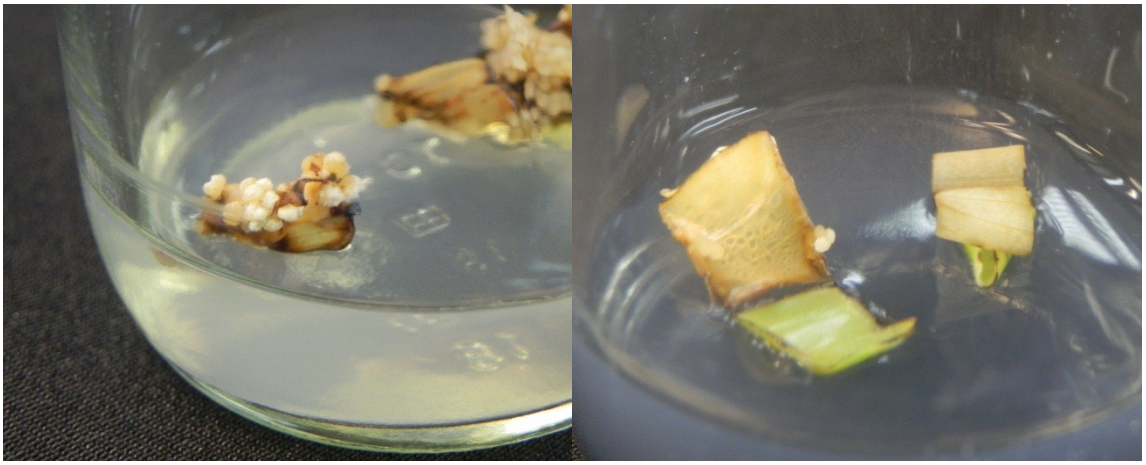


ภาพที่ 10 การพัฒนาของแคลลัสของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 2 ในสภาพแสง Growlux

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบและยอดของปาล์มน้ำมัน

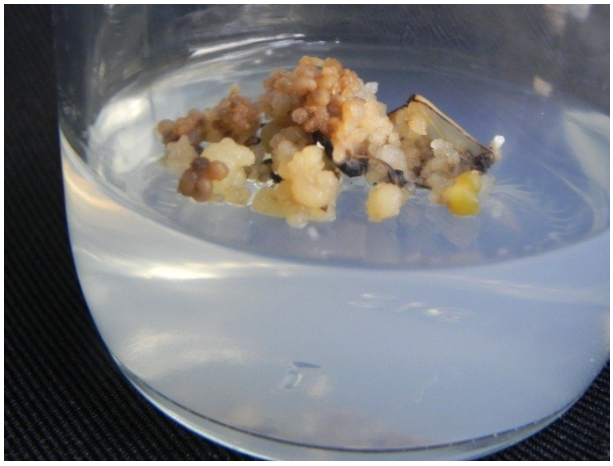
นำยอดของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 ที่ใบอ่อนยังไม่คลี่ออก ลักษณะพับซ้อนคล้ายพัด มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน เปิดน้ำไหลทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นเลือกชิ้นส่วนที่มีเนื้อเยื่อสีขาดบริเวณฐานของใบอ่อน มาแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์นาน 1 นาที ต่อด้วยสารฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้น 10% นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วตัดชิ้นส่วนใบอ่อนที่มีสีขาวและเนื้อเยื่อบริเวณยอด ขนาด 0.5 X 0.5 เซนติเมตร เลี้ยงในอาหารเพื่อการกระตุ้นการเกิดแคลลัสที่ประกอบด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 3 ชนิด คือ dicamba, picloram และ brassinolide ที่ระดับความเข้มข้น 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเลี้ยงใบอ่อนในสภาพที่มืดจะทำให้เกิดแคลลัสได้จากสูตรอาหาร MS ร่วมกับ dicamba ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ระยะเวลา 2.5 เดือน สอดคล้องกับ อาสลัน (2545) ศึกษาการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนรา พบว่า ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสของปาล์มน้ำมัน คือ dicamba เข้มข้น 1-5 มิลลิกรัม/ลิตร (ชักนำแคลลัสได้เฉลี่ย 9.11 เปอร์เซ็นต์) และจากรายงานของชยานิจ และคณะ (2552) ได้รายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนคัพภะอ่อน ช่อดอกอ่อน และใบอ่อนของปาล์มน้ำมันลูกผสม tenera พันธุ์สุราษฎร์ธานี 3 บนอาหารสูตร MS และ Y3 ที่เติม dicamba ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้ชิ้นส่วนสร้างแคลลัส ส่วนใบอ่อนมีอัตราการเกิดแคลลัสสูงสุด 24.63% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร

MS เติม dicamba 15 µM และสูตรอาหาร MS ร่วมกับ picloram ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ระยะเวลา 6 เดือน ทำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะกลมมีสีน้ำตาลอ่อนเกิดขึ้นที่บริเวณขอบใบ (ภาพที่ 11) จากนั้นเปลี่ยนอาหารลงในสูตรอาหารที่มีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.1 mg/l เพื่อให้แคลลัสมีการเพิ่มปริมาณและเกิดการพัฒนา พบว่า แคลลัสไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ (ภาพที่ 12)



MS + dicamba 1 mg/l MS + picloram 3 mg/l

ภาพที่ 11 การเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอ่อนของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี



ภาพที่ 12 แคลลัสจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน บนอาหาร MS + 2,4-D 0.1 mg/l

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

1. การชักนำให้เกิดแคลลัสของปาล์มน้ำมันจำนวน 2 พันธุ์ โดยใช้สภาพแสง 4 ชนิด สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ทุกชนิดไม่แตกต่างกัน แนะนำการใช้แสง LED สีขาวเพื่อการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีในปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 เนื่องจากมีราคาถูกและหาซื้อได้ง่ายในท้องตลาด สำหรับขั้นตอนการพัฒนา embryogenesis callus พบว่า ชนิดของแสงมีผลต่อการพัฒนาแคลลัส โดยแสง Grow lux จะทำให้ได้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักที่ดีในพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2

2. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1 สามารถเกิดได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการเติม dicamba 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่แคลลัสที่ได้ยังไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ จึงควรปรับปรุงสูตรอาหารและวิธีการเพื่อให้เหมาะสมต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เป็นข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสปาล์มน้ำมันและการพัฒนาแคลลัสให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ของปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 และควรศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำไปพัฒนาสำหรับปาล์มน้ำมันพันธุ์แนะนำพันธุ์อื่นๆ ของกรมวิชาการเกษตรต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานีที่อนุเคราะห์เมล็ดปาล์มน้ำมันและคำแนะนำต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง (References)

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 162 หน้า.

ชยานิจ ดิษฐบรรจง, กษิดิศ ดิษฐบรรจง, ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์, อรรัตน์ วงศ์ศรี และ อรุณี ใจเถิง. 2552. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน *ใน* เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 : สาขาพืช วันที่17-20 มีนาคม 2552 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 641 หน้า

ชุมพล คุณวาสี. 2549. เอกสารประกอบการสอนวิชา 2303 107 General Biology. ภาควิชาพฤกษศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 15 หน้า.

พีรเดช ทองอำไพ. พัฒนาพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (2). 25 ธันวาคม 2556. สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) : https://www.arda.or.th

ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์, ชยานิจ ดิษฐบรรจง, กษิดิศ ดิษฐบรรจง และ อรรัตน์ วงศ์ศรี. 2554. การเพิ่มจำนวนและการเจริญเติบโตของแคลลัสปาล์มน้ำมันโดยใช้ Silver nitrate และ Polyamine. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 เล่ม1 . สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า : 510-522.

สมปอง เตชะโต, พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, จรัสศรี นวลศรี และ วันทนา เอ้งย่อง. 2350. การชักนำแคลลัสปฐมภูมิในปาล์มน้ำมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบอ่อน. ว.สงขลานครินทร์. 8 : 1-6.

อมรรัตน์ วงษ์นอก. 2549. ผลของไดโอดเปล่งแสงและสูตรอาหารต่อการพัฒนาของกล้วยไม้ฟาแลนนอพซิสในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, ภาควิชาพืชสวน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 71 หน้า

อาสลัน หิเล. 2545. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพื่อการขยายพันธุ์. วิทยาพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืชศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 40 หน้า.

Jackson, W.T. 1962. Use of carbowaxes (polyethylene glycols) as osmotic agents. Plant Physiol. 37: 513–519.

Paulo Sérgio Gomes da Rocha, Roberto Pedroso de Oliveira and Walkyria Bueno Scivittaro. 2013. Sugarcane micropropagation using light emitting diodes and adjustment in growth-medium sucrose concentration. Ciência Rural, Santa Maria 43 (7) : 1168-1173.

Ravindra B.M. and K. Nataraja. 2007. Brassinosteroids Influences in vitro Regeneration Using Shoot Tip Sections of *Cymbidium elegans* Lindl. Asian J.Plant. Sci, 6(2) : 308-313.

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยของโครงการ ได้ข้อมูลเทคนิคการขยายพันธุ์พืชปลอดโรคเชิงพาณิชย์จำนวน 3 ชนิด ประกอบด้วย ขมิ้นชัน อ้อย และมันฝรั่ง ซึ่งสามารถนำสูตรอาหารที่ได้ศึกษาจากงานวิจัยไปใช้ในการขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณจำนวนมากในอาหารแข็งและการเพิ่มปริมาณด้วยระบบ Temporary Immersion Bioreactor (TIB) และได้ต้นพันธุ์ที่ปลอดเชื้อโรค ขมิ้นชันทั้ง 2 พันธุ์ คือ ขมิ้นชันตรัง1 และ ขมิ้นชันตรัง 2 สามารถเลือกใช้สาร ไซโตไคนินได้ทั้ง 4 ชนิด เนื่องจากให้ผลทางสถิติที่ไม่ต่างกัน แต่ควรพิจารณาราคาของสารเคมีเพื่อลดต้นทุนสำหรับการผลิตทางพาณิชย์ จึงแนะนำการใช้ BA ที่มีราคาถูก และสามารถใช้ต่อเนื่องในขั้นตอนการชักนำให้เกิดเหง้าในสภาพปลอดเชื้อได้ด้วย การชักนำให้เกิดยอดรวมในอ้อย สามารถทำได้บนอาหารกึ่งแข็งและในระบบ TIB การใช้ TIB สามารถได้ยอดอ่อนในระยะเวลาที่สั้นกว่าการชักนำบนอาหารแข็ง แต่ระบบ TIB ชักนำให้เกิดยอดอ่อนได้ในปริมาณที่น้อยกว่าบนอาหารแข็ง (16.2-22.1 vs 47.5-51.6 ยอด/ชิ้นส่วนพืช) นอกจากนี้ควรทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อไฟโตพลาสมาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้แน่ใจว่าต้นพันธุ์ (stock plant) ปลอดโรค การใช้ apical meristem ขนาด 0.1 - 0.2 เซนติเมตร ของมันฝรั่ง เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ร่วมกับ BA 5 µM สามารถชักนำให้มีการพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ในพันธุ์แอตแลนติก 36 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์สปุนตา 24 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ PVY ด้วยวิธีเซรุ่มวิทยา พบการปลอดโรคสูงถึง ได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ การเพิ่มปริมาณยอดรวมในอาหารเหลว และระบบ TIB มันฝรั่งพันธุ์แอตแลนติกและพันธุ์สปุนตาสามารถเพิ่มปริมาณยอดรวมได้สูง เมื่อเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี GA3 0.1 mg/l และ NAA 0.1 mg/L มันฝรั่งสามารถเกิด micro tubers ของพันธุ์แอตแลนติกเกิดในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA 40 µM และน้ำตาลซูโครส 6-8 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Chlorocholine chloride (CCC) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนพันธุ์สปุนต้าอาหารเหลว MS ที่เติม BA 20 µM และน้ำตาลซูโครส 8 เปอร์เซนต์ สามารถชักนำให้เกิด micro tubers ได้ดีที่สุดแต่ในระบบ TIB ยังไม่สามารถสรุปได้ มีปัจจัยที่ต้องศึกษาอีก เช่น ระยะเวลาการให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช และ ความเข้มข้นของ CCC

การศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจ คือ ปาล์มน้ำมัน พบว่า ปัจจัยภายนอกคือการเลือกชนิดแสงต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของปาล์มน้ำมันจำนวน 2 พันธุ์ โดยใช้สภาพแสง 4 ชนิด สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ทุกชนิดไม่แตกต่างกัน แนะนำการใช้แสง LED สีขาวเพื่อการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีในปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 เนื่องจากมีราคาถูกและหาซื้อได้ง่ายในท้องตลาด สำหรับขั้นตอนการพัฒนา embryogenesis callus พบว่า ชนิดของแสงมีผลต่อการพัฒนาแคลลัส โดยแสง Grow lux จะทำให้ได้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักที่ดีในพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 และ 2 ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงใบอ่อนของปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1 สามารถเกิดได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการเติม dicamba 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่แคลลัสที่ได้ยังไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ จึงควรปรับปรุงสูตรอาหารและวิธีการเพื่อให้เหมาะสมต่อไป

บรรณานุกรม

การขยายพันธุ์ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) เชิงการค้า ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยเทคนิคไบโอรีแอคเตอร์

กาญจน สุทธิกุล. 2549. ไบโอรีแอคเตอร์ (Bioreactor) เขี้ยวเล็บใหม่ในวงการขยายพันธุ์พืชของไทย. วารสารเคหการเกษตร. ปีที่ 30 ฉบับที่ 2 เดือนกุมภาพันธ์. : 93-99.

งามผ่อง คงคาทิพย์. 2548. การวิจัยและพัฒนาขมิ้นชันแบบครบวงจร หน่วยปฏิบัติการวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและเคมีอินทรีย์สังเคราะห์ (NPOS). นิทรรศการวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ “เกษตรนำชาติ ศาสตร์ที่ยั่งยืน คืนทรัพยากรสู่ชุมชน” ในงานวันเกษตรแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2548, กรุงเทพฯ.

จินตน์กานต์ งามสุทธา. 2555. ขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 1 และ 84-2. นสพ.กสิกร ปีที่ 85 ฉบับที่ 4 กรกฎาคม-สิงหาคม. กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. : 108-111 หน้า.

อนุพันธ์ กงบังเกิด และ วีระชน ยานะฝั่น. 2548. ผลของแสง น้ำตาล และสารชะลอการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดเหง้าจิ๋วของขมิ้นชันในหลอดทดลอง. NU Science Journal. 2(1): 73 – 86.

Anchalee Jala . 2012. Effects of NAA BA and Sucrose on Shoot Induction and Rapid Micropropagation by Trimming Shoot of Curcuma longa L. Thammasat International Journal of Science and Technology, 17 (4) : 54-60.

Archana C., G.S. Pillai and I. Balachandran. 2014. In vitro microrhizome and minirhizome production in turmeric (*Curcuma longa* L.) cultivar Alleppey Supreme and its comparative anatomical and histochemical analysis. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 3(3): 535-542

Sanghamitra N. and P. Kumar Naik. 2006. Factors Effecting *In Vitro* Microrhizome Formation and Growth in *Curcuma longa* L. and Improved Field Performance of Micropropagated Plants. ScienceAsia (32) : 31-31.

Solomon C.U. and E. B.Odii. 2013. Shoot Proliferation of *In vitro* Turmeric (*Curcuma longa* L.) Affected by Different Concentrations of Benzylaminopurine (BAP). World J Agr Sci 9 (3): 227-230.

การชักนำให้เกิดยอดรวมในอ้อย (*Saccharum* spp.) ที่ปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้ชิ้นส่วนของ ใบอ่อน

Ali, S. M.S. Khan and J. Iqbal. 2012. In vitro direct plant regeneration from cultured young leaf segment of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). J. Animal & Plant Sci. 22 (4) : 1107-1112.

Ali, S., J. Iqbal and M.S. Khan. 2010. Genotype independent in vitro regeneration system in elite varieties of sugarcane. Pakistan J. Bot., 42 (6) : 3783-3790.

Distabanjong, C., K. Distabanjong, J.-G. Woo and S.-W. Jang. 2018. Production of phytoplasma-free plants in sugarcane (*Saccharum* spp.) using temporary immersion bioreactor. Acta Hort. (in press).

Distabanjong, K., C. Distabanjong, P. Wanichchananan, W. Polrakdee and S.-W. Jang. 2012. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Khon Kaen Agri. J. (Suppl.). 40 : 214-221.

Gill, R, P.K. Malhotra and S.S. Gosal. 2006. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 84 : 227-231.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497.

Snyman, S.J., G.M. Meyer, M. Banasiak, T.L. Nicholson,T. van Antwerpen, P. Naidoo and J.D. Erasmus. 2008. Micropropagation of sugarcane via NovaCane® : Preliminary steps in commercial application. Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass. 81 : 513-516.

Sood N., P. K. Srivastava and S. S. Gpsal. 2006. Micropppropagated and conventionally propagated sugarcane plants. Plant Tissue Cult. and Biotech. 16 (1) : 25-29.

การขยายพันธุ์มันฝรั่งโดยใช้ระบบ Temporary Immersion Bioreactor

วงศ์ บุญสืบสกุล. 2550. การควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง ใน น.ส.พ. กสิกร. 80(4): 96-97.

Abbott, A.J. and R. Belcher.1986. Potato tuber formation *in vitro*. In: Plant Tissue Culture and Its Agriculture Application. Lobdon: Butt Worth. 113 -132.

Aitken-Christie J, Kozai T, Takayama S. 1995. Automation in plant tissue culture – General introduction and over view. In : Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp1-18.

Chu I.1995. Economic analysis of automated micropropagation . In: Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp19-27

Etienne H and Berthouly M. 2002. Temporary immersion system in plant micro propagation . Plant Cell, Tissue Org . Culture. 69:215 -231 .

Hussain I., Chaudhry Z.,Muhamma A., Asghar R., Naqvi S.M.S. and Rashid H. Effect of chlorocholine chloride, sucrose and BAP on In vitro tuberlization in Potato Micro Tubers Induction. Pak.J.Bot.,38(2) 275-282

Morel,G. and C. Martin. 1952. Guerison de dahlias atteints d'une maladie a virus. Comptes Rendus de l' Académie des . Sciences, 235: 1324-1325

Neerja,S.,N.Kaur and Anil K. Gupta.1998. Effect of chlorocholine chloride sprays on the carbohydrate composition and activities of sucrose metabolizing enzyme in potato. Plant growth Regulation . Volumn 26,Issue 2, pp 97-103

Smith MA. and Spoomer LA.1995 . Vessels, gels, liquid media and support systems. In: Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp371-405

Wang,P.J. and C.Y. Hu.1982 . In vitro mass tuberization and virus free seed potato production in Taiwan. AMPotato J. 59:33-39

Zuraida AR,Nurul Shahnadz AH, Harteeni A, Che Radziah CMZ and Sreeramanan S. 2011. A novel approach for rapid micropropagation of Maspine pineapple (Ananas comosus L.) Affican Journal of Biotechnology Vol.10(19), pp. 3859-3866.

การศึกษาเทคนิคและปัจจัยเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 162 หน้า.

ชยานิจ ดิษฐบรรจง, กษิดิศ ดิษฐบรรจง, ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์, อรรัตน์ วงศ์ศรี และ อรุณี ใจเถิง. 2552. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน *ใน* เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 : สาขาพืช วันที่17-20 มีนาคม 2552 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 641 หน้า

ชุมพล คุณวาสี. 2549. เอกสารประกอบการสอนวิชา 2303 107 General Biology. ภาควิชาพฤกษศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 15 หน้า.

พีรเดช ทองอำไพ. พัฒนาพันธุ์ปาล์มน้ำมัน (2). 25 ธันวาคม 2556. สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) : https://www.arda.or.th

ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์, ชยานิจ ดิษฐบรรจง, กษิดิศ ดิษฐบรรจง และ อรรัตน์ วงศ์ศรี. 2554. การเพิ่มจำนวนและการเจริญเติบโตของแคลลัสปาล์มน้ำมันโดยใช้ Silver nitrate และ Polyamine. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 เล่ม1 . สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า : 510-522.

สมปอง เตชะโต, พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, จรัสศรี นวลศรี และ วันทนา เอ้งย่อง. 2350. การชักนำแคลลัสปฐมภูมิในปาล์มน้ำมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบอ่อน. ว.สงขลานครินทร์. 8 : 1-6.

อมรรัตน์ วงษ์นอก. 2549. ผลของไดโอดเปล่งแสงและสูตรอาหารต่อการพัฒนาของกล้วยไม้ฟาแลนนอพซิสในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, ภาควิชาพืชสวน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 71 หน้า

อาสลัน หิเล. 2545. การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ผลผลิตดีเพื่อการขยายพันธุ์. วิทยาพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืชศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 40 หน้า.

Jackson, W.T. 1962. Use of carbowaxes (polyethylene glycols) as osmotic agents. Plant Physiol. 37: 513–519.

Paulo Sérgio Gomes da Rocha, Roberto Pedroso de Oliveira and Walkyria Bueno Scivittaro. 2013. Sugarcane micropropagation using light emitting diodes and adjustment in growth-medium sucrose concentration. Ciência Rural, Santa Maria 43 (7) : 1168-1173.

Ravindra B.M. and K. Nataraja. 2007. Brassinosteroids Influences in vitro Regeneration Using Shoot Tip Sections of *Cymbidium elegans* Lindl. Asian J.Plant. Sci, 6(2) : 308-313.

ภาคผนวก

ภาพผนวกที่ 1 การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นอ้อยที่ปลูกในโรงเรือนระบบปิด เพื่อใช้เป็นชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเทคนิค nested-polymerase chain reaction (nested-PCR) ใช้ 2 primers คือ R16mF2/R16mR1 และ R16F2/R16R2

Lane 1-20 – **ไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา**

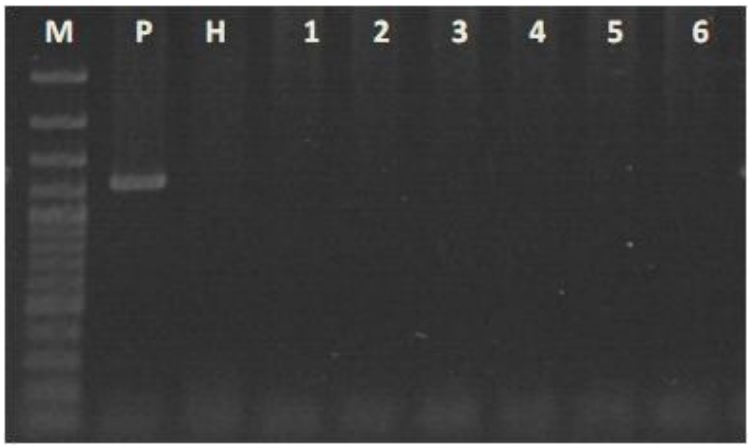
W – น้ำกลั่น

N – ต้นอ้อยปกติไม่มีเชื้อไฟโตพลาสมา

P – positive control (1,250 bp)

M – 100 bp DNA ladder plus, Fermentas

ผล : ไม่พบการติดเชื้อซ้ำ (reinfection)



ภาพผนวกที่ 2 การตรวจสอบซ้ำในต้นอ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบ TIB โดยเทคนิค nested-polymerase chain reaction (nested-PCR) ใช้ 2 primers คือ R16mF2/R16mR1 และ R16F2/R16R2

M – 100 bp DNA ladder plus, Fermentas

P – positive control (1,250 bp)

H – พืชปกติไม่เป็นโรค (healthy plant)

ผล : ไม่พบการติดเชื้อ