Research Article

Received: July 4, 2019; Accepted: January 8, 2020

ขนาดและรูปแบบการตัดชิ้นส่วนกล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Size and Cutting Pattern of Explant for Micropropagation of *Musa* (AA Group) 'Kluai Khai Kasetsart 2'

พรนัชชา คงพันธุ์, อารยา อาจเจริญ เทียนหอม* และทัศไนย จารุวัฒนพันธ์

ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

Pornnatchar Kongphan, Araya Arjcharoen Theanhom* and Tassanai Jaruwattanaphan

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University,

Bangkhen Campus, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

บทคัดย่อ

ขนาดและรูปแบบการตัดชิ้นส่วนกล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 ต่อการชักนำยอด โดยเปรียบเทียบขนาดของชิ้นส่วนหน่อขนาด 1 ซม. (1 x 1 x 1 เซนติเมตร) และ 1.5 ซม. (1.5 x 1.5 x 1.5 เซนติเมตร) ที่มีการตัดแบ่งชิ้นส่วนรูปต่าง ๆ ได้แก่ ไม่ตัดแบ่ง แบ่งเป็น 2 และ 4 ส่วน นำไปเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยหน่อขนาด 1.5 ซม. แบบไม่ตัดแบ่ง เป็นชุดควบคุม วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ผลการศึกษาพบว่าขนาดและวิธีการตัดแบ่งมีผลต่อการรอดชีวิตและการชักนำให้เกิดยอดใหม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชิ้นส่วนขนาด 1.5 ซม. ที่ไม่ผ่าแบ่ง ผ่าแบ่งยอดเป็น 2 และ 4 ส่วน มีการรอดชีวิตร้อยละ 35, 60 และ 50 ตามลำดับ ขณะที่ขนาด 1 ซม. ทั้งสามรูปแบบมีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากัน คือ ร้อยละ 80 นอกจากนี้พบว่าหน่อขนาด 1 ซม. ที่แบ่งเป็น 2 และ 4 ส่วน และหน่อขนาด 1.5 ซม. ที่แบ่งเป็น 4 ส่วน มีจำนวนยอดเพิ่มขึ้น (72, 77, 66 ยอด ตามลำดับ) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่น จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบวิธีการทำลายตายอด โดยนำชิ้นส่วนขนาด 1 ซม. มาคว้านส่วนตายอดออก เปรียบเทียบกับชิ้นส่วนที่ไม่มีการทำลายตายอด พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ชิ้นส่วนที่คว้านตายอด สามารถชักนำเกิดยอดใหม่ได้ (29 ยอด) ดีกว่าชิ้นส่วนที่ไม่มีการทำลายตายอด (12 ยอด) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำสำคัญ : กล้วยไข่; คว้าน; ฟีนอลิก

Abstract

Effects of explant size and cutting pattern of *Musa* (AA group) 'Kluai Khai Kasetsart 2' *in vitro* culture were studied. Two sucker sizes were used: 1 (1 x 1 x 1 cm) and 1.5 (1.5 x 1.5 x 1.5) cm. Both

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** fagrart@ku.ac.th

sized suckers were not divided and divided in to 2 and 4 pieces then the explants were cultured on MS medium supplemented with 5 mg/L BA. Intact explant size 1.5 cm was used as a control. The experiment was arranged in a completely randomized design with 10 replications. The result showed that sucker size and cutting pattern affected plantlet survival percentages. Explants size 1.5 cm with 2- and 4-piece cut had survival rate at 60 and 50 %, respectively, which were higher than that of the control (35%), while explant size 1 cm with all cuts had 80% survival rate. The explants size 1 cm with 2- and 4-piece cuts and size 1.5 cm with 4-piece cut gave the highest new shoot numbers (72, 77 and 66 shoots, respectively). Subsequently, the size 1 cm explants were pinched at the terminal bud by scooping method. The pinched explants had higher regenerated shoots (29) than the non-pinched ones (12).

Keywords: Kluai Khai; scooping; phenolic

1. บทนำ

กล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 [*Musa* (AA group) 'Kluai Khai Kasetsart 2'] จัดอยู่ในสกุล *Musa* เป็นกล้วยที่มีขนาดผลเล็ก เกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของกล้วยไข่ [*M. acuminata* (AA group) 'Kluai Khai'] โดยนำต้นกล้วยไข่ที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อไปฉายรังสีแกมมาปริมาณ 20 เกรย์ ได้กล้วยไข่ที่มีลักษณะผลต่างไปจากพันธุ์เดิม และมีลักษณะที่เหมาะสำหรับการส่งออก [1] นิยมรับประทานผลสดและแปรรูป โดยปลูกเป็นการค้า ปัจจุบันกล้วยไข่เป็นสินค้าส่งออกไปยังประเทศ จีน ฮ่องกง สิงคโปร์ และญี่ปุ่น [2] ผลผลิตกล้วยไข่ใช้บริโภคในประเทศร้อยละ 86 และในปี พ.ศ. 2553-2556 การบริโภคกล้วยไข่ผลสดในประเทศมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น [3]

กล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 นิยมปลูกโดยการใช้หน่อในการขยายพันธุ์ แต่พบปัญหาจำนวนหน่อไม่เพียงพอต่อการเพาะปลูกในพื้นที่ขนาดใหญ่ [2] ซึ่งจำนวนหน่อต่อต้นที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติค่อนข้างน้อย แต่พบว่าการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถเพิ่มปริมาณต้นได้จำนวนมาก โดยอัตราการชักนำให้เกิดต้นอ่อนขึ้นอยู่กับพันธุ์ปลูก สูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่นำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อ [4] และขนาดชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมมีผลต่อการชักนำให้เกิดยอด และเพิ่มอัตราการเพิ่มจำนวนยอดให้สูงขึ้น เนื่องจากชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่เกินไป แม้จะชักนำให้เกิดยอดได้ง่าย แต่มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์สูงกว่า แต่หากชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงมีขนาดเล็กเกินไปจะไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ [5] โดยวิธีที่นิยมใช้ในการเพิ่มจำนวนหน่อหรือต้นพันธุ์ คือ การผ่าหน่อ (bud splitting) [6,7] เนื่องจากการแสดงออกของตาข้างจะถูกยับยั้งด้วยออกซิน ซึ่งผลิตมาจากตายอดส่งผลทำให้ตาข้างไม่สามารถเจริญพัฒนา เมื่อผ่าหน่อซึ่งเป็นการทำลายตายอด ทำให้สามารถเกิดการพัฒนาของตาข้าง และชักนำให้เป็นยอดใหม่ได้ [8] แต่การผ่าหน่อชิ้นส่วนพืชมีข้อเสีย คือ พืชจะมีการปล่อยสารฟีนอลิกออกมาเป็นปริมาณมากจากบริเวณที่เกิดบาดแผล และยับยั้งการเจริญของหน่อใหม่ [2] ดังนั้นควรศึกษาหาขนาดและวิธีการตัดชิ้นส่วนกล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอดในสภาพปลอดเชื้อ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อ

นำหน่อกล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 ที่สมบูรณ์ปราศจากโรคและแมลงมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ตัดแต่งชิ้นส่วนหน่อ นำส่วนที่ไม่ต้องการออก ลอกกาบให้เหลือขนาด 4 x 4 x 4 เซนติเมตร แล้วล้างให้สะอาด จากนั้นแช่ลงในสารกำจัดเชื้อราแคปแทน 50™ (Captan 50 % WP) 0.5 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร และเติมน้ำยาล้างจาน 1 หยด เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวภายนอกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ นาน 15 นาที และความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ นาน 15 นาที ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที โดยก่อนล้างน้ำครั้งสุดท้าย จุ่มชิ้นส่วนลงในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ นาน 20 วินาที

2.2 ผลของขนาดชิ้นส่วนและรูปแบบการตัดชิ้นส่วนกล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 ต่อการชักนำให้เกิดยอด

ศึกษาผลของขนาดและรูปแบบการตัดชิ้นส่วนกล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 ต่อการชักนำให้เกิดยอด โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) 6 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ชิ้น ดังนี้ (1) ทรีตเมนต์ที่ 1 ขนาด 1.5 เซนติเมตร (1.5 x 1.5 x 1.5 เซนติเมตร) ไม่ผ่า (ชุดควบคุม) (2) ทรีตเมนต์ที่ 2 ขนาด 1.5 เซนติเมตร ผ่าเป็น 2 ส่วน (3) ทรีตเมนต์ที่ 3 ขนาด 1.5 เซนติเมตร ผ่าเป็น 4 ส่วน (4) ทรีตเมนต์ที่ 4 ขนาด 1 เซนติเมตร (1 x 1 x 1 เซนติเมตร) ไม่ผ่า (5) ทรีตเมนต์ที่ 5 ขนาด 1 เซนติเมตร ผ่าเป็น 2 ส่วน และ (6) ทรีตเมนต์ที่ 6 ขนาด 1 เซนติเมตร ผ่าเป็น 4 ส่วน

นำเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติม 6-benzylaminopurine (BA) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 5.8 เลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 14 สัปดาห์ และเปลี่ยนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 4 สัปดาห์ บันทึกการรอดชีวิตหลังเพาะเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์ ความสูงยอดวัดจากตำแหน่งที่ตัดยอดเก่าออก บันทึกทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 14 สัปดาห์ จำนวนรากและจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้น บันทึกผลทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 14 สัปดาห์

วัดปริมาณสารฟีนอลิกรวมโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent [2] ใช้สาร Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลือง เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงหรือน้ำเงิน ซึ่งเป็นสีของ molybdate วัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิค (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน เตรียมตัวอย่างสารละลายในการตรวจสอบฟีนอลิก โดยนำอาหารที่เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนในทรีตเมนต์ต่าง ๆ นำมาเติมน้ำ reverse osmosis (RO) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง แล้วกรองสารละลายโดยใช้กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร แล้วนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม 2N Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้น้ำ distilled water (DI) เป็นตัวเปรียบเทียบ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง T80 UV-visible spectrophotometer นำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกที่ปลดปล่อยในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.3 ศึกษาการทำลายเนื้อเยื่อปลายยอดของชิ้นส่วนกล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 โดยคว้านบริเวณ

ปลายยอดของชิ้นส่วน

เลือกขนาดชิ้นส่วนที่เหมาะสม คือ 1 เซนติเมตร นำมาศึกษาเปรียบเทียบวิธีการทำลายตายอดด้วยวิธีการคว้านยอด เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี independent t test 2 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ชิ้น ดังนี้ (1) ทรีตเมนต์ที่ 1 ขนาด 1 เซนติเมตร ไม่คว้านปลายยอด (ชุดควบคุม) และ (2) ทรีตเมนต์ที่ 2 ขนาด 1 เซนติเมตร คว้านปลายยอด แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่าง 5.8 เลี้ยงภายใต้ อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน ตัดยอดและผ่าครึ่งชิ้นส่วนเปลี่ยนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 4 สัปดาห์ และบันทึกจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้น บันทึกผลทุกสัปดาห์เป็นเวลา 14 สัปดาห์ วัดปริมาณสารฟีนอลิกที่ปลดปล่อยลงในอาหารโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent [2] โดยใช้เครื่อง T80 UV-visible spectrophotometer บันทึกผลทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน

3. ผลและวิจารณ์

การศึกษาผลของขนาดและรูปแบบการตัดแบ่งชิ้นส่วนของชิ้นส่วนกล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 ต่อการชักนำให้เกิดยอด ตัดชิ้นส่วนขนาด 1.5 และ 1 เซนติเมตร และรูปแบบการผ่าชิ้นส่วนแบ่งออกเป็น 2 และ 4 ส่วน เปรียบเทียบกับชิ้นส่วนที่ไม่ได้ผ่าแบ่ง หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนขนาด 1.5 เซนติเมตร ที่ไม่ผ่า ผ่าแบ่งยอดเป็น 2 และ 4 ส่วน มีการรอดชีวิต ร้อยละ 35, 60 และ 50 ตามลำดับ (รูปที่ 1) ซึ่งมีร้อยละการรอดชีวิตน้อยกว่าขนาด 1 เซนติเมตร ทั้งสามรูปแบบมีร้อยละการรอดชีวิตที่เท่ากัน คือ ร้อยละ 80 (รูปที่ 1) เมื่อบันทึกจำนวนยอดใหม่ในสัปดาห์ที่ 14 พบว่าชิ้นส่วนขนาด 1 เซนติเมตร ที่ผ่าเป็น 2 และ 4 ส่วน มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 72.45 และ 77 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ ขณะที่ชิ้นส่วนขนาด 1.5 เซนติเมตร (ชุดควบคุม) มีจำนวนยอดต่ำสุด คือ 9.35 ยอดต่อชิ้นส่วน ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1 และรูปที่ 2) ผลการทดลองจะเห็นได้ว่าชิ้นส่วนที่มีขนาด 1 เซนติเมตร ที่ผ่าแบ่งและไม่ผ่า และชิ้นส่วนขนาด 1.5 เซนติเมตร ผ่าเป็น 4 ส่วน มีจำนวนยอดใหม่ที่มากขึ้น ถึงแม้ว่าชิ้นส่วนขนาด 1.5 เซนติเมตร จะเป็นชิ้นส่วนขนาดใหญ่ แต่เมื่อผ่าเป็น 4 ส่วน พบว่าปริมาตรของชิ้นส่วนใกล้เคียงกับ ขนาด 1 เซนติเมตรซึ่งสอดคล้องกับ Israeli และคณะ ที่รายงานว่าขนาดของชิ้นส่วนพืชเป็นปัจจัยสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยชิ้นส่วนที่มีขนาดเล็กมีผลต่อความสามารถในการพัฒนาให้เกิดแคลลัสและยอดต่อเหมาะสมกว่าชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่ [9] นอกจากนี้อิทธิพลการข่มตายอดมีผลต่อการเกิดยอดใหม่ของชิ้นส่วนกล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 เห็นได้จากชิ้นส่วนที่ไม่ผ่าแบ่งมีจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้นได้น้อยกว่าวิธีการผ่าแบ่ง เนื่องจากโดยปกติตาข้าง (lateral bud) จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตโดยออกซินที่ถูกสร้างขึ้นจากส่วนปลายยอด (apical bud) ซึ่งเรียกว่ การข่มของตายอด (apical dominant) โดยตายอดสร้างออกซินขึ้นมาในปริมาณที่สูงแล้วลำเลียงลงสู่ด้านล่าง ความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการเจริญเติบโตของตาและใบด้านข้างไม่ให้เจริญเติบโต แต่เมื่อผ่าชิ้นส่วนออกความเข้มข้นของออกซินจะลดลง ทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของตาด้านข้างและใบ พืชจึงแตกตาด้านข้างได้และทำให้ต้นพืชมีลักษณะเป็นพุ่ม [10, 11] ดังนั้นเมื่อผ่าแบ่งชิ้นส่วน ทำให้ออกซินจากปลายยอดมีปริมาณลดลง ตาข้างที่ถูกข่มไว้จึงสามารถพัฒนาเป็นยอดใหม่และมีจำนวนมากขึ้น สอดคล้องกับการผ่าหน่อกล้วยพันธุ์ปลูก ‘Yangambi’ ตามยาวออกเป็น 4

ส่วน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ส่งเสริมให้เกิดยอดรวมใหม่ได้เฉลี่ย 8.37 หน่อต่อชิ้นส่วน มากกว่าหน่อที่ไม่ได้ผ่าแบ่ง 2 เท่า [8] นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เทคนิคผ่าหน่อในพืชชนิดอื่น เช่น การผ่าจุกสับปะรดพันธุ์ปลูก 'MD2' ออกเป็น 4 ส่วน พบว่าให้จำนวนยอดใหม่ที่มากถึง 8.5 ยอดต่อจุก ขณะที่จุกที่ไม่ได้ผ่า ไม่มียอดใหม่เกิดขึ้น [7] เนื่องจากการผ่าแบ่งชิ้นส่วนเป็นการลดอิทธิพลของฮอร์โมนออกซินจากปลายยอดที่ข่มตาข้างอยู่ ซึ่งกระตุ้นให้พืชสร้างตาข้างได้ในปริมาณมากขึ้น แต่ไม่มีผลต่อจำนวนรากและความยาวของยอด (ตารางที่ 1) เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่เติมลงไปในอาหารสังเคราะห์ ได้แก่ BA จัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน มีสมบัติในการชักนำให้ชิ้นส่วนพืชพัฒนาไปเป็นยอดใหม่ แต่ไม่มีผลต่อการเกิดรากและความสูงของหน่อ เมื่อพืชนำธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตไปใช้ ทำให้ปริมาณของไซโทไคนินลดลง สมดุลระหว่างไซโทไคนินต่อออกซินจึงเปลี่ยนแปลงไปส่งผลให้เกิดรากได้ [12]

เมื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่ปลอดปล่อยลงในอาหารซึ่งมีผลต่อขนาดและรูปแบบการผ่าแบ่งของชิ้นส่วน โดยนำอาหารมาตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Cioacalteu reagent พบว่าขนาดและรูปแบบการผ่าแบ่งของชิ้นส่วน มีผลต่อการปลดปล่อยสารประกอบ

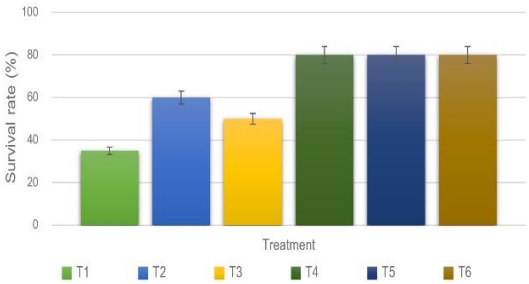

Figure 1 Survival percentages of 'Kluai Khai Kasesart 2' shoots after cultured on MS medium supplemented with 5 mg/L BA for 1 week; T1-T3: 1.5 cm explant size with various splitting pattern (T1) unsplit (control), (T2) half split bud, (T3) quarter split bud, T4-T6: 1 cm explant size with various pattern (T4) unsplit, (T5) half split bud, (T6) quarter split bud.

Table 1 Effect of explant size and splitting pattern of 'Kluai Khai Kasetsart 2' on number of shoots, number of roots and shoot length after cultured for 14 weeks.

Treatments	No. of shoots	No. of root	Average shoot length (cm)
T1 size 1.5 cm (control)	9.35b	3.7	2.70
T2 size 1.5 cm with half split bud	21.35b	9.8	2.35
T3 size 1.5 cm with quarter split bud	66.20ab	16.0	3.05
T4 size 1 cm with unsplit	42.45ab	10.9	4.65
T5 size 1 cm with half split bud	72.45a	16.1	4.20
T6 size 1 cm with quarter split bud	77.00a	10.2	3.05
F-test	**	ns	ns

** = significant at $p < 0.01$; ns = non statistical difference ($p > 0.05$)

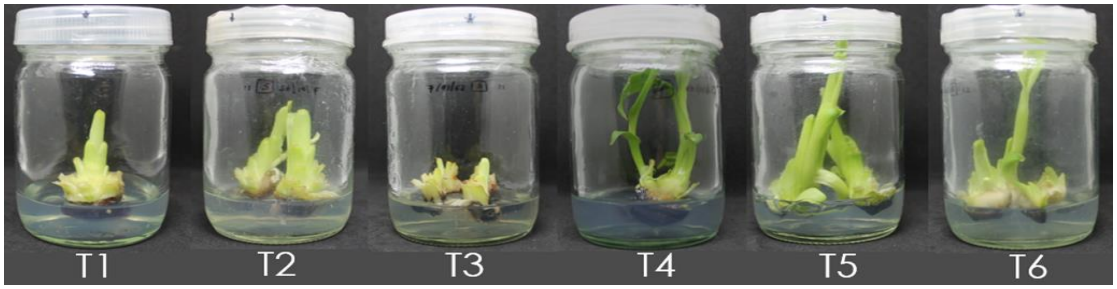

Figure 2 Regenerated shoots of 'Kluai Khai Kasesart 2' after cultured on MS medium supplemented with 5 mg/L BA for 3 weeks; T1-T3: 1.5 cm explant size with various splitting pattern (T1) unsplit (control), (T2) half split bud, (T3) quarter split bud, T4-T6: 1 cm explant size with various pattern (T4) unsplit, (T5) half split bud, (T6) quarter split bud.

Table 2 Total phenolic contents of *in vitro* 'Kluai Khai Kasetsart 2' shoots after regenerated from the explants with different sizes and splitting patterns for 3 months.

Treatments	1st month	2nd month	3rd month
T1 size 1.5 cm (control)	2.60	3.40a	3.36
T2 size 1.5 cm with half split bud	4.42	3.18ab	3.28
T3 size 1.5 cm with quarter split bud	2.20	3.54a	3.16
T4 size 1 cm with unsplit	3.58	3.34a	3.06
T5 size 1 cm with half split bud	2.88	2.48b	3.24
T6 size 1 cm with quarter split bud	5.42	3.30ab	3.34
F-test	ns	*	ns

ns = non statistical difference ($p > 0.05$); * = significant at $p < 0.05$

ฟีนอลิกรวมลงในอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2) โดยสารประกอบฟีนอลิกรวมทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ PPO หรือ POD เกิดเป็น สารประกอบควิโนน [13] ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสีของชิ้นส่วนกล้วยเป็นสีน้ำตาล หรือปลดปล่อยสารสีน้ำตาลลงในอาหาร [14] สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกล้วยในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งพบว่าหลังจากนำชิ้นส่วนกล้วยมาเพาะเลี้ยงในอาหาร ชิ้นส่วนกล้วยทุกทรีตเมนต์มีการสร้างและปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกรวม (ตารางที่ 2) โดยเมื่อชิ้นส่วนกล้วยเกิดการออกซิไดซ์ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสีของชิ้นส่วนกล้วยและอาหารเป็นสีน้ำตาล โดยสารสีน้ำตาลมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของชิ้นส่วน โดยเมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหาร ปริมาณของสารสีน้ำตาลลดลง และปริมาณหน่อใหม่ที่เกิดเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับ Yensai และ Suraninpong รายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกล้วยงาช้าง (AAB) ในอาหาร สูตร MS ร่วมกับการเติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการ

ปลดปล่อยสารสีน้ำตาลหรือสารประกอบฟีนอลิกจากบาดแผล ส่งผลให้มีการยับยั้ง การเพิ่มจำนวน และการเจริญพัฒนาของยอด [15]

การเปรียบเทียบวิธีการทำลายตายอดเพิ่มเติมด้วยวิธีการคว้านยอด โดยชิ้นส่วนหน่อที่มีขนาด 1 เซนติเมตร เปรียบเทียบกับชิ้นส่วนที่ไม่มีการทำลายตายอด พบว่าช่วงแรกที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่คว้านตายอดสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีในระยะเวลาสัปดาห์ที่ 2 ถึง 8 คือ 0.3, 3.8, 15.25 และ 25.95 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3) โดยชิ้นส่วนที่ไม่ได้ถูกทำลายปลายยอดมียอดใหม่เท่ากับ 0.05, 0.8, 7.75 และ 12.05 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ แต่เมื่อเปลี่ยนอาหารจนครบ 14 สัปดาห์ พบว่าจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ (รูปที่ 3 และ 4) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอิทธิพลการข่มของตายอดมีผลต่อการเกิดยอดใหม่ของชิ้นส่วนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการทำลายตายอดด้วยการคว้าน ช่วยลดอิทธิพลของฮอร์โมนออกซินจากปลายยอดที่ข่มตาข้างอยู่ ซึ่งปกติแล้วพืชจะสร้างเนื้อเยื่อเจริญเพื่อพัฒนาไปเป็นส่วนต่าง ๆ เนื้อเยื่อเจริญด้านข้างปลายยอดมีหน้าที่สร้างตาข้าง (axillary bud) สอดคล้องกับ Josephine และ Julian ที่รายงานว่าจุกของสับปะรดทุก ๆ ซอกใบมีตาประมาณ 15-25 ตา ที่สามารถชักนำให้เจริญเติบโตออกมาเป็นยอดใหม่ [6] ส่วนใหญ่ตาข้างมักมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าตายอด เนื่องจากถูกยับยั้งโดยออกซินจากปลายยอด [16] ดังนั้นเมื่อหน่อถูกผ่าแบ่งและคว้านยอดทำให้ออกซินจากปลายยอดมีปริมาณลดลงส่งผลให้ระดับความรุนแรงของการข่มตาข้างน้อยลงไปตามขนาดของชิ้นส่วนที่ถูกผ่าแบ่ง แต่เมื่อผ่านไประยะหนึ่งหน่อใหม่เกิดขึ้นมีการสร้างออกซินเพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้การเกิดหน่อใหม่ในแต่ละทรีตเมนต์ไม่ต่างกัน [10]

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของชิ้นส่วนที่ผ่านการทำลายตายอดด้วยวิธีการคว้านยอด พบว่าชิ้นส่วนมีการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกรวมลงในอาหารโดยที่มีความแตกต่างกันทางสถิติในเดือนที่ 3 (ตารางที่ 3) การทำลายตายอดด้วยวิธีการคว้านยอดของชิ้นส่วนมีผลต่อการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกรวมลงในอาหาร โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีค่าเพิ่มสูงขึ้นจากในเดือนแรกเนื่องจากชิ้นส่วนมีการเจริญเติบโตขยายขนาดและเมื่อเปลี่ยนอาหารมีการตัดยอดและผ่าครึ่งชิ้นส่วนอีกครั้ง ทำให้ชิ้นส่วนเกิดบาดแผลเพิ่มขึ้น การปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกจากความเครียดของชิ้นส่วนจึงเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Silayoi ซึ่งพบว่าชิ้นส่วนพืชสร้างสารสีน้ำตาลออกมาจากบาดแผลมากขึ้นและมีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์การเพิ่มขนาดของเซลล์ และการ

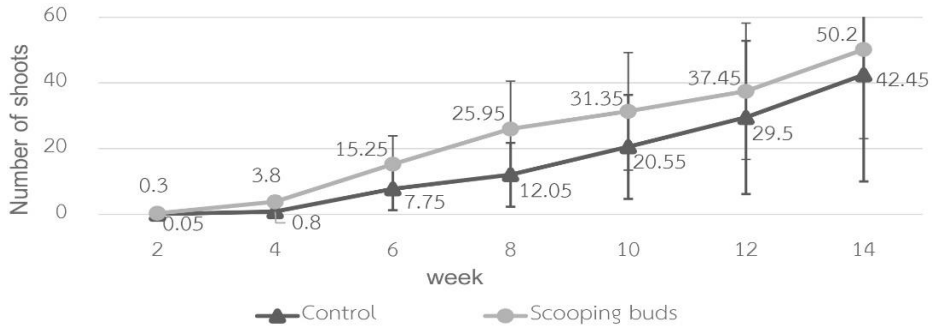

Figure 3 Effect of scooping buds on number of shoots after cultured for 14 weeks.

Table 3 Total phenolic contents of shoots after regenerated from non and scooping buds of 'Kluai Khai Kasetsart 2' for 3 months.

Treatments	1st month	2nd month	3rd month
Control	3.58	3.34	3.06
Scooping buds	3.34	3.86	5.92
t-test	ns	ns	**

ns = non statistical difference ($p > 0.05$); ** = significant at $p < 0.01$

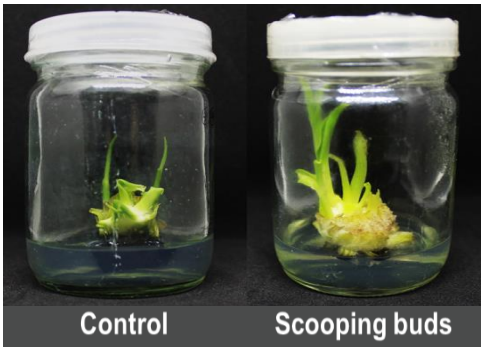

Figure 4 Shoot induction of 1 cm explant size without (control) and with scooping bud after cultured for 4 weeks.

เจริญเติบโตของพืช และปัญหาการเกิดสารสีน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชว่าเกิดจากการออกซิเดชันของสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกที่ปลดปล่อยออกมาจากบาดแผลของเนื้อเยื่อที่ถูกตัด ทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อพืชทำให้เนื้อเยื่อพืชเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด [2]

4. สรุป

ชิ้นส่วนขนาด 1 เซนติเมตร มีการรอดชีวิตที่สูงกว่าชิ้นส่วนขนาด 1.5 เซนติเมตร และชิ้นส่วนขนาด 1 เซนติเมตร ที่ผ่าแบ่งชิ้นส่วนส่งผลให้มีการเกิดยอดใหม่ได้มากกว่าชิ้นส่วนขนาด 1.5 เซนติเมตร การทำลายปลายยอดด้วยการคว้านส่งผลให้มีการแตกตาข้างมากกว่าชิ้นส่วนที่ไม่ได้ทำลายปลายยอด ซึ่งเหมาะสำหรับการขยายพันธุ์พืชที่มีจำนวนต้นแม่น้อย แต่ต้องการเพิ่มปริมาณให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยภายใต้แผนงานเสริมสร้างศักยภาพและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ตามทิศทางยุทธศาสตร์การวิจัยและนวัตกรรม ประเภทบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2562

6. References

[1] Silayoi, B. and Kriengyakul, K., 2001, Mutation inductrion of Kluai Khai using gamma rays through tissue culture, pp. 197-202, 12th Genetics Conference: Gene Revolution Era, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

[2] Silayoi, B., 2015, Banana, KU Publishing, Bangkok, 512 p. (in Thai)

[3] Department of Agriculture, 2013, Banana Research Development Strategy 2016-2020, Available Source: https://www.doa.

go.th/hortold/images/stories/strategyplan thort/ strategybanana. doc, March 29, 2018. (in Thai)

[4] Rungrueangkhaoornlertkul, S., 1993, Study of Shoot of 8 Varieties of Bananas by Tissue Culture, Department of Horti culture, Graduate School, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)

[5] El Boullani, R., Lagram, K., El Mousadik, A. and Serghini, M.A., 2017, Effect of explants density and size on the *in vitro* proliferation and growth of separated shoots of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.), J. Mater. Environ. Sci. 8: 2469-2473.

[6] Josephine, A.U. and Julian, O., 2011, Split crown technique for mass propagation of smooth cayenne pineapple in South-South Nigeria, Afr. J. Plant Sci. 5: 591-598.

[7] Kumplee, S., Havananda, T. and Saradhuldhat, P., 2015, Multiplications of 'MD2' pineapple by crown splitting technique, Agric. Sci. J. 46(Suppl. 3): 121-124. (in Thai)

[8] Ngomuo, M., Mneney, E. and Ndakidemi, P., 2014, The effect of bud splitting on suppression of apical dominance and inducing multiple buds development in banana shoots tip cultures of cv. 'Yangambi' (AAA) in Tanzania, Am. J. Exp. Agric. 4: 1853-1860.

[9] Israeli, Y., Lahav, E. and Reuveni, O., 1995, *In vitro* Culture of Bananas, pp. 147-178, Bananas and Plantains, World Crop Series, Springer, Dordrecht.

[10] Jarassamrit, N., 1994, Plant Hormones and Plant Growth Regulators, Sahamit Off Set, Bangkok, 124 p. (in Thai)

[11] Tongumpai, P., 1986, Plant Hormones, Kasetsart University, Kasetsart University, 196 p. (in Thai)

[12] Tudses, N., Phungbunhan, K. and Audta, A., 2019, Effects of BA and NAA on growth and development of *Musa sapientum* (ABB group) cv 'Kluai Hin' *in vitro* and effects of substrate on growth *in vivo*, King Mongkut's Agric. J. 37(2): 262-273. (in Thai)

[13] Siriphanich, J., 2010, Postharvest Biology and Plant Senescence, Kasetsart University, Nakhon Pathom, 453 p. (in Thai)

[14] Wattanaphansuk, S., 2006, The Effects of Anti- Browning Agents and Modified Atmosphere Packaging on Shelf- Life of Fresh- Cut Lettuce, Department of Food Technology, Graduate School, Silpakorn University, Nakhon Pathom. (in Thai)

[15] Yensai, P. and Suraninpong, P., 2014, Effect of benzyladenine and thidiazuron on multiple shoot induction in 'Kluai Chang' *in vitro*, Khon Kaen Agric. J. 42(Suppl. 3): 157-161. (in Thai)

[16] Kawat, L., Nakhon, M., Suwanwong, S., Tantiwiwat, S. and Wongkantharakorn, N., 2013, Plant Physiology, Kasetsart University, Bangkok, 270 p. (in Thai)