

ผลของสูตรอาหาร ชนิดและปริมาณน้ำตาลต่อการเก็บรักษาเชื้อ
พันธุกรรมระยะกลางในสภาพปลอดเชื้อของกล้วยน้ำว้าปากช่อง 50

Effect of Medium, Type and Concentration of Sugar on

In vitro Medium-Term Storage of

Musa (ABB Group) ‘Namwa Pakchong 50’

น้ำเพชร พรหมสุวรรณ, ทศไฉน จารุวัฒน์พันธ์ และอารยา อัจเจริญ เทียนหอม*

ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

Namphet Phomsuwan, Tassanai Jaruwattanaphan and Araya Arjcharoen Theanhom*

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok Campus,

Ladyao, Chatuchak, Bangkok, 10900

บทคัดย่อ

ศึกษาความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่มีผลต่อการรักษาเชื้อพันธุกรรมระยะกลางของกล้วยน้ำว้าปากช่อง 50 แบ่งเป็น 2 การทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยการทดลองที่ 1 ประกอบด้วย 2 ทรีตเมนต์ เพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS และอาหารสูตรดัดแปลง ½MS เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าอาหารสูตร MS เฟอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ย 95 % และอาหารสูตรดัดแปลง ½MS มีเฟอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ย 92.5 % จากนั้นฟื้นฟูต้นโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มล./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ากล้วยที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ ½MS มีเฟอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่ต่างกัน คือ 97.3 % จึงเลือก ½MS มาใช้ในการทดลองที่ 2 ประกอบด้วย 6 ทรีตเมนต์ เพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตรดัดแปลง ½MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 (ชุดควบคุม), 60 และ 90 กรัมต่อลิตร น้ำตาลแมนนิทอล 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน พบว่ากล้วยที่เติมน้ำตาลซูโครสมีเฟอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 90-92.5 % ส่วนกล้วยที่เติมน้ำตาลแมนนิทอลมีเฟอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 0-40 % จากนั้นฟื้นฟูต้นเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 พบว่าเมื่อเลี้ยงยอดบนอาหาร ½MS ที่เติมน้ำตาลแมนนิทอลทุกชนิดไม่สามารถรอดชีวิตหลังจากฟื้นฟูต้น ในขณะที่ยอดที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสมีเฟอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 94-97 % โดยกล้วยที่เลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง ½MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยเส้นรอบวงของยอดสูงที่สุด (3.66 ซม.) และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับทรีตเมนต์อื่น

คำสำคัญ : การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรม; แมนนิทอล; กล้วยน้ำว้าปากช่อง 50

Abstract

Effects of basal media, type and concentration of sugar on medium-term storage of *Musa* (ABB group) 'Namwa Pakchong 50'. The experiment 1 was arranged in completely randomized design with 2 treatments. Shoots were cultured on MS and $\frac{1}{2}$ MS medium for four months. The result showed that there was not significantly different in survival percentage between these two media. The survival percentages of MS and $\frac{1}{2}$ MS were 95 and 92.5, respectively. After that the plantlets of each treatments were recovered on MS medium supplemented with 5 mg L^{-1} BA for four weeks. We found that plantlets from both treatments had survival percentage of 97.3. Then $\frac{1}{2}$ MS medium was chosen for the second experiment which was designed with 6 treatments. Shoots were cultured on $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with sucrose at the concentrations of 30 (control), 60 and 90 g L^{-1} and mannitol at the concentrations of 30, 40 and 50 g L^{-1} for four months. The result showed that the survival percentages of shoots cultured on $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with sucrose at all concentrations were 90-92.5. In contrast, mannitol gave 0-40 % survival. The plantlets were recovered on the same medium as the first experiment. The result showed that the shoots cultured on $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with various concentrations of mannitol were dead, while the other cultured on $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with sucrose at all concentrations gave survival rate at 94-97 %. Moreover, the shoots cultured on $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with 90 g L^{-1} sucrose had the highest shoot circumference (3.66 cm) and significantly different compared with the others.

Keywords: germplasm conservation; mannitol; *Musa* 'Namwa Pakchong 50'

1. บทนำ

กล้วยเป็นผลไม้ที่รู้จักกันแพร่หลายและมีอัตราการผลิตรายมากที่สุดในโลก เป็นพืชอาหารหลักที่มีความสำคัญเป็นอันดับที่ 4 ของโลก โดยพันธุ์ที่เป็นที่รู้จักกันแพร่หลาย คือ กล้วยหอม กล้วยไข่ และกล้วยน้ำว้า ซึ่งในแต่ละปีกล้วยน้ำว้ามีอัตราการผลิตรายสูงกว่ากล้วยไข่และกล้วยหอมเฉลี่ยถึง 3.5 เท่า [1] เป็นผลไม้ที่สามารถปลูกได้ในพื้นที่ที่มีภูมิอากาศเขตร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอากาศร้อนชื้น มีลำต้นเทียมสูงไม่เกิน 3.5 เมตร เครือหนึ่งมี 7-10 หวี หวีหนึ่งมี 10-16 ผล ผลใหญ่กว่ากล้วยไข่ กว้าง 3-4 เซนติเมตร ยาว 11-13 เซนติเมตร ตกเครือได้ตลอดทั้งปี มีคุณค่าทาง

อาหารมากทำให้เหมาะสำหรับรับประทานทั้งเด็กและผู้ใหญ่ [2,3] โดยกล้วยน้ำว้าพันธุ์ปลูกที่นิยมและมีสมบัติที่เหมาะสมแก่การผลิตเป็นการค้า คือ กล้วยน้ำว้าปากช่อง 50 [*Musa* (ABB Group) 'Namwa Pakchong 50'] [4] หรืออีกชื่อหนึ่ง คือ ไล่เหลียงอุบล มีอัตราการเจริญเติบโตสูง ผลผลิตที่ได้สูงสุดเฉลี่ย 30.6 กิโลกรัมต่อต้น จำนวนหวีต่อเครือ 11.6 หวี จำนวนผลต่อหวี 18.5 ผล และจำนวนผลต่อเครือ 214.8 ผล ระยะการแทงช่อดอก 37 สัปดาห์ คุณภาพดี ผลมีขนาดใหญ่สม่ำเสมอ น้ำหนักผล 139.9 กรัม เปลือกก่อนล้างหนาเนื้อแน่น มีความหวานโดยเฉลี่ยถึง 26.9 %Brix [2]

ประเทศไทยเป็นแหล่งพันธุกรรมกล้วยน้ำว้าที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง แต่เนื่องจากเกษตรกร นิยมปลูกไว้หัวไร่ปลายนา และไม่มีการดูแล ทำให้ผลผลิตไม่สม่ำเสมอ และไม่ได้คุณภาพ นอกจากนี้บางแห่งเกิดโรคระบาดทำให้กล้วยน้ำว้าล้มตายเป็นจำนวนมาก [4] อีกทั้งสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ผลผลิตเกิดการสูญเสียเกิดขึ้น เสี่ยงต่อการเข้าทำลายของโรคพืชและแมลงได้ง่ายยิ่งขึ้น จึงทำให้เกิดอุปสรรคต่อการเก็บรักษาอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยในแปลงปลูก ซึ่งต้องการพื้นที่จัดเก็บและแรงงานสูง [5,6] ส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการเก็บอนุรักษ์พันธุกรรมด้วยวิธีนี้มีค่าใช้จ่ายสูง ในขณะที่การเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* conservation) เป็นวิธีการที่อาศัยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ สามารถลดการใช้พื้นที่ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมเป็นอย่างดี แบ่งเป็น การรักษาพันธุกรรมด้วยการแช่แข็ง (cryopreservation) เป็นวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในระยะเวลาที่ยาวนาน โดยการใช้ไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส และการรักษาพันธุกรรมแบบชะลอการเจริญเติบโต (slow growth) เป็นวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในระยะเวลาที่สั้นกว่า วิธีการรักษานี้แบ่งออกเป็นระยะสั้น (mini term) เป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปกติ ซึ่งต้องการเปลี่ยนถ่ายอาหารบ่อย และระยะกลาง (medium term) เป็นการใช้อุณหภูมิต่ำเพิ่มสารควบคุมการเจริญเติบโต เพิ่มปริมาณวันมากขึ้น ดัดแปลงปริมาณธาตุอาหารเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงานภายในพืช และการเพิ่มปริมาณของน้ำตาลเป็นการเพิ่มแรงดันออสโมติกให้แก่สูตรอาหาร [6] ซึ่งวิธีการดั่งที่กล่าวมาข้างต้นเป็นการช่วยชะลอการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากผลของค่าแรงดันออสโมติกจะทำให้อัตราการขยายขนาดของเซลล์ในเนื้อเยื่อพืชที่กำลังเจริญลดลง เกิดการสูญเสียความเต่งและปริมาณของเซลล์ แต่เป็นเพียงการสูญเสียที่เกิดขึ้นเพียง

ชั่วคราวเท่านั้น เซลล์จะกลับคืนสู่ปริมาตรเดิมและมีแรงเต่งเท่าเดิมเนื่องจากพืชมีการปรับค่าออสโมติก (osmotic adjustment) แม้ว่าปริมาตรของเซลล์จะกลับสู่สภาพปกติ แต่การยืดยาวของเซลล์ลดลง [7] โดยน้ำตาลที่สามารถใช้เพิ่มแรงดันออสโมติก คือ น้ำตาลแมนนิทอล (D-mannohexane-1,2,3,4,5,6-hexaol) ซึ่งเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอน 6 อะตอม และเป็น acyclic hexitol มีโครงสร้างเป็นสเตอริโอไอโซเมอร์กับซอร์บิทอล มีความคงตัวในภาวะแห้งหรือในสารละลายของเหลวที่ปลอดเชื้อ และมีความสามารถดูดความชื้นต่ำมาก เป็นสาร osmoticum เมื่อผสมลงในอาหารจะทำให้ความดันออสโมติกของอาหารสูงขึ้น เป็นผลให้การดูดซับไอออนของพืชผิดปกติ การเจริญเติบโตของพืชจึงลดลง [8]

เทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมระยะกลางในสภาพปลอดเชื้อมีข้อได้เปรียบ คือ ประหยัดพื้นที่ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช ไม่เสี่ยงต่อการเข้าทำลายจากโรคพืชและแมลง ส่งผลให้ประหยัดงบประมาณและง่ายต่อการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมพืชระหว่างประเทศ อีกทั้งยังสามารถขยายพันธุ์ได้ในเวลาที่ต้องการ ทำให้เพิ่มปริมาณในเวลาที่รวดเร็ว [6] อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมระยะกลางของกล้วยน้ำว้าปากช่อง 50 ดังนั้นในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นของสูตรอาหาร MS (1 และ ½ เท่า) ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่มีผลต่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมกล้วยน้ำว้าปากช่อง 50 ในสภาพปลอดเชื้อ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พืชทดลอง

ยอดกล้วยน้ำว้าปากช่อง 50 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA (6-benzyladenine) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) 5.6-5.8

อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน นำมาตัดให้ยอมีความสูงขนาด 1 เซนติเมตร

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมกล้วย

2.2.1 ความเข้มข้นของอาหารสูตร MS

นำยอขนาด 1 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นสูตรอาหารที่มีต่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมระยะกลาง โดยเลี้ยงบนอาหาร MS และ ½MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร pH 5.6-5.8 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทรีตเมนต์ละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ต้น เป็นระยะเวลา 4 เดือน จากนั้นสังเกตการฟื้นฟูของหน่วยทดลองโดยนำต้นกล้วยไปเลี้ยงไว้ในอาหาร MS ที่มีการเติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร pH 5.6-5.8 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ T-test

2.2.2 ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาล

ศึกษาผลของชนิดและปริมาณน้ำตาลที่มีต่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมระยะกลาง โดยใช้อาหารสูตรดัดแปลง ½MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลแมนนิทอล 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นชุดควบคุม pH 5.6-5.8 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 6 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ต้น เป็นระยะเวลา 4 เดือน จากนั้นสังเกตการฟื้นฟูของหน่วยทดลองโดยนำต้นกล้วยไปเลี้ยงไว้ในอาหาร MS ที่มีการเติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีค่าความเป็นกรดต่าง 5.6-5.8 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

2.3 การบันทึกผล

2.3.1 ระยะการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมเก็บข้อมูลหลังเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน

- เปอร์เซ็นต์ของการรอดชีวิต
- ความสูงยอดใหม่ (เซนติเมตร)

2.3.2 ระยะฟื้นฟูหน่วยทดลอง เก็บข้อมูลหลังเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์

- เปอร์เซ็นต์ของการรอดชีวิต
- ความสูงยอดใหม่ (เซนติเมตร)
- ขนาดเส้นรอบวงต้น (เซนติเมตร)

โดยวัดจากโคนลำต้นเทียมขึ้นไป 1 เซนติเมตร โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์

2.4 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์หลักขณะเชิงปริมาณ ใช้ค่าสถิติทดสอบ T-test และ F-test (one-way ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี least significant different (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. ผลและวิจารณ์

3.1 ปัจจัยที่มีผลในระยะการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมกล้วย

3.1.1 ความเข้มข้นของอาหารสูตร MS

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมกล้วยนำว้าปากช่อง 50 บนอาหารสูตร MS และอาหารสูตรดัดแปลง ½MS ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าทรีตเมนต์ที่เก็บรักษาพันธุกรรมบนอาหารสูตร MS มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ย 95 % และทรีตเมนต์ที่เก็บรักษาพันธุกรรมบนอาหารสูตรดัดแปลง ½MS มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ย 92.5 % (ตารางที่ 1) ยอดกล้วยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และสูตรดัดแปลง ½MS ยังคงมีความสูงของยอดเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 1) โดยยอดที่เลี้ยงบนอาหารทั้งสองทรีตเมนต์มียอดใหม่สีเขียว แข็งแรง

ไม่พบอาการฉ่ำน้ำ เนื่องจากสูตรอาหาร MS เป็นสูตรอาหารสูตรพื้นฐานที่มีธาตุอาหารที่เหมาะสมกับกล้วย [5] อีกทั้งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยน้ำว้าปากช่อง 50 มีเปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตสูงและการเจริญเติบโตที่รวดเร็วถึงแม้ลดปริมาณธาตุอาหารจากสูตร MS ลงครึ่งหนึ่งยังสามารถเจริญเติบโตดี ดังนั้นในการทดลอง

Table 1 Survival percentage and shoot length of *Musa* ‘Namwa Pakchong 50’ after 4 months culturing on MS and ½MS.

Treatments	Survival percentage	Shoot length (cm)
MS	95	15.18±0.84
½MS	92.5	15.14±0.95
T-test		ns
%C.V.		5.90

ns = not significantly different at $p < 0.05$.

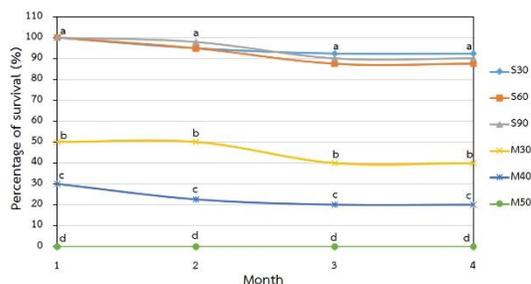


Figure 1 Survival percentage of *Musa* ‘Namwa Pakchong 50’ after 4 months culturing on ½MS supplemented with various types and concentrations of sugar: 30 g L⁻¹ sucrose (S30), 60 g L⁻¹ sucrose (S60), 90 g L⁻¹ sucrose (S90), 30 g L⁻¹ mannitol (M30), 40 g L⁻¹ mannitol (M40) and 50 g L⁻¹ mannitol (M50).

ทดลองที่ 2 จึงใช้อาหารสูตรดัดแปลง ½MS เนื่องจากมีการใช้ปริมาณธาตุอาหารน้อยกว่าและมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่ต่างจากอาหารสูตร MS

3.1.2 ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาล

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมกล้วยน้ำว้าปากช่อง 50 บนอาหารสูตรดัดแปลง ½MS และเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้น 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่าทริตเมนต์ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตรมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 90, 90 และ 92.5 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับทริตเมนต์ที่มีการเติมน้ำตาลแมนนิทอล 30 และ 40 กรัมต่อลิตรมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 40 และ 20 ตามลำดับ โดยอาหารสูตรที่มีการเติมน้ำตาลแมนนิทอลที่ระดับความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ไม่พบชิ้นส่วนรอดชีวิต (รูปที่ 1) เนื่องจากน้ำตาลแมนนิทอลจะมีผลต่อกระบวนการออสโมซิส [9] ซึ่งเป็นกระบวนการแพร่โมเลกุลของเหลวผ่านเยื่อเลือกผ่านจากบริเวณที่มีความเข้มข้นของสารละลายความเข้มข้นต่ำไปยังบริเวณที่มีสารละลายความเข้มข้นสูง กระบวนการนี้ทำให้โมเลกุลของของเหลวจะเท่ากัน [10] และหากมีความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอลที่สูงเกินไปสามารถเป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากแรงดันออสโมติกในอาหารสูงมากเกินไปทำให้พืชไม่สามารถดูดซึมธาตุอาหารเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงานส่งผลให้พืชตาย [9] จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการลดความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอลที่น้อยกว่า 30 กรัมต่อลิตรซึ่งอาจทำให้สามารถเก็บรักษาพันธุกรรมนานขึ้น

การเพาะเลี้ยงยอดกล้วยน้ำว้าปากช่อง 50 บนอาหารที่มีชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลต่างกัน พบว่าทริตเมนต์ที่เติมน้ำตาลซูโครสทั้ง 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร ยังคงมีความสูงของยอดเพิ่มขึ้น

จนจนผาขวดเพาะเลี้ยง ทำให้ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารก่อนครบกำหนด ต่างจากสมมติฐานที่ว่าเมื่อความเข้มข้นของอาหารสูงขึ้นจะส่งผลให้พืชดูดน้ำได้น้อยลงและการเจริญเติบโตลดลง พืชในสภาพธรรมชาติจะลำเลียงน้ำและธาตุอาหารผ่านท่อน้ำ การดูดน้ำของพืชสัมพันธ์กับการคายน้ำและแรงออสโมซิส โดยปริมาณน้ำที่พืชดูดเข้าไปมีสัดส่วนที่ต่างกันขึ้นอยู่กับอัตราการคายน้ำ กรณีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีการคายน้ำต่ำ ทำให้พืชดูดน้ำด้วยแรงออสโมซิสเพิ่มขึ้น [11] อีกทั้งน้ำตาลซูโครสที่เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจะแตกตัวเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส ทำให้พืชสามารถนำคาร์บอนจากน้ำตาลที่ละลายอยู่ในน้ำไปใช้ในการเจริญเติบโต [12] จึงทำให้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงไม่เป็นอันตรายกับกล้วยน้ำว่าปากช่อง 50 ใดๆก็ตาม ควรมีการปรับระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในระดับความเข้มข้นต่ำลงเพื่อให้สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรม [13] การทดลองยังพบว่าหลังจากการเก็บรักษา 30 วัน ทริตเมนต์ที่เติมน้ำตาลแมนนิทอลปริมาณ 30 และ 40 กรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตของหน่อเฉลี่ย 1 เซนติเมตร ทั้ง 2 ทริตเมนต์ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับยอดที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสปริมาณ 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตของหน่อเฉลี่ย 15, 13.9 และ 13 เซนติเมตรตามลำดับ (รูปที่ 2) เมื่อสังเกตจากลักษณะภายนอกพบว่ายอดที่เลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสมียอดใหม่ที่มีสีเขียว แข็งแรง ไม่พบอาการฉ่ำน้ำ ขณะที่ยอดที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลแมนนิทอลพบอาการซ้ำเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ใดๆก็ตาม สีของอาหารที่ใช้เก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมกล้วยน้ำว่าปากช่อง 50 ที่เติมน้ำตาลซูโครสมีสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งเป็นส่วนของสารประกอบฟีนอลิกซึ่งพืชปลดปล่อยออกมาเพื่อกำจัดของเสียภายในพืช ส่วนอาหารที่เติมน้ำตาลแมนนิทอล

นั้นมีสีขาวเช่นเดิม แสดงให้เห็นว่าพืชไม่สามารถปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกออกมา ทำให้ยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลแมนนิทอลตาย (รูปที่ 3)

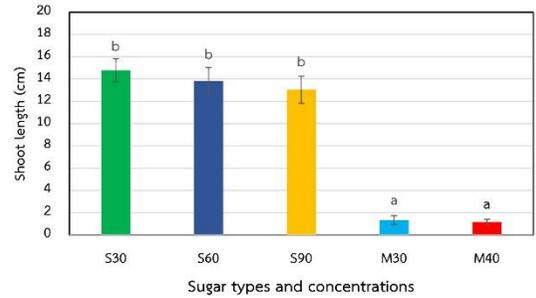


Figure 2 Average shoot length after 4 months culturing on $\frac{1}{2}$ MS supplemented with various types and concentrations of sugar: 30 g L^{-1} sucrose (S30), 60 g L^{-1} sucrose (S60), 90 g L^{-1} sucrose (S90), 30 g L^{-1} mannitol (M30) and 40 g L^{-1} mannitol (M40).

3.2 ระยะการฟื้นฟูหน่วยทดลอง

3.2.1 ความเข้มข้นของอาหารสูตร MS

หลังจากเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมกล้วยน้ำว่าปากช่อง 50 เป็นเวลา 4 เดือน ย้ายยอดมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังการเปลี่ยนถ่ายอาหารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ กล้วยในอาหารสูตร MS และ $\frac{1}{2}$ MS มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 97.3 % ทั้งสองทริตเมนต์ และลักษณะของยอดมีสีเขียว ไม่พบอาการฉ่ำน้ำ

ขนาดเส้นรอบวงต้นของกล้วยหลังผ่านระยะฟื้นฟูหน่วยทดลอง พบว่ากล้วยที่ผ่านการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสระดับความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร มีขนาด 2.22 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากทริตเมนต์ที่เก็บ

รักษาพันธุกรรมบนอาหารสูตรดัดแปลง ½MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีขนาด 0.93 เซนติเมตร (ตารางที่ 2) เนื่องจากอาหารสูตร MS มีปริมาณธาตุอาหารมากกว่าอาหาร

สูตรดัดแปลง ½MS จึงเลือกอาหารสูตรดัดแปลง ½MS มาใช้ในการทดลองที่ 2 เนื่องจากการรอดชีวิตไม่ต่างกัน

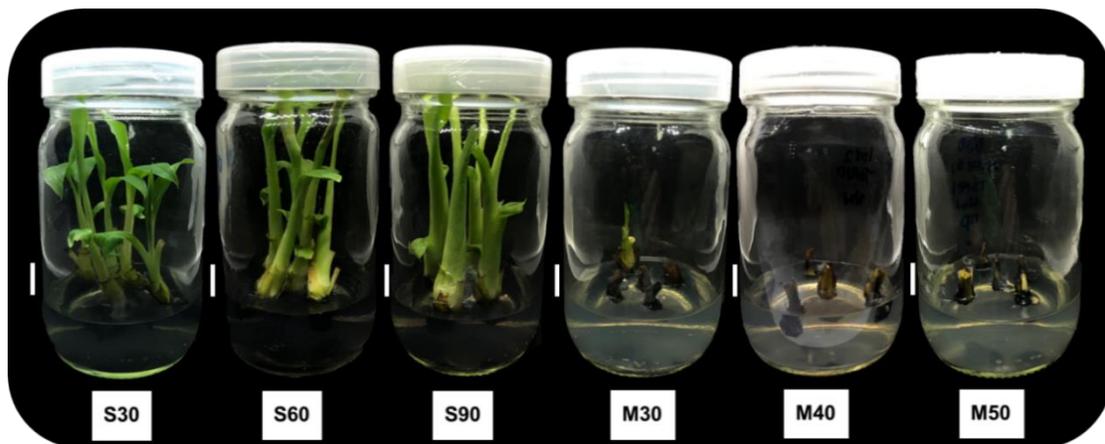


Figure 3 The growth of shoots after 4 months culturing on ½MS supplemented with various types and concentrations of sugar: 30 g L⁻¹ sucrose (S30), 60 g L⁻¹ sucrose (S60), 90 g L⁻¹ sucrose (S90), 30 g L⁻¹ mannitol (M30), 40 g L⁻¹ mannitol (M40) and 50 g L⁻¹ mannitol (M50). (scale bars = 1 cm)

Table 2 Survival percentage of shoot, shoot length and circumference of after restored on MS medium supplemented with 5 mg L⁻¹ BA for four weeks.

Treatments	Survival percentage (%)	Shoot length (cm)	Circumference of shoot (cm)
½MS + sucrose 30 g L ⁻¹	97.3	14.66±1.27	0.93±0.11 b
MS + sucrose 30 g L ⁻¹	97.3	16.9±2.06	2.22±0.25 a
T-test	-	ns	*
%C.V.		10.58	11.54
½MS + sucrose 30 g L ⁻¹	97.3	16.9 a	0.93±0.11 c
½MS + sucrose 60 g L ⁻¹	94.29	13.6 b	2.78±0.59 b
½MS + sucrose 90 g L ⁻¹	97.22	13.9 b	3.66±0.47 a
F-test	-	*	*
%C.V.		18.46	49.9

Means with different letters are significantly different at p < 0.05.



Figure 4 The growth of shoot after restored on MS medium supplemented with 5 mg L⁻¹ BA for four weeks and concentrations of sugar: 30 g L⁻¹ sucrose (S30), 60 g L⁻¹ sucrose (S60), 90 g L⁻¹ sucrose (S90), 30 g L⁻¹ mannitol (M30) and 40 g L⁻¹ mannitol (M40). (scale bars = 1 cm)

3.2.2 ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาล

เมื่อนำต้นกล้วยที่เลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง ½MS ที่เติมน้ำตาลชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ มาฟื้นฟูต้น พบว่ายอดกล้วยที่เลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง ½MS ที่เติมน้ำตาลแมนนิทอลทุกความเข้มข้น ไม่สามารถเจริญเติบโตและตายในที่สุดเนื่องจากในช่วงการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรม ชิ้นส่วนพืชชะงักการเจริญเติบโต เนื้อเยื่ออ่อนแอ และลำต้นเปลี่ยนเป็นสีเข้ม (รูปที่ 4) จึงนำต้นที่รอดชีวิตมาบันทึกข้อมูลการรอดชีวิตและการเจริญเติบโต โดยพบว่าทริตเมนต์ที่ผ่านการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมบนอาหารสูตรดัดแปลง ½MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตรมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 97.3, 94.29 และ 97.22 ตามลำดับ ความสูงต้นหลังผ่านระยะฟื้นฟูหน่วยทดลอง พบว่ากล้วยที่ผ่านการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมบนอาหารสูตร ½MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร มีความสูงยอด 16.9, 13.6 และ 13.9 เซนติเมตร ตามลำดับ เส้นรอบ

วงต้นของยอดที่เลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง ½MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร มีขนาดเส้นรอบวง 0.93, 2.78 และ 3.66 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยชิ้นส่วนที่เก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมบนอาหารสูตรดัดแปลง ½MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีขนาดเส้นรอบวงสูงที่สุด (ตารางที่ 2) เนื่องจากน้ำตาลซูโครสที่ถูกเก็บสะสมเมื่อสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสปริมาณสูง พืชดูดซึมน้ำตาลไปสะสมไว้ในเซลล์ต่าง ๆ ในปริมาณที่มาก [14] จึงส่งผลทำให้มีขนาดเส้นรอบวงที่สูงขึ้น

การรักษาเชื้อพันธุกรรมระยะกลางของกล้วยน้ำว่าปากช่อง 50 น้ำตาลแมนนิทอลสามารถชะลอการเจริญเติบโตของพืช แต่มีการรอดชีวิตต่ำเนื่องจากมีความระดับความเข้มข้นสูงเกินไป จึงควรศึกษาปริมาณและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการรอดชีวิตและการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมเพื่อลดจำนวนครั้งในการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ขณะที่น้ำตาลซูโครสทำให้ชิ้นส่วนพืชมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูง แต่เมื่อใช้ความ

เข้มข้นน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นไม่สามารถชะลอการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาปริมาณและความเข้มข้นเพิ่มเติม

4. สรุป

การศึกษาผลของสูตรอาหาร ชนิดและปริมาณน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยน้ำว้าปากช่อง 50 เพื่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมระยะกลางในครั้งนี้สรุปได้ว่าความเข้มข้นของธาตุอาหาร MS ที่เหมาะสม ได้แก่ อาหารสูตร MS ดัดแปลงซึ่งลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง ส่วนความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ น้ำตาลซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ซึ่งส่งผลให้ชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายสูง และต้นรอดชีวิตสูงถึง 97 เปอร์เซ็นต์ หลังนำออกฟื้นฟู แต่ต้นที่ได้ยังมีขนาดใหญ่ และน้ำตาลแมนนิทอลทุกความเข้มข้นไม่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมระยะกลาง

5. References

- [1] Seubsman, S., Yottapornpinit, P., Changsingha, P. and Pheangsup, S., 2012, Thai Wisdom and The Culture Significance of Bananas, Sukhothaimathirath Open University, Nonthaburi, 383 p. (in Thai)
- [2] Srisaart, A. and Ausuwan C., 2013, Cultivation Guide of Banana, Naka Inter Media Company, Samut Sakhon, 144 p. (in Thai)
- [3] Silayoi, B., 2015, Banana, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, 512 p. (in Thai)
- [4] Boonkorkaew, P., 2011, Thai Banana Database, Biodiversity- Based Economy Development Office (Public Organization), Bangkok, 304 p. (in Thai)
- [5] Wamaedeesa, R. and Dueramae, S., 2011, Multiplication of Kluai Hin (*Musa sapientum* Linn.) by tissue culture, Princess of Naradhiwas Univ. J. 3(3): 47-59. (in Thai)
- [6] Jiwsattanasakun, V. and Charoenwattana, P., 2014, *In vitro* conservation of bat flower (*Tacca chantrieri* Andre) through minimal growth, Khon Kaen Agric. J. 3: 562-566. (in Thai)
- [7] Udomprasert, N., 2015, Plant Stress Physiology, Chulalongkorn University, Bangkok, 237 p. (in Thai)
- [8] Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, Plant Physiol. 15: 473-497.
- [9] Distabanjong, K., Distabanjong, C. and Ruangviset, B., 2005, *In vitro* propagation and conservation of *Rhynchosyilis gigantea* (Lindl.) Ridl., pp. 571-578, Proceeding of 48th Kasetsart University Conference: Plant, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- [10] Sherwood, L., 2010, Human Physiology, From Cell to System, 7th Ed., Nelson Education, Ltd., Belmont, 711 p.
- [11] Feungchan, S., 2013, Principles of Horticulture, Klungnana Vitthaya, Khon Kaen, 1029 p. (in Thai)

- [12] Saurabh, B. and Sharma, K., 2015, Micro environmentation in Micropropagation, pp. 345-360, In Bhatia, S. (Ed.), Modern Application of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Science, Elsevier, Inc., Ltd., Amsterdam.
- [13] Normah, M.N., Chin, H.F. and Barbara M.R., 2013, Conservation of Tropical Plant Species, Springer, New York, 538 p.
- [14] Suriyapananont, S., 1995, Plant Structure, Department of Botany, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 135 p. (in Thai)