

บทที่ 4

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94

1. บทนำ

ได้มีการนำถ่ายทอดเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วยในการขยายพันธุ์ และปรับปรุงพันธุ์อ้อยเพื่อให้สามารถเพิ่มจำนวนพืชได้ในปริมาณมาก และใช้เวลาน้อย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยแต่ละชนิดสามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญได้แตกต่างกันในอาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ ซึ่งมีส่วนประกอบของอาหารที่แตกต่างกันตามความเหมาะสม สำหรับการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทมิตรผลวิจัย พัฒนาอ้อยและน้ำตาลจำกัด โดยมอบแคลลัสอ้อยพันธุ์นี้เพื่อใช้ในการทดลอง จากนั้นนำแคลลัสอ้อยมาเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้แคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 เจริญเป็นต้นอ่อน เพื่อนำไปใช้ในการส่งถ่ายยีน chitinase เข้าสู่แคลลัสอ้อย พันธุ์นี้ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

การเพิ่มปริมาณแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94

นำแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 มาเพิ่มปริมาณบนอาหารอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล 2,4-D มก./ล. 3 ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 10% ซูโครส 30 ก./ล. และผงวุ้น 8 ก./ล. ปรับค่า pH เท่ากับ 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารใหม่ทุก ๆ 2 สัปดาห์

การทดลองที่ 1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ให้เจริญเป็นต้นอ่อน

นำแคลลัสอ้อยที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. ผงวุ้น 8 ก./ล. เคซีนไฮโดรไลเสท 500 มก./ล. ไคเนติน 0.5 มก./ล. และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิดคือ BA และ IBA ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

สูตรอาหารที่ 1 MS ที่เติม BA 0 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 2 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 3 MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 4 MS ที่เติม BA 2 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 5 MS ที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.
 สูตรอาหารที่ 6 MS ที่เติม BA 4 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.
 สูตรอาหารที่ 7 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.
 สูตรอาหารที่ 8 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 2 มก./ล.
 สูตรอาหารที่ 9 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 3 มก./ล.
 สูตรอาหารที่ 10 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 4 มก./ล.

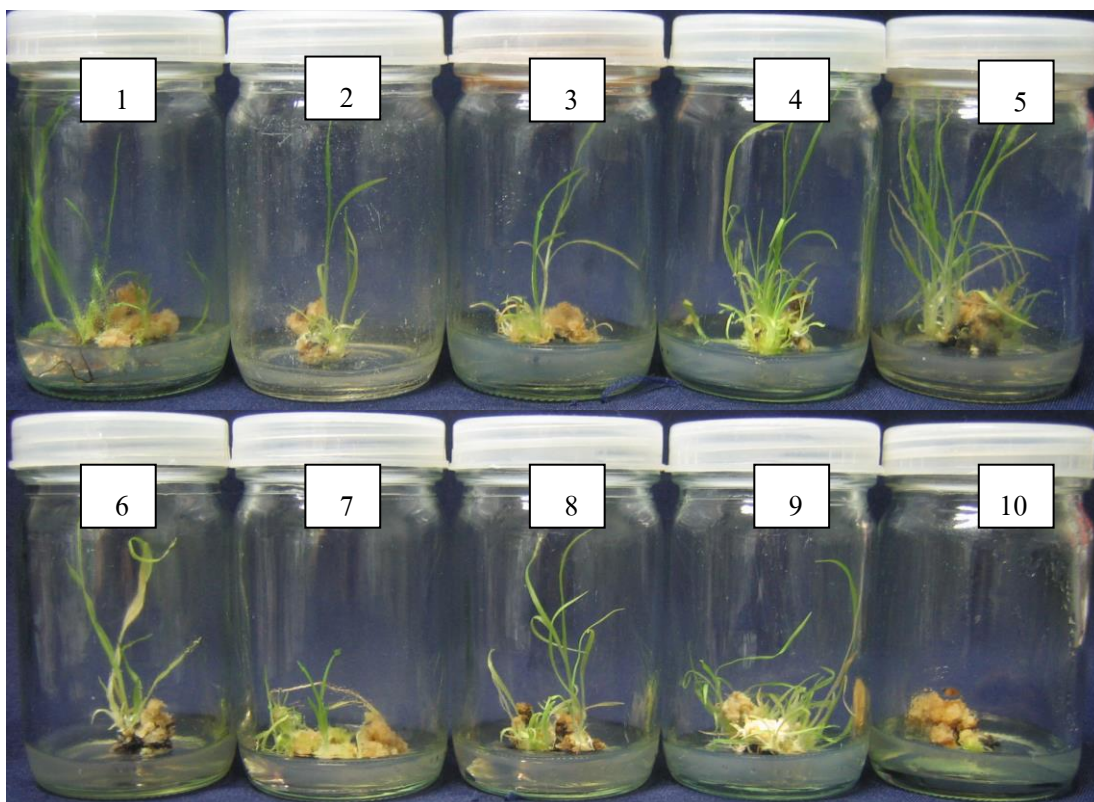
อาหารทุกสูตรปรับค่า pH เท่ากับ 5.7 นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ $25 \pm 2 ^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกผลโดยนับจำนวนต้นเปอร์เซ็นต์การเกิดต้น จำนวนต้นเฉลี่ย/แคลลัส และสังเกตการเจริญเติบโตและลักษณะของต้น วางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomized design (CRD) จำนวน 5 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple rang test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS version 11

3. ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสอ้อยพันธุ์มูมิต
ผล 99-94 ให้เจริญเป็นต้นอ่อน

เมื่อนำแคลลัสอ้อยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. ผงวุ้น 8 ก./ล. เคซีนไฮโดรไลเสท 500 มก./ล. โคเนติน 0.5 มก./ล. และเติม BA ร่วมกับ IBA ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ กัน พบว่า ใน 1-2 สัปดาห์ แคลลัสขยายขนาดและเกิดจุดกำเนิดยอดสีเขียว (green spot) เล็ก ๆ บนก้อนแคลลัส จากนั้นแคลลัสจะเจริญเป็นยอดสีเขียว แคลลัสจะเจริญเป็นยอดที่สมบูรณ์เมื่ออายุได้ 5-6 สัปดาห์

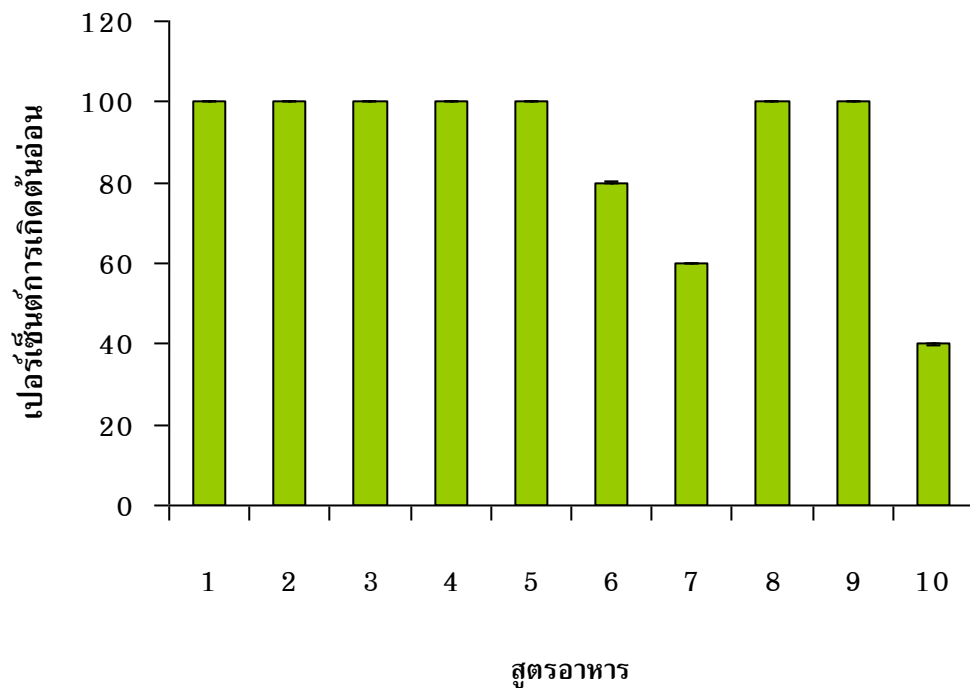
จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดต้นในอาหารสูตรที่เติม BA และ IBA ความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. พบว่าแคลลัสสามารถเจริญเป็นต้นได้ดีที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นต้นใหม่เท่ากับ 100 % จำนวนต้นเฉลี่ย/แคลลัสเท่ากับ 20 ต้น ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับสูตรอาหารที่ 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 และ 10 (ตารางที่ 6 ในภาคผนวก และภาพที่ 18, 19 และ 20)



ภาพที่ 18 ลักษณะต้นใหม่จากแคลลส์อ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS
ดัดแปลงที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 2 เดือน

หมายเหตุ: อาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

- สูตรอาหารที่ 1 MS ที่เติม BA 0 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0 มก./ล.
- สูตรอาหารที่ 2 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.
- สูตรอาหารที่ 3 MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.
- สูตรอาหารที่ 4 MS ที่เติม BA 2 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.
- สูตรอาหารที่ 5 MS ที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.
- สูตรอาหารที่ 6 MS ที่เติม BA 4 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.
- สูตรอาหารที่ 7 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.
- สูตรอาหารที่ 8 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 2 มก./ล.
- สูตรอาหารที่ 9 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 3 มก./ล.
- สูตรอาหารที่ 10 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 4 มก./ล.



ภาพที่ 19 เปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นต้นอ่อนจากแคลลัสอ้อยพ่นสูตรผล 99-94 ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 2 เดือน

หมายเหตุ: อาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

สูตรอาหารที่ 1 MS ที่เติม BA 0 มก./ล ร่วมกับ IBA 0 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 2 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 3 MS ที่เติม BA 1 มก./ล ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 4 MS ที่เติม BA 2 มก./ล ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 5 MS ที่เติม BA 3 มก./ล ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

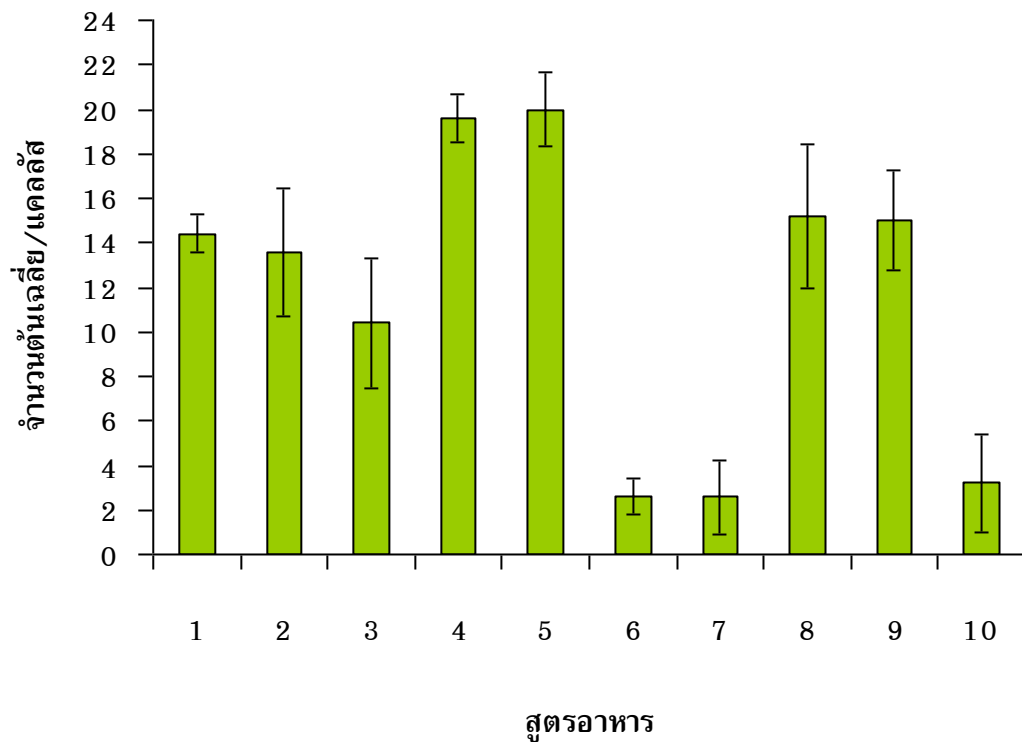
สูตรอาหารที่ 6 MS ที่เติม BA 4 มก./ล ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 7 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 8 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล ร่วมกับ IBA 2 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 9 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล ร่วมกับ IBA 3 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 10 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล ร่วมกับ IBA 4 มก./ล.



ภาพที่ 20 จำนวนต้นเฉลี่ย/แคลล์ของอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS

ดัดแปลงที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 2 เดือน

หมายเหตุ: อาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

สูตรอาหารที่ 1 MS ที่เติม BA 0 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 2 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 3 MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 4 MS ที่เติม BA 2 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 5 MS ที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 6 MS ที่เติม BA 4 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 7 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 8 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 2 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 9 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 3 มก./ล.

สูตรอาหารที่ 10 MS ที่เติม BA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 4 มก./ล.

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการชักนำให้แคลลัสออัยเจริญเป็นต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม ซูโครส 30 ก./ล. ผงวุ้น 8 ก./ล. เคซีนไฮโดรไลเสท 500 มก./ล. ไคเนติน 0.5 มก./ล. และ BA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่างๆพบว่า การเจริญเป็นต้นอ่อนของแคลลัสพัฒนามาจากการขยายขนาดแคลลัสและเริ่มเจริญจากบริเวณที่มีสีเขียวบนแคลลัส และ หลังจากนั้นจะเจริญเป็นยอดอ่อน มีรายงานว่า แคลลัสที่เกิดจากการแบ่งเซลล์ สามารถเจริญเป็นอวัยวะได้โดยจุดกำเนิดของ อวัยวะอาจเกิดจากเซลล์เพียงเซลล์เดียวหรือกลุ่มของเซลล์ parenchyma เจริญไปเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อ เจริญของอวัยวะที่มีการแบ่งเซลล์จำนวนมาก

สำหรับอิทธิพลของ BA และ IBA ที่มีผลต่อการเจริญเป็นต้นใหม่ของแคลลัสออัย พบว่า ความเข้มข้นของ BA และ IBA ที่เหมาะสมคือ BA 3 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. เนื่องจาก IBA เป็นออกซินที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการสร้างโปรตีนและกรดนิวคลีอิก กระตุ้นการเกิด ราก ส่วน BA เป็นไซโตไคนินที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการแบ่งเซลล์เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ โปรตีนและเอนไซม์ ทำให้แคลลัสเจริญเป็นต้นและเพิ่มจำนวนต้นได้ดี (สุริยนต์ จะอุ่ม และคณะ, 2540) สอดคล้องกับ Karim *et al.* (2002) รายงานว่าอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. สามารถชักนำให้แคลลัสออัยพันธุ์ Isd 31 เจริญเป็นต้นได้ Abdulla *et al.* (2002) รายงานว่าแคลลัสออัยที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม IBA 2 มก./ล. IAA 2 มก./ล. และ kinetin 2 มก./ล. แคลลัสออัยสามารถเจริญเป็นต้นได้ นอกจากนี้ยังมีบางรายงานที่ ทำการเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นใหม่โดยใช้สารอินทรีย์บางชนิด เช่น เคซีนไฮโดรไลเสท น้ำมะพร้าว และสารสกัดจากยีสต์ (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2538; Zhao *et al.*, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับ Gandonou *et al.* (2005) รายงานว่าแคลลัสออัยที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 60 ก./ล. เคซีนไฮโดรไลเสท 500 มก./ล. สามารถชักนำให้แคลลัส ออัยพันธุ์ Isd 31 เจริญเป็นต้นได้