รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
เรื่อง
การพัฒนาพันธุ์แก่นตะวันปลอดโรคโดยเทคนิคทาง เทคโนโลยีชีวภาพ
Development on disease free in Kaentawan (*Helianthus tuberosus* L.) using biotechnology

โดย

ผศ.ดร.สุมนา นีระ
นายปิยะวัชร ผาสุข
รศ.ดร.สนั่น จอกลอย

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ได้รับการสนับสนุนการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

กิตติกรรมประกาศ
(Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น จึงใคร่ขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

บทคัดย่อ

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 และ Hel 65 โดยใช้เนื้อเยื่อจากใบอ่อนในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA, IAA, IBA และ 2,4-D ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนใบอ่อนของแก่นตะวันทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ดี โดยเฉพาะในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดทั้งสองสายพันธุ์ ส่วนการเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนแก่นตะวันสองสายพันธุ์ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ kinetin, BA, และ TDZ ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้แต่จำนวนน้อยกว่าในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน จากการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินที่ได้จากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตรดังกล่าวพบว่าปริมาณอินนูลินที่ได้จากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินก็ให้ปริมาณอินนูลินมากกว่าในอาหารที่เติมไซโตไคนินทั้งสองสายพันธุ์ และจากการทดลองพบว่า ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและสายพันธุ์มีผลต่อปริมาณอินนูลินที่ผลิตได้จากเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบของแก่นตะวัน

Abstract

From tissue culture of Kaentawan cultivars JA89 and HEL 65 using young leaf on MS synthetic media supplemented with auxins such as NAA, IAA, IBA and 2,4-D at concentrations 0, 1, 3, 5, and 7 mg/l, found that on media supplemented with 1 mg/l of NAA induced high amount of callus on both 2 cultivars. For the media supplemented cytokinins such as kinetin, BA and TDZ at concentrations 0, 1, 3, 5, and 7 mg/l, were induced slightly callus if compared with media added with auxins. For amount of inulin was analyzed from callus of Kaentawan were cultured on media supplemented with auxins were higher than cytokinins in both 2 cultivars. The kind of growth regulators, concentration of growth regulators and cultivar had affected on amount of inulin which produced on tissue culture of young leave's Kaentawan.

สารบัญเรื่อง
(Table of Content)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	7
สารบัญภาพ	9
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	11
บทนำ	12
วิธีดำเนินการวิจัย	15
- วัสดุอุปกรณ์	15
- วิธีการวิจัย	15
การทดลองที่ 1 ผลของสารออกซินชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อนแก่นตะวันสองสายพันธุ์	16
การทดลองที่ 2 ผลของสารไซโตไคนินชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อนแก่นตะวันสองสายพันธุ์	16
การทดลองที่ 3 ปริมาณอินนูลินที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนแก่นตะวันสองสายพันธุ์ในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและกลุ่มไซโตไคนินที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน	17
- การวิเคราะห์และสกัดอินนูลิน	17
- ผลการทดลอง	17

การทดลองที่ 1 ผลของสารออกซินชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อน แก่นตะวันสองสายพันธุ์ 17

การทดลองที่ 2 ผลของสารไซโตไคนินชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อน แก่นตะวันสองสายพันธุ์ 21

การทดลองที่ 3 ปริมาณอินนูลินที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนแก่นตะวันสองสายพันธุ์ในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและกลุ่มไซโตไคนินที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน 24

- สรุปและวิจารณ์ 29
- เอกสารอ้างอิง 30

สารบัญตาราง
(List of Tables)

หน้า

ตารางที่ 1 น้ำหนักสดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อน ของแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA, IBA, NAA และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 18

ตารางที่ 2 น้ำหนักสดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อนของ แก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA, IBA, NAA และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 19

ตารางที่ 3 น้ำหนักสดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อน ของแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินได้แก่ kinetin, BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 22

ตารางที่ 4 น้ำหนักสดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อน ของแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินได้แก่ kinetin, BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 23

ตารางที่ 5 ปริมาณอินนูลิน (%) ที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 เดือน 24

ตารางที่ 6 ปริมาณอินนูลิน (%) ที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ 26

JA 89 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน
ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 เดือน
ตารางที่ 7 ปริมาณอินนูลิน (%) ที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ 27
HEL 65 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน
ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 เดือน
ตารางที่ 8 ปริมาณอินนูลิน (%) ที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ 28
HEL 65 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน
ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 เดือน

สารบัญภาพ
(List of Figures)

หน้า

ภาพที่ 1 น้ำหนักสดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อน ของแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA, IBA, NAA และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 19

ภาพที่ 2 น้ำหนักสดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อน ของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA, IBA, NAA และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 20

ภาพที่ 3 แคลลัสที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนของแก่นตะวันในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 ppm หลังจากเลี้ยงไว้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 20

ภาพที่ 4 แคลลัสที่ได้จากการชักนำใบอ่อนของแก่นตะวัน 2 สายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D หลังจากเลี้ยงไว้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 21

ภาพที่ 5 น้ำหนักสดแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินได้แก่ kinetin , BA, TDZ ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาพมีแสงจำนวน 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 22

ภาพที่ 6 น้ำหนักสดแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 23

กลุ่มไซโตไคนินได้แก่ kinetin , BA, TDZ ในระดับความเข้มข้น**ต่าง ๆ** ในสภาพมีแสงจำนวน 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ภาพที่ 7 ปริมาณอินนูลิน (%) ที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 เดือน 25

ภาพที่ 8 ปริมาณอินนูลิน (%) ที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 เดือน 26

ภาพที่ 9 ปริมาณอินนูลิน (%) ที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 เดือน 27

ภาพที่ 10 ปริมาณอินนูลิน (%) ที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 เดือน 28

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย
(List of Abbreviations)

MS	Murashige and Skoog media (1962)
IAA	Indole acetic acid
IBA	Indole butyric acid
NAA	Naphthalne acetic acid
2,4-D	2,4-dichlorophenoxy acetic acid
BA	6-benzylamino purine
kinetin	6-Furfurylaminopurine
TDZ	Thidiazuron
NaOH	Sodium hydroxide
HCl	Hydrochloric acid
ppm	part per million
DMRT	Duncan's Multiple Range Test
CRD	Completely Randomized Design

บทนำ
(Introduction)

พืชวงศ์ Asteraceae (Compositae) จัดเป็นไม้ล้มลุกเกือบทั้งหมด พบว่ามีไม้พุ่มและไม้ยืนต้นเพียงบางชนิดเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่ามีความหลากหลายทั้งรูปร่างและขนาด บางชนิดมีดอกสวยงาม นิยมนำมาเป็นไม้ดอกดอกไม้ประดับ ไม้วงศ์นี้ส่วนใหญ่มีช่อดอกสวยงาม เด่นสะดุดตา จึงนิยมนำมาปลูกเป็นไม้ประดับ อาจปลูกรวมกันเป็นกลุ่ม และมีอีกหลายชนิดที่เป็นวัชพืชขึ้นอยู่ทั่วไป ได้แก่ กลุ่มพืชเก๊กฮวย, เบญจมาศ (*Chrysanthemum indicum* L.) สาบเสือ (*Eupatorium odoratum* L.) ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) หมอน้อย (*Vernonia cinerea* Less.) บานชื่น (*Zinnia elegans* Lacq.) นอกจากความสวยงามแล้วพืชวงศ์ Asteraceae บางชนิดยังจัดอยู่ในกลุ่มของพืชสมุนไพร เช่น ชาจากดอกเบญจมาศ (*C. indicum* L.) ที่ผลิตจากดอกเบญจมาศอบแห้ง หรือที่เรียกว่าน้ำเก๊กฮวย ช่วยคลายร้อน กระตุ้นการไหลเวียนของโลหิต และแก่นตะวัน (*H. tuberosus* L.) ในหัวแก่นตะวันมีสารสำคัญ คือ อินนูลิน ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทฟรุกแทน เมื่อรับประทานเข้าไปแล้วจะไม่ถูกย่อยในระบบทางเดินอาหารส่วนบน แต่จะถูกย่อยได้โดยกระบวนการหมักในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์โดยจุลินทรีย์ Bifidobacteria และ Lactobacillus มีประโยชน์สำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยช่วยป้องกันโรคอ้วน ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเบาหวานประเภท 2 ลดไขมันในเลือด ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจและสร้างภูมิคุมกันโรค (นิมิตร และสนั่น, 2549)

แก่นตะวัน หรือ Jerusalem artichoke เป็นพืชหัวที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus tuberosus* L. อยู่ในวงศ์ Asteraceae เป็นพืชที่อยู่ในสกุลเดียวกับทานตะวัน มีถิ่นกำเนิดในแถบทวีปอเมริกาเหนือ ปัจจุบันมีการปลูกทั่วไปในประเทศอเมริกา แคนาดา ฝรั่งเศส อิตาลี รัสเซีย จีน อินเดีย ประเทศในแถบอัฟริกากลางและทางตอนใต้ของประเทศออสเตรเลีย (Verveide, 1996) ประเทศญี่ปุ่นมีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับความสำคัญของเยรูซาเล็มอาร์ติโชคมากมาย (Kikuimo Society, 2005) แก่นตะวันยังถูกนำมาใช้ประโยชน์มากมาย จากคุณสมบัติการช่วยเจริญ

อาหาร การะตุ้นการหลั่งของน้ำดี ขับปัสสาวะ ใช้เป็นยาระบาย กระตุ้นการสร้างอสุจิ และใช้เป็นยาพื้นบ้านในการรักษาโรคเบาหวาน และไขข้ออักเสบ หรือใช้ส่วนหัวประกอบอาหาร ขนม เบเกอรี่ ไอศกรีมและผลิตไวน์ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งของพลังงานเชื้อเพลิงแอลกอฮอล์ (Cosgrove et al., 1991) acetone, butanol และ ethanol ได้อีกด้วย (Denoroy, 1996) ส่วนลำต้นใช้ทำพืชหมัก (siliage) เพื่อเป็นอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง และใช้เป็นอาหารเสริมในสุกรโดยทำให้ปริมาณแอมโมเนียในลำไส้และในกระแสเลือดลดลง มีผลยับยั้งสารก่อมะเร็ง มีผลต่อการสังเคราะห์ไขมันในตับและส่งผลในระดับไขมันและคอเลสเทอรอลในเลือดลดลง (Younes et al, 1995; Schijver, 2001; Kaur and Gupta, 2002; Summart et.al, 2006) แก่นตะวันเป็นพืชที่ได้รับความสนใจในหลายประเทศที่จะนำมาใช้เป็นพืชทางเลือกใหม่ เนื่องจากแก่นตะวันเป็นพืชที่จัดว่าเป็นทั้งพืชสมุนไพร พืชพลังงาน พืชอาหาร และไม้ดอกไม้ประดับ จากงานวิจัยที่ผ่านมานั้นพบว่าแก่นตะวันมีสารสำคัญได้แก่ อินนูลินซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทฟรุ๊กโตสต่อกันเป็นสายยาวที่ปลายมีกลูโคสมาเชื่อมต่อ ซึ่งไม่สามารถย่อยในทางเดินอาหารส่วนบนได้ แต่จะเป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดดีในลำไส้ใหญ่ เช่น lactobacillus และ bifodobacteria ซึ่งจากรายงานการวิจัยพบว่า อินนูลินสามารถลดน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานชนิด 2 ได้ อินนูลินอยู่ในกระเพาะอาหารนานขึ้นและลดเวลาที่อยู่ในลำไส้เล็กลง ทำให้การดูดซึมเกิดขึ้นได้น้อย อินนูลินได้รับการรับรองว่าเป็นพรีไบโอติกที่ดีที่สุด ด้วยเหตุที่กล่าวมาจึงกล่าวได้ว่าแก่นตะวันเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่ง นอกจากจะใช้แก่นตะวันในแง่ของสมุนไพรในคนแล้ว ยังมีงานวิจัยพบว่าสามารถใช้แก่นตะวันได้ดีในสัตว์เช่นสุกร อีกด้วย

แก่นตะวันเป็นพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจชนิดใหม่ของไทย สำหรับการผลิตในประเทศไทยได้มีการศึกษาวิจัยแบบสหวิทยาการของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้มีการศึกษาวิจัยถึงสารสำคัญในแก่นตะวัน บทบาทของแก่นตะวันในอาหารสัตว์ การใช้แก่นตะวันเป็นพืชพลังงานทดแทน ศักยภาพการผลิตแก่นตะวันในสภาพการเพาะปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ศึกษาการให้ผลผลิตอิทธิพลของการใช้ปุ๋ยอินทรีย์และเคมีในการผลิตแก่นตะวัน ระยะเวลาเก็บเกี่ยวแก่นตะวันที่เหมาะสม

และการศึกษาค่าความหวานของแก่นตะวัน (เยาวมาลย์และคณะ, 2006: สนั่นและคณะ, 2006: นิมิตรและสนั่น, 2006, สนั่นและคณะ, 2006) และยังได้มีการส่งเสริมการผลิตแก่นตะวันไปสู่เกษตรกร จากการปลูกและศึกษาแก่นตะวันที่ผ่านมาพบว่า เริ่มมีการระบาดของโรคที่ติดมากับหัวพันธุ์เช่นโรคโคนเน่า โรครากเน่าและโรคหัวเน่า จากปัญหาดังกล่าวจึงต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้น ซึ่งเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพอันได้แก่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เพื่อแก้ไขปัญหาโรคที่ติดมากับหัวพันธุ์ได้ จากการศึกษาของ Gamborg et al., 1999 พบว่าการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตหัวย่อยปลอดโรคกับ Jerusalem artichoke เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการเก็บรักษาหัวพันธุ์เพื่อการขยายพันธุ์พืชปลอดโรค นอกจากนี้จะพบว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้ยังเป็นเทคนิคขั้นพื้นฐานสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชที่ได้รับความนิยมกันอยู่ในปัจจุบันและอนาคต ซึ่งผลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้จะนำไปสู่การใช้เทคนิคขั้นสูงในการปรับปรุงพันธุ์แก่นตะวันในประเทศไทยเพื่อให้ได้สายพันธุ์แก่นตะวันที่มีสารอินนูลินสูงที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการค้าและอุตสาหกรรมของประเทศไทยต่อไป

ปัจจุบันได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกแก่นตะวัน เนื่องจากสามารถนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้มากมายเช่น อาหาร ได้แก่ ไอศกรีม ขนมปัง เบเกอรี่ ขนมหวาน แก่นตะวันเชื่อม สลัดแก่นตะวัน และปรุงอาหารอื่น ๆ ได้หลากหลายชนิด แต่จากการส่งเสริมการปลูกแก่นตะวันได้พบว่าโรคหลายชนิดที่ติดมากับหัวพันธุ์ เช่น เชื้อ Sclerotium, Phytophthora, Pythium ที่ก่อให้เกิดโรคโคนเน่า รากเน่าและหัวเน่า ซึ่งโรคดังกล่าวจะทำอันตรายให้แก่แก่นตะวันอย่างมาก ดังนั้นการใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพอันได้แก่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตหัวย่อยปลอดโรค จึงเป็นช่องทางที่สำคัญในการแก้ปัญหาการระบาดของโรคที่ติดกับหัวไปยังพื้นที่ใหม่ ดังนั้นการใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพได้แก่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงเป็นช่องทางที่สำคัญในการแก้ไขปัญหาการระบาดของโรคที่ติดกับหัวไปยังพื้นที่ใหม่ การวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาปริมาณสารอินนูลินที่ได้จากต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อนำไปใช้ในการผลิตแก่นตะวันปลอดโรคที่มีสารอินนูลิน ปริมาณมากในเชิงการค้า และเป็นแนวทางในการพัฒนาพันธุ์แก่นตะวันสายพันธุ์ดีต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย
(Materials & Methods)

วัสดุและอุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้แก่ ชิ้นส่วนใบอ่อนของแก่นตะวัน สองสายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ JA 89 และ HEL 65

2. สารเคมีที่ใช้ในการทดลองได้แก่ สารเคมีในสูตรอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS), สารฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (sodium hypochlorite ซึ่งมีชื่อการค้าว่า คลอร๊อกซ์), สารกำจัดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา, สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินได้แก่ BA (6-benzylamino purine), kinetin (6-Furfurylaminopurine), TDZ (Thidiazuron) และสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA (Indole acetic acids), IBA (Indole butyric acid), NAA (Naphthalene acetic acid), 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid), NaoH (Sodium chloride), HCl (hydrochloric acid) และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารอินนูลินตามวิธีของ วิภาวีและจันทนี (2551)

3. เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหารสังเคราะห์และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ เครื่องชั่ง 2, 3 และ 4 ตำแหน่ง, เครื่องปรับความเป็นกรดเป็นด่าง, หม้อนึ่งความดันไอ, ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ, ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ, เครื่องมือผ่าตัด เครื่อง freeze dryer ฯลฯ

4. เครื่องแก้วที่ใช้ในการเตรียมอาหารสังเคราะห์และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ กระบอกตวง, ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ, จานเลี้ยงเนื้อเยื่อ, ปิเปต ฯลฯ

วิธีการวิจัย

การทดลองนี้ได้แบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อย โดยการทดลองที่ 1 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่มีต่อการเจริญเติบโตของใบอ่อนแก่นตะวัน การทดลองที่ 2

ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่มีต่อการเจริญเติบโตของใบอ่อนของแก่นตะวัน และการทดลองที่ 3 ได้นำแคลลัสจากการทดลองที่ 1 และ 2 มาศึกษาปริมาณอินนูลินที่มีอยู่ในแคลลัสที่ได้เลี้ยงในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและปริมาณที่แตกต่างกันกับแก่นตะวันสองสายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ JA 89 และ HEL 65 ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

<u>การทดลองที่ 1 ผลของสารออกซินชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อนแก่นตะวันสองสายพันธุ์</u>

นำชิ้นส่วนแก่นตะวันได้แก่ ใบอ่อน สองสายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ JA 89 และ HEL 65 มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้น 2% และนำชิ้นส่วนที่ได้ล้างน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ตัดชิ้นส่วนที่ใบอ่อนที่ฟอกฆ่าเชื้อ มาตัดให้ได้ขนาด 1x1 ซม. แล้วนำเลี้ยงลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3% ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA, IBA, IAA, 2,4-D ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5 และ 7 ppm เลี้ยงในขวดขนาด 4 ออนซ์ ที่เติมอาหารสังเคราะห์ขวดละ 20 มล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ภายในห้องที่ให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 10 ซ้ำ บันทึกน้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้น จำนวนต้นและ/หรือรากที่เกิดขึ้น วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย t-test

<u>การทดลองที่ 2 ผลของสารไซโตไคนินชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนแก่นตะวันสองสายพันธุ์</u>

นำชิ้นส่วนแก่นตะวันได้แก่ ใบอ่อน สองสายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ JA 89 และ HEL 65 มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้น 2% และนำชิ้นส่วนที่ได้ล้างน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ตัดชิ้นส่วนที่ใบอ่อนที่ฟอกฆ่าเชื้อ มาตัดให้ได้ขนาด 1x1 ซม. แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3% ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ BA, kinetin และ TDZ ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5 และ 7 ppm เลี้ยงในขวดขนาด 4 ออนซ์ ที่เติมอาหารสังเคราะห์ขวดละ 20 มล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ภายในห้องที่ให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 10 ซ้ำ บันทึกน้ำหนักแคลลัสที่เพิ่ม

ขึ้น จำนวนต้นและ/หรือรากที่เกิดขึ้น วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

<u>การทดลองที่ 3 ปริมาณอินนูลินที่ได้จากแคลลัสใบอ่อนแก่นตะวันสองสายพันธุ์ในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน และกลุ่มไซโตไคนินที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน</u>

นำแคลลัสหรือหัวย่อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการทดลองที่ 1 และ 2 มาวิเคราะห์หาปริมาณอินนูลิน ตามวิธีของวิภาวีและจันทนี (2551) โดยแต่ละหน่วยทดลองมี 3 ซ้ำ เก็บข้อมูลจากทุกซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ย และนำข้อมูลที่ได้มา plot graph

<u>การวิเคราะห์และสกัดอินนูลิน</u>

นำแคลลัสที่ได้จากการทดลองในการทดลองที่ 1 มาทำแห้งเพื่อให้ได้ผงแก่นตะวันโดยวิธีแช่แข็งระเหิด (Freeze dryer) และวิเคราะห์หาปริมาณอินนูลิน (32-32AACC 2004) ตามวิธีของวิภาวีและจันทนี (2551)

<u>สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล</u>

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สาขาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผลการทดลอง

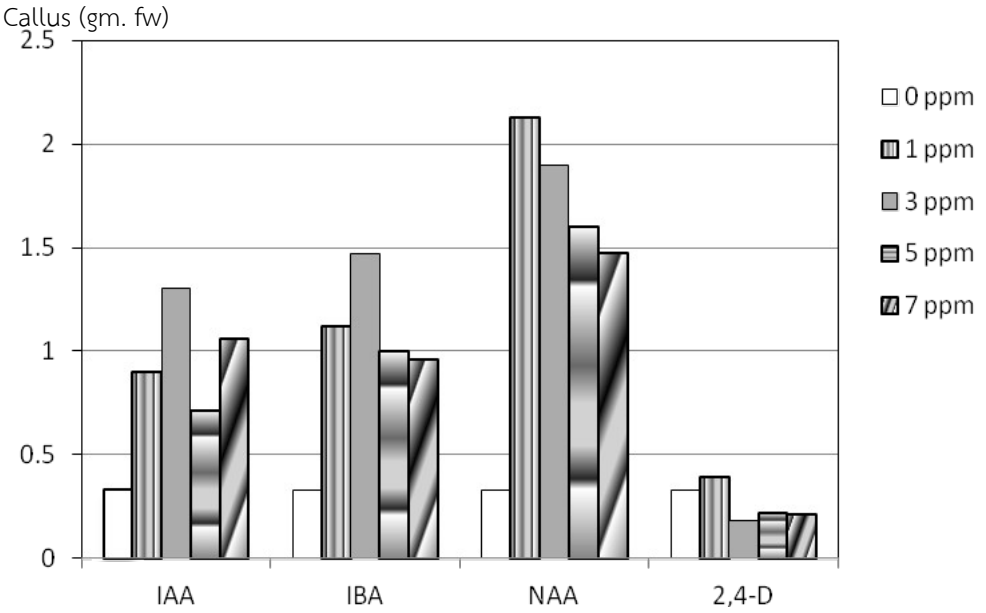
<u>การทดลองที่ 1 ผลของสารออกซินชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อนแก่นตะวันสองสายพันธุ์</u>

จากการนำใบอ่อนของแก่นตะวันมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA, IAA, IBA หรือ 2,4-D ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5, 7 ppm เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า หลังจากที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2-3 วันใบอ่อนมีการโค้งงอและขยายขนาดขึ้น แสดงให้เห็นว่าใบอ่อนมีการตอบสนองต่อ auxins ที่เพิ่มลงไป เมื่อเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์มีการเกิดแคลลัสบนชิ้นส่วนของใบอ่อน และเมื่อเลี้ยงต่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์เกิดแคลลัสขึ้นทั่ว

ชิ้นส่วนของใบอ่อนในทุกความเข้มข้น โดยที่ในอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 ppm สามารถชักนำให้ใบอ่อนของแก่นตะวัน 2 สายพันธุ์เกิดแคลลัสได้มากที่สุด (2.16 กรัมต่อชิ้นส่วนในสายพันธุ์ JA 89 (ตารางที่ 1) และ 2.13 กรัมต่อชิ้นส่วนในสายพันธุ์ HEL 65 (ตารางที่ 2) ส่วนในอาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 3 ppm สามารถชักนำให้ใบอ่อนของแก่นตะวันเกิดรากได้ดีที่สุดในสายพันธุ์ JA 89 (4 รากต่อชิ้นส่วน) ซึ่งต่างจากใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 ที่เกิดรากได้ดีที่สุดในอาหารที่เติม IBA เข้มข้น 5 ppm (3 รากต่อชิ้นส่วน) (ตารางที่ 3, ภาพที่ 1, ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 น้ำหนักสดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อนของแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA, IBA, NAA และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

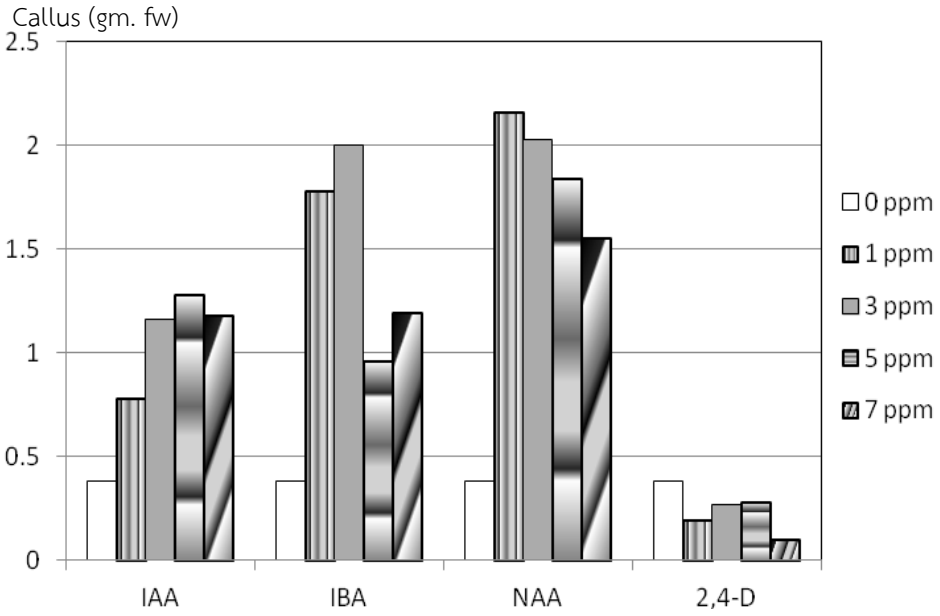
ความเข้มข้น (ppm)	น้ำหนักแคลลัส (กรัมต่อชิ้นส่วน)			
	IAA	IBA	NAA	2,4-D
0	0.33^{c}	0.33^{b}	0.33^{d}	0.33^{a}
1	0.90^{ab}	1.12^{a}	2.13^{a}	0.39^{a}
3	1.30^{a}	1.47^{a}	1.90^{b}	0.18^{b}
5	0.71^{bc}	1.00^{a}	1.60^{c}	0.22^{b}
7	1.06^{ab}	0.96^{a}	1.47^{c}	0.21^{b}
F-test	**	**	**	**
CV (%)	33.30	35.55	6.79	15.90



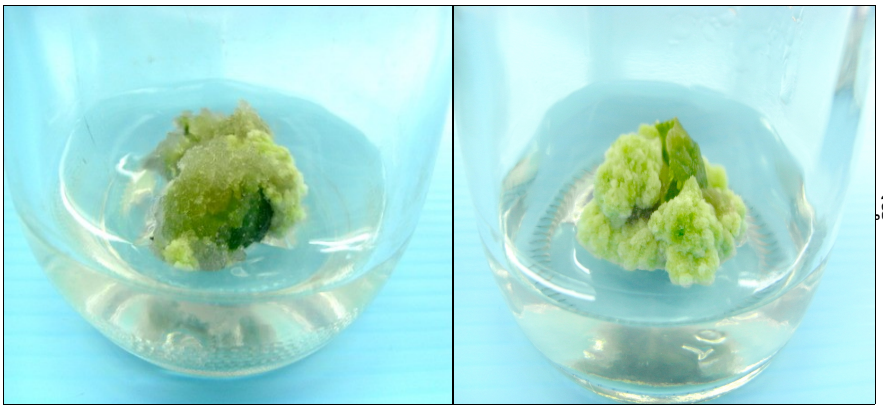
ภาพที่ 1 น้ำหนักสดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อนของแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA, IBA, NAA และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 2 น้ำหนักสดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อนของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA, IBA, NAA และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้น (ppm)	น้ำหนักแคลลัสที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อชิ้นส่วน)			
	IAA	IBA	NAA	2,4-D
0	0.38^{a}	0.38^{c}	0.38^{d}	0.38^{a}
1	0.78^{bc}	1.78^{a}	2.16^{a}	0.19^{bc}
3	1.16^{ab}	2.00^{a}	2.03^{ab}	0.27^{b}
5	1.28^{a}	0.96^{b}	1.84^{b}	0.28^{b}
7	1.18^{a}	1.19^{b}	1.55^{c}	0.10^{c}
F-test	**	**	**	**
CV (%)	31.60	27.58	9.08	30.08



ภาพที่ 2 น้ำหนักสดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อนของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA, IBA, NAA และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์



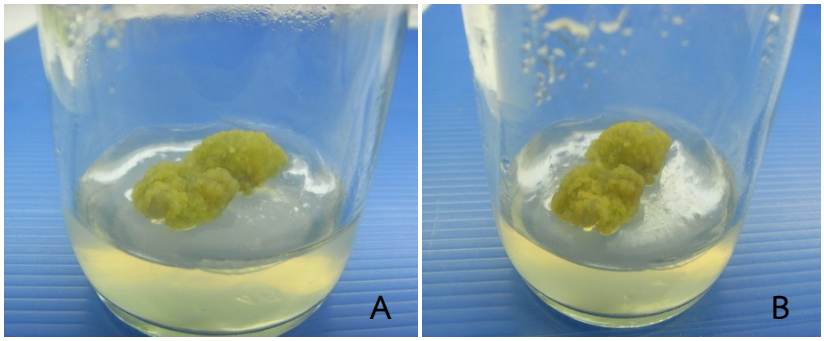
AB

เยื่อใบอ่อนของแก่นตะวันในอ

AB

NAA

ความเข้มข้น 1 ppm หลังจากเลี้ยงไว้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (A : แก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 B : แก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65)



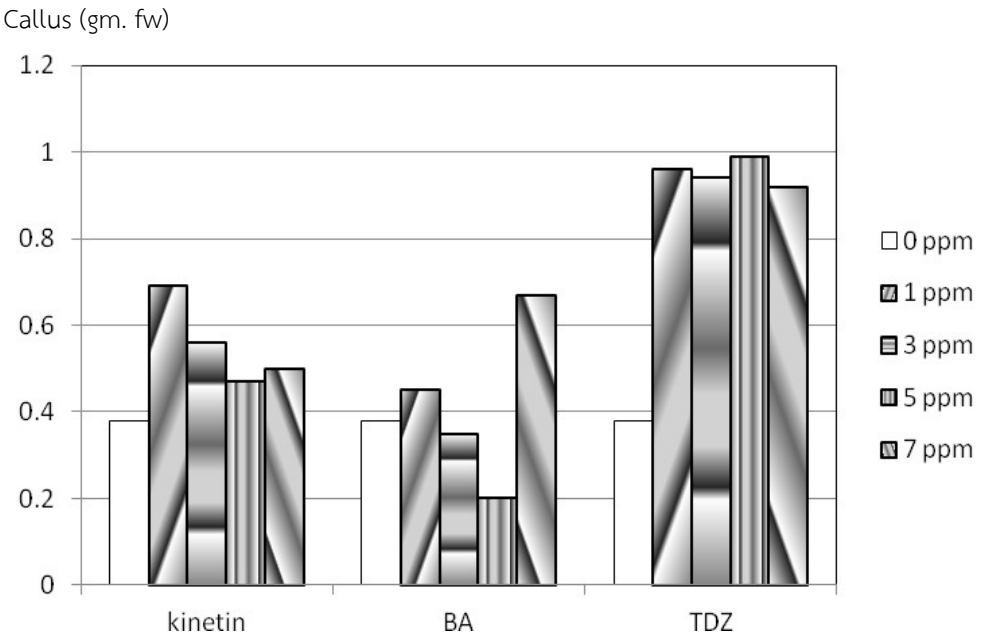
ภาพที่ 4 แคลลัสที่ได้จากการชักนำใบอ่อนของแก่นตะวัน 2 สายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D หลังจากเลี้ยงไว้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (A : สายพันธุ์ JA 89, B: สายพันธุ์ HEL65)

การทดลองที่ 2 ผลของสารไซโตไคนินชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนแก่นตะวันสองสายพันธุ์

จากการนำใบอ่อนของแก่นตะวันมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA, kinetin หรือ TDZ ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5, 7 ppm เป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 2-3 วัน พบว่าใบอ่อนโค้งงอและขยายขนาดขึ้น แสดงให้เห็นว่าใบอ่อนตอบสนองต่อไซโตไคนินที่เติมลงไป หลังจากเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์มีการขยายขนาดขึ้นแต่ไม่มีการเกิดแคลลัส และเมื่อครบสัปดาห์ที่ 4 พบว่าเริ่มมีการตายและไม่มีการพัฒนาต่อ โดยที่ในอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1 ppm สามารถชักนำให้ใบอ่อนของแก่นตะวันทั้ง 2 สายพันธุ์เพิ่มน้ำหนักสดจากเดิมได้ดี (0.96 กรัมต่อชิ้นส่วนในสายพันธุ์ JA 89 และ 1.01 กรัมต่อชิ้นส่วน ในสายพันธุ์ HEL 65 ตามลำดับ) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 น้ำหนักสดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อนของแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินได้แก่ kinetin, BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

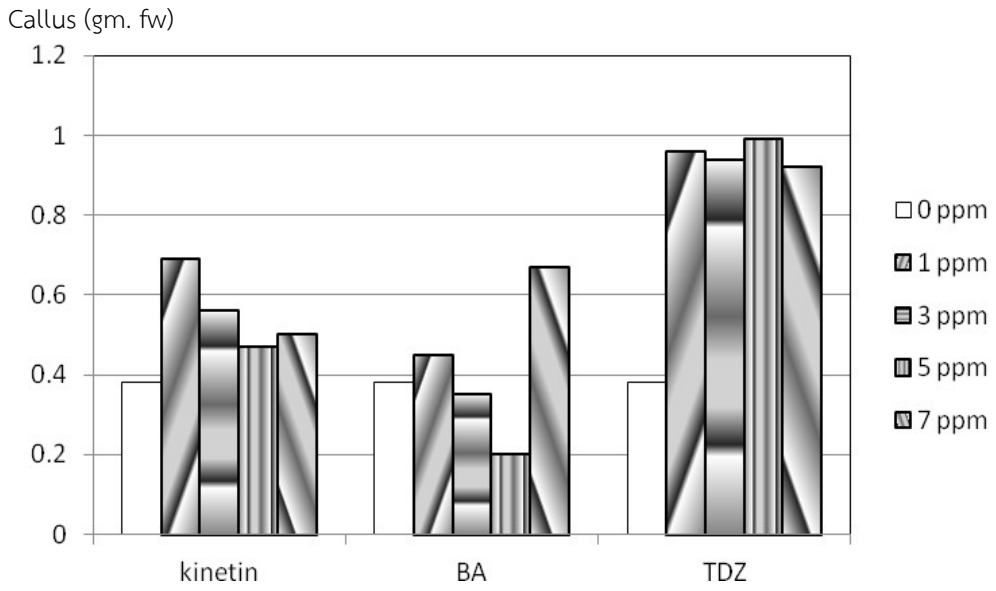
ความเข้มข้น	น้ำหนักสดแคลลัส (กรัมต่อชิ้นส่วน)		
(ppm)	Kinetin	BA	TDZ
0	0.38[a]	0.38[a]	0.38[a]
1	0.69[d]	0.45[b]	0.96[b]
3	0.56[c]	0.35[a]	0.94[b]
5	0.47[b]	0.20[a]	0.99[b]
7	0.50[bc]	0.67[c]	0.92[b]
F-test	**	**	**
CV (%)	32.2	21.5	15.8



ภาพที่ 5 น้ำหนักสดแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินได้แก่ kinetin ,BA, TDZ ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาพมีแสงจำนวน 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 4 น้ำหนักสดของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อนของแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินได้แก่ kinetin, BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้น	น้ำหนักสดแคลลัส (กรัมต่อชิ้นส่วน)		
(ppm)	Kinetin	BA	TDZ
0	0.33[a]	0.33[a]	0.33[a]
1	0.69[d]	0.52[b]	1.01[b]
3	0.55[c]	0.28[a]	0.91[b]
5	0.46[b]	0.19[a]	0.95[b]
7	0.48[bc]	0.18[a]	0.98[b]
F-test	**	**	**
CV (%)	38.54	32.05	20.12



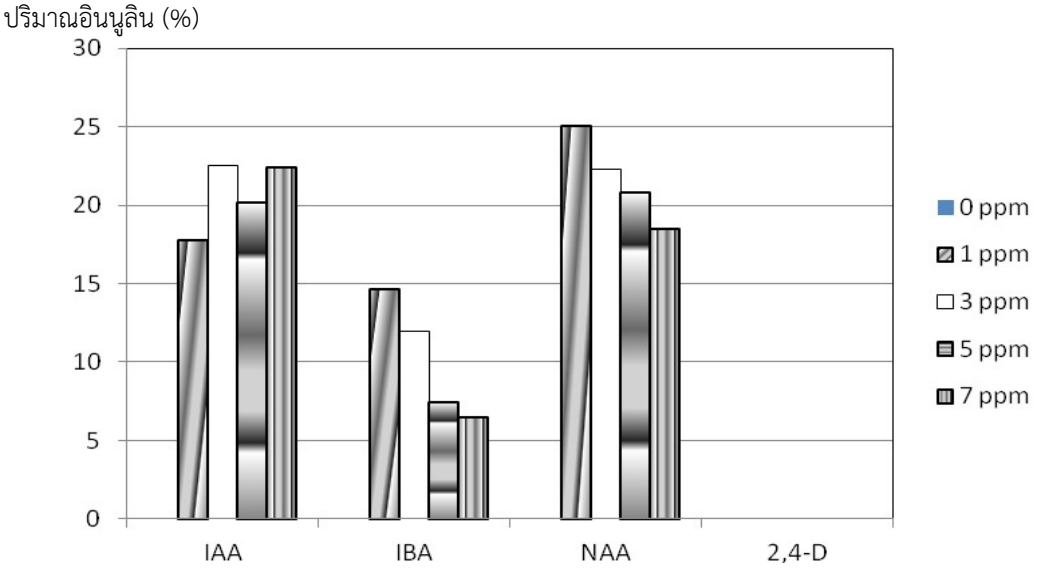
ภาพที่ 6 น้ำหนักสดแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินได้แก่ kinetin ,BA, TDZ ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาพมีแสงจำนวน 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

<u>การทดลองที่ 3 ปริมาณอินนูลินที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนแก่นตะวันสองสายพันธุ์ในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน และกลุ่มไซโตไคนินที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน</u>

นำแคลลัสจำนวน 100 กรัม น้ำหนักสด ในแต่ละหน่วยทดลองจากการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2 มาทำให้แห้งเป็นผงด้วยวิธีการแช่แข็งระเหิด (freeze dryer) ตามวิธีของวิภาวีและจันทนี (2551) และวิเคราะห์หาปริมาณอินนูลิน (32-32 AACC 2004) พบว่า จากการเลี้ยงแคลลัสที่ได้จากใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ในอาหารที่เติม 2,4-D จะสามารถเลี้ยงแคลลัสได้เพียง 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นแคลลัสจะตายหมดในทุกความเข้มข้น และแคลลัสที่ได้ในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดใดเลยก็ไม่สามารถผลิตอินนูลินได้ ส่วนในอาหารที่เติม NAA มีแนวโน้มที่จะมีปริมาณอินนูลินมากกว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม IAA และ IBA ส่วนในอาหารที่เติม IBA มีแนวโน้มที่จะผลิตอินนูลินได้น้อยที่สุด และในอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 ppm มีปริมาณอินนูลินมากที่สุด (25.02%) (ตารางที่ 5 และภาพที่ 7)

ตารางที่ 5 ปริมาณอินนูลิน (%) ที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 เดือน

ความเข้มข้น	ปริมาณอินนูลิน (%)			
(ppm)	IAA	IBA	NAA	2,4-D
0	0	0	0	0
1	17.78 ± 4.5	14.61 ± 3.48	25.02 ± 4.03	0
3	22.51 ± 6.15	11.97 ± 4.01	22.25 ± 2.80	0
5	20.17 ± 3.5	7.47 ± 2.52	20.81 ± 2.99	0
7	22.38 ± 6.52	6.51 ± 1.15	18.51 ± 0.56	0

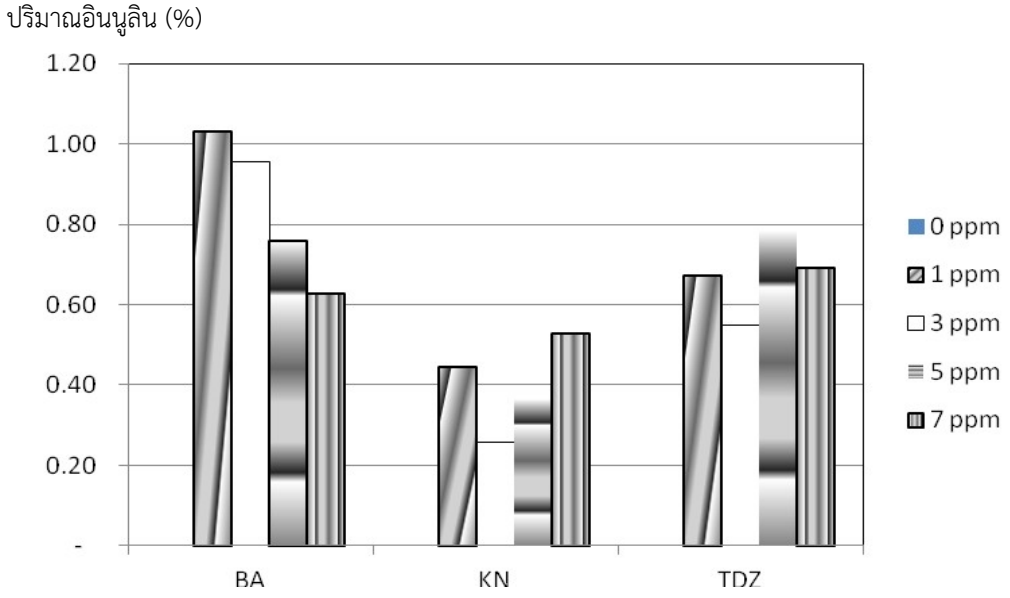


ภาพที่ 7 ปริมาณอินนูลิน (%) ที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 เดือน

สำหรับในอาหารที่เติมไซโตไคนินได้แก่ BA, kinetin และ TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5 และ 7 ppm พบว่า มีปริมาณอินนูลินน้อยกว่าในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน (ตารางที่ 6 และภาพที่ 8) และพบว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสาร BA มีปริมาณอินนูลินมากกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม kinetin และ TDZ โดยเฉพาะในอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 ppm ให้ปริมาณอินนูลินมากที่สุด แต่ยังน้อยกว่าในอาหรที่เติมออกซินมาก

ตารางที่ 6 ปริมาณอินนูลิน (%) ที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 เดือน

ความเข้มข้น (ppm)	ปริมาณอินนูลิน (%)		
	BA	Kinetin	TDZ
0	0	0	0
1	1.03 ± 0.51	0.44 ± 0.42	0.67 ± 0.40
3	0.96 ± 0.42	0.26 ± 0.17	0.55 ± 0.06
5	0.76 ± 0.28	0.36 ± 0.20	0.78 ± 0.11
7	0.63 ± 0.34	0.53 ± 0.07	0.69 ± 0.18



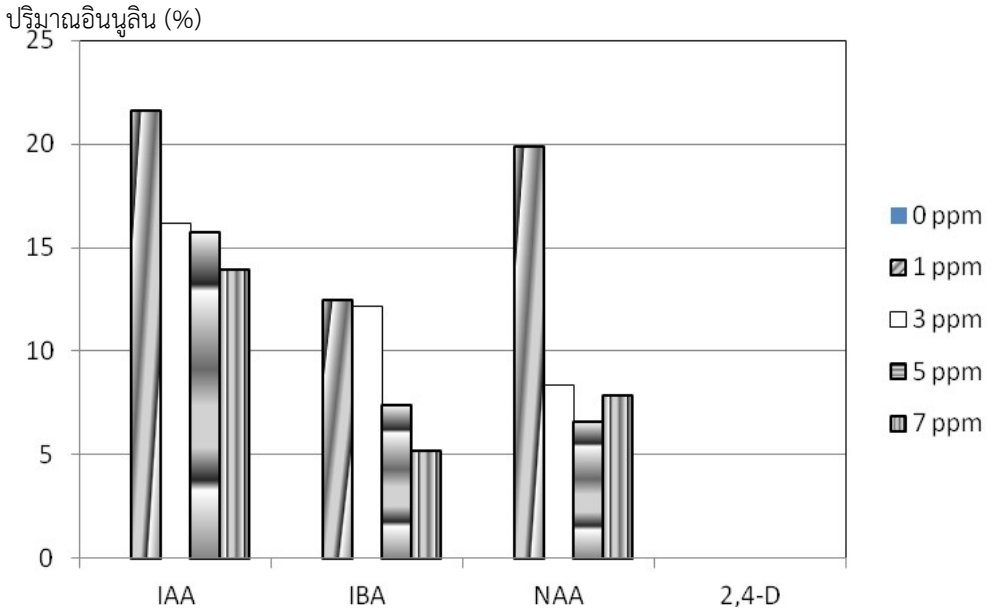
ภาพที่ 8 ปริมาณอินนูลิน (%) ที่ได้จากแคลลัสจากใบอ่อนของแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 เดือน

สำหรับการเพาะเลี้ยงใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 ในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันพบว่าให้ผลเช่นเดียวกับแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89

คือ แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D ในทุกความเข้มข้นสามารถเจริญเติบโตได้เพียง 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นแคลลัสก็จะเปลี่ยนเป็นสีดำและตายในที่สุด แต่พบว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IAA ให้ผลที่ดีกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IBA และ NAA ดังตารางที่ 7 และภาพที่ 9

ตารางที่ 7 ปริมาณอินนูลิน (%) ที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 เดือน

ความเข้มข้น	ปริมาณอินนูลิน (%)			
(ppm)	IAA	IBA	NAA	2,4-D
0	0	0	0	0
1	21.64 ± 4.83	12.49 ± 2.55	19.85 ± 2.06	0
3	16.18 ± 2.7	12.18 ± 2.64	8.37 ± 3.01	0
5	15.72 ± 4.00	7.42 ± 2.38	6.57 ± 1.38	0
7	13.96 ± 3.67	5.17 ± 1.50	7.85 ± 1.49	0

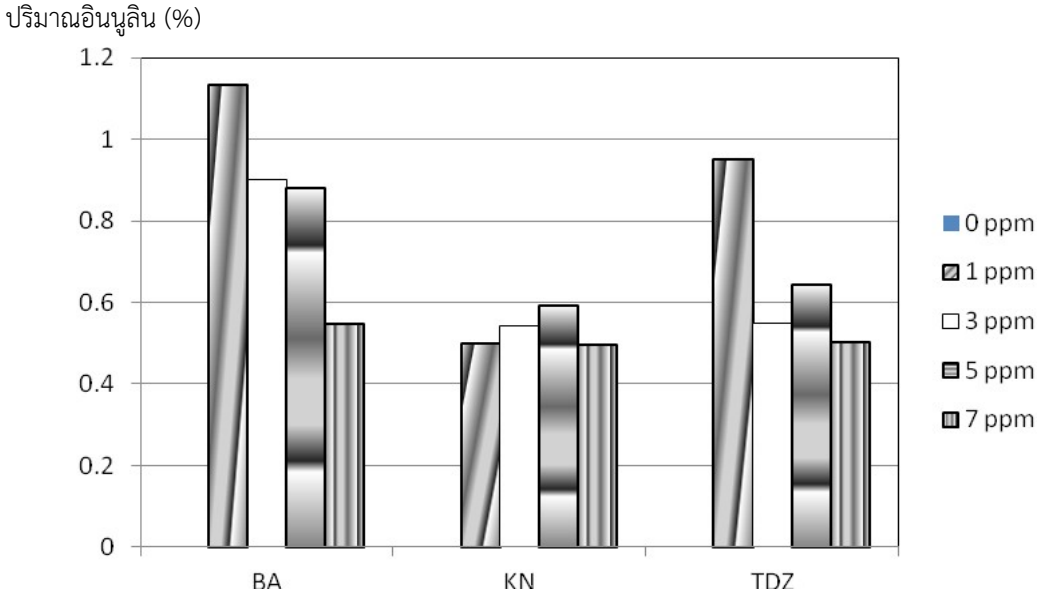


ภาพที่ 9 ปริมาณอินนูลิน (%) ที่ได้จากแคลลัสจากใบอ่อนของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 เดือน

ส่วนแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 ในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน พบว่า แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม BA ที่ความเข้มข้น 1 ppm ให้ปริมาณอินนูลินสูงสุด 1.13% (ตารางที่ 8 และภาพที่ 10) ส่วนแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่เติม kinetin ให้ปริมาณอินนูลินน้อยที่สุด

ตารางที่ 8 ปริมาณอินนูลิน (%) ที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 เดือน

ความเข้มข้น (ppm)	ปริมาณอินนูลิน (%)		
	BA	Kinetin	TDZ
0	0	0	0
1	1.13 ± 0.34	0.50 ± 0.30	0.95 ± 0.14
3	0.90 ± 0.29	0.54 ± 0.27	0.55 ± 0.11
5	0.88 ± 0.10	0.59 ± 0.39	0.64 ± 0.35
7	0.55 ± 0.07	0.50 ± 0.33	0.50 ± 0.25



ภาพที่ 10 ปริมาณอินนูลิน (%) ที่ได้จากแคลลัสของใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL 65 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 เดือน

สรุปและวิจารณ์
(Discussion)

จากการศึกษาวิจัยเรื่องการพัฒนาพันธุ์แก่นตะวันปลอดโรคโดยเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ โดยทำการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินได้แก่ IAA, IBA, NAA, 2.4-D ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5, 7 ppm พบว่า NAA ความเข้มข้น 1 ppm สามารถชักนำให้ใบอ่อนแก่นตะวัน 2 สายพันธุ์เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด โดยที่ IBA ความเข้มข้น 3 ppm สามารถชักนำให้ใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 เกิดรากดีที่สุดและในสายพันธุ์ HEL 65 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 5 ppm สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด ส่วน TDZ ความเข้มข้น 1 ppm สามารถชักนำให้ใบอ่อนแก่นตะวัน 2 สายพันธุ์ มีน้ำหนักสดมากที่สุด ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ ปรียา และวิภาพรรณ, (2551) พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม NAA และ Kinetin เข้มข้นอย่างละ 2 ppm สามารถสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด และยังสามารถชักนำให้เกิดรากจากข้อและแคลลัสได้ สอดคล้องกับรายงานของ Taha et al. (2007) ที่รายงานว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม NAA และ BA เข้มข้นอย่างละ 1 ppm สามารถชักนำให้ใบอ่อนของแก่นตะวันเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการชักนำใบอ่อนแก่นตะวันให้เกิดแคลลัส ไม่จำเป็นต้องใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกันระหว่างออกซินกับไซโตไคนิน เนื่องจากอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมออกซินเพียงกลุ่มเดียว ก็สามารถชักนำให้ใบอ่อนของแก่นตะวันเกิดแคลลัสได้ดีและมีประสิทธิภาพเช่นกัน ส่วนข้อดีของการใช้ใบอ่อนเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ ฟอกฆ่าเชื้อได้ง่าย เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนน้อย อีกทั้งยังสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ง่ายอีกด้วย

จากการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนแก่นตะวันทั้งสองสายพันธุ์พบว่า ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อปริมาณอินนูลินที่ได้จากแคลลัส รวมทั้งสายพันธุ์ก็มีผลต่อการผลิตสารอินนูลินในแคลลัสที่ได้จากใบอ่อนเช่นเดียวกัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าปัจจัยเรื่องสารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและ สายพันธุ์ก็มีผลต่อการผลิตปริมาณของอินนูลินในเซลของพืชเช่นเดียวกัน

เอกสารอ้างอิง
(References)

นพดล จรัสสัมฤทธิ์. 2537. ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์รั้วเขียว. 128 หน้า

นิมิตร วรสูต และ สนั่น จอกลอย. 2549. อินนูลิน: สารสำคัญสำหรับสุขภาพในแก่นตะวัน. แก่นเกษตร. 34(2): 85-101.

ปรียา พวงสำลี-หวังสมนึก และ วิภาวรรณ เคณาอุประ. ผลของ NAA และ Kinetin ต่อการเกิดแคลลัสและรากของแก่นตะวัน. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาวิชาการเกษตรประจำปี 2551. 28 มกราคม 2552. ห้องประชุมกวี จุติกุล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วิภาวี ศรีคำภา และจันทนี อุริยะพงศ์สรรค์. 2551. การวิเคราะห์และสกัดอินูลินจากแก่นตะวัน. ว.วิทย.กษ. 39: 3 (พิเศษ): 373-376.

Hodson de Jaramillo, E., A.Ferero, G. Cancino, A.M. Moreno. L. E. Monsalve and W. Acero. 2008. *In vitro* regeneration of three Chrysanthemum (*Dendrathema grandiflora*) varieties via organogenesis and somatic embryogenesis. Universitas Scientiarum. 13(2): 118-127

Malgorzata Z., J. Lema-Rumiñska and N. Miler. 2007. *In vitro* propagation using adventitious buds technique as a source of new variability in chrysanthemum. Scientia Horticulturae 113(2007): 70–73.

Morel, G.M., 1960. Proceeding virus free cymbium. Amer. Orchids Soc. Bull. 29: 495-497

Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15(3): 473-497.

Taha, H. S., A.M. El-sawy, and S.A. Bekheet. 2007. *In Vitro* Studies on Jerusalem

Artichoke (*Helianthus tuberosus*) and Enhancement of Inulin Production. Journal of Applied Science Research. 3: 853-858