ปัญหาพิเศษ

ผลของออกซินและแหล่งคาร์บอนต่อการชักนำให้ออกราก ในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมันเหลือง (*Dioscorea decipiens*)

Effects of Auxin and Carbon Source Onto *In Vitro* Root Induction of *Dioscorea decipiens*

นางสาวปวิชญา ประยงค์ทรัพย์

ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

DEPARTMENT OF AGRONOMY

FACULTY OF AGRICULTURE KASETSART UNIVERSITY

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เกษตร)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์เกษตร พืชไร่นา

สาขา **ภาควิชา**

เรื่อง ผลของออกซินและแหล่งคาร์บอนต่อการชักนำให้ออกรากในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมันเหลือง (*Dioscorea decipiens*)

Effects of Auxin and Carbon Source Onto *In Vitro* Root Induction of *Dioscorea decipiens*

นามผู้วิจัย นางสาวปวิชญา ประยงค์ทรัพย์

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษหลัก .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณสิริ วรรณรัตน์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภัศจี คงศีล, Ph.D)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปาริชาติ พรมโชติ, Ph.D.)

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. .....

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ผลของออกซินและแหล่งคาร์บอนต่อการชักนำให้ออกราก ในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมันเหลือง (*Dioscorea decipiens*)

Effects of Auxin and Carbon Source Onto *In Vitro* Root Induction of *Dioscorea decipiens*

โดย

นางสาวปวิชญา ประยงค์ทรัพย์

เสนอ

ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

DEPARTMENT OF AGRONOMY

FACULTY OF AGRICULTURE KASETSART UNIVERSITY

บทคัดย่อ

นางสาวปวิชญา ประยงค์ทรัพย์ 2565: ผลของออกซินและแหล่งคาร์บอนต่อการชักนำให้ออกรากในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมันเหลือง (*Dioscorea decipiens*) ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิทยาศาสตร์เกษตร ภาควิชาพืชไร่นา อาจารย์ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณสิริ วรรณรัตน์, Ph.D. 31 หน้า

มันเหลือง (*Dioscorea decipiens*) เป็นพืชหัวที่พบการกระจายตัวในป่าธรรมชาติของไทย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถนำมาประยุกต์ใช้ขยายพันธุ์มันเหลืองเพื่อผลิตหัวแม่พันธุ์สำหรับปลูกเชิงพาณิชย์ได้ วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อพัฒนาสูตรอาหารออกรากสำหรับต้นเนื้อเยื่อมันเหลือง และศึกษาอัตราการรอดชีวิตหลังออกปลูกในแปลงของต้นกล้าเนื้อเยื่อมันเหลืองที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม Indole-3-butyric acid (IBA) และผงถ่านกัมมันต์ จากการเพาะเลี้ยงยอดเนื้อเยื่อมันเหลืองในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดัดแปลง เป็นเวลา 90 วัน พบว่า ต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองจากอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม IBA (0.3 มก./ล.) ร่วมกับซูโครสเข้มข้น 3% มีจำนวนรากสูงสุด ขณะที่ต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองจากอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม IBA (0.3 มก./ล.) ร่วมกับซูโครสเข้มข้น 4% มีน้ำหนักสดต้นสูงสุด จากการประเมินอัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของต้นกล้าเนื้อเยื่อมันเหลืองหลังอนุบาลในโรงเรือน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และหลังปลูกลงในแปลง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าต้นกล้ามันเหลืองเนื้อเยื่อจากกลุ่มที่อาหารเพาะเลี้ยงเติม IBA อย่างเดียว กลุ่มที่เติม IBA ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ และกลุ่มควบคุม มีอัตรารอดชีวิตเกิน 90% อย่างไรก็ตามต้นกล้ามันเหลืองเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตจากอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม IBA ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ มีค่าเฉลี่ยความสูงต้นและค่าเฉลี่ยจำนวนใบน้อยที่สุด

ปวิชญา ประยงค์ทรัพย์ สรรเสริญ วรรณรัตน์ 31 สิงหาคม

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษหลัก ___/___/___

ABSTRACT

Pawitchaya Prayongsap 2022: Effects of Auxin and Carbon Source Onto *In Vitro* Root Induction of *Dioscorea decipiens*. Bachelor's special problem in Agricultural Science, Department of Agronomy. Advisor: Wannasiri Wannarat, Ph.D. 31 pages.

Dioscorea decipiens, a tuber crop, distributes in natural forests of Thailand. Micropropagation of *D. decipiens* can be used to establish mother clones of tuber seed stocks for commercial plantation. The study aimed to develop the root induction medium of *D. decipiens* tissue culture and to observe the survival rate after transplanting into the field of *D. decipiens* plantlets resulting from the incubation of IBA and activated charcoal supplemented MS culture medium. Shoot explants were inoculated onto formulated culture media for 90 days. The results showed that *D. decipiens* plantlets generated from medium combined 0.3 mg./l. IBA with 3% sucrose formed the highest root number. While the fresh weight of those cultured on medium supplemented with 0.3 mg./l. IBA and 4% sucrose were highest. The survival rate and growth of *D. decipiens* tissue culture derived seedlings determined at the 4th week after transplanting to nursery and at the 4th week after field transplantation were 90% or higher in every experimental group including IBA alone, the combination of IBA and activated charcoal and none of IBA and activated charcoal. However, the survived seedlings regenerating from IBA and activated charcoal supplement treatment yielded the least averages of stem length and leave number.

ปวิชญา ประยงค์สกุลพร

Student's signature

Wannasiri Wannarat Mar 31, 2023

Special Problem Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และโครงการการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชหัวสกุลกลอย (*Dioscorea* sp.) เพื่อความมั่นคงทางอาหาร สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้เงินทุนสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณสิริ วรรณรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ที่ช่วยสอนและแนะนำอย่างเอาใจใส่ในการทำวิจัยครั้งนี้ตั้งแต่เริ่มต้นจนจบ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัศจี คงศีล อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษร่วมที่ช่วยให้คำแนะนำในการวิจัย และขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นาทุกท่านที่ได้สอนและชี้แนะสิ่งที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยในครั้งนี้และสำหรับใช้ต่อไปในอนาคต

ขอขอบคุณ คุณศรินยา คำพิลา เกษตรกรเจ้าของสวนป่า จังหวัดสระแก้ว ที่ให้ความอนุเคราะห์แปลงทดลอง ขอขอบคุณผู้ช่วยนักวิจัยห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับการสอนเทคนิควิจัยตั้งแต่เริ่มทำวิจัยและให้การดูแลเป็นอย่างดี และขอบคุณเพื่อน ๆ ที่ช่วยเหลือและให้กำลังใจจนงานวิจัยนี้สำเสร็จ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัวที่เป็นทั้งที่ปรึกษาและผู้ให้การสนับสนุนมาตลอด ทำให้ข้าพเจ้ามีกำลังใจและสามารถทำสิ่งต่าง ๆ ให้สำเร็จลุล่วงไปได้อย่างดี

นางสาวปวิชญา ประยงค์ทรัพย์

พฤศจิกายน 2565

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	4
วัตถุประสงค์	5
การตรวจเอกสาร	6
อุปกรณ์และวิธีการ	10
สถานที่และระยะเวลาการทำวิจัย	18
ผลและวิจารณ์	19
สรุป	28
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	29
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	31

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS ต่อปริมาตร 1 ลิตร 14

ตารางที่ 2 การเกิดรากและหัวในสภาพปลอดเชื้อของต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม IBA และซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ 20

ตารางที่ 3 การเจริญของเนื้อเยื่อมันเหลืองเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม IBA และซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ 21

ตารางที่ 4 อัตราการรอดชีวิตของต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองหลังย้ายปลูกในโรงเรือน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 23

ตารางที่ 5 การเจริญของเนื้อเยื่อมันเหลืองหลังย้ายปลูกในโรงเรือน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 24

ตารางที่ 6 อัตราการรอดชีวิตของต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองหลังย้ายปลูกในแปลงครบเวลา 4 สัปดาห์ 25

ตารางที่ 7 การเจริญของเนื้อเยื่อมันเหลืองหลังย้ายปลูกในแปลง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 26

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของมันเหลือง 6

ภาพที่ 2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 8

ภาพที่ 3 ต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองในอาหารสูตร BA 0.75 มก./ล. 13

ภาพที่ 4 ขั้นตอนประเมินการเจริญของต้นเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงต่าง ๆ หลังปรับสภาพเพื่อออกปลูกในแปลง 15

ภาพที่ 5 ผังแปลงปลูกทดสอบต้นกล้ามันเหลืองจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและหัวแม่พันธุ์ในแปลง 16

ภาพที่ 6 การเกิดหัวในสภาพปลอดเชื้อของต้นเนื้อเยื่อมันเหลือง 19

ภาพที่ 7 การเจริญของต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองหลังเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ 22

ภาพที่ 8 ต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองในสูตรอาหารต่าง ๆ หลังอนุบาลในโรงเรือนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ 23

ภาพที่ 9 ต้นกล้าเนื้อเยื่อมันเหลืองที่พัฒนาจากในสูตรอาหารต่าง ๆ หลังย้ายปลูกในแปลงครบ 4 สัปดาห์ 25

ผลของออกซินและแหล่งคาร์บอนต่อการชักนำให้ออกราก
ในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมันเหลือง (*Dioscorea decipiens*)

Effects of Auxin and Carbon Source Onto *In Vitro* Root Induction of *Dioscorea decipiens*.

คำนำ

มันเหลืองเป็นพืชในวงศ์กลอย (Dioscoreaceae) เป็นไม้เลื้อยที่พบในป่าเบญจพรรณและป่าดิบเขา นิยมนำหัวมันเหลืองมาเป็นอาหาร เนื่องจากต้นมันเหลืองในธรรมชาติสร้าง 1 หัวต่อต้น (Willkin and Thapyai, 2009) ซึ่งในปัจจุบันป่าถูกบุกรุกจากกิจกรรมหลาย ๆ อย่างของมนุษย์ จึงทำให้เกิดโอกาสที่พืชที่อาศัยในป่าจะสูญพันธุ์ได้ ดังนั้นควรมีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมของพืชป่าในท้องถิ่นของประเทศไทย (เชิดศักดิ์, 2554) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสำหรับมันเหลืองเพื่อนำมาใช้ในการอนุรักษ์พันธุ์มันเหลือง ผู้วิจัยคาดหวังว่างานวิจัยในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสำหรับพืชสกุลกลอยชนิดอื่น ๆ เพื่อเป็นแนวทางการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อประเมินการออกรากของเนื้อเยื่อมันเหลืองเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมออกซินและซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ และเพื่อประเมินการเจริญของต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองจากอาหารชักนำให้ออกรากที่เติมออกซินและผงถ่านกัมมันต์หลังจากปรับสภาพเพื่อออกปลูกในแปลง

การตรวจเอกสาร

ข้อมูลทั่วไปของมันเหลือง

มันเหลืองเป็นไม้เลื้อยในสกุล Dioscoreaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dioscorea decipiens* Hook.f. มีถิ่นกำเนิดจากประเทศจีน อินเดีย พม่าและลาว มันเหลืองสามารถเลื้อยได้สูงถึง 12 เมตร และจะเกิดหัว (tuber) เพียง 1 หัวต่อฤดูปลูก หัวมีลักษณะเป็นทรงกระบอกถึงทรงกระบองและจะออกหัวเป็นแนวตั้ง มีขนสั้น ๆ (indumentum) ความยาวประมาณ 0.2 - 0.35 มิลลิเมตร ปกคลุมทั่วทั้งต้น ลำต้นมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5 - 5 เซนติเมตร เวียนไปทางขวา มีลักษณะเป็นเนื้อไม้มีหนามแหลม ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงแบบตรงข้ามหรือสลับ ลักษณะเป็นทรงรี ก้านใบยาว 1.2 - 4.3 เซนติเมตร ใบเกล็ด (cataphylls) เป็นรูปไข่ มีความยาว 4.5-7 มิลลิเมตรและมีความกว้าง 3 - 5 มิลลิเมตร มีการเกิดหัวอากาศ (bulbils) ในบางสายพันธุ์ ซึ่งมีขนาดยาว 34 - 50 มิลลิเมตรและกว้าง 8.2 - 25 มิลลิเมตร ลักษณะเป็นทรงกระบองหรือทรงกลมถึงทรงไข่ มักพบมันเหลืองในป่าเบญจพรรณทั้งที่มีและไม่มีต้นไผ่และป่าดิบเขา (Willkin and Thapyai, 2009)

ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของมันเหลือง

ที่มา : วรรณสิริ (2562)

ประโยชน์ของพืชสกุลกลอย

กลอยเป็นพืชอาหารกลุ่มแป้งที่ชาวบ้านนิยมนำมารับประทาน ทำอาหารได้หลากหลาย เช่น กินแทนข้าว นึ่งปนกับข้าวเหนียว ทำเป็นข้าวเหนียวกลอยหน้ากะฉีด หน้าสังขยา โรยน้ำตาลปั่นปนกับงา ชุบแป้งทอด หรือฉาบน้ำตาล (สุพินญา, 2556) สามารถนำหัวมันเหลืองมาต้มนึ่งหรือคั่วเป็นอาหารได้ (Willkin and Thapyai, 2009) องค์ประกอบทางเคมีหลักของกลอย ชนิด *Dioscorea*

hispida Dennst. คือ แป้งถึง 15 - 25% นอกจากนี้ประกอบด้วย น้ำ ไขมัน ใยอาหาร เถ้า กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) และสารพิษในกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloid) และสเตียรอยด์ (steroid) เช่น ไดออสคอรีน (dioscorine, $C_{13}H_{19}O_2H$) ซาโปจินิน (sapogenin) ทาทาคอรีน (tatacorine) และไดออสจินิน (diosgenin) กลอยยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตร โดยนำน้ำแช่หัวกลอยมาฉีดฆ่าเพลี้ยอ่อนและแมลงทั่วไปได้ (สุพินญา, 2556) นอกจากนี้ สารไดออสจินิน (diosgenin) ที่พบในพืชสกุล *Dioscorea* เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยาคุมกำเนิด ฮอร์โมนเพศ และยาเสตียรอยด์อีกหลาย ๆ ชนิด และสามารถชะลอวัย ยับยั้งเชื้อรา โรคเบาหวาน มะเร็ง และการเกิดลิ่มเลือดได้อีกด้วย (Nazir *et al*., 2022)

เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากสามารถผลิตพืชที่มีลักษณะเหมือนกันเป็นจำนวนมากในเวลาไม่มาก และพืชที่ได้จะเป็นพืชที่สะอาด ปราศจากแมลงและปลอดเชื้อจากทั้งแบคทีเรีย รา ไวรัสและไฟโตพลาสม่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทำได้โดยนำชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ตาข้าง ตายอด หน่ออ่อน ใบ เมล็ด มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ประกอบด้วย เกลือแร่ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ควบคุมแสงและอุณหภูมิและปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2559)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์พืชเริ่มจากการเตรียมต้นแม่พันธุ์สำหรับฟอกฆ่าเชื้อ โดยการนำต้นแม่พันธุ์มาเลี้ยงในโรงเรือนเพื่อลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ ขั้นตอนที่สองคือการฟอกฆ่าเชื้อเนื้อเยื่อพืช เช่น ปลายยอด ตาข้าง ใบ เพื่อเป็นชิ้นเนื้อเยื่อปลอดเชื้อ ขั้นตอนที่สามคือการเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อตายอด ตาข้างในอาหารชักนำให้เพิ่มจำนวนตาพิเศษ (adventitious bud) ตาข้าง (axially bud) ขั้นตอนต่อไปคือการชักนำให้เนื้อเยื่อยอดยืดยาวและการเกิดราก เพื่อผลิตต้นอ่อนและเพื่อผลิตยอดที่จะนำไปใช้สำหรับการปักชำ โดยสามารถชักนำให้เกิดรากตั้งแต่ยังอยู่ในสภาพปลอดเชื้อหรือชักนำให้เกิดรากหลังออกมาจากขวดแล้ว และขั้นตอนสุดท้าย คือการย้ายปลูกต้นเนื้อเยื่อออกจากขวดเพาะเลี้ยง เป็นการปรับสภาพต้นเนื้อเยื่อให้เข้ากับสภาพแวดล้อมธรรมชาติและการอนุบาลต้นกล้าเนื้อเยื่อในโรงเรือน ก่อนนำไปปลูกในแปลง (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

ภาพที่ 2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ที่มา : https://www.plantcelltechnology.com/pct-blog/tissue-culture-contamination-and-7-easy-steps-of-prevention/

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของต้นเนื้อเยื่อพืชสกุล *Dioscorea*

การพัฒนาสูตรอาหารการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขึ้นอยู่กับชนิดพืช ลักษณะเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนที่นำมาใช้เพาะเลี้ยง (สิริภัทร์, 2560) มีการใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชใน *Dioscorea oppositifolia* L. เพื่อการขยายพันธุ์ โดยตัดตาที่กำลังเจริญจากเถาเลื้อยจากต้นในแปลงปลูก ความยาวประมาณ 1.5 – 2 เซนติเมตร มาฟอกฆ่าเชื้อ จากนั้นนำมาเนื้อเยื่อตาปลอดเชื้อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม Kinetin ความเข้มข้น 0.25 – 3 มก./ล. BAP (6-benzylaminopurine) ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.25 – 1 มก./ล. และ NAA (1-naphthalene acetic acid) ความเข้มข้น 0.25 – 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า กลุ่มควบคุมในอาหารที่ไม่มีการเติมฮอร์โมน (อาหารสูตรควบคุม) ไม่มีพัฒนายอดใหม่เลย กลุ่มที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม Kinetin ความเข้มข้น 1.5 มก./ล. ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มก./ล. และ NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. จะเกิดจำนวนยอดมากที่สุด (Behera *et al*., 2009) และมีการใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชผลิตต้นปลอดไวรัสของ *Dioscorea* spp. โดยนำส่วนข้อของต้นแม่ที่มีเชื้อไวรัส BV (*Badnavirus*) ไวรัส YMV (*Yam mosaic virus*) ทั้งที่ติดไวรัสชนิดเดียวและติดไวรัสทั้ง 2 ชนิดในต้นเดียวกัน และต้นที่มีเชื้อไวรัส YMMV (*Yam mild mosaic virus*) มาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรดัดแปลงเพื่อเพิ่มจำนวนยอดเป็นเวลา 7 วัน และนำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบอุณหภูมิสูงด้วยความร้อนเป็นเวลา 21 วัน พบว่าทำให้ต้นเนื้อเยื่อปลอดจากไวรัส YMMV 100% ไวรัส YMV 73% ไวรัส YMV + BV 25%

และ ไวรัส BV 24% (Balogun *et al*., 2017) มีการใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อเก็บรักษาพันธุ์มันจาวมะพร้าว (*Dioscorea alata* L.) โดยทดลองชะลอการเจริญของต้นจาวมะพร้าวเนื้อเยื่อในอาหาร MS ที่เติมแมนนิทอลเข้มข้น 0 – 3% เป็นเวลา 90 วัน พบว่า กลุ่มที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมแมนนิทอล 2% จำนวนยอด เปอร์เซ็นต์การเกิดราก และความสูงของต้นน้อยที่สุด (นุชจรี และ สุรีภรณ์, 2563)

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาของ *Dioscorea bulbifera* และ *Dioscorea olfersiana* ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 - 4 มก./ล. และซูโครส 15 – 80 ก./ล. เป็นเวลา 95 วัน พบว่า การเติมซูโครส 30 – 50 ก./ล. มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นจำนวนใบของต้นเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิด (Chu and Ribeiro, 2002) และเมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Dioscorea cayenensis-rotundata* ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสองระบบคือแบบกึ่งแข็งและแบบเหลวที่เติมและไม่เติมผงถ่านกัมมันต์ ความเข้มข้น 3 ก./ล. เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า การเติมผงถ่านกัมมันต์ 3 ก./ล. จะช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของยอดในอาหารทั้ง 2 ระบบ (Polzin *et al*., 2014) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Dioscorea rotundata* Poir ในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA, KIN, BAP ที่ความเข้มข้น 0 – 2 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การเติม IBA (indole-3-butyric acid) และ NAA (1-naphthalene acetic acid) ชักนำให้เกิดราก และการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมซูโครส 80 ก./ล. เป็นเวลา 8 เดือน ชักนำให้เกิดหัวในสภาพปลอดเชื้อ (microtuber) สูงสุด (Uchendu *et al*., 2016)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ต้นเนื้อเยื่อมันเหลือง

2. อุปกรณ์และวัสดุสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.1 ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อปลอดเชื้อ (Laminar flow)
2.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำความดันสูง
2.3 กระบอกใส่อุปกรณ์
2.4 ตะแกรงฆ่าเชื้อแล้ว
2.5 ปากคีบ
2.6 ด้ามมีด
2.7 จานแก้วเพาะเลี้ยงสำหรับรองตัด
2.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์
2.9 ถุงมือผ่าตัด
2.10 ผ้าขนหนูนึ่งฆ่าเชื้อ
2.11 ถาดบรรจุ 95% เอทิลแอลกอฮอล์
2.12 เครื่องชั่งดิจิตอล 2 ตำแหน่ง

3.สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1 ปุ๋ยเคมีเม็ดละลายช้า สูตร 13-13-13
3.2 6-benzylaminopurine (BA)
3.3 Indole-3-butyric acid (IBA)
3.4 ผงถ่านกัมมันต์ (Activated carbon)
3.5 น้ำตาลทราย
3.6 แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)
3.7 โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3)

3.8 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)

3.9 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)

3.10 โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4)

3.11 กรดบอริก (H_3BO_3)

3.12 แมงกานีสซัลเฟตเตตระไฮเดรต ($MnSO_4.4H_2O$)

3.13 ซิงค์ซัลเฟตเตตระไฮเดรต ($ZnSO_4.4H_2O$)

3.14 โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)

3.15 โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต ($Na_2MoO_4.2H_2O$)

3.16 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$)

3.17 โคบอล์ตคอลไรด์เฮกซะไฮเดรต ($CoCl_2.6H_2O$)

3.18 กรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติก (Na_2-EDTA)

3.19 เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)

3.20 ไกลซีน (Glycine)

3.21 กรดนิโคตินิก (Nicotinic acid)

3.22 ไพริดอกซีน ไฮโดรคลอไรด์ (Pyridoxine-HCl)

3.23 ไทอามีน ไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl)

3.24 ไมโออิโนซิทอล (Myo-inositol)

3.25 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.26 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)

3.27 น้ำกลั่น

3.28 ผงวุ้น

3.29 95% เอทิลแอลกอฮอล์ (C_2H_6O)

3.30 70% เอทิลแอลกอฮอล์ (C_2H_6O)

4. อุปกรณ์และวัสดุสำหรับย้ายปลูกและเก็บข้อมูล

4.1 ถุงเพาะชำ

4.2 ดิน

4.3 แกลบเผา

4.4 ขุยมะพร้าว

4.5 มะพร้าวสับ

4.6 พลั่ว

4.7 กรรไกร

4.8 ไม้บรรทัด

4.9 เวอร์เนีย

4.10 กระดาษกราฟ

4.11 เครื่องชั่งดิจิตอล 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. การประเมินการออกรากของเนื้อเยื่อมันเหลืองเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลงที่เติม IBA และซูโครส

1.1. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ใช้ในการทดลอง

ผสมธาตุอาหาร วิตามิน กรดอะมิโน ในน้ำกรองตามอัตราส่วนที่แสดงใน ตารางที่ 1 ปรับปริมาตรสารละลายอาหาร-ปรับค่ากรดด่างให้เป็น 5.6 เติม IBA และน้ำตาลทราย จากนั้นเติมผงวุ้นและหลอมสารละลายจนผงวุ้นละลายหมด นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำความดันสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 21 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

1.2. การเตรียมต้นเนื้อเยื่อที่ใช้ในการทดลอง

มันเหลืองเนื้อเยื่อที่นำมาทดลองออกราก การเพิ่มจำนวนเนื้อเยื่อตาในอาหารสูตร MS ที่เติม BA (6-Benzylaminopurine) 0.75 มก./ล. เป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นจึงย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญทดลองที่เติม IBA และซูโครสเป็นเวลาอีก 3 เดือน

ภาพที่ 3 ต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองในอาหารสูตร BA 0.75 มก./ล.

1.3. แผนการทดลอง

การทดลองเป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) มี 4 ทรีตเมนต์ คือ

1. อาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสเข้มข้น 3%
2. อาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสเข้มข้น 3% และ IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล.
3. อาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสเข้มข้น 4 %
4. อาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสเข้มข้น 4% และ IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล.

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยอด 10 เนื้อเยื่อ ต่อซ้ำ ทรีตเมนต์ละ 3 ซ้ำ ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์

1.4. เก็บผลการทดลอง

- เก็บข้อมูลจำนวนข้อ จำนวนใบ จำนวนราก วัดความสูงต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นเนื้อเยื่อ
- อัตราการเกิดราก = $\frac{\text{จำนวนต้นเนื้อเยื่อที่เกิดราก}}{\text{จำนวนต้นเนื้อเยื่อทั้งหมด}} \text{ X } 100$
- อัตราการเกิดหัวในสภาพปลอดเชื้อ = $\frac{\text{จำนวนต้นเนื้อเยื่อที่เกิดหัว}}{\text{จำนวนต้นเนื้อเยื่อทั้งหมด}} \text{ X } 100$
- อัตราการรอดชีวิต = $\frac{\text{จำนวนต้นเนื้อเยื่อที่รอดชีวิต}}{\text{จำนวนต้นเนื้อเยื่อทั้งหมด}} \text{ X } 100$

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS ต่อปริมาตร 1 ลิตร

สารเคมี	ปริมาณ (มิลลิกรัม)	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตรต่อลิตร)
<u>Stock 1</u>			
NH_4NO_3	33,000	20	
KNO_3	38,000	20	
$CaCl_2.2H_2O$	8,800	20	50
$MgSO_4.7H_2O$	7,400	20	
KH_2PO_4	3,400	20	
<u>Stock 2</u>			
H_3BO_3	620	100	
$MnSO_4.4H_2O$	2,230	100	
$ZnSO_4.7H_2O$	860	100	
KI	83	100	10
$Na_2MoO_4.2H_2O$	25	100	
$CuSO_4.5H_2O$	2.5	100	
$CoCl_2.6H_2O$	2.5	100	
<u>Stock 3</u>			
Na_2-EDTA	3,725	100	10
$FeSO_4.7H_2O$	2,785	100	
<u>Stock 4</u>			
Glycine	200	100	
Nicotinic acid	50	100	
Pyridoxine-HCl	50	100	10
Thiamine-HCl	10	100	
Myo-inositol	1,000	100	

2. การประเมินการเจริญของต้นเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงต่าง ๆ หลังปรับสภาพเพื่อออกปลูกในแปลง

ต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองที่ปรับสภาพเพื่อออกปลูกในแปลงมาจากอาหารชักนำให้ออกราก 3 สูตร คือ อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนและผงถ่านกัมมันต์ อาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล. และอาหารสูตร MS ที่เติมทั้ง IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล. และผงถ่านกัมมันต์ 1 ก./ล. ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยสรุปดังภาพที่ 4

ภาพที่ 4 ขั้นตอนประเมินการเจริญของต้นเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงต่าง ๆ หลังปรับสภาพเพื่อออกปลูกในแปลง

2.1. การปรับสภาพต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองในห้องแสงเทียม

ย้ายปลูกต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในถ้วยปลูกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว ที่บรรจุสแฟกนั่มมอส และปรับสภาพในห้องปิดที่ควบคุมอุณหภูมิและให้แสงเทียมเป็นเวลา 2 เดือน หลังจากนั้นย้ายปลูกต้นเนื้อเยื่อที่พัฒนายอดและรากใหม่ในถุงเพาะชำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว วัสดุปลูกคือดินผสมขุยมะพร้าวและแกลบ ในอัตราส่วน 1:1:1 โรยปุ๋ยเม็ดละลายช้าสูตร 13-13-13 ประมาณ 4-5 เม็ดในถุงปลูก

2.2. การอนุบาลต้นกล้าเนื้อเยื่อมันในโรงเรือน

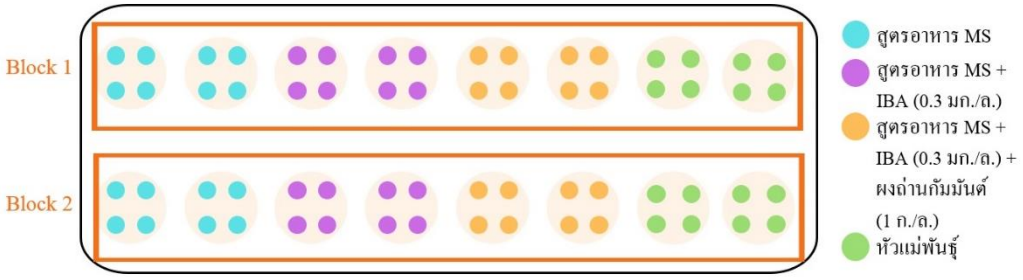
ย้ายต้นกล้าเนื้อเยื่อมันเหลืองไปวางไว้ในโรงเรือนพลาสติกที่ได้รับแสงอาทิตย์ตลอดทั้งวัน เป็นการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design) โดยวางต้นกล้าเนื้อเยื่อมันเหลืองจากแต่ละสูตรอาหารจำนวน 10 ต้น ต่อสูตรอาหาร ทำซ้ำ 3 ซ้ำ รดน้ำทุกวันเป็นเวลาอย่างน้อย 1 อาทิตย์ หลังจากที่ต้นกล้าปรับสภาพได้จึง

รดน้ำอาทิตย์ละ 2-3 ครั้ง เมื่ออนุบาลต้นกล้าในโรงเรือนครบ 4 สัปดาห์ เก็บข้อมูลอัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าเนื้อเยื่อมันเหลือง และข้อมูลการเจริญของต้นกล้าเนื้อเยื่อ คือ จำนวนข้อ จำนวนใบ จำนวนกอ ความสูงต้น ความกว้างของใบ และความยาวของใบ

2.3 การปลูกทดสอบต้นกล้ามันเหลืองจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในแปลง

เตรียมแปลงทดลองด้วยการนำวงบ่อซีเมนต์มาจัดวางในแปลงตามผังแปลงที่แสดงในภาพ ที่ 4 จากนั้นนำดินปลูกผสมกับทรายในอัตราส่วน 1:1 เติมลงในวงบ่อซีเมนต์จนเกือบเต็ม ให้น้ำระบบมินิสปริงเกอร์ ทำค้างความยาวประมาณ 30 เซนติเมตร เพื่อให้ต้นมันเหลืองยึดเกาะ วางต้นกล้ามันเหลืองเนื้อเยื่อในแปลงที่ปลูก เพื่อปรับสภาพกับแสงแดดกลางแจ้งอย่างน้อย 3 วัน

ปลูกทดสอบตามแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ โดยเปรียบเทียบการเจริญของต้นกล้ามันเหลืองที่มาจากหัวแม่พันธุ์ธรรมชาติ กับต้นกล้ามันเหลืองจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 3 สูตร ขุดหลุมปลูกในบ่อซีเมนต์ตามแผนการทดลอง ปลูกหัวมันเหลืองและต้นกล้ามันเหลืองจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวน 8 ตัวอย่าง ต่อทรีตเมนต์ โดยมี 4 ตัวอย่าง ต่อ 1 บ่อซีเมนต์ และจำนวน 1 ตัวอย่าง ต่อหลุมปลูก มีบ่อซีเมนต์ทั้งหมด 2 บ่อซีเมนต์ ต่อทรีตเมนต์ ต่อซ้ำ ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง หลังย้ายปลูกต้นกล้ามันเหลืองจากเนื้อเยื่อและหัวมันเหลืองในแปลงเป็นเวลา 1 เดือน เก็บอัตรารอดชีวิตของต้นกล้าที่ปลูก และข้อมูลการเจริญของต้นกล้ามันเหลือง คือ จำนวนใบ ความสูงต้น ความกว้างของใบ ความยาวของใบ



ภาพที่ 5 ผังแปลงปลูกทดสอบต้นกล้ามันเหลืองจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและหัวแม่พันธุ์ในแปลง

3. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามวิธีการของ Tukey's Honest Significant Difference (HSD) Test ด้วยโปรแกรม STAR 2.0.1 (IRRI) ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

สถานที่และระยะเวลาการทำวิจัย

1. สถานที่การทำวิจัย

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โรงเรือนคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสวนป่าเกษตรกร อำเภอเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว

2. ระยะเวลาการทำวิจัย

เดือน มกราคม ถึง กันยายน พ.ศ. 2565

ผลและวิจารณ์

งานวิจัยนี้มี 2 การทดลอง การทดลองที่หนึ่งเพื่อหาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชักนำให้เนื้อเยื่อมันเหลืองการออกรากและสร้างหัวในสภาพปลอดเชื้อ และการทดลองที่สองเพื่อปลูกทดสอบต้นกล้ามันเหลืองจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เปรียบเทียบกับการปลูกมันเหลืองด้วยหัวแม่พันธุ์ ผลการทดลองมีรายละเอียดดังนี้

1. การประเมินการออกรากของเนื้อเยื่อมันเหลืองเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลงที่เติม IBA และซูโครส

1.1. การเกิดรากและการเกิดหัวในสภาพปลอดเชื้อของเนื้อเยื่อมันเหลืองเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 12 สัปดาห์

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเหลืองในอาหาร MS ทั้ง 4 สูตร ได้แก่ สูตรที่เติมซูโครสเข้มข้น 3% สูตรที่เติมซูโครสเข้มข้น 4% สูตรที่เติมทั้งเข้มข้น 3% และ IBA เข้มข้น 0.3 มก./ล. และสูตรที่เติมทั้งซูโครสเข้มข้น 4% และ IBA เข้มข้น 0.3 มก./ล. เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยมีการเก็บข้อมูลจำนวนต้นเนื้อเยื่อที่เกิดรากและเกิดหัวในสภาพปลอดเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 2

พบว่า ต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองจากทุกสูตรอาหารมีการเกิดรากมากกว่า 70 % และเกิดหัวมากกว่า 60% โดยสูตรอาหาร MS ที่เติมซูโครสเข้มข้น 3% และ IBA เข้มข้น 0.3 มก./ล. เป็นสูตรที่ทำให้ต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองเกิดรากมากที่สุด ที่ 92.31% และสูตรอาหาร MS ที่เติมซูโครสเข้มข้น 4% และ IBA 0.3 มก./ล. เป็นสูตรอาหารที่ทำให้ต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองเกิดการเกิดหัวมากที่สุด ที่ 76.67% (ภาพที่ 6)

ภาพที่ 6 การเกิดหัวในสภาพปลอดเชื้อของต้นเนื้อเยื่อมันเหลือง

ตารางที่ 2 การเกิดรากและการเกิดหัวในสภาพปลอดเชื้อของต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม IBA และซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

ทรีตเมนต์	ออกราก เกิดหัว (%)	ออกราก ไม่เกิดหัว (%)	ไม่ออกราก เกิดหัว (%)	ไม่ออกราก ไม่เกิดหัว (%)
MS + ซูโครส เข้มข้น 3%	60	26.67	10	3.33
MS + ซูโครส เข้มข้น 3% + IBA (0.3 มก./ล.)	57.69	34.62	3.85	3.84
MS + ซูโครส เข้มข้น 4%	53.34	23.33	20	3.33
MS + ซูโครส เข้มข้น 4% + IBA (0.3 มก./ล.)	56.67	16.67	20	6.66

1.2. การเจริญของเนื้อเยื่อมันเหลืองเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 12 สัปดาห์

จากการเก็บผลการเจริญของต้นเนื้อเยื่อมันเหลือง ซึ่งประกอบไปด้วย จำนวนข้อ จำนวนใบ จำนวนราก ความสูงต้น ความยาวราก และน้ำหนักสดต้น หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ภาพที่ 7)

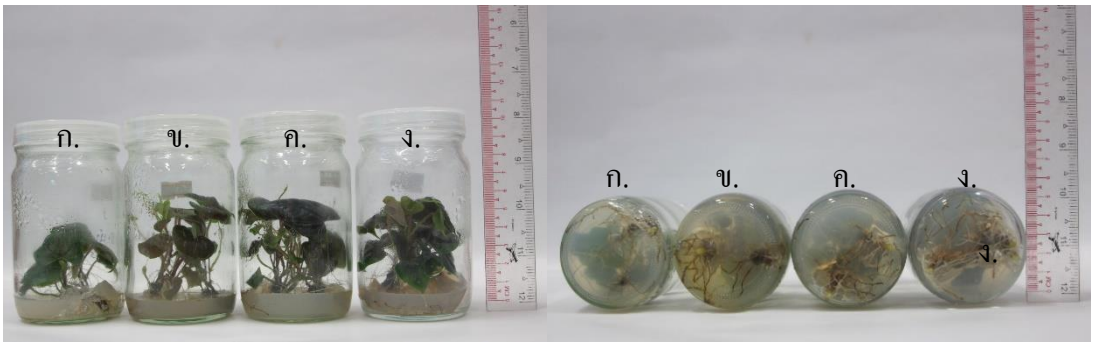
พบว่าต้นเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสเข้มข้น 3% และ IBA เข้มข้น 0.3 มก./ล. มีค่าเฉลี่ยจำนวนรากมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ที่ 7.96 ราก และสูตรอาหาร MS ที่เติมซูโครสเข้มข้น 4% และ IBA เข้มข้น 0.3 มก./ล. มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดต้นมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ที่ 0.7612 กรัม (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การเจริญของเนื้อเยื่อมันเหลืองเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม IBA และซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

ทรีตเมนต์	ค่าเฉลี่ยจำนวนข้อ	ค่าเฉลี่ยจำนวนใบ	ค่าเฉลี่ยจำนวนราก	ค่าเฉลี่ยความสูงต้น (ซม.)	ค่าเฉลี่ยความยาวราก (ซม.)	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดต้น (ก.)
MS + ซูโครสเข้มข้น 3%	4.54	7.04	6.07 b	4.92	3.04	0.5314 b
MS + ซูโครสเข้มข้น 3% + IBA (0.3 มก./ล.)	3.61	6.39	7.96 a	5.69	3.01	0.5901 b
MS + ซูโครสเข้มข้น 4%	4.68	7.60	2.39 c	5.35	3.32	0.5835 b
MS + ซูโครสเข้มข้น 4% + IBA (0.3 มก./ล.)	4.75	7.05	2.09 c	5.23	2.80	0.7612 a
C.V. (%)	14.53	14.50	19.11	9.24	27.46	9.98
F-test	NS	NS	**	NS	NS	**

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 7 การเจริญของต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองหลังเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์
ก. สูตร MS ที่เติมซูโครสเข้มข้น 3%
ข. สูตร MS ที่เติมทั้งซูโครสเข้มข้น 3% และ IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล.
ค. สูตร MS ที่เติมซูโครสเข้มข้น 4%
ง. สูตร MS ที่เติมทั้งซูโครสเข้มข้น 4% และ IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล.

2. การประเมินการเจริญของต้นเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงต่าง ๆ หลังปรับสภาพเพื่อออกปลูกในแปลง

2.1. การเจริญของต้นกล้ามันเหลืองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในโรงเรือน

2.1.1. การรอดชีวิตของต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองหลังย้ายปลูกในโรงเรือน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากการประเมินอัตรารอดชีวิตของนำต้นกล้ามันเหลืองเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร MS สูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล. และ สูตร MS ที่เติมทั้ง IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล. และผงถ่านกัมมันต์ 1 ก./ล. หลังอนุบาลในโรงเรือน 4 สัปดาห์ พบว่าต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองจากทุกสูตรอาหารรอดชีวิต 100% (ตารางที่ 4 และภาพที่ 8)

ตารางที่ 4 อัตราการรอดชีวิตของต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองหลังย้ายปลูกในโรงเรือนเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ทรีตเมนต์	จำนวนต้น	การรอดชีวิต (%)
MS	30	100
MS + IBA (0.3 มก./ล.)	30	100
MS + IBA (0.3 มก./ล.) + ผงถ่านกัมมันต์ (1 ก./ล.)	30	100

ภาพที่ 8 ต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองในสูตรอาหารต่าง ๆ หลังอนุบาลในโรงเรือนเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ก. สูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล.

ข. สูตร MS

ค. สูตร MS ที่เติมทั้ง IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล. และผงถ่านกัมมันต์ 1 ก./ล.

2.1.2. การเจริญของต้นกล้ามันเหลืองจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลังอนุบาลในโรงเรือน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากข้อมูลการเจริญของต้นกล้ามันเหลืองจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ จำนวนข้อ จำนวนใบ ความสูงต้น จำนวนกอ ความกว้างใบ และความยาวใบ เมื่ออนุบาลในโรงเรือนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 5) พบว่าต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองจากสูตรอาหาร MS และสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล. มีค่าเฉลี่ยจำนวนข้อและค่าเฉลี่ยจำนวนใบมากกว่าต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองที่มาจากสูตรอาหาร MS ที่เติมทั้ง IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล. และผงถ่านกัมมันต์ 1 ก./ล. อย่างมีนัยสำคัญ

2.2. การเจริญของต้นกล้าเนื้อเยื่อมันเหลืองในแปลงปลูก

จากการย้ายต้นกล้าเนื้อเยื่อมันเหลืองปลูกในแปลงเพื่อเพื่อทดสอบผลผลิตเปรียบเทียบกับการใช้หัวแม่พันธุ์ ได้มีการเก็บผลการทดลองดังนี้

2.2.1. การรอดชีวิตของต้นกล้าเนื้อเยื่อมันเหลืองหลังย้ายปลูกในแปลงครบ 4 สัปดาห์

ได้มีการเก็บข้อมูลจำนวนต้นที่รอดชีวิต พบว่าต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองจากทุกสูตรอาหารมีการรอดชีวิต 100% ยกเว้นต้นเนื้อเยื่อจากสูตรอาหาร MS ที่การรอดชีวิต 93.75% (ตารางที่ 6 และภาพที่ 9)

ตารางที่ 5 การเจริญของเนื้อเยื่อมันเหลืองหลังย้ายปลูกในโรงเรือน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ทรีตเมนต์	ค่าเฉลี่ยจำนวนข้อ	ค่าเฉลี่ยจำนวนใบ	ค่าเฉลี่ยความสูงต้น (cm.)	ค่าเฉลี่ยจำนวนกอ	ค่าเฉลี่ยความกว้างใบ (cm.)	ค่าเฉลี่ยความยาวใบ (cm.)
MS	8.47 a	7.67 a	16.94	1.83	6.29	9.28
MS + IBA (0.3 มก./ล.)	8.93 a	7.83 a	16.24	1.97	6.69	9.32
MS + IBA (0.3 มก./ล.) + ผงถ่านกัมมันต์ (1 ก./ล.)	5.97 b	5.48 b	9.46	1.66	6.29	8.17
C.V. (%)	13.03	12.81	24.22	20.80	4.39	6.81
F-test	**	**	NS	NS	NS	NS

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 6 อัตราการรอดชีวิตของต้นกล้าเนื้อเยื่อมันเหลืองหลังย้ายปลูกในแปลงครบเวลา 4 สัปดาห์

ทรีตเมนต์	จำนวนต้น	การรอดชีวิต (%)
MS	16	93.75
MS + IBA (0.3 มก./ล.)	16	100
MS + IBA (0.3 มก./ล.) + ผงถ่านกัมมันต์ (1 ก./ล.)	16	100

ภาพที่ 9 ต้นกล้าเนื้อเยื่อมันเหลืองที่พัฒนาจากในสูตรอาหารต่าง ๆ หลังย้ายปลูกในแปลงครบ 4 สัปดาห์

ก. สูตร MS

ข. สูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล.

ค. สูตร MS ที่เติมทั้ง IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล. และผงถ่านกัมมันต์ 1 ก./ล.

2.2.2. การเจริญของเนื้อเยื่อมันเหลืองหลังย้ายปลูกในแปลงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ได้มีการเก็บข้อมูลการเจริญของต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองซึ่งประกอบไปด้วย จำนวนใบ ความสูงต้น ความกว้างใบ และความยาวใบ จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีตเมนท์ และนำไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติ จะได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7

พบว่าต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองจากสูตรอาหาร MS และ สูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล. มีค่าเฉลี่ยจำนวนใบและค่าเฉลี่ยความสูงต้นมากกว่าต้น

เนื้อเยื่อมันเหลืองที่มาจากสูตรอาหาร MS ที่เติมทั้ง IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล. และผงถ่านกัมมันต์ 1 ก./ล. อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 7 การเจริญของเนื้อเยื่อมันเหลืองหลังย้ายปลูกในแปลงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ทรีตเมนต์	ค่าเฉลี่ยจำนวนใบ	ค่าเฉลี่ยความสูงต้น (ซม.)	ค่าเฉลี่ยความกว้างใบ (ซม.)	ค่าเฉลี่ยความยาวใบ (ซม.)
MS	7.15 a	25.52 a	6.41	9.72
MS + IBA (0.3 มก./ล.)	7.40 a	23.19 a	6.75	9.69
MS + IBA (0.3 มก./ล.) + ผงถ่านกัมมันต์ (1 ก./ล.)	5.20 b	10.91 b	6.61	8.84
C.V. (%)	18.07	32.20	10.34	6.99
F-test	**	**	NS	NS

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากผลการทดลองที่ต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองเพาะเลี้ยงในสูตร MS ที่เติมซูโครสความเข้มข้นสูงขึ้นเป็น 40 ก./ล. ร่วมกับ IBA 0.3 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การเกิดหัวในสภาพปลอดเชื้อมากที่สุด การศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Nazir *et al.* (2022) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *D. deltoidea* ในอาหารที่เติมซูโครสความเข้มข้น 60 ก./ล. มีอัตราการเกิดหัวในสภาพปลอดเชื้อมากที่สุด เช่นเดียวกับ *D. opposita* (Li *et al*., 2014) และ *D. cayenensis-D.rotundata* cv. Krengle และ cv. Kponan (Oliver *et al*., 2012) นอกจากนี้ Behera *et al*. (2009) พบว่า IBA เพิ่มอัตราการชักนำให้ออกรากใน *D. oppositifolia* L. ทำให้สรุปได้ว่า น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูงและ IBA น่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมการออกรากและการเกิดหัวในสภาพปลอดเชื้อในพืชสกุลกลอย

เมื่อออกปลูกต้นกล้ามันเหลืองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในโรงเรือนและแปลง พบว่า การปรับตัวของต้นกล้าเนื้อเยื่อที่มาจากการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำให้ออกรากที่เติม IBA หรือ ผงถ่านกัมมันต์ หลังจากออกปลูกในสภาพธรรมชาติ ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม โดยต้นกล้าทุกกลุ่มทดลองมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 90% ผลการศึกษาที่พบสอดคล้องกับรายงานในพืชสกุล

กลอยชนิดอื่นๆ ได้แก่ *D. alata* ที่มีการรอดชีวิต 85 – 87% (Das *et al.*, 2013) และ *D. oppositifolia* L. ที่มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 90% (Behera *et al*., 2009) นอกจากนี้ Fotso *et al*. (2013) พบว่า ต้นเนื้อเยื่อ *D.alata* L. มีอัตรารอดชีวิตตั้งแต่ 6 – 97% โดยขึ้นอยู่กับวัสดุปลูกที่ใช้ขณะทำการปรับสภาพต้นเนื้อเยื่อ *D. alata* L. มีการรอดชีวิต 100% ในวัสดุปลูก ดินดำผสมทราย อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การใช้สแฟกนั่มมอสมีความเหมาะสมในออกปลูกต้นเนื้อเยื่อมันเหลือง ต้นกล้าสามารถปรับอัตราการคายน้ำในช่วง acclimatization ได้ดี ทำให้มีอัตรารอดชีวิตสูงมากกว่า 90%

สรุป

1. เนื้อเยื่อมันเหลืองที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสเข้มข้น 3% พร้อมกับ IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล. มีค่าเฉลี่ยจำนวนรากมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ

2. ต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมซูโครสเข้มข้น 4% เป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีอัตราการเกิดหัวในสภาพปลอดเชื้อมากที่สุด

3. หลังจากการปรับสภาพในโรงเรือนและปลูกในแปลง ต้นเนื้อเยื่อมันเหลืองที่เพาะเลี้ยงในสูตรที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.3 มก./ล.และผงถ่านกัมมันต์เข้มข้น 1 ก./ล. มีค่าเฉลี่ยของจำนวนใบและค่าเฉลี่ยของความสูงต้นสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2547. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : เพื่อการประยุกต์ทางการเกษตร**. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

กรมส่งเสริมการเกษตรและสหกรณ์. 2559. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

เชิดศักดิ์ ทัพใหญ่. 2554. พืชวงศ์กลอยถิ่นเดียวและหายากของประเทศไทย, หน้า 74-82. *ใน* **การสัมมนาเชิงวิชาการ นิเวศวิทยาป่าไม้**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นุชจรี สิงห์พันธ์ และ สุรีภรณ์ ยอดดี. 2563. การเจริญเติบโตของมันจาวมะพร้าวในสภาพทำเทียมความเข้มข้นของแมนนิทอลแตกต่างกัน. **Naresuan Phayao Journal** 13 (1): 21-25.

สิริภัทร์ พราหมณีย์. 2560. **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายและปรับปรุงพันธุ์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุพินญา บุญมานพ. 2556. กลอย…พืชพื้นบ้านให้แป้ง. **น.ส.พ.กสิกร** 86 (6): 70-74.

Balogun, M., Maroya, N., Augusto, J., Ajayi, A., Kumar, L., Aighewi, B. and Asiedu, R. 2017. Relative efficiency of positive selection and tissue culture for generating pathogen-free planting materials of yam (*Dioscorea* spp.). **Czech J. Genet. Plant Breed** 53 (1): 9-16.

Behera, K.K., Sahoo, S. and Prusti, A. 2009. Regeneration of plantlet of Water yam (*Dioscorea oppositifolia* L.). **Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj** 37 (1): 94-102.

Chu, E.P. and Ribeiro, R.D.C.L.F. 2002. Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of *Dioscorea* species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose and cytokinin concentrations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 70: 241-249.

Das, S., Choudhury, M.D. and Mazumdar, P.B. 2013. Micropropagation of *Dioscorea alata* L. through nodal segments. **African Journal of Biotechnology** 12 (47): 6611-6617.

Fotso, Sandrine, N.N.M.F., Desire, M.H., Francois, D.P. and Denis, O.N. 2013. Micropropagation of *Dioscorea alata* L. from microtubers induced *in vitro*. **African Journal of Biotechnology** 12 (10): 1057-1067.

Li, M., Li, J., Liu, W., Liu, L., Lu, J., Niu, J., Liu, X., and Yang, Q. 2014. A protocol for in vitro production of microtubers in Chinese yam (*Dioscorea opposite*). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 78:6.

Nazir, R., Gupta, S., Dey, A., Kumar, V., Gupta, A. P., Shekhawat, M. S., Goyal, P. and Pandey, D.K. 2022. *In vitro* tuberization, genetic, and phytochemical fidelity assessment of *Dioscorea deltoidei*. **Industrial Crops & Products** 175:114174.

Oliver, K.A., Konan, K.N., Anike, F.N., Agbo, G.N., and Dodo, H.W. 2012. In vitro induction of minitubers in yam (*Dioscorea cayenensis-D. rotundata* complex). **Plant Cell Tiss Organ Cult** 109:179-189.

Polzin, F., Sylvestre, I., Deechamp, E., Ilbert, P., Etienne, H. and Engelmann, F. 2014. Effect of activated charcoal on multiplication of African yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) nodal segments using a temporary immersion bioreactor (RITA). **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant** 50:210-216.

Uchendu, E.E., Sobowale, O.O., Odimegwu, J. and Adetimirin, V.O. 2016. *In vitro* sucrose concentration influences microtuber production and diosgenin content in White yam (*Dioscorea rotundata* Poir). **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant** 52:563-570.

Willkin, P. and Thapyai, C. 2009. **Flora of Thailand Volume Ten Part One Dioscoreaceae**. Prachachon Co. Ltd., Thailand.

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวปวิชญา ประยงค์ทรัพย์
วัน เดือน ปี เกิด	4 กรกฎาคม 2543
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	มัธยมปลายโรงเรียนมงฟอร์ตวิทยาลัย ปริญญาตรีมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-