การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการวิเคราะห์ความคงตัวของระดับพลอยด์ดีของกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง

Tissue Culture and the Analysis of Ploidy Stability of *Musa* (ABB) 'Namwa Mali-Ong'

นิดาพร สุธัญญรัตน์ สุพรรนี อะโอกิ และ ขวัญเดือน รัตนา*
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

Nidaporn Sudhanyaratana, Supanee Aoki and Khwanduean Rattana*
Faculty of Science, Ubon Ratchathani Rajabhat University

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของกล้วยน้ำว้ามะลิอ่องด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog, 1962 (MS) ที่เติม N_6-Benzyladenine (BA), α-Naphthalene acetic acid (NAA) และน้ำมะพร้าว ทั้งหมด 15 สูตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% (v/v) สามารถชักนำให้มีร้อยละการเกิดยอดสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 2.00 ยอด/ชิ้นส่วนพืช จากนั้นย้ายต้นอ่อนที่สมบูรณ์ออกปลูกในสภาพโรงเรือน พบว่าการใช้วัสดุปลูกขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว : ทราย ในอัตราส่วน 2 : 1 : 1 ต้นอ่อนมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดเท่ากับ 100% จากการนำใบอ่อนกล้วยน้ำว้ามะลิอ่องที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและกล้วยน้ำว้าต้นพันธุ์ที่ปลูกในสภาพธรรมชาติไปวิเคราะห์ความคงตัวของระดับพลอยด์ดี โดยวิธี flow cytometry พบว่ากล้วยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และกล้วยที่ปลูกในสภาพธรรมชาติไม่พบความแตกต่างของระดับพลอยด์ดี

คำสำคัญ : กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ระดับพลอยด์ดี Flow cytometry

Abstract

Shoot apices of *Musa* (ABB) 'Namwa Mali-Ong' were cultured to study shoot formation on Murashige and Skoog, 1962 (MS) medium supplemented with different concentrations of N_6-Benzyladenine (BA), α-Naphthalene acetic acid (NAA) and 15% coconut water which were consisted of 15 treatments and cultured for 8 weeks. The result showed the most suitable medium, providing 100 percent shoot induction and the highest average number of shoot/apices (2.00 shoots/shoot apices), was MS medium supplemented with 15% coconut water. All healthy regenerated shoots and roots were then transplanted to the greenhouse. The results exhibited that 100% of the survival plantlets were planted on rice-husk ash : coconut dust: sand in the ratio of 2 : 1 : 1. Flow cytometric analysis of young leaves collected from mother plants and micropropagated plants showed no difference in ploidy level.

Keywords : *Musa* sp. cv. Kluai Namwa Mali-Ong, plant tissue culture, ploidy, flow cytometry

---

*** ผู้ประสานงานหลัก (Corresponding Author)**
e-mail: K_rattana@yahoo.com

บทนำ

กล้วยเป็นพืชในสกุล *Musa* วงศ์ Musaceae นิยมบริโภคกันมากในประเทศไทย พันธุ์กล้วยที่เกษตรกรนิยมปลูก ได้แก่ กล้วยน้ำว้า กล้วยไข่ กล้วยหอม กล้วยหักมุก และกล้วยเล็บมือนาง ตามลำดับ (Silayoi, 2015) สำหรับกล้วยน้ำว้าเป็นพันธุ์ที่นิยมบริโภคกันในทุกครัวเรือน ให้พลังงานมากที่สุดเมื่อเทียบกับกล้วยสายพันธุ์อื่น โดยสายพันธุ์ของกล้วยน้ำว้านั้นเป็นสายพันธุ์ที่พัฒนามาจากลูกผสมระหว่างกล้วยป่ากับกล้วยตานี ปลูกง่าย รสชาติดี มีคุณค่าทางอาหารและยา นอกจากนี้กล้วยน้ำว้ายังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญทั้งในการบริโภคสดและการแปรรูป เพื่อการบริโภคทั้งภายในประเทศและส่งจำหน่ายในตลาดต่างประเทศ สำหรับประเทศไทยมีปริมาณการปลูกกล้วยจัดอยู่ในอันดับ 3 ของทวีปเอเชีย (Silayoi, 2015) แต่ในปัจจุบันกลับพบว่าพื้นที่ทางการเกษตรเพื่อการเพาะปลูกกล้วยได้ลดลง อันเนื่องมาจากการที่เกษตรกรได้ทำการเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ ที่ได้ราคาดี เช่น ยางพารา มันสำปะหลัง และปาล์ม เป็นต้น นอกจากนี้ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งของการปลูกกล้วยของเกษตรกรคือการเกิดโรคจากเชื้อไวรัส ส่งผลให้ผลผลิตที่ได้มีจำนวนลดลง ไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาดทั้งภายใน และต่างประเทศ (Silayoi, 2015) ส่งผลทำให้ราคากล้วยน้ำว้ามีราคาสูงขึ้น ดังนั้นการนำเอาความรู้ด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนของกล้วย จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มปริมาณต้นอ่อนให้แก่เกษตรกรต่อไปในอนาคต โดยการขยายพันธุ์กล้วยด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นมีจุดประสงค์ใหญ่ ๆ 2 ประการ คือเพื่อเพิ่มจำนวนต้นให้ได้มากในเวลาอันรวดเร็ว และเพื่อให้ได้ต้นที่สะอาด ปราศจากโรคและแมลง ซึ่งหากขยายพันธุ์โดยใช้หน่อ อาจมีเชื้อโรคหรือไข่ของแมลงติดมาได้ (Silayoi, 2015) สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยสามารถเพาะเลี้ยงได้จากชิ้นส่วนปลายยอด (Apical meristem) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนที่อยู่ในบริเวณของเนื้อเยื่อเจริญที่มีศักยภาพในการผลิตพืชปราศจากไวรัส เนื่องจากบริเวณดังกล่าวยังไม่มีการพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อลำเลียงที่จะเป็นทางให้ไวรัส แพร่ผ่านเข้าไปได้ ดังนั้นจึงสามารถเพาะเลี้ยงเพื่อการขยายพันธุ์ต้นกล้วยให้ได้ต้นจำนวนมากและปราศจากโรคพืชได้ (Bunnag, 2013) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยน้ำว้ามะลิอ่องทำโดยการวางเลี้ยงส่วนปลายยอดเช่นเดียวกับการขยายพันธุ์กล้วยชนิดอื่น ๆ Muangkaewngam (2014) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยหิน บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 5 $mg.L^{-1}$ สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมและจำนวนยอดสูงสุด 58.35 % และ 3.25 ยอด ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจำนวนชุดโครโมโซมหรือเกิดความผันแปรทางพันธุกรรมที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อันเนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง ดังนั้นการวิเคราะห์ระดับความคงตัวของพลอยด์ดีในพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะช่วยยืนยันความคงตัวของจำนวนชุดโครโมโซมของต้นพืชได้ ดังนั้นการเลือกใช้วิธีการ Flow cytometry เพื่อการศึกษาความคงตัวของระดับพลอยด์ดีในพืชจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในพืชหลายชนิด เนื่องจากการศึกษาปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธี Flow cytometry นั้นทำได้ง่าย และรวดเร็ว (Srangsam & Kanchanapoom, 2007)

ในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาการชักนำให้เกิดต้นของกล้วยน้ำว้ามะลิอ่องด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ และการเติมน้ำมะพร้าว รวมถึงการนำต้นกล้วยที่ได้ออกปลูกในสภาพโรงเรือน และวิเคราะห์ความคงตัวของระดับพลอยด์ดีของกล้วยน้ำว้ามะลิอ่องที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเทียบกับต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติด้วยวิธี Flow cytometry เพื่อประโยชน์ในการเพาะปลูกสำหรับเกษตรกรต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต N_6-Benylaminopurline (BA) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับการเติม α-Naphthaleneacetic acid (NAA) และน้ำมะพร้าว ต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดของกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง

2. เพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนกล้วยน้ำว้ามะลิอ่องที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเมื่อย้ายออกปลูกในสภาพโรงเรือน

3. เพื่อศึกษาความคงตัวของระดับพลอยด์ดีของกล้วยที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และกล้วยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยวิธี Flow cytometry

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. พืชตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

พืชตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ กล้วยน้ำว้าพันธุ์มะลิอ่อง โดยการคัดเลือกต้นกล้วยที่สมบูรณ์ ปลอดโรค จากนั้นนำหน่อกล้วยที่ความสูง 25 ซม. มาทำความสะอาดด้วยน้ำไหลผ่าน ตัดให้เหลือส่วนยอดที่มีขนาด 5 – 6 ซม. ฆ่าเชื้อที่ผิว โดยการแช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 30 วินาที จึงย้ายมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ (Clorox^{TM}) เข้มข้น 15 % (NaOCl 0.9%) เติมสารจับใบ (Tween 20) 2 หยด เป็นเวลา 20 นาที ตามด้วยสารละลายคลอรอกซ์ เข้มข้น 5% (NaOCl 0.3%) เติมสารจับใบ (Tween 20) 2 หยด นาน 5 นาที นำไปล้างในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นตัดให้เหลือเฉพาะส่วนปลายยอดแล้วจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ (ตารางที่ 1)

2. การศึกษาการชักนำให้เกิดต้นอ่อนจากชิ้นส่วนปลายยอดของกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง

นำชิ้นส่วนปลายยอดของกล้วยที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) ที่เติมน้ำตาล 3% (w/v) ผงถ่าน 0.5% (w/v) ผงวุ้น 0.8% (w/v) ร่วมกับการเติม BA เข้มข้น 0, 1, 3, 5 และ 7 mg.L^{-1}, NAA เข้มข้น 0 และ 0.1 mg.L^{-1} และน้ำมะพร้าว 0 และ 15% (v/v) รวมทั้งหมด 15 สูตร ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 0 – 7 mg.L^{-1} ร่วมกับการเติม NAA เข้มข้น 0 และ 0.1 mg.L^{-1} และน้ำมะพร้าว 0 และ 15%

ทรีทเมนต์	สูตรอาหาร
M1	MS (control)
M2	MS + 1 mg.L^{-1} BA
M3	MS + 3 mg.L^{-1} BA
M4	MS + 5 mg.L^{-1} BA
M5	MS + 7 mg.L^{-1} BA
M6	MS + 0.1 mg.L^{-1} NAA
M7	MS + 1 mg.L^{-1} BA + 0.1 mg.L^{-1} NAA
M8	MS + 3 mg.L^{-1} BA + 0.1 mg.L^{-1} NAA
M9	MS + 5 mg.L^{-1} BA + 0.1 mg.L^{-1} NAA
M10	MS + 7 mg.L^{-1} BA + 0.1 mg.L^{-1} NAA
M11	MS + 15% น้ำมะพร้าว
M12	MS + 1 mg.L^{-1} BA + 15% น้ำมะพร้าว
M13	MS + 3 mg.L^{-1} BA + 15% น้ำมะพร้าว
M14	MS + 5 mg.L^{-1} BA + 15% น้ำมะพร้าว
M15	MS + 7 mg.L^{-1} BA + 15% น้ำมะพร้าว

จากนั้นนำอาหารมาปรับความเป็นกรด – ด่าง (pH) ให้ได้ 5.5 – 5.6 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ นาน 8 สัปดาห์ บันทึกร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดที่เจริญจากชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น จำนวนใบ ความสูงของต้น และจำนวนรากของกล้วย วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design : CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี Duncan’ s New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด

3. การย้ายต้นอ่อนออกปลูกในสภาพโรงเรือน

นำต้นอ่อนกล้วยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% ที่เพาะเลี้ยงมาแล้วเป็นเวลา 5 เดือน และมีลำต้นและรากที่สมบูรณ์ ความสูงประมาณ 15-20 ซม. มีจำนวนใบไม่ต่ำกว่า 4 ใบ จำนวนรากไม่ต่ำกว่า 4 ราก ความยากรากอยู่ระหว่าง 3-5 ซม. มาอนุบาลโดยการปรับสภาพที่อุณหภูมิห้องที่มีอากาศถ่ายเทสะดวกเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำต้นอ่อนกล้วยออกจากขวดเพาะเลี้ยง มาล้างอาหารวุ้นที่ติดอยู่บริเวณรากออกให้หมดด้วยน้ำสะอาด นำต้นอ่อนมาแช่ในสารป้องกันเชื้อราและแบคทีเรีย (ออโธไซด์^{TM} 5 g.L^{-1}) เพื่อป้องกันโรคต้นเน่าเนื่องจากพืชยังอ่อนแอและสามารถถูกเชื้อโรคบุกรุกได้ง่าย จากนั้นนำไปปลูกในถุงพลาสติกดำที่มีวัสดุปลูก 2 ชนิดในสภาพโรงเรือน ได้แก่ สูตรที่ 1 ประกอบด้วยขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว : ทราย ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 และสูตรที่ 2 ประกอบด้วย ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว : ทราย ในอัตราส่วน 2 : 1 : 1 รดน้ำทุกวัน ในเวลา 08.00 น. โดยทำการปลูกสูตรละ 5 ซ้ำ เพาะปลูกเป็นเวลา 30 วัน บันทึกการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วย วัดความสูงของต้น จำนวนใบ และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของใบ

4. การวิเคราะห์ความคงตัวของระดับพลอยด์ดี โดยวิธี Flow cytometry

นำใบอ่อนของกล้วยน้ำว้าจากต้นที่เจริญจากอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% อายุเพาะเลี้ยง 5 เดือน และกล้วยน้ำว้าต้นพันธุ์ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ชนิดละ 5 ตัวอย่างๆ ละ 1 กรัม มาวิเคราะห์ความคงตัวของระดับพลอยด์ดี ตามวิธีการของ Hongthongkham & Bunnag (2014) ด้วยการนำใบอ่อนกล้วยมา วางบนจานแก้ว (petri dish) และสับตัวอย่างใบพืชด้วยใบมีดที่คม หยดสารละลาย extraction buffer (Partec Cy stain UV ploidy, one step DAPI staining solution) 200 µl จากนั้นกรองสารที่สกัดได้ใส่ใน celltrics disposable filtered ขนาด 30 µm นำไปย้อมด้วยสีย้อม 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 1 ml (10 mM Tris, 50 mM sodium citrate, 2 mM $MgCl_2$, 0.1% (w/v) Polyvinyl Pyrrolidone (PVP), 0.1% (w/v) Triton X-100 and 2 mg L^{-1} DAPI) และนำไปตรวจวัดความคงตัวของระดับพลอยด์ดีด้วยเครื่องโฟลไซโตรมิเตอร์ของ Partec รุ่น PA II ใช้แหล่งแสงเหนือม่วง (UV-laser) และ blue emission ร่วมกับสาร 4’6- diamidino -2- phenylindole (DAPI dye) ของบริษัท Partec ประเทศเยอรมัน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดต้นอ่อนจากชิ้นส่วนปลายยอดของกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA NAA และ น้ำมะพร้าว ทั้งหมด 15 สูตร ที่มีอายุเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่ปราศจาการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (M1) อาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 1, 3, 5, 7 mg.L^{-1} รวมถึงอาหารสูตรที่เติม BA เข้มข้น 1, 3, 5, 7 mg.L^{-1} ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 mg.L^{-1} ไม่พบการเปลี่ยนแปลง ยกเว้นในอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 5 mg.L^{-1} (M4), MS ที่เติม BA เข้มข้น 1 mg.L^{-1} ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 mg.L^{-1} (M7) และ MS ที่เติม BA เข้มข้น 3 mg.L^{-1} ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 mg.L^{-1} (M8) พบว่าชิ้นส่วนปลายยอดของกล้วยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารทั้งสามสูตร มีขนาดใหญ่ขึ้นและมีสีเขียวเข้ม แต่ไม่พบการชักนำให้เกิดเป็นยอดใหม่ได้ ซึ่งการเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดต้นจำนวนมาก และการเพิ่มความสูงของต้นอ่อนของกล้วยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องอาศัยบทบาทของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื่องจากไซโตไคนินมีผลต่อการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ในส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ดี เช่น ลำต้นและราก รวมถึงเซลล์เพาะเลี้ยง (Bunnag, 2013) สำหรับไซโตไคนินที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย ได้แก่ BA และ TDZ (Habiba et al., 2002; Gübbük & Pekmexci, 2004; Srangsam & Kanchanapoom, 2007; Al-Amin et al., 2009; Roy et al., 2010; Goswami & Handique, 2013) และความเข้มข้นที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นจะมีความแตกต่างกันไปขึ้นกับสายพันธุ์ของกล้วย ดังรายงานของ Srangsam & Kanchanapoom (2007) พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยสา และกล้วยเล็บมือนาง สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด 4.9 และ 5.5 ยอด ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 5 mg.L^{-1} และรายงานของ Roy et al. (2010) รายงานผลของการใช้ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0.11 mg.L^{-1} สามารถชักนำให้กล้วย

พันธุ์ Malbhog เกิดยอดได้มากที่สุด แต่จากการวิจัยในครั้งนี้พบว่าการเติม BA เพียงอย่างเดียว หรือเติมร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม NAA ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยที่นำมาเพาะเลี้ยงแต่อย่างใด ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Al-Amin et al. (2009) รายงานว่าการเติม BA เข้มข้น 7.5 $mg.L^{-1}$ ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 $mg.L^{-1}$ ส่งเสริมให้กล้วยสายพันธุ์ BARI Banana-I เกิดจำนวนยอดมากที่สุด

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 $mg.L^{-1}$ ร่วมกับการเติมน้ำมะพร้าว 15% (อาหารสูตร M11 – M15) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% (M11) ดังภาพที่ 1 และตารางที่ 2 สามารถชักนำให้เกิดร้อยละการเกิดยอดสูงสุด 100 % จำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 2 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้ แตกต่างจากรายงานของ Muangkaewngam (2014) พบว่าการเติมน้ำมะพร้าว 15% ในอาหารเพาะเลี้ยงร่วมกับการเติม BA เข้มข้น 5 $mg.L^{-1}$ ส่งผลให้เกิดยอดรวมของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนปลายยอดของกล้วยหิน เพิ่มขึ้นถึง 58.94% อย่างไรก็ตามการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับน้ำมะพร้าวที่ระดับความเข้มข้น 15% ในกล้วยพันธุ์อื่นๆ สามารถกระตุ้นให้เกิดยอดจำนวนมากได้ดังรายงานของ Kanchanapoom & Promsorn (2011) พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของกล้วยหิน สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 22 μM ร่วมกับการเติมน้ำมะพร้าว 15% และสอดคล้องกับรายงานของ Kaewsompong et al. (1992) พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไข่ บนสูตรอาหาร MS ซึ่งมีน้ำมะพร้าว 15% และ BA เข้มข้น 5 $mg.L^{-1}$ สามารถชักนำให้เกิดต้น 3.33 ต้น/เนื้อเยื่อ 1 ชิ้น ภายในเวลา 1 เดือน ถ้ามีการตัดแบ่งทุก 6 สัปดาห์ ภายในเวลา 1 ปีสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้ประมาณ 14,000 ต้น

จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเติมน้ำมะพร้าวเพียงอย่างเดียวสามารถกระตุ้นให้มีร้อยละการสร้างชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด ซึ่งเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการเพิ่มปริมาณต้นกล้วยได้ หากเปรียบเทียบสูตรอาหารที่มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีราคาสูง เนื่องจากน้ำมะพร้าวที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นสามารถส่งเสริมและกระตุ้นการแบ่งเซลล์ให้เซลล์เพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโตได้ดีมากขึ้น (Neumann et al., 2009) เนื่องจากในน้ำมะพร้าวนั้นมีองค์ประกอบของกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก วิตามิน น้ำตาล และน้ำตาลแอลกอฮอล์ รวมถึงฮอร์โมนพืชในกลุ่มไซโตไคนิน ซึ่งล้วนส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ และการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตได้ดีของพืชเพาะเลี้ยง (Molnar et al., 2011)

ตารางที่ 2 ผลของการเติม BA ความเข้มข้น 0 - 7 $mg.L^{-1}$ ร่วมกับการเติมน้ำมะพร้าว 15% (v/v) ต่อการชักนำให้เกิดยอด และการเจริญเติบโตของกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	ร้อยละการชักนำให้เกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย/ชิ้นพืชเริ่มต้น	จำนวนใบเฉลี่ย/ชิ้นพืชเริ่มต้น	ความสูงเฉลี่ย (ซม.)/ต้น	จำนวนรากเฉลี่ย/ต้น
MS + 15% น้ำมะพร้าว	100 ± 0.00^{a}	2.00 ± 0.45^{ab}	3.40 ± 0.51	6.50 ± 0.65^{a}	1.40 ± 0.24^{b}
MS + 1 $mg.L^{-1}$ BA + 15% น้ำมะพร้าว	60 ± 6.32^{c}	1.00 ± 0.00^{b}	2.00 ± 0.63	4.40 ± 0.55^{b}	1.80 ± 0.37^{b}
MS + 3 $mg.L^{-1}$ BA + 15% น้ำมะพร้าว	20 ± 0.00^{d}	1.00 ± 0.32^{b}	3.00 ± 0.32	4.20 ± 0.22^{b}	1.40 ± 0.40^{b}
MS + 5 $mg.L^{-1}$ BA + 15% น้ำมะพร้าว	80 ± 3.16^{b}	2.60 ± 0.40^{a}	3.00 ± 0.71	5.50 ± 0.39^{ab}	4.00 ± 0.32^{a}
MS + 7 $mg.L^{-1}$ BA + 15% น้ำมะพร้าว	60 ± 5.47^{c}	2.40 ± 0.51^{a}	2.00 ± 0.00	1.80 ± 0.21^{c}	2.00 ± 0.00^{b}

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ย ($\bar{x} \pm$ S.E.) มีตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ($p<0.05$)

ภาพที่ 1 การเจริญของต้นอ่อนกล้วยน้ำว้ามะลิอ่องจากการเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอด บนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% (v/v) ร่วมกับการเติม BA เข้มข้น 0 mg.L^{-1} (ก) 1 mg.L^{-1} (ข) 3 mg.L^{-1} (ค) 5 mg.L^{-1} (ง) 5 mg.L^{-1} (จ) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (สเกลบาร์ = 1 ซม.)

2. ผลการย้ายต้นอ่อนของกล้วยน้ำมะลิอ่องออกปลูกในโรงเรือน

จากการนำต้นอ่อนกล้วยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีลำต้นและรากที่สมบูรณ์ ความสูงประมาณ 4-8 ซม. มีจำนวนใบไม่ต่ำกว่า 4 ใบ จำนวนรากไม่ต่ำกว่า 4 ราก ความยากรากอยู่ระหว่าง 3-5 ซม. ย้ายออกปลูกในสภาพโรงเรือน จากนั้นนำไปปลูกในวัสดุปลูก 2 ชนิด ได้แก่ สูตรที่ 1 ประกอบด้วยขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว : ทราย อัตราส่วน 1 : 1 : 1 และสูตรที่ 2 ประกอบด้วย ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว : ทราย อัตราส่วน 2 : 1 : 1 ปลูกเป็นเวลา 30 วัน บันทึกการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วย วัดความสูงของต้น จำนวนใบ และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของใบ พบว่าต้นกล้วยที่ย้ายจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมภายนอก (ภาพที่ 2, ตารางที่ 3) มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 100 เปอร์เซนต์ และลักษณะการเปลี่ยนแปลงของต้นอ่อนกล้วยที่ปลูกในวัสดุปลูกสูตรที่ 1 พบว่าลำต้นมีการเจริญเติบโต ใบมีสีเขียวอ่อน ความสูงเท่ากับ 10.4 ซม. จำนวนใบเท่ากับ 3 ใบ และในวัสดุปลูกสูตรที่ 2 พบว่าต้นอ่อนของกล้วยน้ำว้ามะลิอ่องมีการเจริญเติบโตดีกว่าสูตรที่ 1 ใบมีสีเขียว ความสูงของลำต้นเท่ากับ 16.8 ซม. จำนวนใบเท่ากับ 4 ใบ เนื่องจากในวัสดุปลูกสูตรที่ 2 มีอัตราส่วนของขี้เถ้าแกลบมากกว่าสูตรที่ 1 ซึ่งขี้เถ้าแกลบนี้มีคุณสมบัติช่วยในการปรับปรุงคุณภาพทางกายภาพของดิน เพราะมีรูพรุนจำนวนมากทำให้ดูดซับน้ำ และธาตุอาหารต่างๆ ในวัสดุปลูกพืชไว้ได้เป็นอย่างดี รวมทั้งยังช่วยลดสภาพความเป็นกรดในวัสดุปลูกและดินด้วย (Mariati, 2014) นอกจากนี้ยังมีรายงานการย้ายต้นอ่อนของกล้วยพันธุ์อื่นที่ออกปลูกในสภาพธรรมชาติแต่มีการใช้วัสดุปลูกที่แตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ ดังรายงานของ Al-Almin et al. (2009) ซึ่งสามารถย้ายต้นอ่อนของกล้วยพันธุ์ BARI Banana-I ออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้ดี เมื่อปลูกในวัสดุปลูกได้แก่ ดินร่วน : ปุ๋ยวัว ในอัตราส่วน 1 : 1 และรายงานของ Roy et al. (2011) ที่สามารถย้ายต้นอ่อนของกล้วยพันธุ์ Mabhog ออกปลูกในสภาพธรรมชาติและใช้วัสดุปลูกคือ ปุ๋ยอินทรีย์ : vermiculite : ดิน ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 โดยพบอัตราการรอดชีวิต 92% และรายงานของ Srangsam & Kanchanapoom (2003) ที่สามารถย้ายต้นอ่อนกล้วยสายพันธุ์ Gros Michel AAA group ที่เจริญมาจากชิ้นส่วนแคลลัส และย้ายออกปลูกในสภาพธรรมชาติ โดยมีอัตราการรอดชีวิต 100% ต้นกล้วยที่ได้มีลักษณะปกติเหมือนต้นกล้วยดังกล่าวในธรรมชาติ

ตารางที่ 3 ชนิดและอัตราส่วนของวัสดุปลูกต่อร้อยละการรอดชีวิต ความสูงเฉลี่ย และจำนวนใบเฉลี่ยของกล้วยที่ย้ายออกปลูกในสภาพโรงเรือน เมื่อย้ายออกปลูกนาน 30 วัน

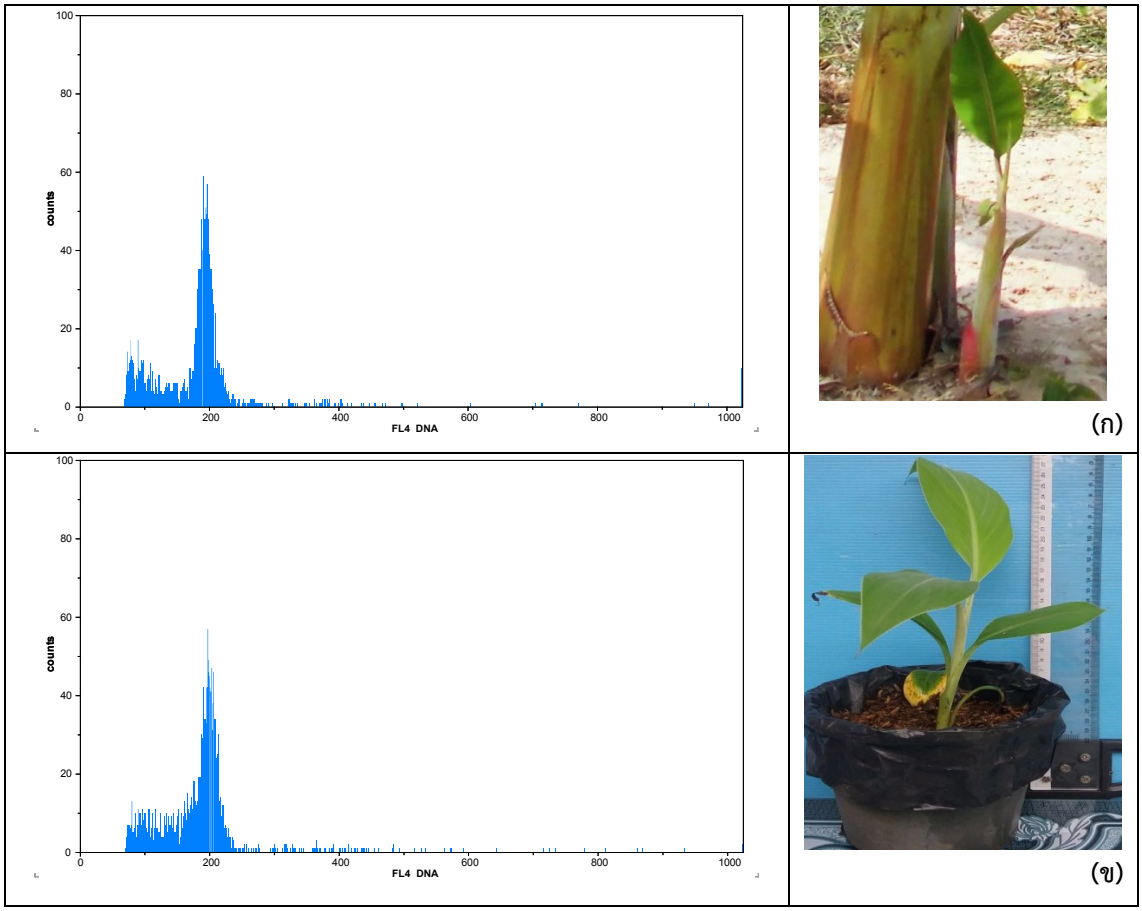
ชนิดของวัสดุปลูก	ร้อยละการรอดชีวิต	ความสูงเฉลี่ย (ซม.) /ต้น	จำนวนใบเฉลี่ย (ใบ) /ต้น
ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว : ทราย อัตราส่วน 1 : 1 : 1	100 ± 0.00	10.4 ± 1.16^{a}	3.00 ± 0.45
ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว : ทราย อัตราส่วน 2 : 1 : 1	100 ± 0.00	16.8 ± 0.86^{b}	4.00 ± 0.32

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$ ± S.E.) ตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Independent t-test ($p<0.05$)

ภาพที่ 2 ต้นกล้วยน้ำว้ามะลิอ่องที่ย้ายจากขวดเพาะเลี้ยงและนำออกปลูกในสภาพโรงเรือน เป็นเวลา 30 วัน
(ก) ต้นอ่อนกล้วยที่ปลูกในวัสดุปลูกสูตรที่ 1 (ขี้เถ้าแกลบ: ขุยมะพร้าว: ทราย อัตราส่วน 1: 1: 1)
(ข) ต้นอ่อนกล้วยที่ปลูกในวัสดุปลูกสูตรที่ 2 (ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว : ทราย อัตราส่วน 2 : 1 : 1)

3. ผลการวิเคราะห์ความคงตัวของระดับพลอยด์ดีของกล้วยน้ำว้ามะลิอ่องโดยวิธี Flow cytometry

จากการนำใบอ่อนกล้วยน้ำว้าจากต้นที่เจริญจากอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% อายุเพาะเลี้ยง 5 เดือน กับกล้วยน้ำว้าต้นพันธุ์ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ มาวิเคราะห์ความคงตัวของระดับพลอยด์ดีโดยวิธี Flow cytometry พบว่ากล้วยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และกล้วยที่ปลูกในสภาพธรรมชาติไม่พบความแตกต่างของระดับพลอยด์ดี (ภาพที่ 3) ซึ่งในการตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซมของพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะช่วยยืนยันความคงตัวของระดับพลอยด์ดีจากต้นกล้วยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยปกติการศึกษาจำนวนชุดโครโมโซมมักนิยมใช้เทคนิค Squash แต่มักจะประสบปัญหาในการนับจำนวนโครโมโซม เนื่องจากโครโมโซมของพืชมีขนาดเล็ก ดังนั้นการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอในพืชด้วยวิธี Flow cytometry จึงเป็นอีกวิธีที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาระดับพลอยด์ดีที่พบในพืชได้ (Srangsam & Kanchanapoom, 2007) ซึ่งจากการศึกษาระดับพลอยด์ดีของต้นกล้วยที่ปลูกในสภาพธรรมชาติและต้นอ่อนของกล้วยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น พบว่าระดับพลอยด์ดีของต้นกล้วยจากกการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนชุดโครโมโซม ซึ่งโดยปกติแล้วพืชที่ได้จากการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ เช่น ปลายยอด มักจะก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในอัตราที่ต่ำ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Srangsam & Kanchanapoom (2007) ศึกษาความคงตัวของระดับพลอยด์ดีของกล้วยสา และกล้วยเล็บมือนางที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและต้นในธรรมชาติ พบว่ากล้วยทั้งสองพันธุ์ไม่มีความแตกต่างของระดับพลอยด์ดี และมีระดับพลอยด์ดีเป็นดิพลอยด์ ($2n = 2x = 22$)



ภาพที่ 3 ผลการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยน้ำว้าจากต้นกล้วยที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ (ก) และต้นกล้วยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (ข) ที่ปลูกเป็นเวลา 4 เดือน

สรุปผลการวิจัย

สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยน้ำว้ามะลิอ่องคือ อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% (v/v) มีร้อยละการชักนำให้เกิดยอดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 2 ยอด/ชิ้นส่วนพืช และสามารถย้ายต้นอ่อนจากขวดเพาะเลี้ยงออกปลูกในสภาพโรงเรือนมีอัตรารอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อปลูกในวัสดุปลูกคือ ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว : ทราย ในอัตราส่วน 2 : 1 : 1 และเมื่อตรวจสอบความคงตัวของระดับพลอยด์ดีของต้นกล้วยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับต้นในสภาพธรรมชาติพบว่าไม่พบความแตกต่างของระดับพลอยด์ดี

References

Al-Almin, MD., Karim, M.R., Amin, M.R., Rahman, S. and Mamun, A.N.M. (2009). *In Vitro* Micropropagation of Banana (*Musa* spp.). *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 34(4), 645-659.

Bunnag, S. (2013). Plant Tissue Culture and Plant Gene Transfer. *Khon Kaen : KKU publishing*. (in thai).

Goswami, N.K. & Handique, P.J. (2013). Explants Size Response to *In Vitro* Propagation of *Musa* (Aaa group) 'Amritsagar' *Musa* (Aab group) 'Malbhog' and *Musa* (Aab group) 'Chenichampa' Banana. *Biotechnology*, 3(8), 40-43.

GÜbbÜk, H. & Pekmexci, M. (2004). *In Vitro* Propagation of Some New Banana Types (*Musa* spp.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 28, 355-361.

Habiba, U., Reza, S., Saha, M.L., Khan, M.R. & Hadiuzzaman, S. (2002). Endogenous Bacterial Contamination During *In vitro* Culture of Table Banana : Identification and Prevention. *Plant Tissue Culture*, 12(2), 117-124.

Hongthongkham, J. & Bunnag, S. (2014). *In Vitro* Propagation and Cryopreservation of *Aerides odorata* Lour. (Orchidaceae). Pakistan Journal of Biological Sciences, 17, 608 - 618.

Kaewsompong, S., Chunwongs, J., Wanichkul, K. & Silayoi, B. (1992). Effect of 6-Benzylaminopurine in Shoot Induction of *Musa* (aa group) Kluai Khai on Synthetic Medium. *Kasetsart Journal (Natural Sciences)*, 26(2), 115 – 118. (in thai).

Kanchanapoom, K. & Promsorn, N. (2011). The Influence of Explant Types and Oreintation on *In Vitro* Culture of *Musa balbisiana* 'Kluai Hin' (BBB group). *Notulae Scientia Biologicae*, 3(3), 89-92.

Mariati, N. (2014). Utilization of maize cob biochar and rice husk charcoal as soil amendments for improving acid soil fertility and productivity. *Journal of Degraded and Mining Lands Management*, 2(1), 223 - 230.

Molnár, Z., Virág, E. & Ördög, V. (2011). Natural Substances in Tissue Culture Media of Higher Plants. *Acta Biologica Szegediensis*, 55(1), 123-127.

Muangkaewngam, A. (2014). Micropropagation of Suba (*Musa sapientum* Lin.) *In Vitro* Through Shoot Tip Culture. *Songklanakarin Journal of Plant Science*, 1(3), 1-4. (in thai).

Murashige, T. & Skoog F. (1962). A revised medium for repid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantrum*, 15, 473 – 497.

Neumann, K-H, Kumar, A. & Imani J. (2009). *Plant cell and tissue culture – A Tool in Biotechnology. Basics and Application*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. Silayoi, B. (2015). Banana. Bangkok: KU publishing. (in thai).

Silayoi, B. (2015). Banana. Bangkok: KU publishing. (in thai).

Srangsam, A. & Kanchanapoom, K. (2003). Thidaiazuron Induced Plant Regeneration in Callus Culture of Triploid banana (*Musa* sp.) 'Gros Michel', AAA Group. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 25(6), 689-696.

Srangsam, A. & Kanchanapoom, K. (2007). Establishment of *In Vitro* Culture of *Musa* AA group 'Kluai Sa' and *Musa* AA Group 'Kluai Leb Mue Nang' and the Analysis of Ploidy Stability. *ScienceAsia*, 33, 437-442.

Roy, O.S., Bantawa, P., Ghosh, S.K., Teixeira da Silva, J.A., DebGhosh, P. & Mondal, T.K. (2010). Micropropagation and Field Performance of 'Malbhog' (*Musa paradisiaca*, AAB group): A Popular Banana Cultivar with High Keeping Quality of North East India. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 4 (Special Issue 1), 52-58.

คณะผู้เขียน

นางสาวนิดาพร สุธัญญรัตน์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ต.ในเมือง อ.เมือง จ.อุบลราชธานี 34000

e-mail: nadapasorn@gmail.com

ดร.ขวัญเดือน รัตนา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี ต.ในเมือง อ.เมือง จ.อุบลราชธานี 34000

e-mail: K_rattana@yahoo.com