อภินันทนาการ

โครงการวิจัย (research project)ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

สำนักหอสมุด

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) การเพิ่มจำนวนต้นกล้วยไข่โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในไบโอรีแอกเตอร์แบบจมชั่วคราว(TIB): การเปรียบเทียบลักษณะและความคงตัวทางพันธุกรรมของต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยระบบ TIB กับต้นปกติ

(ภาษาอังกฤษ) The Micropropagration of *Musa acuminata* 'Kluai Khai' by Temporary Immersion Bioreactor (TIB): A Comparative Characteristics and Genetic Stability of TIB Micro propagated -Plantlets to Its normal

รหัสโครงการ R2561B058

รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร เปรมจิต หัวหน้าโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพงษ์ เปรมจิต ผู้ร่วมวิจัย

ดร.ฐนิตา บุญสร้างสม ผู้ร่วมวิจัย

สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 14 มิ.ย. 2565
เลขทะเบียน 1052768
เลขเรียกหนังสือ 9 SB 379 .B2 ด 211ค 2563

มีนาคม พ.ศ. 2563

กิตติกรรมประกาศ

การเพิ่มจำนวนต้นกล้วยไข่โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในไบโอรีแอกเตอร์แบบจมชั่วคราว(TIB): การเปรียบเทียบลักษณะและความคงตัวทางพันธุกรรมของต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยระบบ TIB กับต้นปกติ (R2561B058) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2561 การวิจัยนี้สำเร็จผลได้จากความร่วมมือของหลายส่วนได้แก่ วิสาหกิจชุมชนฟื้นฟูกล้วยไข่กำแพงเพชร(โดยมีประธานคือคุณนพพล เทพประถม) นิสิตปริญญาตรี ปริญญาโท ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ช่วยงานภาคสนามและห้องปฏิบัติการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร เปรมจิต หัวหน้าโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพงษ์ เปรมจิต ผู้ร่วมวิจัย

ดร.นิตา บุญสร้างสม ผู้ร่วมวิจัย

19 มีนาคม 2563

บทคัดย่อ

การวิจัยความคงตัวทางพันธุกรรมของกล้วยไข่กำแพงเพชรที่ผ่านการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบบรีแอคเตอร์แบบขวดคู่ขนาด 2 ลิตร เปรียบเทียบกับต้นแม่พันธุ์ โดยใช้ศึกษาทางพันธุกรรมในระดับเซลล์คือการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากและการวิเคราะห์ระดับพลอยดีโดย Flow cytometry และ ศึกษาโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) ผลการศึกษาพบว่า ทั้งต้นกล้วยไข่แม่พันธุ์และกล้วยไข่ที่มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีจำนวนโครโมโซม 2n=22 เท่ากัน ผลการวิเคราะห์ระดับพลอยดีพบว่ามีการกระจายตัวของนิวเคลียสที่ 2n เหมือนกัน ที่ 75 เปอร์เซ็นต์ และผลการวิเคราะห์ SRAP พบว่ามีค่าpolymorphicที่ 13.3 เปอร์เซ็นต์

Abstract

Genetic fidelity of micro-propagated through the twin flasks temporary immersion bioreactor of *Musa acuminata,* AA Group cv. "Kluai Khai" was assessed using Counting root tips chromosome number, ploidy analysis with flow cytometry, and molecular marker Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP). Results revealed that both mother plant and TIB-plantlets have the somatic chromosome number 2n=22. Detection of nuclei TIB-plantlets by Flow cytometry showed the main peak of 2n nuclei at 75 percent as same as the mother plants. SRAP-PCR showed polymorphic was 13.3 percent.

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
ทฤษฎีและสมมุติฐาน	3
สถานการณ์ทั่วไปของกล้วยไข่	3-4
ข้อมูลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไข่	4-5
3 วิธีการทดลอง	7
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไข่ใน TIB	7
การประเมินความคงตัวทางพันธุกรรมของกล้วยไข่ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับแม่พันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SRAP	8-10
การวิเคราะห์ระดับพลอยดี	10
การนับจำนวนโครโมโซม	10-11
4 ผลการทดลอง	12
การเพาะเลี้ยงหน่อกล้วยไข่ในระบบ TIB	12
ผลการประเมินความคงตัวทางพันธุกรรมของกล้วยไข่ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับแม่พันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SRAP	17-22
การวิเคราะห์ระดับพลอยดี	23

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลอง	
จำนวนโครโมโซม	24
5 สรุปผลการศึกษา	26-27
6. เอกสารอ้างอิง	28-29

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

4.1 การเปรียบเทียบผลกระทบต่อการเพิ่มจำนวนทวีคูณต้นในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารแข็ง กับระบบTIB ของกล้วยไข่กำแพงเพชร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์.....12

4.2 ไพรเมอร์ SRAP ส่วนหน้า 8 ชนิดและไพรเมอร์ส่วนหลัง 8 ชนิดในการทำ PCR จับคู่ได้ทั้งหมด 64 คู่... 17

4.3 คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน.....18

4.4 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของกล้วยไข่กำแพงเพชรต้นแม่พันธุ์กับต้นที่มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Similarity coefficient).....20

4.5 แสดงค่าระดับพลอยดีของกล้วยไข่แม่พันธุ์ และกล้วยไข่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่วิเคราะห์จาก Flow Cytometry.....23

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 ระบบ TIB แบบขวดคู่ (Twin Flask) ขนาด 2 ลิตรจำนวน 24 คู่..... 7
4.2 แสดงต้นกล้วยไข่จากระบบ TIB จากเนื้อเยื่อเริ่มต้น 1 ชิ้น.....13
4.3 การเจริญและพัฒนาของกล้วยไข่กำแพงเพชรในระบบอาหารแข็ง (ก.) และ
ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว (TIB) (ข.).....14
4.4 กล้วยไข่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออนุบาลครั้งที่ 1 ในโรงเรือนพรางแสงด้วยตาข่ายกรองแสง.....15
4.5 กล้วยไข่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออนุบาลครั้งที่ 2 ในโรงเรือนให้แสงปกติสามารถนำออก
ปลูกในแปลงได้.....16
4.6 แสดงคู่ไพรเมอร์ Me2+Em2 ให้แถบดีเอ็นเอจากการทำ SRAP-PCR.....18
4.7 แสดงคู่ไพรเมอร์ Me5+Em7 (A) ให้แถบดีเอ็นเอจากการทำ SRAP-PCR
คู่ไพรเมอร์ Me6+Em3 (B) ให้แถบดีเอ็นเอจากการทำ SRAP-PCR
คู่ไพรเมอร์ . คู่ไพรเมอร์ Me8+Em7 (C) ให้แถบดีเอ็นเอจากการทำ SRAP-PCR.....19
4.8 Dendrogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างของแถบ DNA ของกล้วยไข่กำแพงเพชรทั้ง 2 กลุ่ม
ด้วยโปรแกรม Treeview เวอร์ชั่น 1.6.6 โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนแบบ
Jacquard similarity coefficient ในการพิจารณาความแตกต่าง
4.9 แสดง Histogram ที่ channel 102 ทั้งกล้วยไข่แม่พันธุ์ (ก) และกล้วยไข่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ข)
ที่วิเคราะห์จาก Flow Cytometry แสดงนิวเคลียส diploid (2n) ทั้งสองตัวอย่าง.....23
4. 10 แสดงเมทาเฟสโครโมโซมจากเซลล์เจริญที่ปลายรากกล้วยไข่กำแพงเพชรแม่พันธุ์เซลล์ที่ 1(ก)
และเซลล์ที่ 2(ข) มีค่า 2n=22 ที่กำลังขยาย 1000 เท่า.....25
4.11 แสดงเมทาเฟสโครโมโซมจากเซลล์เจริญที่ปลายรากกล้วยไข่กำแพงเพชรแม่พันธุ์ 2n=22 ที่กำลังขยาย
1000 เท่า วัดขนาดโครโมโซมแท่งที่เห็นชัดได้ความยาว 1.375 ไมโครมีเตอร์.....26
4.12 แสดงเมทาเฟสโครโมโซมจากเซลล์เจริญที่ปลายรากกล้วยไข่กำแพงเพชรที่ผลิตจากระบบ TIB
มีจำนวนโครโมโซม 2n=22 ที่กำลังขยาย 1000 เท่า.....27

บทที่ 1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

กล้วยไข่มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ Musa (AA Group) 'Kluai Khai'หรือ *Musa acuminata* 'Kluai Khai' (เบญจมาศ 2558) เป็นผลไม้ส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย มีปริมาณ และมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นทุกปี ข้อมูลจากสำนักงานเศรษฐกิจเกษตรในปี 2550 รายงานว่ามีปริมาณการส่งออก 15,000 ตัน มูลค่า 100 ล้านบาท แต่ข้อมูลที่ได้รับฟังจากผู้ส่งออกมีปริมาณสูงกว่าทางราชการประมาณ 2-3 เท่า และมูลค่าการส่งออกนับพันล้านบาท ทำนองเดียวกับพื้นที่ปลูกกล้วยไข่ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัด เพราะกล้วยไข่มีปลูกทั้งเป็นพืชเชิงเดี่ยวและปลูกแซมในสวนผลไม้ ข้อมูลในปี 2546 รายงานว่ามีพื้นที่ปลูก 75,177 ไร่ แต่ปัจจุบันพื้นที่ปลูกกล้วยไข่มีการเปลี่ยนแปลงไปมาก แหล่งปลูกกล้วยไข่เชิงเดี่ยว เช่น จังหวัดกำแพงเพชร ตาก นครสวรรค์ ลดพื้นที่ปลูกลง เพราะปัญหาลมพายุทำให้ผลผลิตเสียหาย ขณะเดียวกันก็มีพืชอื่นที่มีราคาดีเช่น อ้อย มันสำปะหลัง และข้าวโพด จึงได้มีการนำพืชเศรษฐกิจเหล่านั้นมาปลูกแทนทำให้พื้นที่ปลูกกล้วยไข่ลดลง ตรงกันข้ามกับในภาคตะวันออกมีการขยายพื้นที่ปลูกเพิ่มขึ้น เช่น ที่จังหวัดจันทบุรี ระยอง และตราด เกษตรกรปลูกแซมในสวนผลไม้ทำให้ลดปัญหาการโค่นล้มจากลมพายุ ทางภาคใต้มีการปลูกมากที่จังหวัดชุมพรทั้งยังสามารถผลิตกล้วยไข่ออกสู่ตลาดได้ตลอดทั้งปี ตามรายงานสำนักงานเศรษฐกิจเกษตรในปี 2550

ปี 2558 กล้วยไข่ของไทยกำลังได้รับความนิยมสูงในตลาดจีน โดยเฉพาะตลาดทางแถบตะวันตกของจีน ทั้งในมณฑลเสฉวน มหานครฉงชิ่ง นครเซี่ยงไฮ้ ปักกิ่ง กวางโจว มณฑลเจ้อเจียง มณฑลเจียงซู และมณฑลอันฮุย ซึ่งมีกำลังซื้อสูงและความต้องการมีแนวโน้มขยายตัวเพิ่มขึ้น ปี 2557 ที่ผ่านมา ไทยส่งออกสินค้ากล้วยไข่ไปยังจีนปริมาณ 21,741.18 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 201.03 ล้านบาท ปีนี้คาดว่า ปริมาณและมูลค่าการส่งออกกล้วยไข่ไปจีนจะเติบโตมากขึ้น ขณะเดียวกันผลิตภัณฑ์จากกล้วยไข่และกล้วยชนิดต่างๆ เช่น กล้วยฉาบ กล้วยตาก และกล้วยอบน้ำผึ้ง ก็เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคชาวจีนในพื้นที่ดังกล่าวด้วย คาดว่าโอกาสทางการตลาดจะขยายตัวสูงขึ้นเช่นกัน [1,2)]

การขยายพันธุ์พันธุ์กล้วยสายพันธุ์ที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจเพื่อการส่งออกนิยมใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพราะเป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่ได้จำนวนต้นมากในระยะเวลาอันสั้น ทั้งยังสามารถคัดต้นอ่อนที่จะออกปลูกให้มีขนาดเท่าๆกัน เพื่อให้ต้นที่ออกผลผลิตพร้อมกัน และกำหนดวันในการเก็บเกี่ยวได้ถูกต้อง การใช้ต้นพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการทดลองในหลายประเทศพบว่าต้นที่ได้มีการเจริญเติบโตเร็วกว่า แข็งแรงกว่า ให้ผลผลิตสูงกว่าต้นที่ปลูกจากหน่อ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะต้นที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีรากและยอดที่เจริญเติบโตได้ดีและสามารถผลิตต้นพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี ในปี 2559 กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้พัฒนาและศึกษาศักยภาพของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในไบโอรีแอกเตอร์แบบจมชั่วคราวต่อการนำไปเพิ่มจำนวนต้นกล้วยไข่ เนื่องจากระบบนี้มีข้อดีหลายประการเช่น ลดงานลง ลดพื้นที่ที่ใช้วางชั้นวางขวด ลดการใช้ขวดเพาะเลี้ยง ให้ผลผลิตสูงขึ้น สามารถนำมาขยายพันธุ์ในระบบการค้า[3)]

อย่างไรก็ตามพืชหลายชนิดที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro*-regenerated plants) มีแนวโน้มที่จะเกิดการกลายพันธุ์ทำให้เกิดความแปรผันของลักษณะทางพันธุกรรมไปจากเดิม ซึ่งแปรผันนั้นเกิดในระหว่างขั้นตอนการเพาะลี้ยง เรียกว่าเกิด "somaclonal

variation" แล้วส่งต่อลักษณะไปยังรุ่นลูกรุ่นหลาน[4-6] การเกิดความแปรผันแบบนี้มีประโยชน์ในแง่ของการปรับปรุงพันธุ์ แต่สำหรับการขยายพันธุ์นั้นเป็นเหตุการณ์ที่อยู่นอกเหนือการควบคุมและเป็นอุปสรรคต่อการผลิตต้นพันธุ์ให้มีคุณภาพสม่ำเสมอ[7] ความแปรผันทางพันธุกรรมของกล้วยเพาะเลี้ยงอาจจะเกิดจากพันธุกรรมของต้นแม่พันธุ์ (genetic variation) หรือปัจจัยอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรม (epigenetic variation) เช่น อายุต้นแม่พันธุ์ที่นำมาเพาะเลี้ยงระยะเวลาการเพาะเลี้ยง จำนวนครั้งของการ sub-cultures สารเคมีต่างๆที่อยู่ในอาหาร โดยเฉพาะ ชนิดออกฤทธิ์กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์[8] ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องมีการประเมินความคงตัวทางพันธุกรรมของต้นอ่อนกล้วยไข่ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงมาจากระบบ TIB กับต้นปกติโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเช่น RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) , ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) markers, Chromosome number counting, Flow cytometer ก่อนนำเทคโนโลยีไปถ่ายทอดและส่งเสริมต่อไป

6. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อประเมินความคงตัวของพันธุกรรมของต้นอ่อนกล้วยจากการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB ช่วงต้นอ่อนเปรียบเทียบแม่พันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SRAP ตรวจ Somatic chromosome number (2n), และวิเคราะห์ระดับพลอยดีโดย Flow cytometer

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

ทฤษฎี สมมติฐานและ / หรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

"Somaclonal variation" คือการเกิดความแปรผันของลักษณะทางพันธุกรรมไปจากพันธุเดิมของพืชที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro*-regenerated plants) ซึ่งแปรผันนั้นเกิดในระหว่างขั้นตอนการเพาะลี้ยงแล้วส่งต่อลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปยังรุ่นลูกรุ่นหลาน เหตุการณ์นี้สามารถตรวจสอบได้โดยการใช้เครื่องหมายโมกุล

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะพฤกษศาสตร์ของกล้วยไข่

กล้วยไข่กำแพงเพชร มีชื่อสามัญคือ Kluai Khai จัดอยู่ในวงศ์ Musaceae กล้วยไข่ ที่ปลูกในจังหวัดกำแพงเพชร เป็นกล้วยไข่ในสายพันธุ์ acuminata Cultivars สกุล Musa หมู่ Eumusa กลุ่ม AA (AA Group) " Khuai Khai " มีโครโมโซม 2 ชุด (Diploid) (2n=2x =22, n=11)
กล้วยไข่เป็นพืชเขตร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งมีภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ปลูกได้ดีทั่วทุกภาคของประเทศ เป็นไม้ล้มลุกปลูกง่าย อายุสั้น ให้ผลตอบแทนเร็ว สามารถปลูกและเก็บผลผลิตได้ภายใน 1 ปี โดยมีคำอธิบายลักษณะทางพฤกษศาสตร์ไว้กว้างๆ ดังนี้ ลำต้นสูง 2. 5 - 3 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 16 - 20 เซนติเมตร กาบลำต้นด้านนอกสีเขียวปนเหลือง มีประสีน้ำตาลอ่อน ด้านในสีชมพูอมแดงใบ ก้านใบสีเขียวอมเหลือง มีร่องกว้าง โคนก้านมีครีบสีชมพู ดอก ก้านช่อดอก มีขนอ่อนปลีรูปไข่ม้วนงอขึ้นปลายแหลม ด้านนอกสีแดงอมม่วง ด้านในที่โคนกลีบสีซีด ผล เครือหนึ่งมี 6 - 7 หวี หวีหนึ่งมีประมาณ 14 ผล ผลค่อนข้างเล็ก ก้านผลสั้น เปลือกผลบางเมื่อสุก มีสีเหลืองสดใส บางครั้งมีจุดดำเล็ก ๆ ประปราย เนื้อสีครีม อมส้ม รสหวาน [9-10)]

สถานการณ์ทั่วไปของกล้วยไข่

นอกจากจะเป็นผลไม้ที่นิยมบริโภคกันภายในประเทศแล้ว ยังส่งเป็นสินค้าไปจำหน่ายต่างประเทศ สามารถทำรายได้ให้กับประเทศปีละหลายล้านบาท เนื่องจากในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 6 รัฐบาลมีนโยบายส่งเสริมการส่งออกผลไม้ จึงมีผลให้กล้วยไข่เป็นสินค้าเกษตรกรรมใหม่ที่มีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว เป็นผลไม้อีกชนิดหนึ่งที่ต่างประเทศให้ความสนใจ มีแนวโน้มจะเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศเพิ่มขึ้นในอนาคต มีการเปิดตลาดต่างประเทศให้กว้างขึ้น มีการทดสอบการส่งออกกล้วยไข่ไปประเทศต่าง ๆ ได้แก่ สหพันธรัฐเยอรมัน สวิสเซอร์แลนด์ ญี่ปุ่น และเดนมาร์ก จากผลการทดสอบการส่งออกที่ผ่านมาพบว่า กล้วยไข่เมื่อถึงตลาดต่างประเทศมีคุณภาพดี ชาวต่างประเทศพอใจในรสชาติและขนาดผลที่พอเหมาะ แนวโน้มการส่งออกกล้วยไข่นับว่าดีขึ้นเรื่อย ๆ

อาชีพการทำสวนกล้วยไข่จึงเป็นอาชีพที่เกษตรกรหันมาสนใจมากขึ้น โดยเฉพาะเกษตรกรในจังหวัดกำแพงเพชรซึ่งปัจจุบันเป็นจังหวัดที่มีพื้นที่การเพาะปลูกกล้วยไข่มากเป็นอันดับหนึ่งของประเทศ และถือว่าเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญ และเป็นผลไม้ที่เป็นสัญลักษณ์ของจังหวัด โดยทางจังหวัด

มีแผนส่งเสริมและพัฒนาการปลูกกล้วยไข่ เพิ่มพื้นที่การปลูกให้มากขึ้นทุกปี เพื่อให้เป็นไม้ผลเพื่อการค้า และการส่งออกให้สอดคล้องกับแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติของประเทศ การส่งออกกล้วยไข่ นี้ยังอยู่ในระยะเริ่มต้น ปริมาณการส่งออกยังน้อยเมื่อเทียบกับผลผลิตรวมที่ผลิตการผลิตส่วนใหญ่เพื่อบริโภคภายในประเทศ

แหล่งเพาะปลูกภายในประเทศไทยกล้วยไข่เป็นพืชที่ปลูกง่าย สามารถขึ้นได้ทุกภาคของประเทศ พื้นที่การเพาะปลูกรวมทั่วประเทศยังมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ไม่คงที่ เนื่องจากการตลาดของกล้วยไข่ ในปัจจุบันยังไม่มีความแน่นอน ความต้องการการบริโภคมีจำกัด การผลิตส่วนใหญ่เป็นการผลิตเพื่อใช้บริโภคภายในประเทศ ซึ่งมีผลต่อราคากล้วยไข่ในบางปีที่ปริมาณผลผลิตออกสู่ตลาดมาก ทำให้มีราคาต่ำ ขายไม่ได้ราคา มีผลต่อการตัดสินใจลงทุนปลูกกล้วยไข่ของเกษตรกร จากสถิติข้อมูลของกรมส่งเสริมการเกษตร ซึ่งรวบรวมพื้นที่การปลูกกล้วยไข่ทั่วประเทศ รายงานพื้นที่การเพาะปลูกทั้งสิ้น รวม ๑๔๔,๘๘๙ ไร่ แหล่งเพาะปลูกกล้วยไข่ที่สำคัญและมีชื่อเสียงที่สุดในประเทศอยู่ภาคเหนือคือจังหวัดกำแพงเพชร เชื่อกันว่าเป็นแหล่งที่ผลิตกล้วยไข่ที่มีคุณภาพดีรสชาติดี

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์กำลังผลักดันกล้วยไข่ส่งออก เป็นสินค้าเกษตรตัวใหม่ มีการส่งออกกล้วยไข่ เมื่อปี 2531 เป็นหมวดกล้วยไข่ มีชื่อส่งออกเป็นภาษาอังกฤษชื่อ Dainty Bananas หรือ Kluai Khai Fresh การส่งออกกล้วยไข่ของประเทศไทย ตลาดใหญ่ที่สำคัญที่สุด คือตลาดฮ่องกง ปริมาณการส่งออกกล้วยไข่ไปยังประเทศฮ่องกง เท่ากับ 1.397,485 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่า 8,729,448 บาทรองลงมาได้แก่ บรูไน ฝรั่งเศส เนเธอร์แลนด์ ลาว มาเลเซีย และประเทศอื่นๆ

การปลูกกล้วยไข่ของเกษตรกรจังหวัดกำแพงเพชร จะทำการปลูกกล้วยไข่เพียงครั้งเดียวและทำการล้างสวนทุก 3 ปี การเก็บผลผลิตจะเก็บได้ทุกปี ตั้งแต่ปีแรกซึ่งผลผลิตที่ได้รับในแต่ละปีจะไม่เท่ากัน โดยปกติแล้วจะได้รับผลผลิตสูงสุดในปีที่ 2 ภาวการณ์ตลาดของกล้วยไข่ขึ้นอยู่กับอุปสงค์และอุปาทานของตลาด ราคาจำหน่ายของกล้วยไข่จึงเปลี่ยนแปลงเคลื่อนไหวไปตามภาวการณ์ตลาด กล่าวคือ ในช่วงต้นที่ผลผลิตเริ่มออกสู่ตลาดคือ ประมาณเดือนกรกฎาคม – สิงหาคม และช่วงเทศกาลสารทไทยประมาณเดือนกันยายน ความต้องการมีมากราคาจำหน่ายจะสูง หลังจากนั้นราคาจำหน่ายจะเริ่มลดต่ำลง การจำหน่ายผลผลิตก็สะดวก เนื่องจากมีพ่อค้าเข้าไปรับซื้อผลผลิตถึงสวนของเกษตรกร[11)]

ข้อมูลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย

อรดี (2532) นำเนื้อเยื่อกล้วยหอมค่อมมาเพาะเลี้ยงแบบปลอดเชื้อเนื่อเยื่อพัฒนาไปเป็นต้นที่เหมือนเดิมทุกประการ และเป็นต้นปลอดโรค อายุการตกผลดเร็วกว่า และจำนวนหวีต่อเครือมากกว่าขึ้นจาก 6 หวีเป็น 9 หวี [12)]

สุภาพร และคณะ (2535) รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วย โดยตัดชิ้นเนื้อเยื่อขนาด 1x1 นิ้ว แช่เนื้อเยื่อด้วยคลอรอกซ์ 10% เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตัดเนื้อเยื่อเป็น 4 ชิ้น นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% ผงถ่าน 1 กรัม/ลิตร Benzylaminopurine (BAP) ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยง 3.33 ต้นต่อ 1 ชิ้นเนื้อเยื่อ[13)]

Ma และ Huang 1982, รายงานว่าสามารถเพาะเลี้ยงส่วนต่างๆ ของกล้วยเพื่อขยายพันธุ์ได้ เช่นปลายยอดของหน่อ ช่อดอกอ่อน ปลายของช่อดอก พบว่าส่วนที่เหมาะสมที่สุดคือปลายยอดของหน่อ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม IAA และ kinetin อย่างละ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร[14)]

Banerjee et al, 1985 ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย Musa (ABB group) "Bluggoe" ชักนำแคลลัสชนิดโปรเอ็มบริโได้ในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D เมื่อย้ายลงอาหารที่มี 2,4,5-T สามารถชักนำต้นได้[15)]

Oliveira et al, 1999 นำเนื้อเยื่อปลายยอดของ diploid (AA) และ Nanicao (AAA) และ Prata Ana (AAB) และเทตราพลอยด์(AAAB) เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Phytagel 1.8 กรัม น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร pH 5.7 พบว่าเพิ่มจำนวนยอดได้ในอาหารที่เติม BAP 5 มิลลิกรัม และชักนำรากในอาหารสูตร ½ MS [16)]

Khalil et al, 2002 ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย Dwarf Brazillian (Musa spp. AAB group) โดยใช้ส่วนของดอกตัวผู้เลี้ยงบนอาหารสูตร MS มีฮอร์โมนBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำเอ็มบริโอ ส่วน ½ MS ชักนำรากได้ 90% ของ secondary embryo สามารถเจริญเป็นต้นสมบูรณ์ [17)]

Etienne et al, 2002 เป็นผู้รายงานว่าระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในไบโอรีแอกเตอร์แบบจมชั่วคราวมีประสิทธิภาพดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลว เนื่องจากมีแยกต้นพืชและอาหารออกจากกันแล้วตั้งระบบปั๊มอาหารให้ต้นเป็นระยะตามที่กำหนด

Au et al, 2012 ได้รายงานการเปรียบเทียบวิธีการขยายพันธุ์กล้วยสายพันธุ์ Pisang Awak โดยระบบเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง แบบเขย่าฟาก์สเนื้อเยื่ออยู่ในอาหารเหลวและแบบจมชั่วคราว พบว่าแบบจมชั่วคราวเหมาะสมต่อการใช้เพื่อเพิ่มจำนวนกล้วยมากที่สุด โดยใช้อาหาร MS เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งและระบบรีแอกเตอร์เนื้อเยื่อจมในอาหารชั่วคราวมีการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมในเรือนทดลองได้ดี แต่ต้นที่ได้จากอาหารเหลวตายทั้งหมด[18)]

Lyam et al, 2012 พบว่า Topolin เป็นไคเนตินชนิดที่เหมาะสมต่อการเกิดยอดของพืชเศรษฐกิจหลายชนิดของไนจีเรียเช่น สับปะรด กล้วย เมื่อเพาะเลี้ยงในรีแอกเตอร์แบบจมชั่วคราว และใช้เวลา 5 สัปดาห์จะได้ต้นใหม่มากกว่า 13 ต้นต่อฟาก์ส [19)]

จากข้อมูลที่กล่าวมาคณะผู้วิจัยได้ทำการค้นคว้าวิจัยหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อพัฒนาระบบการใช้ระบบรีแอกเตอร์แบบจมชั่วคราว(TIB) เพื่อการขยายพันธุ์กล้วยไข่กำแพงเพชร ซึ่งผลการศึกษาจะมีผลกระทบต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์ให้มีจำนวนมากพอต่อการส่งออก อย่างไรก็ตามหลังจากได้ต้นอ่อนจากระบบ TIB แล้วยังมีความเสี่ยงเรื่องการได้กล้วยไข่ที่มีลักษณะไม่ตรงตามสายพันธุ์เดิมเนื่องจาก Somaclonal variation ดังการรายงานในพืชอื่นๆ ที่กล่าวมาแล้วในบทนำ มีรายงานพบว่ากล้วยที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดมิวเทชันที่ส่งผลให้พบลักษณะเช่น ต้นแคระ (Dwarfism) ช่อดอกผิดปกติ สีดอก ใบ ลำต้นเทียมเปลี่ยนไป [20)] ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการประเมินความคงตัวทางพันธุกรรมก่อนลงทดสอบผลผลิตในแปลงเกษตรกร และถ่ายทอดเทคโนโลยี

การประเมินความคงตัวทางพันธุกรรมของกล้วยไข่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB จะเลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด Sequence related amplified polymorphism ซึ่งเป็นวิธีการที่

ใช้ในการประเมินเชื้อพันธุกรรมของกล้วยใน Gene Bank ตามวิธีการของ Lakshmanan et al.,2007 ทำการตรวจจำนวนโครโมโซม (2n) และตรวจระดับพลอยดีโดยเครื่อง Flow cytometer

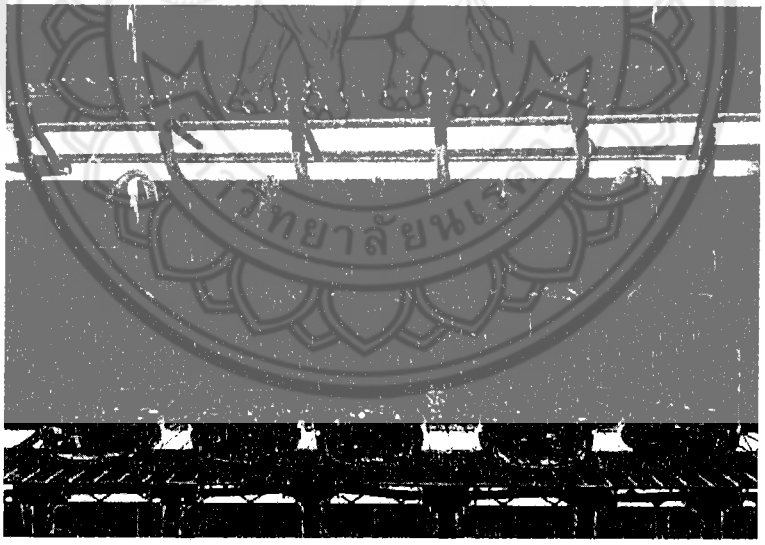
บทที่ 3
วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 3.I การเพาะเลี้ยงหน่อกล้วยไข่ใน TIB

1) การเตรียมตัวอย่างแม่พันธุ์กล้วยไข่กล้วยไข่ที่นำมาศึกษาคือพันธุ์กำแพงเพชร ที่ปลูกโดยที่วิสาหกิจชุมชนฟื้นฟูกล้วยไข่กำแพงเพชร ลักษณะพันธุ์ดีคือมีจำนวนหวีต่อเครือ 6-7 หวี มีความสมบูรณ์ ในการเพาะเลี้ยงใช้หน่อกล้วยใบแคบ (sword sucker) ตัดส่วนอื่นๆออกให้เหลือตายอดขนาด 1-2 เซนติเมตร นำมาผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกและเชื้อจุลินทรีย์โดยล้างชิ้นเนื้อเยื่อด้วยน้ำยาล้างจานและ Clorox (1:1) ต่อจากนั้นล้างด้วยน้ำประปา 30 นาที

2) การเพาะเลี้ยงยอดทวีคูณบนอาหารกึ่งแข็ง

นำชิ้นเนื้อเยื่อจากขั้นที่ 1) เข้า ตู้ปลอดเชื้อ และแช่ใน Clorox เข้มข้น 20% (v/v) เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ฟอกใน Clorox เข้มข้น 10% (v/v)เติม tween 2-3 หยด เป็นเวลา 20 นาทีล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำชิ้นเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) มีซูโครส 30 กรัม และเติม kanamycin 150 มิลลิกรัมต่อลิตร วางไว้ 7 วัน ในห้องเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ จะได้ยอดที่ปลอดเชื้อ ย้ายยอดที่ได้ลงเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และวุ้น (7.5 กรัมต่อลิตร) pH 5.7 15) อาหารสูตรนี้จะเพิ่มจำนวนยอดจำนวนมาก เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ เลือกยอดขนาดความยาว 1.5 ซ.ม.มาทำการทดลองจากนั้นนำไป inoculated shoots ใน TIBs



ภาพที่ 2.1 ระบบ TIB แบบขวดคู่ (Twin Flask) ขนาด 2 ลิตรจำนวน 24 คู่

3) การชักนำราก

หลังจากเพาะเลี้ยงใน TIB เป็นเวลา 5 สัปดาห์ จากนั้นนำลงอาหารสูตรชักนำรากในอาหาร MS เติม NAA (0.5 mg/l) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ได้ลำต้นยาว 4-5 เซนติเมตร ย้ายลงในถุงดำที่มีวัสดุปลูกพีทมอสจากนั้นเข้าสู่การอนุบาลต้นในโรงเรือน

4) การเพาะเลี้ยงในโรงเรือน

นำต้นกล้วยไข่ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3 มาล้างด้วยน้ำประปา แล้วย้ายลงปลูกในถุงโพลีเอทีลีนซึ่งมีส่วนประกอบของดินร่วนและทราย อนุบาลต้นไว้ในโรงเรือนที่มีความชื้น 70-80% 3-4 สัปดาห์

5) การวิเคราะห์ข้อมูล

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยโดย TIB วางแผนการทดลอง Completely randomized block design สถิติที่ใช้ ANOVA และ Duncan's multiple range test

อัตราการผลิตตายอดหรือสัมประสิทธิ์ของการเพิ่มปริมาณยอดและเวลา

$$K = \frac{N-n}{n}$$

เมื่อ N คือ จำนวนยอดนะเวลา T_1

n คือ จำนวนยอด ณ เวลา T_0

K คือ อัตราการผลิตยอดและตาหรือสัมประสิทธิ์ของการเพิ่มปริมาณยอดและตา

การทดลองที่ 3.2 การประเมินความคงตัวทางพันธุกรรมของกล้วยไข่ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับแม่พันธุ์โดยเครื่องหมายโมเลกุล SRAP

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนกล้วยไข่กำแพงเพชรทั้งเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและต้นแม่พันธุ์ใช้วิธีการตามชุดสกัดของ E.Z.N.A.® Plant DNA Kit (Omega bio-tek) โดยการล้างทำความสะอาดตัวอย่างจากนั้นใช้กรรไกรตัดใบม้วนของกล้วยไข่กำแพงเพชรเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วชั่งน้ำหนักสด 0.1 กรัม ใส่โกร่งที่แช่เย็น เติมไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen) แล้วบดให้ละเอียด ตักตัวอย่างที่บดแล้วใส่ลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร (Centrifuge tube) ที่เตรียมไว้ เติม P1 Buffer ปริมาตร 600 µL แล้ว vortex ให้ละลาย นำไปบ่มไว้ใน Incubator ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Vortex ทุกๆ 5 นาที) จากนั้นนำออกมาเติม P2 Buffer ปริมาตร 140 µL แล้ว vortex นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใส 500 µL ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติมไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ที่แช่เย็น ปริมาตร 350 µL พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 x g เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดเซนตริฟิวส์บนกระดาษ (Paper tower) เพื่อตากตะกอนให้แห้งเป็นเวลา 1 นาที เติมน้ำ DI (Deionized water) ปริมาตร 300 µL แล้ว vortex จนละลาย ถ้าไม่ละลายให้บ่มอีก เติม RNase ปริมาตร 4 µL แล้ว vortex ผสมให้เข้ากัน เติม P3 buffer ปริมาตร 150 µL และเติม Absolute ethanol (100% ethanol) แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง 10-15 ครั้ง นำ mini column ใส่ในหลอด 2 มิลลิลิตร แล้วเทดีเอ็นเอใส่ mini

column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที ย้าย mini column ใส่ในหลอด 2 มิลลิลิตร อันใหม่ เติม DNA wash buffer ปริมาตร 650 μL นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เท DNA wash buffer ทิ้ง เติม DNA wash buffer ปริมาตร 650 μL นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เท DNA wash buffer ทิ้ง แล้วนำ mini column ที่ไม่เติม buffer ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัดให้ Absolute ethanol ออกไปให้หมด จากนั้นย้าย mini column ไปใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution buffer ปริมาตร 50-100 μL วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้เครื่อง Microplate reader (Synergy H1 BioTek, USA) ที่ใช้ตามคู่มือผู้ผลิต แผ่นไมโครเพลต (loading plates) ทำความสะอาดด้วยเอทานอล 70% และใช้บัฟเฟอร์ elution ที่ใช้สำหรับการสกัด DNA เพื่อการเทียบมาตรฐานสำหรับการอ่าน (ในการศึกษานี้ DNA ที่สกัดได้มีปริมาณ 23-80 นาโนกรัมต่อตัวอย่างใบสด 0.1 กรัม)

3.2.3 การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม

จากการทดสอบเพื่อคัดเลือกหาคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไข่กำแพงเพชร โดยจับคู่ forward primer จำนวน 8 คู่ กับ reverse primer จำนวน 8 คู่ ได้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 64 คู่ไพรเมอร์ พบคู่ไพรเมอร์ที่ดีที่สุดจำนวน 8 คู่ ได้แก่ Me2+Em2, Me2+Em6, Me2+Em7, Me3+Em3, Me5+Em6, Me5+Em7, Me6+Em3 และ Me8+Em7

3.2.4 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP

คัดเลือกตัวอย่างกล้วยไข่กำแพงเพชรทั้งต้นปกติและต้นที่ผลิตจากระบบ TIB มาสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำไปตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วย microplate reader (Synergy H1) จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR กับคู่ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้จำนวน 8 คู่ ที่มีขั้นตอนดังนี้ ขั้นที่ 1 pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที,35 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 5 รอบ ทำปฏิกิริยาขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 50 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ และขั้นสุดท้าย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิตของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis บันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation

การทดลองที่ 3.3 การวิเคราะห์ระดับพลอยดี (Ploidy Analysis)

ใช้วิธีการตาม Galbraith DW et al., 1983 [21] ใช้เครื่องวิเคราะห์ยี่ห้อ Guava easyCyte 8HT benchtop flow cytometer โดยตั้งค่าดังนี้ Event rate: medium - fast, Total count: at least 5,000 – 10,000, Dye: Guava Cell Cycle reagent

วิธีการ

ตัดตัวอย่างใบกล้วยไข่ที่แช่ในน้ำแข็งให้ได้ขนาด 1 cm x 1 cm (60 mg) ใช้ใบมีด (single-edged razor blade) สับใบที่วางบนน้ำแข็งที่วางอยู่บนจานแก้ว (Petridish, diameter – 5cm) ที่มี buffer (Tris.MgCl2) 1 mL (* The minimal convenient sample size was 12mg chopped in a volume of 0.2ml of buffer. The coefficients of variation for the G1 peaks of nuclei prepared in this manner were similar to those obtained with larger tissue samples.) หลังจากนั้น 2 นาที ให้กรองเศษเซลล์ออกโดย nylon filter ที่มีขนาด pore size 41 µm นิวเคลียสในสารละลายถูกย้อมด้วยสี Guava cell cycle reagent, 1:1 ratio (100 u + 100 uL) บ่มบนน้ำแข็ง 10 นาที นำไปวิเคราะห์โดยเครื่อง flow cytometer.

การทดลองที่ 3.4 การนับจำนวนโครโมโซม (Somatic chromosome number counting)

การศึกษาหาระยะเวลาพรีทีตเมนต์ที่เหมาะสม

3.4.1. การเก็บตัวอย่างรากจากกล้วยไข่แม่พันธุ์และกล้วยไข่ที่มาจากระบบ TIB

3.4.1.1 นำหน่อกล้วยไข่และต้นอ่อนที่ได้จากระบบ TIB ปลูกในกระถาง บำรุงรักษาประมาณ 1 เดือน เมื่อหน่อแข็งแรงจะมีลักษณะขาว อวบ ปลายรากใส

3.4.1.2 ตัดรากยาว 1 เซนติเมตร ใส่ในขวดที่มีสารละลายอิ่มตัวของ alpha-Bromonaphthalene เป็นระยะเวลา 9, 18, 22, 24, และ 36 ชั่วโมง

3.4.1.3 นำรากไปฟิกซ์ในกรดแอซิติก 90% ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วล้างด้วยเอทีลแอลกอฮอล์ 70% 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.4.1.4 เก็บตัวอย่างรากในเอทีลแอลกอฮอล์ 70% ในอุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส ได้นาน 6-12 เดือน

3.4.1.5 นำรากจากข้อ 3.4.1.4 มาล้างให้หมดแอลกอฮอล์ด้วยน้ำเปล่า 2-3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.4.1.6 นำรากใส่ในขวด vial ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่เติม 1N.HCl ทำให้ร้อนผ่านน้ำที่ต้มอยู่ในบีกเกอร์ที่เซตให้มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 10 นาที ขั้นนี้ต้องคุมควบอุณหภูมิของ ให้คงที่ 60 องศาเซลเซียสสม่ำเสมอ

3.4.1.7 เท 1 N.HCl ทิ้ง ใส่ Schiff's reagent ให้ท่วมราก ทิ้งไว้ 30 นาที

3.4.1.8 นำรากที่ได้ไปเตรียมสไลด์ โดยย้ายรากจาก Schiff's reagent ใส่ลงในน้ำกลั่น แล้วตัดเฉพาะบริเวณปลายรากที่ติดสีม่วงแดงเข้มวางบนสไลด์ หยดสี propiono- carmine 2% 1 หยด ตรงปลายราก

3.4.1.9 ใช้ปลายปากคีบขยี้เนื้อเยื่อปลายรากให้เป็นชิ้นเล็ก เอาแผ่นแก้วปิดบริเวณที่มีเนื้อเยื่อสีม่วงแดง ใช้ปลายดินสอเคาะชิ้นเล็กๆ ของเนื้อเยื่อให้เซลล์กระจายจากนั้น เคาะเพื่อให้เนื้อเยื่อบางเป็นชั้นเดียว แยกเซลล์เดี่ยวออกจากเนื้อเยื่อและจะช่วยให้โครโมโซมกระจายตัวดี

3.4.1.10 นำสไลด์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Compound ที่กำลังขยาย 100 เท่า

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเพาะเลี้ยงหน่อกล้วยไข่ในระบบ TIB

จากการศึกษาการผลิตกล้วยไข่กำแพงเพชรโดยการเพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว (TIB) ชนิดขวดคู่ นำหน่อกล้วยไข่กำแพงเพชรมาฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 เดือน จากนั้นคัดเลือกชิ้นส่วนต้นอ่อนที่มีขนาดเท่ากันเพาะเลี้ยงในระบบอาหารแข็ง เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนกล้วยไข่กำแพงเพชรที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS+BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้จำนวนต้นอ่อนมากที่สุดเฉลี่ย 2.00 ± 0.78 ต้นต่อชิ้น จำนวนตายอดเฉลี่ย 0.70 ± 0.12 ตาต่อต้น จำนวนใบเฉลี่ย 1.75 ± 0.17 ใบต่อต้น จำนวนรากเฉลี่ย 1.05 ± 0.04 รากต่อต้น ความสูงต้นเฉลี่ย 0.82 ± 0.1 0ส่วนในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวชนิดขวดคู่ พบว่าชิ้นส่วนกล้วยไข่กำแพงเพชรที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS+BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลให้จำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย 2.38 ± 0.83 ต้นต่อชิ้น จำนวนตายอดเฉลี่ย 0.83 ± 0.13 ตาต่อต้น จำนวนใบเฉลี่ย 1.60 ± 0.06 ใบต่อต้น จำนวนรากเฉลี่ย 0.08 ± 0.01 รากต่อต้น ความสูงต้นเฉลี่ย 0.51 ± 0.04 เซนติเมตรดังแสดงในตาราง 4.1

ตารางที่ 4.1 การเปรียบเทียบผลกระทบต่อการเพิ่มจำนวนทวีคูณต้นในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารแข็งกับระบบ TIB ของกล้วยไข่กำแพงเพชร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์

ระบบการเพาะเลี้ยง	จำนวนต้นต่อชิ้น	จำนวนตายอดต่อชิ้น	จำนวนใบต่อต้น	จำนวนรากต่อต้น
อาหารแข็ง	1.00 ± 0.78[b]	0.70 ± 0.12[a]	1.75 ± 0.17[a]	1.05 ± 0.04[a]
TIB	2.38 ± 0.83[a]	0.83 ±0.13[a]	1.60 ± 0.06[a]	1.00. ± 0.01[a]

หมายเหตุ: ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย±S.E.) และตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ p=0.05 วิเคราะห์ความแตงต่างโดยวิธี One-Way ANOVA

ภาพที่ 4.2 แสดงต้นกล้วยไข่จากระบบ TIB จากเนื้อเยื่อเริ่มต้น 1 ชิ้น

จำนวนยอดและตา

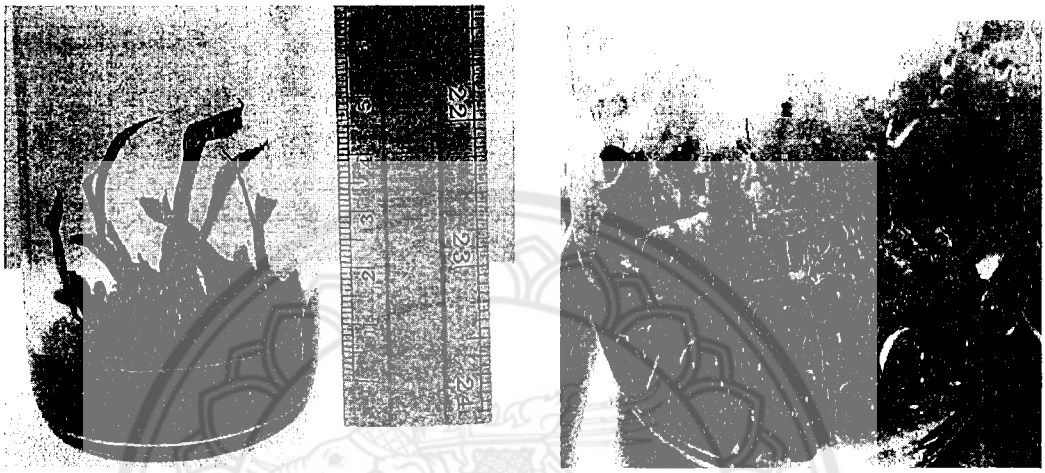
การทดลองได้วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน บนสูตรอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นคัดเลือกชิ้นส่วนต้นอ่อนกล้วยไข่กำแพงเพชร เพาะเลี้ยงในระบบอาหารแข็ง และระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวได้พบว่า จำนวนยอดในระบบTIB ได้จำนวนยอดมากที่สุด เท่ากับ 2.38 ยอดต่อต้น และมีจำนวนตามากที่สุด เท่ากับ 0.83 สอดคล้องกับงานของรังสิมาและคณะ ได้ทำการศึกษาหัวพันธุ์บุกเนื้อทราย จากการศึกษาพบว่าบุกเนื้อทรายที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหาร TIB มีการแตกยอดใหม่และมีการแตกตาเล็กเป็นจำนวนมาก แต่ในขณะที่เพาะเลี้ยงบุกเนื้อทรายในอาหารแข็งไม่มีการงอกของยอดน้อย และมีการแตกตาข้างขนาดเพียงเล็กน้อย

จำนวนใบ

เมื่อทำการตรวจนับจำนวนใบและสังเกตการเจริญเติบโตพบว่าใบที่เกิดขึ้นจากส่วนที่เจริญไปเป็นยอดในระบบอาหารแข็งเฉลี่ยเท่ากับ 1.75 ใบต่อต้น ซึ่งไม่แตกต่างกับการเพาะเลี้ยงในระบบTIB ที่ได้จำนวนใบเท่ากับ 1.6 ใบต่อต้น แต่ในรายงานของ Au และคณะ ได้ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยน้ำว้า พบว่าระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว (TIB) มีการงอกของใบมากกว่าระบบอาหารแข็ง ดังนั้นจีโนไทป์อาจจะมีผลในการตอบสนองต่อระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเนื่องจากกล้วยไข่นั้นมีจีโนม AA แต่กล้วยน้ำว้ามีจีโนม ABB

จำนวนราก

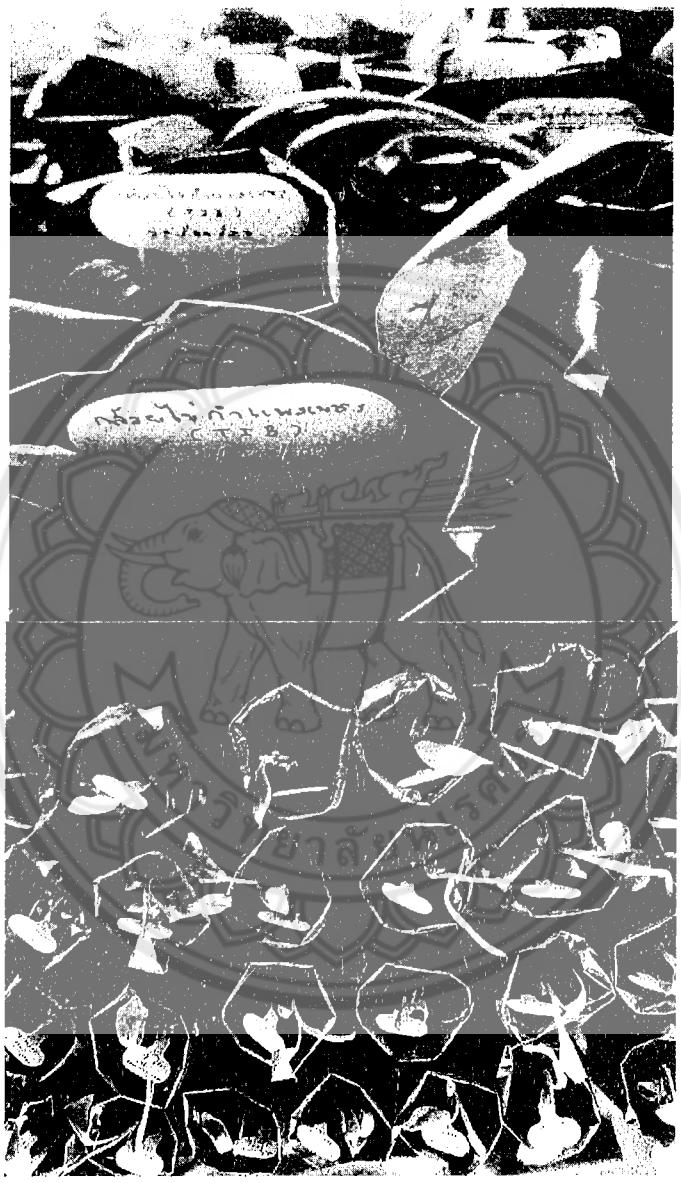
เมื่อทำการตรวจนับจำนวนราก พบว่ารากที่เกิดขึ้นในระบบอาหารแข็งเฉลี่ยเท่ากับ 1.05 ราก ต่อต้น ในระบบ TIB มี 1 รากต่อต้น จึงไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามหลังจากนี้ไปจะต้องมีการชักนำรากอีก 2 สัปดาห์ในอาหารที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร



ก. ทรีตเมนท์ 1 : ระบบอาหารแข็ง ข. ทรีตเมนท์ 2 : ระบบ TIB

ภาพที่ 4.3 การเจริญและพัฒนาของกล้วยไข่กำแพงเพชรในระบบอาหารแข็ง (ก.) และระไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว (TIB) (ข.)

การอนุบาลกล้วยไข่ หลังจากอกจาก TIB ล้างต้นอ่อนด้วยน้ำประปา แล้วนำลงปลูกในถุงดำที่มีวัสดุปลูกพีทมอสแล้วนำลงไปอนุบาลในโรงเรือน โดยพรางแสงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และย้ายลงถุงดำที่มีขนดใหญ่ขึ้นทุกเดือน 2 ครั้งก็นำไปปลูกในแปลงได้



ภาพที่ 4.4 กล้วยไข่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออนุบาลครั้งที่ 1 ในโรงเรือนพรางแสงด้วยตาข่ายกรองแสง

ภาพที่ 4.5 กล้วยไข่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออนุบาลครั้งที่ 2 ในโรงเรือนให้แสงปกติสามารถนำออกปลูกในแปลงได้

4.2 การประเมินความคงตัวทางพันธุกรรมของกล้วยไข่ที่เพาะเลี้ยงในTIB เปรียบเทียบกับแม่พันธุ์โดยเครื่องหมายโมเลกุล SRAP

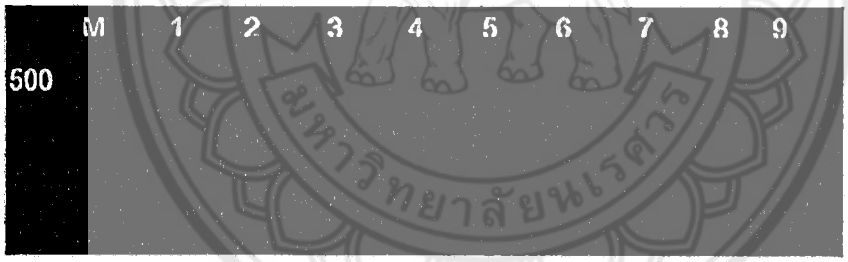
จากการทดสอบเพื่อคัดเลือกหาคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไข่กำแพงเพชร โดยจับคู่ forward primer จำนวน 8 คู่ กับ reverse primer จำนวน 8 คู่ ได้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 64 คู่ไพรเมอร์นำมาทำ PCR โดยใช้ต้นแม่พันธุ์กล้วยไข่เป็นตัวอย่าง พบคู่ไพรเมอร์ที่ดีที่สุดจำนวน 8 คู่ ได้แก่ Me2+Em2, Me2+Em6, Me2+Em7, Me3+Em3, Me5+Em6, Me5+Em7, Me6+Em3 และ Me8+Em7 (ดังตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ไพรเมอร์ SRAP ส่วนหน้า 8 ชนิดและไพรเมอร์ส่วนหลัง 8 ชนิดในการทำ PCR จับคู่ได้ทั้งหมด 64 คู่

No.	Forward primer	Sequences (5'-3') (17 bp)	No.	Reverse primer	Sequences (5'-3') (18 bp)
1	Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	1	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
2	Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	2	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC
3	Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	3	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
4	Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	4	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
5	Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	5	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
6	Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	6	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
7	Me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	7	Em7	GACTGCGTACGAATTCAA
8	Me8	TGAGTCCAAACCGGTGC	8	Em8	GACTGCGTACGAATTCTG

ตารางที่ 4.3 คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน

Forward / Reverse	Me1	Me2	Me3	Me4	Me5	Me6	Me7	Me8
Em1	X	X	X	X	X	X	X	X
Em2	X	✓	X	X	X	X	X	X
Em3	X	X	✓	X	X	✓	X	X
Em4	X	X	X	X	X	X	X	X
Em5	X	X	X	X	X	X	X	X
Em6	X	✓	X	X	✓	X	X	X
Em7	X	✓	X	X	✓	X	X	✓
Em8	X	X	X	X	X	X	X	X

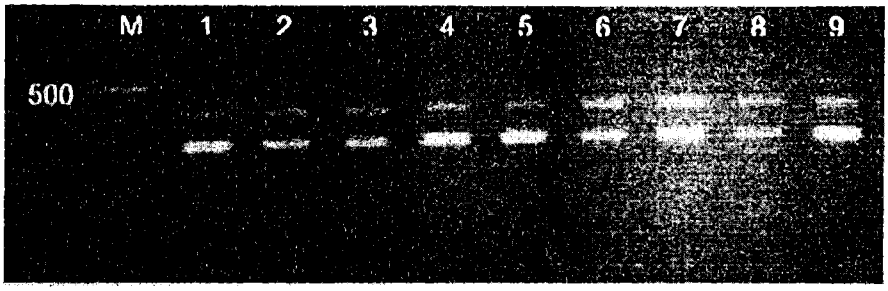


ภาพที่ 4.6 แสดงคู่ไพรเมอร์ Me2+Em2 ให้แถบดีเอ็นเอจากการทำ SRAP-PCR ที่มีขนาด 100, 300 bp

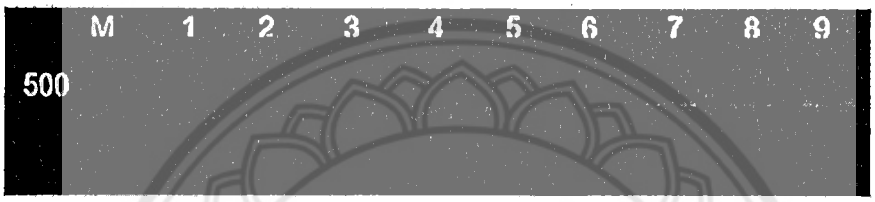
เลน M คือ DNA ladder ขนาด 100 bp

เลน 1-4 กล้วยไข่กำแพงเพชรต้นแม่พันธุ์

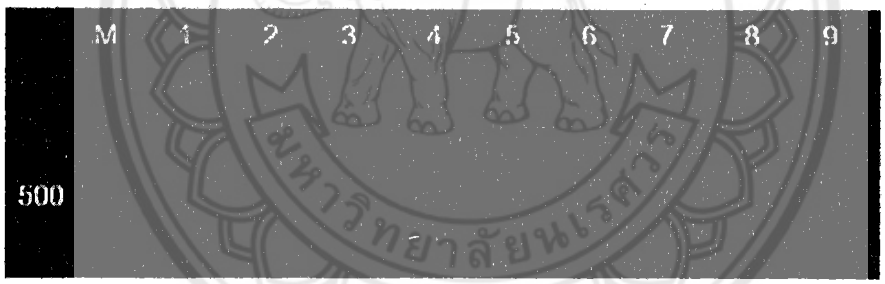
เลน 5-9 กล้วยไข่กำแพงเพชรเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



A. คู่ไพรเมอร์ Me5+Em7



B. คู่ไพรเมอร์ Me6+Em3



C. คู่ไพรเมอร์ Me8+Em7

ภาพที่ 4.7 แสดงคู่ไพรเมอร์ Me5+Em7 (A) ให้แถบดีเอ็นเอจากการทำ SRAP-PCR ที่มีขนาด 100, 300, 400, 500 bp

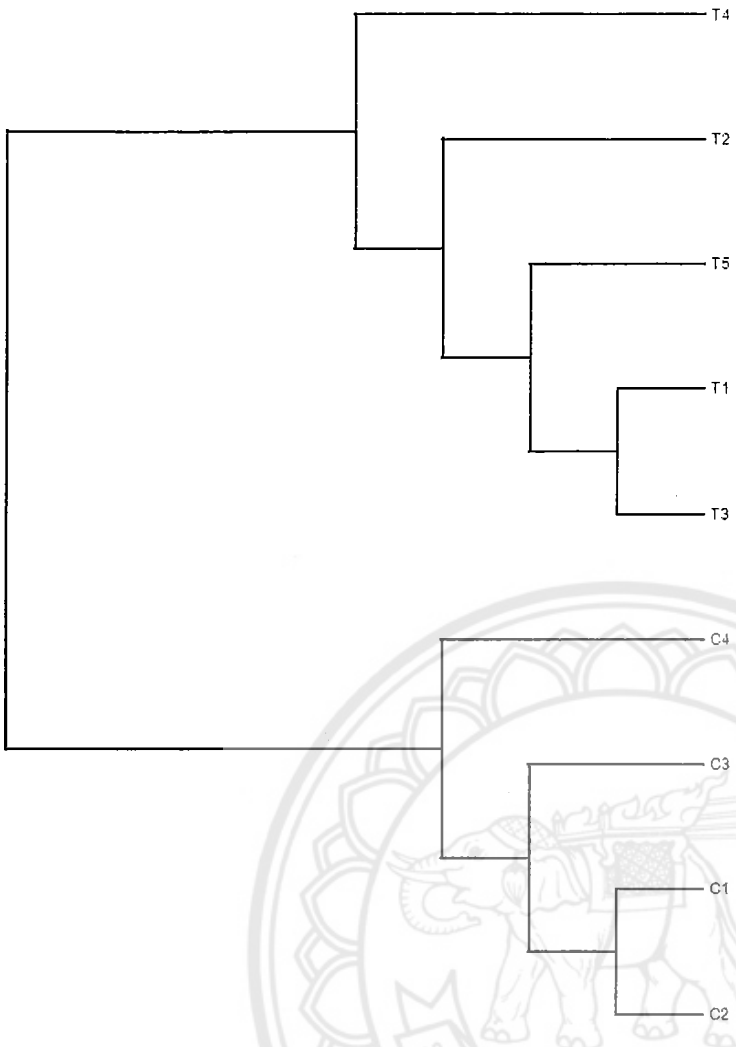
คู่ไพรเมอร์ Me6+Em3 (B) ให้แถบดีเอ็นเอจากการทำ SRAP-PCR ที่มีขนาด 400 bp

คู่ไพรเมอร์ . คู่ไพรเมอร์ Me8+Em7 (C) ให้แถบดีเอ็นเอจากการทำ SRAP-PCR ที่มีขนาด 300, 400, 600, 700, 900 bp เลน M คือ DNA ladder 100 bp เลน 1-4 กล้วยไข่กำแพงเพชรต้นแม่พันธุ์ เลน 5-9 กล้วยไข่กำแพงเพชรเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ตารางที่ 4.4 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของกล้วยไข่กำแพงเพชรต้นแม่พันธุ์กับต้นที่มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Similarity coefficient)

	C_1	C_2	C_3	C_4	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5
C_1	1.00000								
C_2	1.00000	1.00000							
C_3	1.00000	1.00000	1.00000						
C_4	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000					
T_1	0.71429	0.71429	0.71429	0.71429	1.00000				
T_2	0.75000	0.75000	0.75000	0.75000	0.95238	1.00000			
T_3	0.71429	0.71429	0.71429	0.71429	1.00000	0.95238	1.00000		
T_4	0.67857	0.67857	0.67857	0.67857	0.95000	0.90476	0.95000	1.00000	
T_5	0.71429	0.71429	0.71429	0.71429	1.00000	0.95238	1.00000	0.95000	1.00000

C หมายถึง ต้นแม่พันธุ์ T หมายถึง ต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



ภาพที่ 4.8 Dendrogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างของแถบ DNA ของกล้วยไข่กำแพงเพชรทั้ง 2 กลุ่ม ด้วยโปรแกรม Treeview เวอร์ชั่น 1.6.6 โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนแบบ Jacquard similarity coefficient ในการพิจารณาความแตกต่าง

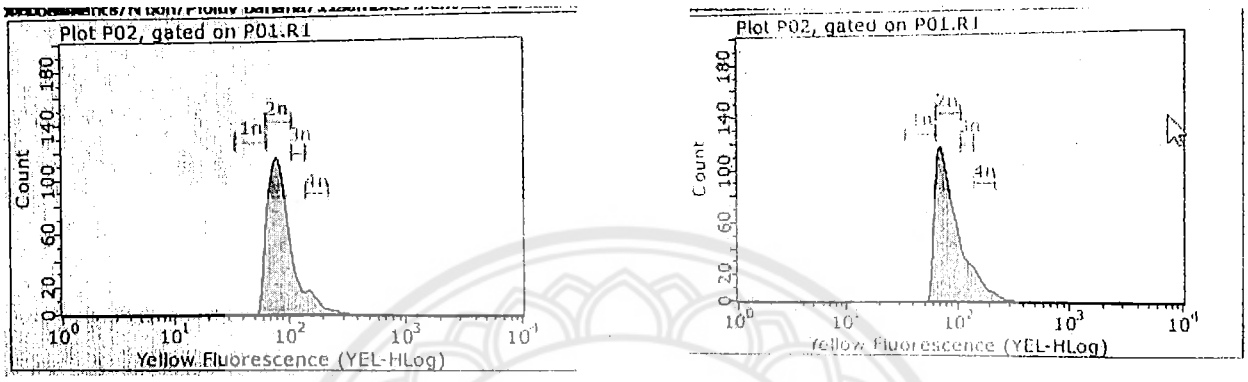
จากผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการ PCR โดยเทคนิค SRAP พบว่า กล้วยไข่ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อเปรียบเทียบกับต้นแม่พันธุ์จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอพบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ Me2+Em2, Me5+Em7, Me6+Em3, Me8+Em7 นั้นให้ลักษณะแถบดีเอ็นเอแบบ monomorphic มีค่า Jaccard similarity coefficient ระหว่าง 0.67857-0.75000 เมื่อนำค่า similarity coefficient ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างของแถบ DNA มาเขียน Dendrogram สามารถแยกกล้วยไข่กำแพงเพชรออกเป็น 2 กลุ่ม ด้วยโปรแกรม Treeview ทั้งนี้จากแถบดีเอ็นเอแบบ monomorphic แสดงว่ากล้วยไข่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นไม่มีความแตกตต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาค่า similarity coefficient ระหว่าง 0.67857-0.75000 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกลุ่มที่เป็นแม่พันธุ์กับต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความเหมือนทางพันธุกรรม 68-75 % ทั้งนี้ถ้าเปรียบเทียบในกลุ่มแม่พันธุ์เองมี similarity coefficient เท่ากับ 1.00 ซึ่งเหมือนกัน 100% และเปรียบเทียบพันธุกรรมในกลุ่มต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกันเองมี similarity coefficient เท่ากับ 0.90476- 1.00ซึ่งเหมือนกัน 90-100% ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมี somaclonal variation เกิดขึ้น

4.3 การวิเคราะห์ระดับพลอยดี

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา flow cytometry ได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีการใหม่ที่มีประโยชน์และรวดเร็วในการตรวจสอบอย่างมีประสิทธิภาพ ทำซ้ำ และลดค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่าง โดยใช้ค่าปริมาณ Relative nuclear DNA สามารถบอกระดับ ploidy ของสายพันธุ์พืชจำนวนมาก นอกจากนั้นยังใช้ในการจัดเรียงเซลล์ที่มีลักษณะแตกต่างจากประชากรเซลล์ผสม เช่นใช้ในการแยก heterokaryons จาก protoplasts ในการทดลองการทำฟิวชั่นโปรโต-พลาสต์สำหรับการผลิตพืชลูกผสม โดยพื้นฐานแล้ว flow cytometer เป็นกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ซึ่งวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของอนุภาคในสารแขวนลอย สิ่งเหล่านี้น่าตื่นเต้นโดยแหล่งกำเนิดแสง (U.V. หรือ เลเซอร์) และในทางกลับกันปล่อย epifluorescence ซึ่งกรองผ่านชุดกระจกดิจิโรอิค จากนั้นโปรแกรม inbuilt ของอุปกรณ์จะแปลงสัญญาณเหล่านี้เป็นกราฟแสดงความเข้มของ epi-fluorescence ที่ปล่อยออกมากับจำนวนเซลล์ที่ปล่อยออกมาในเวลาที่กำหนด ดังนั้น flow cytometer ประกอบด้วย fluidics, optics และ electronics เนื่องจากมันจะทำการตรวจวัดเซลล์ที่แขวนลอยที่ไหลในไฟล์เดียวผ่านปริมาตรที่ส่องสว่างซึ่งจะกระจายแสงและเปล่งแสงที่ถูกรวบรวมกรองและแปลงเป็นค่าดิจิตอลสำหรับการจัดเก็บบนคอมพิวเตอร์ (Robinson, 2006) ในการทดลองนี้ วิเคราะห์ระดับพลอยดีของกล้วยไข่กำแพงเพชรโดยการใช้ส่วนใบม้วนมาสกัดศึกษาปริมาณดีเอ็นเอจากนิวเคลียส ใช้วิธีการตาม Galbraith DW et al., 1983 [21] ใช้เครื่องวิเคราะห์ยี่ห้อ Guava easyCyte 8HT benchtop flow cytometer โดยตั้งค่าดังนี้ Event rate: medium - fast, Total count: at least 5,000 – 10,000, Dye: Guava Cell Cycle reagent ผลการศึกษาพบว่าตัวอย่างกล้วยไข่แม่พันธุ์ และกล้วยไข่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ค่า Histogram ที่มีนิวเคลียสอยู่ในสภาพ 2n ที่ 75.71 % และที่ 75.02 % ตามลำดับ แม้จะปรากฏ peak ที่แสดงค่า 1n, 3n, และ 4n แต่เป็นเปอร์เซ็นต์ต่ำ ดังนั้นสรุปได้ว่า ตัวอย่างกล้วยไข่แม่พันธุ์ และกล้วยไข่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่นำมาวิเคราะห์ค่าระดับพลอยดีนั้นแสดงพลอยดีที่ระดับเดียวกันคือ 2n ซึ่งเป็นดิพพลอยด์ (ตารางที่ 4.5 และ ภาพที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าระดับพลอยดีของกล้วยไข่แม่พันธุ์ และกล้วยไข่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่วิเคราะห์จาก Flow Cytometry

ตัวอย่าง	1n (%)	2n (%)	3n (%)	4n (%)
กล้วยไข่แม่พันธุ์	5.21	75.71	9.65	7.73
กล้วยไข่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	13.22	75.02	8.07	3.27



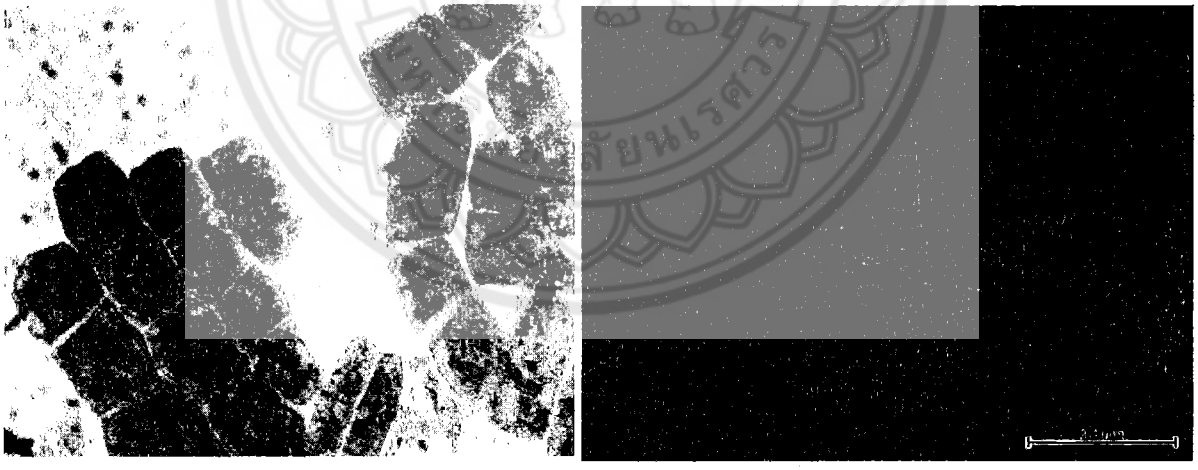
ก ข

ภาพที่ 4.9 แสดง Histogram ที่ channel 10^2 ทั้งกล้วยไข่แม่พันธุ์ (ก) และกล้วยไข่เพาะ**เลี้ยงเนื้อเยื่อ (ข) ที่วิเคราะห์จาก** Flow Cytometry แสดงนิวเคลียส diploid (2n) ทั้งสองตัวอย่าง

4.4 จำนวนโครโมโซมของกล้วยไข่

ผลการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายราก (somatic number 2n)ของกล้วยไข่กำแพงเพชรด้วยเทคนิคการเตรียมปลายรากแบบ Feulgen squash พบว่าการพรีทรีตเมนท์ (Pretreatment) ด้วยละลายอิ่มตัว alpha-bromonaphthlene เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสมมารถหยุดวงชีพเซลล์ให้อยู่ระยะเมตาเฟส (metaphase) ได้และทำให้โครโมโซมในระยะนี้จะหดสั้นเห็นรายละเอียดชัดเจน เหมาะสำหรับการนับโครโมโซม สรุปวิธีการที่เหมาะสมสำหรับนับโครโมโซมกล้วยไข่มีรายละเอียดดังนี้นำตัวอย่างปลายรากที่ผ่านการพรีทรีตเมนท์ (Pretreatment) จากนั้นนำไป Fixation ในสารละลาย 90% acetic acid นาน 30 นาที ทำการ Storage ด้วยเอทีลแอลกอฮอล์ 70% 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้น Hydrolysis โดยการแช่ใน 1N HCl ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที สารละลาย 1N HCl จะช่วยย่อยสลายผนังเซลล์พืช ละลายผนังเซลล์ชั้น middle lamella ทำให้เซลล์กระจายตัวได้ดี และแยกเบส purine ออกจาก deoxyribose glucosidic bond ของดีเอ็นเอได้หมู่ aldehyde และเมื่อย้อมด้วยสารละลาย Schiff's reagent เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่ aldehyde กับสี basic fuchsin ของ Schiff's reagent ทำให้โครโมโซมติดสีม่วงแดงเห็นได้ชัดเจนส่วนไซโทพลาสซึมจะใสไม่มีสี

กล้วยไข่แม่พันธุ์และกล้วยไข่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีจำนวนโครโมโซม 2n=22 โครโมโซมเหมือนกัน และมีโครโมโซม 2 ชุด ดังนั้นจึงมีจีโนมเป็น Diploid (2n =22, x=11) ดังแสดงในภาพที่ .4.6.. วัดโครโมโซมที่เห็นชัดในสไลด์พบว่ามีขนาด1.375 ไมโครมีเตอร์ (ภาพที่ 4.7.) โดยรวมโครโมโซมมีขนาดเล็ก ผลการนับจำนวนโครโมโซมพบว่าทั้งกล้วยแม่พันธุ์และกล้วยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีจำนวนโครโมโซม 2n=22 ไม่แตกต่างกัน



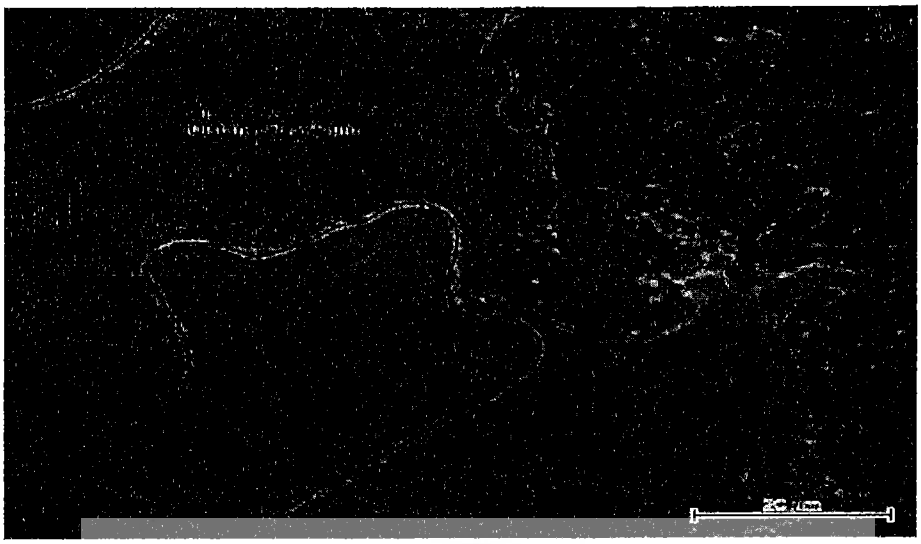
ก. ข.

ภาพ 4. 10 แสดงเมทาเฟสโครโมโซมจากเซลล์เจริญที่ปลายรากล้วยไข่กำแพงเพชรแม่พันธุ์เซลล์ที่ 1(ก) และเซลล์ที่ 2(ข) มีค่า 2n=22 ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

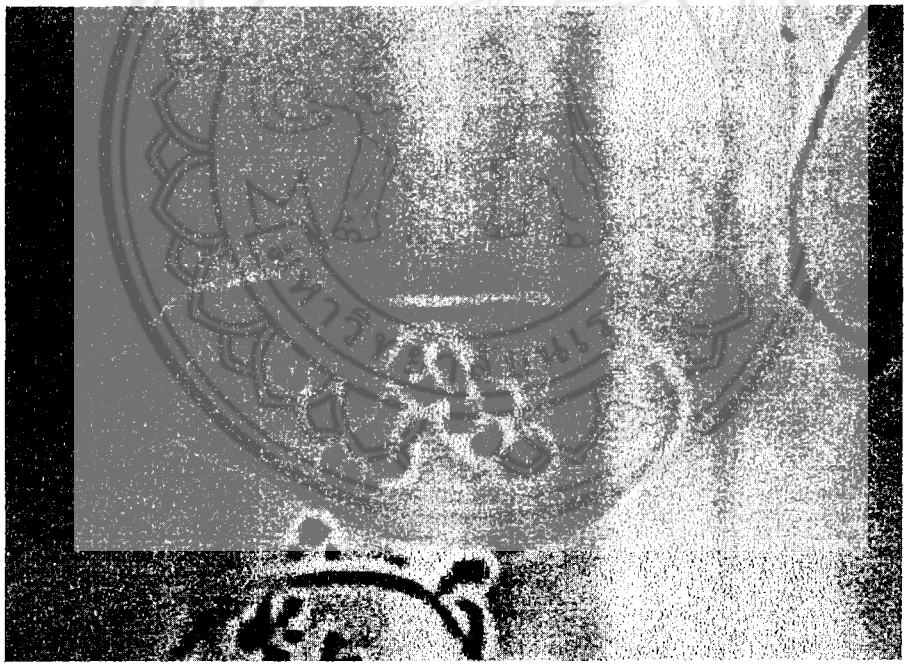
1052768

สำนักหอสมุด

14 มิ.ย. 2565



ภาพ 4.11 แสดงเมทาเฟสโครโมโซมจากเซลล์เจริญที่ปลายรากล้วยไข่กำแพงเพชรแม่พันธุ์ 2n=22 ที่กำลังขยาย 1000 เท่า วัดขนาดโครโมโซมแท่งที่เห็นชัดได้ความยาว 1.375 ไมโครมีเตอร์



ภาพ 4.12 แสดงเมทาเฟสโครโมโซมจากเซลล์เจริญที่ปลายรากล้วยไข่กำแพงเพชรที่ผลิตจากระบบ TIB มีจำนวนโครโมโซม 2n=22 ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา

การผลิตกล้วยไข่ต้นพันธุ์โดยใช้ระบบ TIB โดยใช้ระบบรีแอคเตอร์แบบขวดคู่ขนาด 2 ลิตร ระบบควบคุมแบบอัตโนมัติมีแผงควบคุมโดยตั้งเวลาการให้อาหารทั้งระยะเวลาและความถี่ที่อาหารจะเคลื่อนที่จากขวดบรรจุอาหารไปยังขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สภาวะที่ใช้ในการศึกษานี้คือ ชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มต้น 10 ชิ้น ปริมาตรอาหาร 2 ลิตร การให้อาหาร 2 ครั้งต่อวันโดยให้อาหารทุกๆ 12 ชั่วโมง ระยะเวลาที่เนื้อเยื่อจมในอาหารครั้งละ 10 นาที วางในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ให้จำนวนยอด 20.38 ต้นต่อรีแอกเตอร์ มากกว่าระบบอาหารแข็ง 2.4 เท่า อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้เป็นการทำซ้ำจากผลการศึกษาที่มีมาก่อนหน้าซึ่งให้ผลการทดลองจำนวนต้น 4.19 เท่า ปัจจัยของฤดูกาลที่เก็บหน่อใบแคบนั้นมีผลต่อการแตกยอดใหม่ในระบบเลี้ยงเนื้อเยื่อเนื่องจากปีที่ทำการศึกษานี้มีภาวะแล้ง

จากการประเมินความคงตัวของพันธุกรรมกล้วยไข่ที่ผลิตจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่าเมื่อประเมินด้วยการนับจำนวนโครโมโซม การวิเคราะห์ระดับพลอยดี นั้นบ่งชี้ว่ากล้วยไข่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีพันธุกรรมเหมือนกันโดยมีจำนวนโครโมโซม 2n=22 เท่ากันและ เมื่อนำไปวิเคราะห์ระดับพลอยดีด้วยเครื่อง Flow cytometer พบว่าให้ค่าระดับพลอยดีที่ 2n ของกล้วยไข่แม่พันธุ์ เป็น 75.71 เปอร์เซ็นต์ และ กล้วยไข่ที่มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 75.02 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีระดับพลอยดีเป็นดิพลอยด์

การวิเคราะห์ SRAP พบว่ากลุ่มต้นพันธุ์กล้วยที่นำมาเป็นแม่พันธุ์นั้นมีค่า similarity coefficient ที่ 1.00 ส่วนต้นพันธุ์ที่ผ่านระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีค่า similarity coefficient ที่ 0.95-1.00 ซึ่งแสดงความเป็นเนื้อเดียวกันของพันธุกรรมของแต่ละกลุ่ม อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มพบว่าค่า similarity coefficient 0.67857- 0.7500 ซึ่งแสดง polymorphism ระหว่างแม่พันธุ์และต้นพันธุ์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการศึกษานี้พบว่าการขยายพันธุ์กล้วยไข่กำแพงเพชรในระบบ TIB สามารถเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ได้ปริมาณมากกว่าระบบอาหารแข็ง ระบบสามารถลดแรงงานในการย้ายเนื้อเยื่อ ลดค่าองค์ประกอบอาหาร ลดพื้นที่การทำงาน และจากการศึกษาความคงตัวทางพันธุกรรมของต้นพันธุ์นั้นพบว่ามีโครโมโซมเท่ากัน เป็นดิพลอยด์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับพลอยดีซึ่งยืนยันด้วยผลของ Flow cytometry แต่พบ polymorphism เมื่อตรวจด้วย SRAP จากคู่ไพร์เมอร์ 8 คู่ มี monomorphic 6 คู่ (Me2+Em2, Me2+Em6, Me5+Em6, Me5+Em7, Me6+Em3, Me8+Em7) และแสดง polymorphic 2 คู่ (Me2+Em7, Me3+Em3) มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 28 แถบ แถบ monomorphic 22 แถบ แถบ polymorphic 6 แถบ คิดเป็น 13.3 เปอร์เซ็นต์ polymorphic ขนาดแถบดีเอ็นเอที่พบ 100-1010 bp

สรุป เทคโนโลยีการการขยายพันธุ์กล้วยไข่กำแพงเพชรในระบบ TIB นั้นมีความคงตัวทางพันธุกรรมแต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้เทคโนโลยีได้รับการพิสูจน์ว่าดีให้ผลผลิตมีคุณภาพขอเสนอให้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในแปลงต่อจากการศึกษานี้

เทคโนโลยีนี้เป็นนวัตกรรมใหม่ทั้งในแง่ของระบบรีแอกเตอร์และกรรมวิธีการผลิตต้นพันธุ์ที่ดีซึ่งจะสามารถนำไปเพิ่มมูลค่าของสินค้าที่เกิดจากการแปรรูปกล้วยไข่กำแพงเพชร และกล้วยไข่กำแพงเพชรบริโภคสด ซึ่งเป็นสินค้า GI (Geography Indication) ของจังหวัดกำแพงเพชร ซึ่งจะทำให้เศรษฐกิจมีมูลค่าสูงขึ้นกว่าการใช้วิธีการดั้งเดิมที่มีปัญหาผลผลิตต่ำหน่อพันธุ์เสื่อมลงเมื่อปลูกไว้เกินสามปี

เอกสารอ้างอิง

1) The Thailand research fund, www.trf.or.th

2) ข่าวสด วันที่ 16 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2558

3) Etienne H, Berthouly M, 2002.Temporary immersion system in plant micropopagation, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69:215-231.

4) Lakshmanan V, Venkataramanan SR, Neelwarne B, 2007. Molecular Analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of Bnana using RAPD and ISSR markers, Electronic Journal of Biotechnology: 10 (1): 106-113.

5) Nwauzoma A.B, and Jaja E, T, 2013. A Review of somaclonal variation in plantain (Musa spp.) : mechanisms and applications. Journal of Applied Biosciences 67 : 5252-5260

6) Hsie BS, Brito MX Vila Nova, Borges-Paluch LR, Silva MV, and Donato VWST,2015. Determining the genetic stability of micropropagated sugarcane using inter-simple sequence repeat markers, Genetics and Molecular Research:14 (4): 17651-17659.

7) Leva AR, Petruccelli R, Rinaldi LMR, 2012. Somaclonal Variation in Tissue Culture : A case study with Olive, Recent Advanced in Plant in vitro culture : 10-17.

8) Martins M, Sarmento D, and Oliveira MM, 2004. Genetic stability of micropropagated almond plantlets as assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell Rep.23:492-496.

9) เบญจมาศ ศิลาย้อย 2558.กล้วย (พิมพ์ครั้งที่ 4) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

10) เครือกล้วยตั้ง กล้วยไข่เมืองกำแพงเพชร: www.kamphaengphet.doae.go.th/banana/101_banana_03.htm (access: July10, 2016)

11) ศิริพร เจนศิริสกุล. (2533). ผลตอบแทนจากการลงทุนปลูกกล้วยไข่ในจังหวัดกำแพงเพชร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย : กรุงเทพฯ

12) อรดี สหวัชรินท์ กวิศร์ วานิชกุล สุรพงษ์ โกสิยจินดา (2536) การพัฒนาพันธุ์และการผลิตกล้วยกลุ่มกล้วยไข่โดยเทคโนโลยีชีวภาพ 202 หน้า

13) สุภาพร แก้วสมพงษ์ จุลภาค คุ้นวงษ์ กวิศร์ วานิชกุล และเบญจมาศ ศิลาย้อย (2535) ผลของ 6-Benzylaminopurine ต่อการเกิดหน่อของกล้วยไข่ บนอาหารสังเคราะห์ วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย์) 26,115-118.

14) Ma และ Huang 1982 First report of plantain leaf spot casual by Pestlotiopsis menace siaua in Chaina the European Physical.

15) Banerjee et al, 1985 A tissue cultures technigue for clonal propagation via and storage under minimal growth conditions of musa (banana and plantain) Plant cell report

16) Oliveira et al, 1999 Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose tree Moringa oleifera Lamarck. J. Sci. Food Agric., 79 (6): 815-820

17) Khalil et al, 2002 Khalil S, Cheah K, Peroz E, Gaskill D, Hu J.2002 Regeneration of banana (Musa spp. AABcv Dwart Bragillian) Secandary somatic embryogenesis Plant cell report

18) Au V.H, Bhat A, Keng CL.2012.Micropropagation of Musa acuminate x M.balbisiana cv Pisang Awak (ABB genome) and other three cultivars. Pak. J. Bot. 44(2):777-780.

19) Lyam P.T, Mutah L.M, Zainab O.J, 2012.The potential of Temporary Immersion Bioreactors (TIBs) in Meeting Crop Production Demand in Nigeria, Journal of Biology and Life Science 3(1):66-86.

20) Nwauzoma AB, Tenkouano A, Crouch JH, Pillay M. Vuylsteke D, Daniel-kalio L. A. 2002. Yield and disease resistance of plaintain (Musa spp. , AAB group) Somaclones in Nigeria, Euphytica, 123 : 323-333.

21) Galbraith DW et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science 1983, 220:1049-1051.