

การคัดเลือกและพัฒนาโซมาโคลนของกล้วยน้ำว้าสายพันธุ์สุโขทัย 1 และมะลิองค์ เพื่อเพิ่มความต้านทานต่อโรคตายพรายที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Race 1)

Selection and development of somaclones from banana cultivars 'Sukhothai 1' and 'Mali-Ong' for resistance to Fusarium Wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Race 1)

เอกพล ภูวนารณฤบาล¹, สุภาภรณ์ สาชาติ², อุทัยวรรณ ทรัพย์แก้ว¹, ธารทิพย์ ภาสบุตร³, จุฬารัตน์ หน่อแก้ว³ และ เพ็ญจันทร์ สุธธานกุล^{1*}

Eakpol Phuvanartnarubal¹, Supaporn Sachart², Uthaiwan Supkaew¹, Tharntip Bhasabutra³, Jurarat Norkaew³ and Penchan Sutthanukul^{1*}

¹ ศูนย์วิจัยพืชสวนสุโขทัย กรมวิชาการเกษตร เลขที่ 239 หมู่ที่ 4 ตำบลท่าชัย อำเภอสว่างวีรกรรม จังหวัดสุโขทัย 64190

² Sukhothai Horticultural Research Center, Department of Agriculture, 239, Moo 4, Tha Chai, Si Satchanalai, Sukhothai 64190

³ สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร เลขที่ 50 ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

² Horticulture Research Institute, Department of Agriculture, 50 Ngam Wong Wan Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 10900

³ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เลขที่ 50 ดิเก็จจกรทอง แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

³ Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, 50 Ngam Wong Wan Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 10900

บทคัดย่อ: ปัจจุบันเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยมักพบปัญหากล้วยเป็นโรคตายพรายที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). เป็นโรคที่สร้างความเสียหายรุนแรงต่อการปลูกกล้วยมากที่สุดโรคหนึ่ง ซึ่งเชื้อมีอยู่รอดในดินได้นานกว่า 15 ปี เชื้อสามารถแพร่กระจายไปกับส่วนขยายพันธุ์ ดิน และน้ำ ซึ่งสร้างความเสียหายอย่างมากให้กับเกษตรกร การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโซมาโคลน (Somaclones) ในพันธุ์กล้วยน้ำว้าสุโขทัย 1 และมะลิองค์ คัดเลือกโซมาโคลนที่ต้านทานต่อเชื้อ Foc Race 1 เพื่อให้สามารถยังคงให้ผลผลิตได้ในพื้นที่ที่พบการระบาด โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของพันธุ์สุโขทัย 1 และมะลิองค์ ในอาหาร MS ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.2 mg/l จากนั้นจึงทดสอบด้วยกรดฟูซาริก (FA) ในการทดลองที่ประกอบด้วย 9 วิธีการที่มีความเข้มข้นต่างกัน (0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35 และ 0.4 mM) ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 30 เนื้อเยื่อเจริญ เวลา 60 วัน พบว่า LD₅₀ ของกล้วยน้ำว้าสุโขทัย 1 และมะลิองค์ มีค่าอยู่ที่ 1.75 และ 1.50 mM ตามลำดับ เนื้อเยื่อเจริญที่รอดชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยอาหารที่มีความเข้มข้นของ FA ต่ำ (0.05, 0.10 และ 0.15 mM) จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงทั้งสองสายพันธุ์ กล้วยน้ำว้าสุโขทัย 1 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม FA ความเข้มข้นสูง (0.35 - 0.40 mM) มีอัตราการรอดต่ำ และกล้วยน้ำว้ามะลิองค์ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกันมีอัตราการรอดเป็นศูนย์ จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อเจริญที่ยังมีชีวิตเพาะเลี้ยงในอาหาร MS เพื่อเพิ่มปริมาณ ชักนำให้เป็นต้น และราก จากนั้นนำไปปลูกเชื้อ Foc Race 1 isolate DOA2415 ความเข้มข้น 10⁶ conidia/mL ในห้องปฏิบัติการ ประเมินความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคที่ 30 วันหลังจากปลูกเชื้อ ตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคโดยนำตัวอย่างพืชบริเวณที่แสดงอาการมาแยกเชื้อด้วยวิธี Tissue transplanting technique ผลวิจัยสามารถคัดเลือกโซมาโคลนของกล้วยน้ำว้ามะลิองค์ ที่ต้านทานโรคปานกลางจำนวน 1 สายต้น และ กล้วยน้ำว้าสุโขทัย 1 จำนวน 2 สายต้นที่ต้านทานโรคตายพรายจากเชื้อรา Foc Race 1 ขึ้นต่อไปจะตรวจสอบศักยภาพทางการเกษตรและการตลาดของโซมาโคลนที่คัดเลือกได้

คำสำคัญ: กล้วยน้ำว้า; การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย; ความแปรผันของโซมาโคลน; ความต้านทานโรคตายพราย

* Corresponding author: banky31@gmail.com

Received: date; December 16, 2024, Revised: date; June 13, 2025

Accepted: date; June 16, 2025, Published: date; July 16, 2025

ABSTRACT: Banana production is severely threatened by Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). This soilborne pathogen persists for over 15 years, spreading through planting materials, soil, and water, and causes substantial economic losses. This study aimed to induce somaclonal variation in 'Sukhothai 1' and 'Mali Ong' bananas and select Foc Race 1-resistant somaclones for cultivation in affected areas. The research began with the *in vitro* culture of shoot tips from 'Sukhothai 1' and 'Mali Ong' using MS medium supplemented with 0.2 mg/L TDZ. The explants were then subjected to fusaric acid (FA) as a selective agent across nine concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, and 0.4 mM). Each treatment consisted of 30 shoot tips with three replicates, cultured for 60 days. The LD₅₀ values for 'Sukhothai 1' and 'Mali Ong' were 1.75 mM and 1.50 mM, respectively. Survival rates varied significantly depending on both cultivar and FA concentration, with higher survival observed at lower FA concentrations (0.05-0.15 mM). In contrast, elevated FA concentrations (0.35-0.4 mM) resulted in low survival rates in 'Sukhothai 1' and complete mortality in 'Mali Ong' after 60 days of culture. The surviving multiple bud clumps were transferred to MS medium for shoot multiplication and subsequent root induction, after which the plantlets were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 1 (isolate DOA2415) at a concentration of 10⁶ conidia/mL under controlled laboratory conditions. Thirty days post-inoculation, screening revealed one somaclonal line of 'Mali Ong' exhibiting moderate resistance to *Fusarium* wilt and two somaclonal lines of 'Sukhothai 1' displaying resistance to Foc Race 1. Further evaluation will focus on the agronomic performance and market potential of these selected somaclones.

Keywords: Banana (*Musa* spp.); Banana tissue culture; Somaclonal variation; *Fusarium* wilt resistance

บทนำ

กล้วยน้ำว้า (*Musa sapientum* L. หรือ *Pisang Awak*) เป็นพืชที่มีความหลากหลายในการใช้ประโยชน์ ไม่ว่าจะเป็นการบริโภคสด นำไปใช้ในเมนูอาหารต่าง ๆ ทั้งคาวหวาน หรือแปรรูปเป็นขนมขบเคี้ยวและผลิตภัณฑ์อาหารอื่น ๆ อย่างไรก็ตาม การผลิตกล้วยต้องเผชิญกับปัญหาโรคพืชหลายชนิด โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อรา ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพและปริมาณผลผลิตอย่างมีนัยสำคัญโรคที่สำคัญ ได้แก่ โรคใบจุดสีน้ำตาล (Pseudocercospora musicola), โรคใบจุดสีน้ำตาล (Pseudocercospora fijiensis) และโรคตายพรายที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) ซึ่งถือเป็นภัยคุกคามรุนแรงต่ออุตสาหกรรมกล้วยทั่วโลก (Ploetz, 2015; Alakonya et al., 2018; Santos et al., 2019; Zakaria, 2023)

โรคตายพราย ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) เป็นหนึ่งในโรคที่สร้างความเสียหายรุนแรงต่ออุตสาหกรรมกล้วยทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงต้นศตวรรษที่ 20 โรคนี้ส่งผลให้เกิดการระบาดครั้งใหญ่ที่สุดครั้งหนึ่งในประวัติศาสตร์การปลูกกล้วย ทำให้การค้าส่งออกกล้วยทั่วโลกต้องหยุดชะงัก (Stover, 1962; Buddenhagen et al., 2009) เชื้อ Foc เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดินและสามารถพบได้ในพื้นที่ปลูกกล้วยทั่วโลก โดยสามารถสร้างโครงสร้างด้านทานที่เรียกว่าคลาโมโดสปอร์ (chlamydospores) ทำให้สามารถอยู่รอดในดินได้นานกว่า 10 ปี (Ploetz, 2015) เชื้อรา Foc เข้าสู่พืชผ่านทางรากและแพร่กระจายไปยังท่อลำเลียงน้ำ ส่งผลให้เกิดอาการเนื่อเยื่อตายและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในท่อลำเลียงของลำต้นเทียม จากนั้นลุกลามไปยังก้านใบ โดยในระยะแรก โคนใบแก่ด้านนอกจะมีสีซีดเหลือง ก่อนที่ใบจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและหักพับภายใน 1-2 สัปดาห์ เมื่อผ่าลำต้นเทียมหรือกาบใบใกล้กับระดับผิวดิน จะพบว่ากลุ่มท่อลำเลียงมีสีเปลี่ยนเป็นน้ำตาล เหลือง หรือแดง (ณรงค์, 2555)

เชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) ถูกจำแนกออกเป็น 3 สายพันธุ์หลัก โดยพิจารณาจากช่วงของพืชอาศัย (host range) ที่อ่อนแอ และการแบ่งตามกลุ่มความเข้ากันได้ของเส้นใยรา (Vegetative hyphae Compatibility) ซึ่งสามารถจำแนกได้มากถึง 24 กลุ่ม (Mostert et al., 2017) สายพันธุ์หลักที่มีผลต่อกล้วยได้แก่ Race 1, Race 2 และ Race 4 โดย Race 1: มีผลต่อพันธุ์กล้วยหอมทอง (Gros Michel, AAA group), กล้วยไข่ (Lady Finger, AA group) และกล้วยน้ำว้า (Pisang Awak, ABB group) (Fourie et al., 2011) Race 2: มีผลต่อพันธุ์กล้วยเดียวกันกับ Race 1 รวมถึงพันธุ์ปลีกล้วย (Bluggoe, ABB group) และ Race 4: เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงมากที่สุด ส่งผลกระทบต่อพันธุ์กล้วยส่วนใหญ่รวมถึงพันธุ์ คาเวนดิช ซึ่งเป็นพันธุ์กล้วยที่ได้รับการปลูกอย่างแพร่หลาย (Buddenhagen et al., 2009; Ploetz, 2015)

กรดฟูซาริก (Fusaric Acid; FA) ซึ่งเป็นสารพิษที่สร้างขึ้นโดยเชื้อรา *Fusarium* หลายชนิด มีบทบาทสำคัญในการทำให้พืชเกิดอาการเหี่ยว และตาย การคัดเลือกพันธุ์พืชที่ทนทานต่อ FA อาจเป็นวิธีที่มีศักยภาพในการพัฒนาพืชที่มีความต้านทานต่อเชื้อรา Foc

การคัดเลือกพันธุ์ในหลอดทดลองหรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อสร้างโซมาโคลนกลายพันธุ์ (somaclonal variation) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มความต้านทานต่อโรคในพืช (Švábová and Lebeda, 2005; Pillay, 2002; Naserian Khiabani et al., 2018; Wu et al., 2010) การทดลองในหลอดทดลองนี้ช่วยลดพื้นที่การคัดกรองในแปลงทดลองและเป็นวิธีที่มีความแม่นยำในการประเมินลักษณะทนทานต่อโรค (Chen et al., 2013; Ghag et al., 2014)

การคัดเลือกเซลล์กลายพันธุ์ (mutants) ที่ทนทานต่อสารพิษ FA ให้ห้องปฏิบัติการ มีความเป็นไปได้สูงที่จะทำให้ได้พืชที่ทนทานต่อโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อราสกุล *Fusarium* (Matsumoto et al. 2010) แนวทางนี้เกี่ยวข้องกับการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมหรือทางเอพิเจเนติกส์ (epigenetic variation) ที่อาจเกิดขึ้นจากกระบวนการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (Penna et al., 2019; Anil et al., 2018) ซึ่ง Bacon et al. (1996) พบว่า เชื้อราสกุล *Fusarium* ผลิตสารพิษ FA ความสำเร็จที่ชัดเจนของการใช้เทคนิค somaclonal variations ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยให้ต้านทาน *Foc* TR 4 เกิดขึ้นในไต้หวันโดยใช้พันธุ์ 'Giant Cavendish' (Hwango and KO, 2004) การศึกษาอีกกรณีหนึ่งซึ่งใช้เอ็มบริโอโซมาติกที่เก็บไว้ในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นระยะเวลานานเพื่อสร้าง somaclones จากนั้นจึงทดสอบความต้านทานด้วยด้วย *Foc* race 1 พบว่า somaclones ของกล้วย 4 จาก 26 สายพันธุ์ 'Rasthali' มีความต้านทาน *Foc* มากขึ้น นอกจากนี้ การวิเคราะห์ cDNA-RAPD ยังระบุยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างน้อยหนึ่งยีน (ไลโปออกซิเจนเนส) ในโซมาโคลนเหล่านี้ (Ghag et al., 2014) Matsumoto et al. (2010) ได้คัดเลือกกล้วยสายพันธุ์ต้านทานต่อโรคตายพรายที่เกิดจากเชื้อรา *Foc* โดยเริ่มต้นคัดเลือกกล้วยกลายพันธุ์ (mutant) ที่ทนทานต่อเชื้อรา *Foc* R 1 (กลุ่ม race 1) จากการคัดเลือกเนื้อเยื่อกล้วยในกลุ่มคาเวนดิชที่เลี้ยงในอาหารที่ผสมสารพิษ FA ความเข้มข้น 0.05 -1.6 mM แล้วนำมาอนุบาลในโรงเรือนปลูก และเมื่อนำไปปลูกในแปลงปลูกกล้วย พบว่ากล้วยบางสายต้นมีลักษณะที่ต้านทานต่อโรคตายพราย และ Morpurgo et al. (2010) ศึกษาการคัดเลือกเนื้อเยื่อกล้วยที่อ่อนแอ และต้านทานต่อเชื้อ *Foc* กลุ่ม race 1 และ race 4 โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารผสมสารพิษ FA และในอาหารที่ผสมสารสกัดหยาบจากเชื้อราสาเหตุโรค (fungal crude filtrates) รวมทั้งดูลักษณะความสัมพันธ์ของพฤติกรรมเนื้อเยื่อกล้วยที่เจริญในอาหารพิษ และขณะเป็นต้นกล้วยที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคลงไป พบว่าการคัดเลือกสายต้นกล้วยจากการเลี้ยงในอาหารผสมสารพิษ FA หรือการเลี้ยงในอาหารที่ผสมสารสกัดหยาบจากเชื้อราสาเหตุโรค มีลักษณะที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างกัน Rebouças et al. (2021) คัดเลือกกล้วยสายพันธุ์กลุ่มพันธุ์กล้วยสายพันธุ์คาเวนดิชต้านทานต่อโรคตายพรายที่เกิดจากเชื้อรา *Foc* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มี FA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1-0.4 mM แล้วนำมาปลูกทดสอบในโรงเรือนปลูกพืช ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อรา *Foc* TR 4 (กลุ่ม race 4) พบว่าสามารถคัดเลือกสายต้นที่มีความต้านทานต่อเชื้อ *Foc* TR 4 ได้ดีในระดับโรงเรือน

การวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนาสายพันธุ์กล้วยน้ำว้าที่ทนทานต่อโรคตายพรายจากเชื้อรา *Foc* โดยใช้สายพันธุ์ 'กล้วยน้ำว้าสุโขทัย 1' ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีลักษณะทางเศรษฐกิจดี (กรมวิชาการเกษตร, 2565) และ 'กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง' วิธีการการพัฒนาสายพันธุ์เริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพที่มีสาร FA ในความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อสร้างการแปรปรวนทางพันธุกรรม จากนั้นคัดเลือกโซมาโคลนที่มีศักยภาพในการทนทานต่อโรคเพื่อประเมินความต้านทานในระดับห้องปฏิบัติการ โรงเรือน และในแปลงทดลองต่อไป

วิธีการศึกษา

การเลี้ยงเนื้อเยื่อของกล้วยน้ำว้าบนอาหารสังเคราะห์สร้างเซลล์เนื้อเยื่อเจริญ (multiple bud clumps)

นำหน่ออ่อนของกล้วยน้ำว้าสายพันธุ์ที่ประเมินลักษณะภายนอกแล้วว่าเป็นสายพันธุ์ทนทาน และเป็นสายพันธุ์อ่อนแอ จากแหล่งปลูกต่าง ๆ ของประเทศ คือ น้ำว้าสุโขทัย 1 และมะลิอ่อง ทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด ใช้มีดตัดใบทิ้งและเอาส่วนรอบนอกออกให้หมด เหลือแต่ส่วนในที่มีหัว (corm) และส่วนยอด มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 ซม. นำส่วนที่ได้ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ เข้มข้น 15% และ 10% นาน 20 และ 15 นาที ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่นฟอกฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเข้าตู้ย่ำเยื่อเยื่อ ตัดส่วนที่สัมผัสกับคลอโรกซ์ออกให้หมด ลอกกาบใบออกจนเหลือปลายยอด ขึ้นส่วนจะมีขนาด ประมาณ 1.5 ลบ.ซม. ตัดแบ่งตรงกลางออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน นำชิ้นส่วนมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้นของ 0.2 mg/l ย้ายขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปไว้บนชั้นวางขวดในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิประมาณ 25 °C ความเข้มแสง 2000 Lux นาน 16 ชม./วัน หลังจากเพาะเลี้ยง

ประมาณ 3-4 สัปดาห์จะเริ่มเกิดกลุ่มตา (multiple bud) ตัดแบ่งกลุ่มตา และนำไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิม เพื่อเพิ่มปริมาณ adventitious bud สำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

การคัดเลือกเซลล์เนื้อเยื่อเจริญบนอาหาร MS ที่ผสม FA ความเข้มข้นต่าง ๆ

นำเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของกล้วยน้ำว้าสุโขทัย 1 (a) และกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง (b) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม FA ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ T0= MS ที่ไม่เติม FA (Control), T1= MS+FA 0.05 mM, T2= MS+FA 0.10 mM, T3= MS+FA 0.20 mM, T4= MS+FA 0.25 mM, T5= MS+FA 0.35 mM, T6= MS+FA 0.35 mM และ T7= MS+FA 0.40 mM วางขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ในชั้นวางขวดในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิประมาณ 25 °C ความเข้มแสงประมาณ 2000 Lux นาน 16 ชม./วัน ตรวจสอบการเจริญของเนื้อเยื่อหลังจากเพาะเลี้ยงที่ 60 วัน บันทึกจำนวนกลุ่มเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของกล้วยน้ำว้าที่รอดตาย หลังจากเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม FA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดย วางแผนการทดลองแบบ 2 x 9 Factorial in CRD แบ่งการทดลองออกเป็น 18 กลุ่มทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 30 เนื้อเยื่อเจริญ วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% คัดเลือกเนื้อเยื่อเจริญที่ยังมีชีวิต และแข็งแรงในแต่ละกรรมวิธีเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมในขวดเพาะเลี้ยง เพื่อเพิ่มจำนวนกลุ่มตาให้เพียงพอ จากนั้นจึงย้ายลงอาหารสูตร MS ที่เติม BA + น้ำมะพร้าว 2 ครั้ง เพื่อให้พัฒนาเจริญทางใบและรากที่สมบูรณ์พร้อมจะนำไปประเมินความทนทานโรคในการทดลองระยะต่อไป

การวิเคราะห์ LD₅₀ ของเซลล์เนื้อเยื่อเจริญ กล้วยน้ำว้าสุโขทัย 1 และกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง

นำข้อมูลการเจริญของกล้วยน้ำว้าสุโขทัย 1 และมะลิอ่อง มาวิเคราะห์โดยใช้ระบบโพรบิท (Probit) ด้วยโปรแกรม R และนำข้อมูลที่ได้เขียนเป็นกราฟ โดยกำหนดให้แกน X คือ ความเข้มข้นของ FA ที่ได้รับ และแกน Y คือ การตายของเซลล์เนื้อเยื่อเจริญ และแสดงค่า LD₅₀

การเตรียมเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Race 1) isolate DOAC2415

เตรียมเชื้อ *Foc* race 1 isolate DOAC2415 ที่ได้จากการสำรวจการรวบรวม (อภิรัชต์ และคณะ, 2562) เพื่อใช้สำหรับการปลูกเชื้อ โดยนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °C ให้แสง 12 ชม./วัน ระยะเวลา 5 วัน จากนั้น ล้างสปอร์บนผิวหน้าอาหารด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำมารวมกันในขวดรูปชมพู่ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 100 rpm นาน 20 นาทีเพื่อให้ สปอร์ กระจายออกจากกันโดยสม่ำเสมอ จากนั้น ดูดสารละลาย 20 ml ปรับความเข้มข้นโดยการนับสปอร์ โดยใช้ counting chamber ให้มีความเข้มข้น 10⁶ conidia/mL (Wu et al., 2010)

การประเมินความต้านทานต่อเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Race 1) ในห้องปฏิบัติการ

โดยดัดแปลงจาก Kahiabani (2022) โดยนำ Spore suspension ที่เตรียมไว้มาปรับความเข้มข้นให้ได้ 10⁶ conidia/mL หลังจากนั้นใช้เข็มฉีดยาคูด Spore suspension ปริมาตร 10 ml ปลูกเชื้อโดย ฉีดใส่ในถุงพลาสติกกบนอาหารที่มีต้นอ่อนของ กล้วยน้ำว้าสุโขทัย 1 (ที่รอดชีวิตจากการให้ FA ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, และ 0.40 mM) และ กล้วยมะลิอ่อง (ที่รอดชีวิตจากการให้ FA ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, และ 0.30 mM) จำนวน 8 ต้นต่อถุง จำนวน 3 ซ้ำ (แต่ละซ้ำประกอบด้วย 4 ถุง รวม 32 ต้นต่อซ้ำ) โดยกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับ คือ กล้วยสุโขทัย 1 และมะลิอ่อง ที่ไม่ได้รับ FA เป็นกลุ่มควบคุมภายใน (Internal control) และใช้ กล้วยคาวนดิช: ที่ไม่ได้รับ FA ใช้เป็นพันธุ์ต้านทานมาตรฐาน (Resistant check) และ ชุดควบคุมคือกล้วยที่ไม่ปลูกเชื้อแต่ได้รับ FA (Negative control) (ไม่นำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ) จากนั้นเพาะเลี้ยงในตู้ Growth Chamber ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ให้แสงสว่าง 12 ชม. ที่ความเข้มแสง 50 μmol m⁻² s⁻¹ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน บันทึกระดับความรุนแรง (Disease severity) ของโรคโดยแบ่งการให้คะแนนเป็น 0 -6 คะแนน (Wu et al., 2010) (Table 1) จากนั้นคำนวณดัชนีการเกิดโรค (Disease index; % DI) (อัสนี, 2546) และจัดแบ่งระดับความต้านทานโรค โดยดัดแปลงจาก Sinha et al. (1988) (Table 2) วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% โดยนำคะแนนการเกิดโรคแต่ละระดับ มาคำนวณเป็นดัชนีการเกิดโรค (Disease index; % DI) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% DI = \frac{\sum (N_i \times V_i)}{N \times V} \times 100$$

$$N \times V$$

เมื่อ N_i = จำนวนต้นที่แสดงการเกิดโรคตายพรายในแต่ละระดับ

V_i = ระดับการเกิดโรค (1, 2, 3, 4, 5 หรือ 6)

N = จำนวนต้น

V = ระดับอาการโรคสูงสุด

Table 1 Disease severity-rating scale used to record symptoms caused by *Foc* Race 1 in banana plants

Disease severity	Disease symptoms
0	Corm completely clean, no vascular discoloration
1	Smaller leaves at the base of pseudostem wilted, no discoloration of the pseudostem
2	$\leq 1/2$ the height of the pseudostem discolored
3	$> 1/2$ the height of the pseudostem discolored and (or) there was discoloration of the leaf stalk
4	$\leq 50\%$ of the leaves wilted or yellowed
5	$> 50\%$ of the leaves wilted or yellowed
6	The whole plantlet wilted

Table 2 Criteria for grading resistance against *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense*

Disease index (%)	Level of resistance to Fusarium wilt
0%	Highly resistant (HR)
1-20%	Resistant (R)
21-40%	Moderately resistant (MR)
41-60%	Moderately susceptible (MS)
61-80%	Susceptible (S)
81-100%	Highly susceptible (HS)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทดสอบการเจริญบนอาหารของเนื้อเยื่อเจริญบนอาหาร MS ที่ผสมสาร FA ความเข้มข้นต่าง ๆ

สำหรับ Somaclones ที่สร้างขึ้นในงานวิจัยนี้ พบว่าการอยู่รอดของกลุ่มเซลล์เนื้อเยื่อเจริญลดลงเมื่อความเข้มข้นของ FA เพิ่มขึ้นสำหรับพันธุ์ สุโขทัย 1 และ มะลิอ่อน (**Figure 1**) สอดคล้องกับ Singh et al. (2017) รายงานว่าความเข้มข้นของ FA ปริมาณปานกลาง (50–100 μ M) กระตุ้นให้เกิด apoptosis (การตายของเซลล์ตามโปรแกรม) ในขณะที่ ความเข้มข้นของ FA ปริมาณสูง (>200 μ M) กระตุ้นให้เกิดเนื้อเยื่อตาย ดังนั้น เมื่อใช้ FA ในความเข้มข้นต่ำ FA จะสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาป้องกันในพืชได้ เนื่องจาก FA จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลออกซิเจนที่มีปฏิกิริยา (ROS) ซึ่งจะกระตุ้นโปรตีนที่ควบคุมการตายของเซลล์ตามโปรแกรมและองค์ประกอบการตอบสนองต่อความไวเกินอื่นๆ ในพืช (Samadi and Behboodi, 2006)

หลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญในอาหารที่เติม FA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตขึ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญระหว่างกล้วยน้ำว้าสุโขทัย 1 และมะลิอ่อน พบว่าเนื้อเยื่อเจริญที่เจริญเติบโตในอาหารแข็งที่เติม FA ความเข้มข้น

0.05, 0.10, 0.20, และ 0.30 mM ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามพบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) ในอาการแห้งที่เติม FA เข้มข้น 0.15, 0.35 และ 0.40 mM และแตกต่างกันทางสถิติที่ ($p < 0.01$) ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 mM เมื่อพิจารณาการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อเจริญในอาหารแห้งที่เติม FA ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ พบว่าการรอดชีวิตของทั้งกล้วยน้ำว้าสุโขทัย 1 และมะลิอ่องมีแนวโน้มของการรอดชีวิตไปในทางเดียวกัน โดยในอาหารแห้งสูตร MS ที่ไม่เติม FA (Control) เนื้อเยื่อเจริญจะมีลักษณะปกติ มีสีเขียว และมีขนาดใหญ่ขึ้น (Figure 2) และ (Figure 3)

Table 3 Number of surviving multiple bud clumps after culturing on MS solid medium supplemented with different concentrations of FA for 60 days (initial fragment number = 30 fragments)

Treatments	Number of Surviving multiple bud clumps (pieces)		F-test
	Sukhothai 1	Mali Ong	
Sterile water	30.0 a A	30.0 a A	ns
FA 0.05 mM	30.0 a A	30.0 a A	ns
FA 0.10 mM	27.7 b A	27.0 b A	ns
FA 0.15 mM	22.0 c B	18.3 c A	**
FA 0.20 mM	9.0 d A	9.0 d A	ns
FA 0.25 mM	4.7 e B	3.3 e A	*
FA 0.30 mM	3.3 f A	3.0 e A	ns
FA 0.35 mM	3.3 f B	0.0 f A	**
FA 0.40 mM	2.3 f B	0.0 f A	**
F-test	*	*	
C.V. (%)	5.1		

Mean in the same row and column followed by the difference letters are significantly by DMRT ($P < 0.01$, **), ($P < 0.05$, *)

ns = not significant difference ($P > 0.01$), ($P > 0.05$)

เมื่อพิจารณาการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อเจริญในอาหารแห้งที่เติม FA ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ พบว่าทั้งกล้วยน้ำว้าสุโขทัย 1 และมะลิอ่อง มีแนวโน้มของการรอดชีวิตไปในทางเดียวกัน โดยในอาหารแห้งสูตร MS ที่ไม่เติม FA (Control) เนื้อเยื่อเจริญจะมีลักษณะปกติ มีสีเขียว และมีขนาดใหญ่ขึ้น (Figure 2) และ (Figure 3) ส่วนเนื้อเยื่อที่เจริญในอาหาร MS ที่เติม FA พบว่าอาหารที่มีความเข้มข้นของ FA ต่ำ 0.05, 0.10 และ 0.15 mM จะมีอัตราการรอดตายสูง โดยที่ กล้วยน้ำว้าสุโขทัย 1 ที่เลี้ยงบนอาหารแห้งสูตร MS ที่เติม FA ความเข้มข้น 0.05 มีการรอดชีวิตไม่แตกต่างทางสถิติกับวิธีการควบคุม ส่วนที่ความเข้มข้น 0.35 และ 0.40 mM มีต้นเหลือรอดต่ำ แตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) กับวิธีการควบคุม และกล้วยน้ำว้ามะลิอ่องที่เลี้ยงบนอาหารแห้งสูตร MS ที่เติม FA ความเข้มข้น 0.05 มีการรอดชีวิตไม่แตกต่างทางสถิติกับวิธีการควบคุม ส่วนที่ความเข้มข้น 0.35 และ 0.40 mM ไม่มีต้นเหลือรอด แตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) กับวิธีการควบคุมหลังเลี้ยงนาน 60 วัน (Table 3)

การวิเคราะห์ LD₅₀ ของเซลล์เนื้อเยื่อเจริญ กล้วยน้ำว้าสุโขทัย 1 และกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง

การวิเคราะห์ค่า LD₅₀ พบว่ากล้วยน้ำว้าสุโขทัย 1 และ กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง มีค่า LD₅₀ เท่ากับ 1.75 และ 1.50 mM ตามลำดับ (Figure 1) ซึ่งค่า LD₅₀ ของกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง และกล้วยน้ำว้าสุโขทัย 1 ในการทดลองนี้มีค่าใกล้เคียงกับการทดลองของ Matsumoto et al. (2010) ที่พบว่า FA ที่ความเข้มข้น 0.1 mM เพียงพอในการชักนำให้กล้วยสายพันธุ์ Maçã ให้เกิดการกลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อมีความต้านทานโรคตายพรายที่เกิดจากเชื้อรา *Foc* race 1 ซึ่งความเป็นพิษต่อพืชในระดับสูงของ FA ที่ความเข้มข้นสูงนั้นส่วนใหญ่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ เนื่องจาก FA ที่ความเข้มข้นสูงเกินไปจะไปรบกวนการสังเคราะห์แสงของพืชโดยตรง (Hussain et

al., 2021) (Figure 2) และ (Figure 3) ซึ่งในมะเขือเทศ การใช้ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* เพาะเลี้ยงโดยตรงบนใบ แสดงให้เห็นว่า FA มีส่วนทำให้เกิดอาการเหี่ยวและมีศักยภาพในการทำให้เซลล์ตายในเนื้อเยื่อเนื่องจากการระเบิดออกซิเดชันที่เกิดจากการผลิต ROS อย่างรวดเร็ว (Singh et al., 2017)

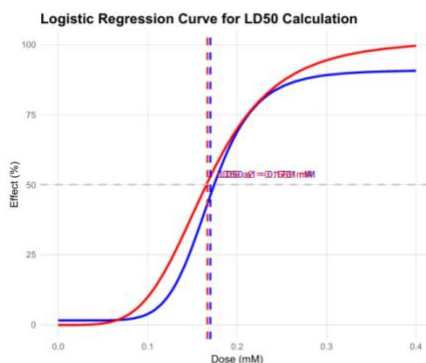


Figure 1 Dose-response curves showing LD₅₀ values of fusaric acid (FA) on callus cells of banana cultivars Sukhothai 1 (blue line) and Mali-Ong (red line). The comparative dose-response analysis demonstrates differential sensitivity between the two cultivars to FA treatment.

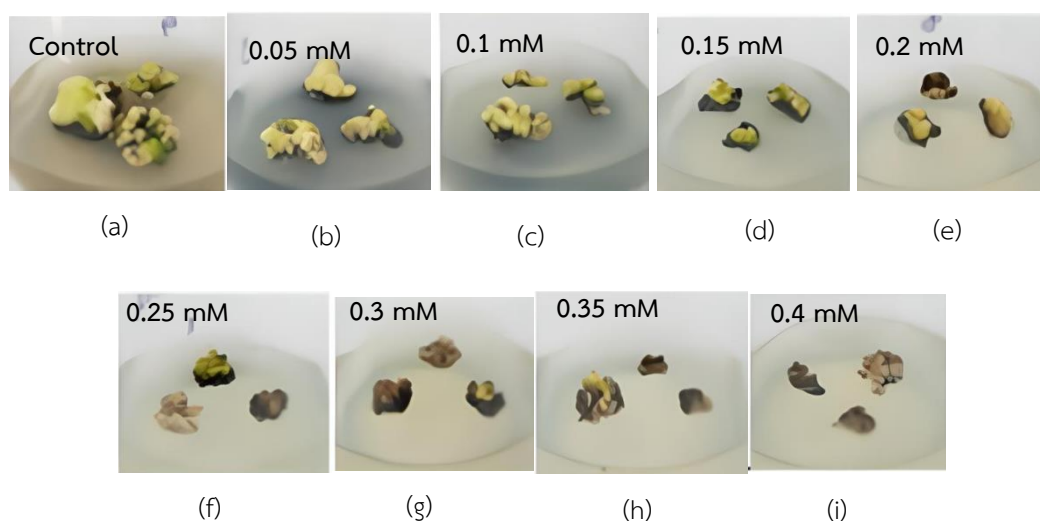


Figure 2 Effect of fusaric acid (FA) doses on plant survival and regeneration using multiple bud clumps of Sukhothai 1 (a– i) cultivars grown in a medium containing different concentrations of FA treatment. Control (0.0 mM); Treatment 1 (0.05 mM FA); Treatment 2 (0.1 mM); Treatment 3 (0.2 mM); Treatment 4 (0.25 mM); Treatment 5 (0.3 mM); Treatment 6 (0.35 mM); Treatment 7 (0.4 mM).

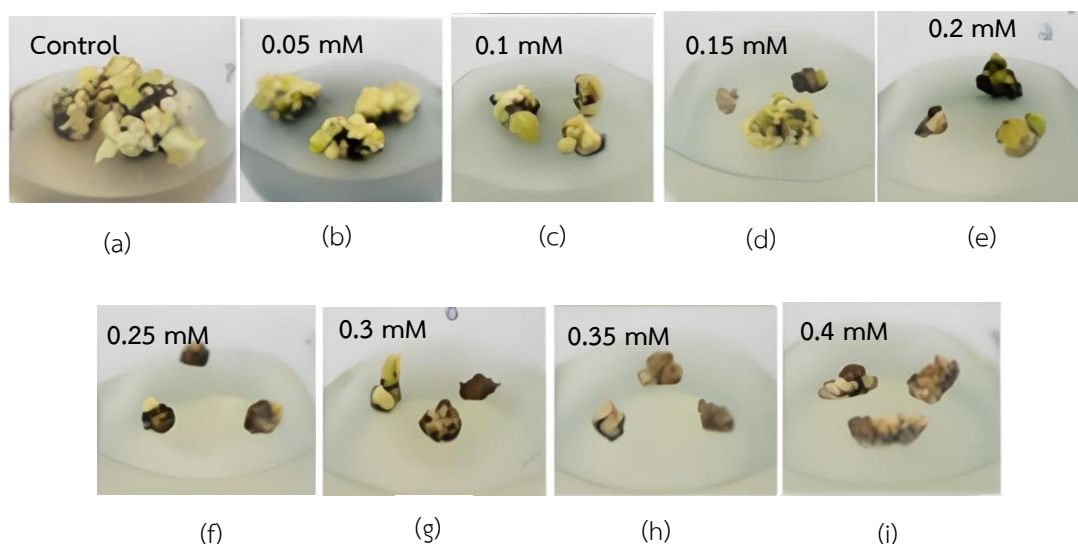


Figure 3 Effect of fusaric acid (FA) doses on plant survival and regeneration using multiple bud clumps of Mali-Ong (a–i) cultivars grown in a medium containing different concentrations of FA treatment. Control (0.0 mM); Treatment 1 (0.05 mM FA); Treatment 2 (0.1 mM); Treatment 3 (0.2 mM); Treatment 4 (0.25 mM), Treatment 5 (0.3 mM), Treatment 6 (0.35 mM), Treatment 7 (0.4 mM).

การทดลองแสดงให้เห็นว่าการอยู่รอดชีวิตของ multiple bud clumps ที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์ สุโขทัย 1 และ มะลิอ่อน เป็นผลจากความสำเร็จในการสร้าง Somaclonal variation ที่ให้ความต้านทานต่อโรคตายพรายที่เกิดจากเชื้อรา *Foc* และยิ่งไปกว่านั้น การศึกษายังแสดงให้เห็นว่าปริมาณสารพิษที่ทำให้ชิ้นส่วนพืชตายนั้นจะแตกต่างกันไปตาม จีโนไทป์ และสายพันธุ์ของเชื้อก่อโรค (Saraswathi et al., 2016) เหตุผลที่เป็นไปได้ว่าพืชจะต้านทาน FA ในหลอดทดลองอาจเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ที่ต่ำของ FA กระตุ้นให้พืชต้านทานต่อเชื้อในกลุ่มของ *Foc* โดยส่งเสริมการตอบสนองการป้องกันของพืช (Jiao et al., 2013; Kuanar et al., 2014; Ramírez-Mosqueda et al., 2019; Samadi and Behboodi, 2006) การศึกษาวิจัยบางกรณีแนะนำว่า FA ความเข้มข้นต่ำจะกระตุ้นการตอบสนองการป้องกันต่างๆ ในเซลล์พืชโดยไม่มีผลเป็นพิษ และมีบทบาทในการส่งสัญญาณในการโต้ตอบระหว่างเชื้อโรคกับสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน (Bouizgarne et al., 2006; Singh et al., 2017) การศึกษาในพืชสกุล *Arabidopsis* ความเข้มข้นของ FA ที่ถือว่าไม่เป็นพิษนั้นต่ำกว่า 10^{-6} M ในการบำบัดด้วยเซลล์แบบแขวนลอย ซึ่งทำให้เกิดการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ไฟโตเอเล็กซิน และการตอบสนองอย่างรวดเร็วที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดสัญญาณ เช่น การผลิต ROS (Bouizgarne et al., 2006)

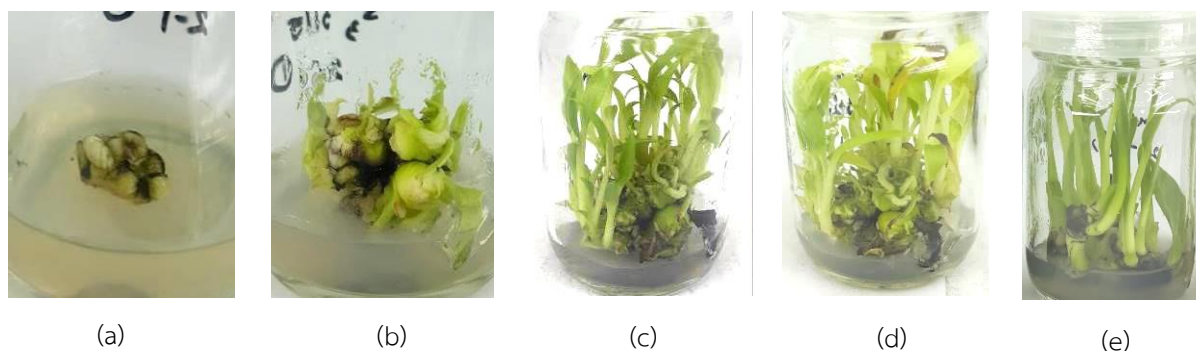


Figure 4 Characteristics of the multiple bud clumps of Sukhothai 1 grown on MS solid medium added BA 2 mg/l and 15% coconut water to restore the buds and become young plants. a: After re-germinated, b: After the second subculture, c: After the third subculture, d: After the fourth subculture, e: After the fifth subculture.

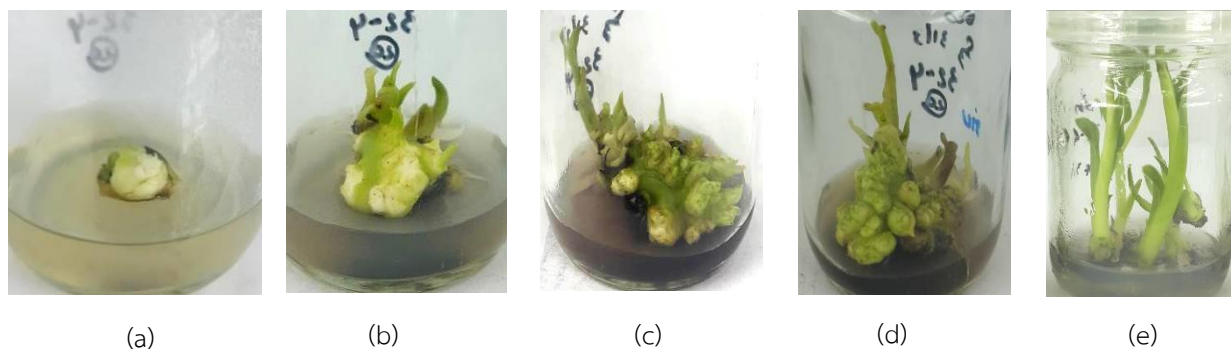


Figure 5 Characteristics of the multiple bud clumps of Mali Ong grown on MS solid medium added BA 2mg/l and 15% coconut water to restore the buds and become young plants. a: after re-germinated, b: After the second subculture, c: After the third subculture, d: After the fourth subculture, e: After the fifth subculture.

เมื่อได้กลุ่มเซลล์เนื้อเยื่อเจริญที่รอดตายจากการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติม FA และที่เติม FA (Table 3) ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 2 mg/L และน้ำมะพร้าว 15% โดยเปลี่ยนอาหาร 3-5 ครั้ง เพื่อให้กลุ่มตากล้ากลับคืนมาเป็นต้นอ่อน (Figure 4) และ (Figure 5) จากนั้นนำต้นอ่อนที่ได้แบ่งลงถุงพลาสติกที่ปลอดเชื้อถุงละ 8 ต้น พร้อมทั้งชักนำให้เกิดราก สำหรับทดสอบความต้านทานในห้องปฏิบัติการในขั้นตอนต่อไป

การคัดเลือกกล้วยกลายพันธุ์ที่ต้านทานโรคตายพรายที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Foc race 1* ในห้องปฏิบัติการ

ผลการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงต้นกล้วยในอาหาร MS เสริมด้วย FA ความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถกระตุ้นการต้านทานต่อเชื้อ *Foc race 1* isolate DOAC2415 ได้ จากการวิเคราะห์ DMRT พบว่าสามารถคัดเลือกSomacloneที่ต้านทานโรคได้จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ Somaclone ของกล้วยน้ำว้า "สุโขทัย 1" ที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วย FA 0.25 mM และ 0.40 mM ซึ่งมีค่าเฉลี่ยดัชนีโรค (Disease Index, %DI) ต่ำสุดที่ 13.12% และ 15.62% ตามลำดับ แตกต่างจากกลุ่มควบคุมภายในอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) (Table 4)

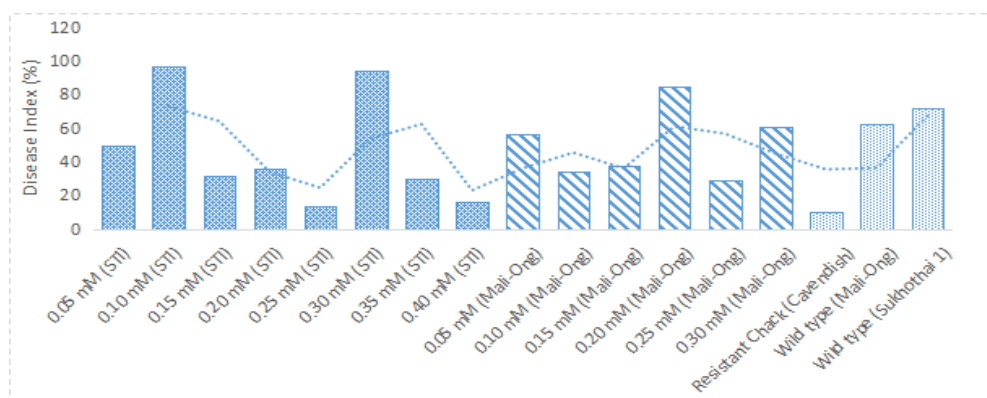


Figure 6 Disease index (%) of somaclone banana plants (cv. 'Sukhothai 1' and 'Mali-Ong') induced with different concentrations of ferulic acid (FA) after inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 (isolate DOAC2415). Resistant check (Cavendish) and wild-type controls (non-induced 'Sukhothai 1' and 'Mali-Ong') are included for comparison. Bars represent mean values; dotted lines indicate trend patterns across treatments. FA concentrations significantly affected disease resistance levels as analyzed by DMRT at $P < 0.01$.

จากการวิเคราะห์ Heat-Map Analysis โดยจัดกลุ่มจำนวนต้นในแต่ละระดับความต้านทานพบว่า มี Somaclone ที่ไม่แสดงอาการ (resistant somaclones) (**Figure 7**) มีจำนวนน้อย สอดคล้องกับรายงานของ Hwang and Ko (2004) ที่ระบุว่าการเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ในกล้วยคาเวนดิช จำนวน 20,000 ต้นในได้หวั่น พบจีโนไทป์ที่ต้านทานเพียง 0.01% และสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ต้านทาน เช่น GCTCV-218, GCTCV-53 และ GCTCV-119 เพื่อการเพาะปลูกเชิงพาณิชย์

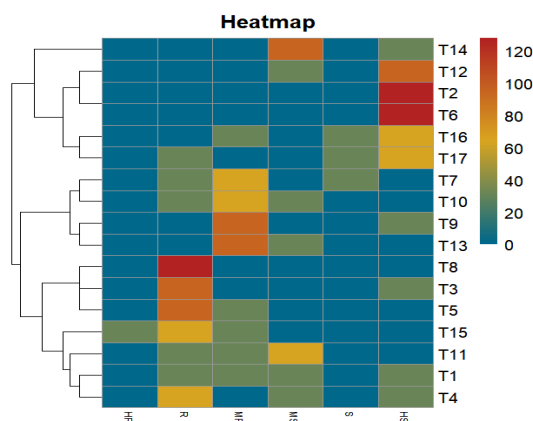


Figure 7 Heat map of the presence (red, gold and green) and absence (deepskyblue) of *Fusarium* wilt symptoms in Sukhothai 1 and Mali-Ong banana somaclonal variants evaluated in *In Vitro* after *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 resistance induction with plant regulators. The tree on the left shows the hierarchical grouping of treatments. T1: STI-1 MS+FA (0.05 mM), T2: STI-1 MS+FA (0.1mM), T3 : STI-1 MS+FA (0.15mM), T4 : STI-1 MS+FA (0.2mM), T5 : STI-1 MS+FA (0.25mM), T6 : STI-1 MS+FA (0.3mM), T7: STI-1 MS+FA(0.35mM), T8: STI-1 MS+FA (0.4mM), T9 : Mali-Ong (0.05 mM), T10 : Mali-Ong (0.1 mM), T11 : Mali-Ong (0.15 mM), T12 : Mali-Ong (0.2 mM), T13 : Mali-Ong (0.25 mM), T14 : Mali-Ong (0.3 mM)

การตรวจสอบเชื้อเมื่อสิ้นสุดการทดสอบเบื้องต้น 30 วันหลังปลูกเชื้อพบเส้นใยของ *Foc* ใน Somaclones ที่มี % DI สูง เช่น STI-1-T2 และ Mali-Ong-T14 เป็นต้น เมื่อเทียบกับวิธีการควบคุม (ไม่ปลูกเชื้อ) (Figure 8) และ (Figure 9) เมื่อนำตัวแทนของต้นที่ต้านทาน ได้แก่ STI-1-T5 ไปแยกเชื้อพบเส้นใยของ *Foc* และเมื่อผ่าลำต้นออกมา ไม่พบร่องรอยการเข้าทำลาย (Figure 10) ซึ่งเป็นที่ยืนยันผลการทดสอบเบื้องต้นสำหรับ Somaclones นี้ การศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเกิดขึ้นซึ่งเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ทำให้เซลล์พืชสามารถเปลี่ยนพันธุกรรมได้โดยเกิดการสร้างความผันแปรทางพันธุกรรม หรือ Somaclonal Variation ในสภาพการเพาะเลี้ยง (Brar and Jain, 1998) และการตอบสนองการป้องกันถูกกระตุ้นใน Somaclones STI-1-T5 และ STI-1-T8 ซึ่งอาศัยสิ่งกีดขวางที่เกี่ยวข้องกับการแทรกซึมของเชื้อโรคสอดคล้องกับรายงานของ Ferreira et al. (2020) ที่ใช้การแยกเชื้อของ *Foc* CNPMF 218A เพื่อคัดเลือกและประเมิน Somaclone ในกล้วยต้านทานพันธุ์ 'Prata-Anã' (*Musa* AAB Group) ซึ่งผู้เขียนพิจารณาว่าการไม่มีโครงสร้างของเชื้อโรคในเนื้อเยื่อรากเป็นข้อบ่งชี้ว่าเชื้อโรคไม่สามารถแทรกซึมเนื้อเยื่อเหล่านี้ได้สำเร็จ เนื่องจาก Somaclone ที่ต้านทานอาจสร้างสิ่งกีดขวางทางกายภาพและ/หรือทางเคมีเพื่อปิดกั้นการแทรกซึมของเชื้อก่อโรค

เมื่อนำต้น Somaclones ที่คัดเลือกได้มาย้ายปลูกลงในถุงเพาะชำ และประเมินการรอดชีวิตของกล้วยน้ำว้าสายพันธุ์ STI-1-T5 (MS+FA 0.25 mM) และ STI-1-T8 (MS+FA 0.40 mM) พบว่า 41.37% และ 25% ตามลำดับ (Figure 11) ซึ่งการปนเปื้อนของเชื้อ *Foc* ในต้นอ่อนอาจเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของ *Foc* ที่อยู่ในเนื้อเยื่อของพืช ถึงแม้จะไม่แสดงอาการ แต่ก็อาจเกิดการติดเชื้อ ทำให้มีการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกแตกต่างกัน

Table 4 Screening of banana cultivars for resistance to Fusarium wilt under *in vitro* conditions

No	Cultivar	Disease index (%)	Level of resistance to Fusarium wilt (In vitro Bio-assay)
1	STI (MS+FA 0.05 mM)	49.375 bcdef	MS
2	STI (MS+FA 0.1 mM)	96.250 a	HS
3	STI (MS+FA 0.15 mM)	31.875 cdef	MR
4	STI (MS+FA 0.2 mM)	35.625 cdef	MR
5	STI (MS+FA 0.25 mM)	13.125 f	R
6	STI (MS+FA 0.3 mM)	94.375 a	HS
7	STI (MS+FA 0.35 mM)	30.000 cdef	MR
8	STI (MS+FA 0.4 mM)	15.625 ef	R
9	Mali-Ong (MS+FA 0.05 mM)	56.250 abcde	MS
10	Mali-Ong (MS+FA 0.1 mM)	34.375 cdef	MR
11	Mali-Ong (MS+FA 0.15 mM)	37.500 cdef	MR
12	Mali-Ong (MS+FA 0.2 mM)	84.375 ab	HS
13	Mali-Ong (MS+FA 0.25 mM)	28.750 def	MR
14	Mali-Ong (MS+FA 0.3 mM)	60.625 abcd	MS
15	Resistant Control: Cavendish subgroup	11.205 f	R
16	Wild type Suseptable: Mali-ong	68.12 abcd	S
17	Wild type Suseptable: Sukhothai 1	71.875 abc	S
F-test		**	
C.V. (%)		52.66	

Mean in the same column followed by the difference letters are significantly by DMRT ($P < 0.01$, **)

ns = not significant difference ($P > 0.01$)

ซึ่งกลไกซึ่งการต้านทานบางอย่างที่เกิดขึ้นหลังจากการติดเชื้อเมื่อเชื้อก่อโรคจะเข้าสู่เนื้อเยื่อ แต่ไม่สามารถสร้างเส้นใยขึ้นเพื่อเข้าทำลายได้เนื่องจากพืชตอบสนองต่อการต้านทานได้เร็วกว่าการเติบโตของเชื้อรา (Li et al., 2015) การปรากฏขึ้นของสารพิษที่ปล่อยออกมาจากเชื้อราในเนื้อเยื่อเหล่านี้ก็เป็นไปได้เช่นกัน เนื่องจาก *Foc* เป็นเชื้อราที่ปล่อยสารพิษเพื่อทำลายเนื้อเยื่อของพืช ทำให้เกิดการเน่าเปื่อย (Ploetz, 2015) สารพิษจากพืชหลักบางส่วนที่ผลิตโดย *Foc* ได้แก่ กรดฟูซาริกและโบเวอร์รีซิน (Portl et al., 2018) ดังนั้นผลจากการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิค Somaclonal Variations ด้วย FA ความเข้มข้น 0.25 mM และ 0.4 mM ทำให้เกิด Somaclones ของกล้วยที่ต้านทานโรคตายพรายที่เกิดจากเชื้อรา *Foc* Race 1 ที่พบการระบาดมากในประเทศไทยดังนั้นผลจากการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิค Somaclonal Variations ด้วย FA ความเข้มข้น 0.25 mM และ 0.4 mM ทำให้เกิด Somaclones ของกล้วยที่ต้านทานโรคตายพรายที่เกิดจากเชื้อรา *Foc* Race 1 ที่พบการระบาดมากในประเทศไทย

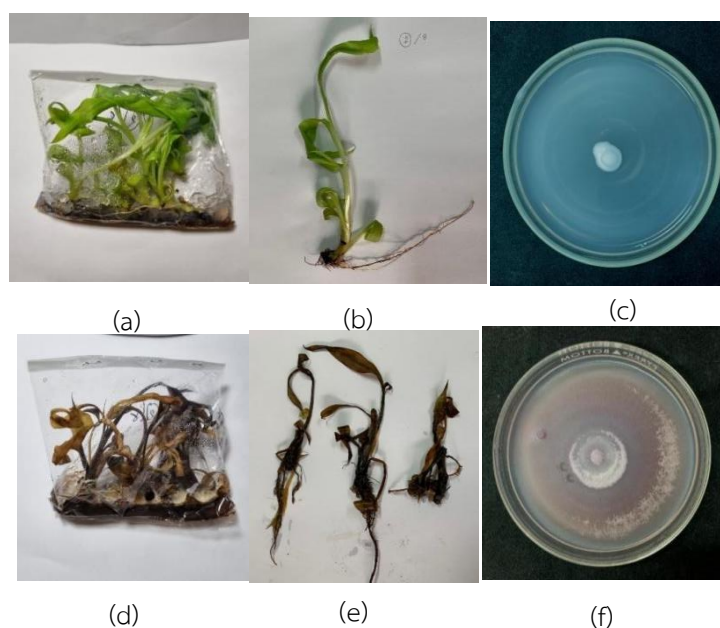


Figure 8 Characteristics of somaclonal variant of banana cultivar 'Sukhothai 1' under treatment 2 (MS + FA 0.10 mM) after 30 Days of Inoculation. (a) Somaclonal variant cultured in a bag inoculated with sterile water (Control) for 30 days; (b) Characteristics of the control somaclonal variant; (c) Fungal growth from somaclonal tissue cultured on PDA medium; (d) Somaclonal variant cultured in a plastic bag inoculated with *Fusarium oxysporum* isolate DOAC2415 for 30 days; (e) Characteristics of the infected somaclonal variant; (f) Fungal growth from somaclonal tissue cultured on PDA medium.

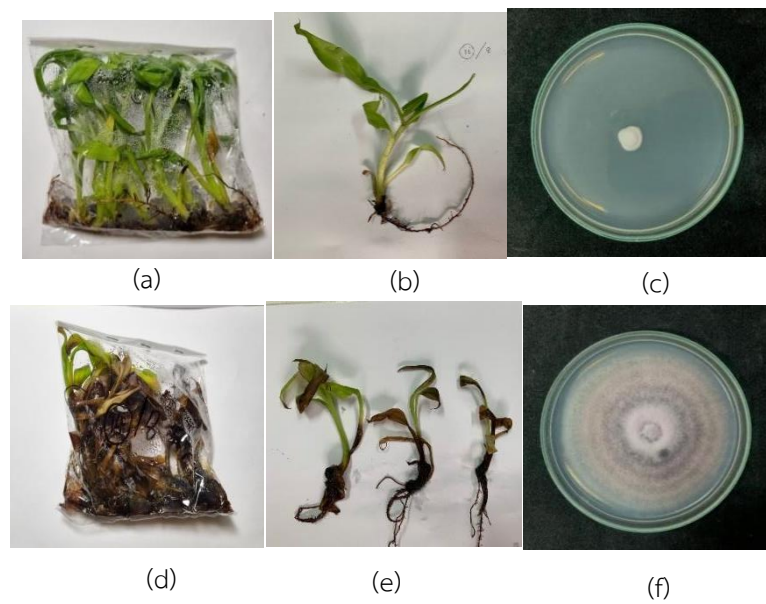


Figure 9 Characteristics of somaclonal variant of banana cultivar 'Mali-Ong' under treatment 14 (MS + FA 0.30 mM) after 30 Days of Inoculation. (a) Somaclonal variant cultured in a plastic bag inoculated with sterile water (Control) for 30 days; (b) Characteristics of the control somaclonal variant; (c) Fungal growth from somaclonal tissue cultured on PDA medium; (d) Somaclonal variant cultured in a plastic bag inoculated with *Fusarium oxysporum* isolate DOAC2415 for 30 days; (e) Characteristics of the infected somaclonal variant; (f) Fungal growth from somaclonal tissue cultured on PDA medium.

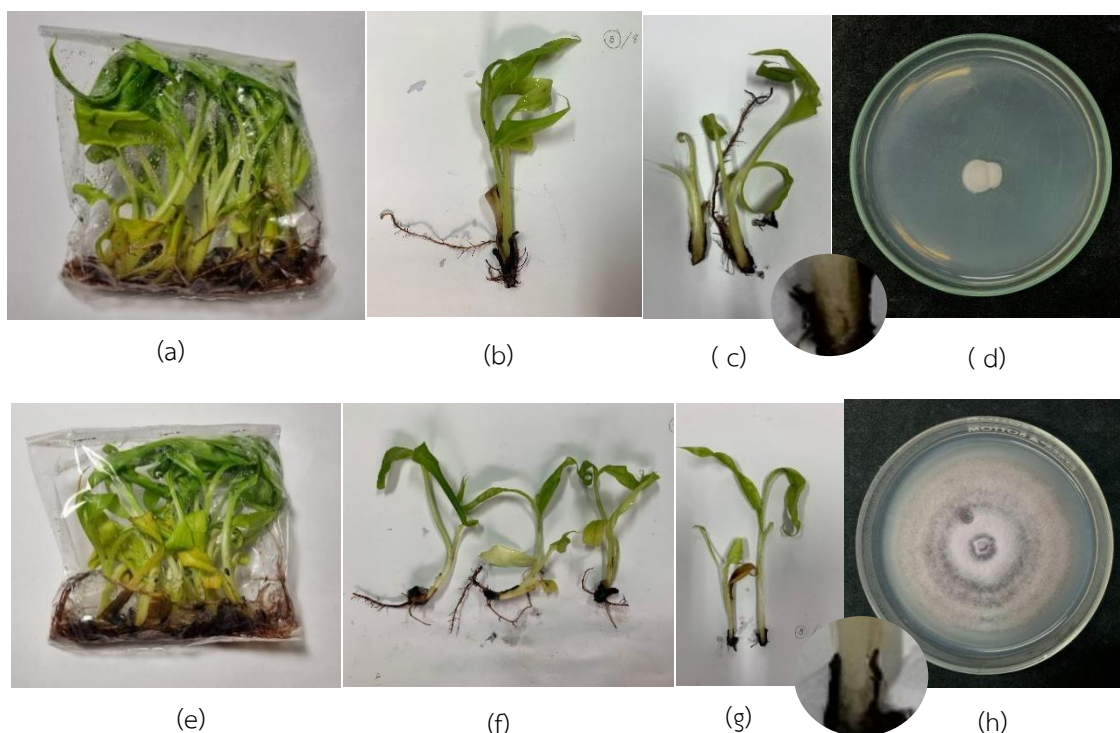


Figure 10 Characteristics of somaclonal variant of banana cultivar 'Sukhothai 1' under treatment 5 (MS + FA 0.25 mM) after 30 Days of Inoculation. (a) Somaclonal variant cultured in a bag inoculated with sterile water (Control) for 30 days; (b) Characteristics of the control somaclonal variant; (C) Longitudinal section; (d) Fungal growth from somaclonal tissue cultured on PDA medium; (e) Somaclonal variant cultured in a plastic bag inoculated with *Fusarium oxysporum* isolate DOAC2415 for 30 days; (f) Characteristics of the infected somaclonal variant ; (G) Longitudinal section of the resistance somaclone; (h) Fungal growth from somaclonal tissue cultured on PDA medium.



Figure 11 Image of selected Somaclones plants after transplanting in a greenhouse.

โดย Somaclone ที่คัดเลือกได้ลักษณะที่ด้านทานจะถูกทดสอบในโรงเรือน และในแปลงเพื่อยืนยันศักยภาพทางการเกษตร และการตลาดที่ศูนย์วิจัยเครือข่ายของสถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร ทดสอบในพื้นที่ควบคุมที่ดำเนินการภายใต้สภาพดินและ ภูมิอากาศที่แตกต่างกันในประเทศไทย Somaclone ที่ด้านทานเหล่านี้เป็นพันธุ์ที่เกิดจากเทคนิค Somaclonal Variation อาจเกิดการ เปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมซึ่งการศึกษาขั้นต่อไปจะศึกษาลักษณะที่เปลี่ยนแปลงโดย เปรียบเทียบกับพันธุ์แม่ โดยจะประเมินในหลายสภาพแวดล้อม หากสามารถยืนยันศักยภาพในการนำไปใช้โดยผู้ผลิตกล้วย ผลลัพธ์

สามารถขยายไปยังประเทศผู้ผลิตกล้วยได้ เนื่องจากกล้วยน้ำว้าเป็นสายพันธุ์พื้นฐานของตลาดในประเทศไทย นอกจากนี้ยังนิยมนำไปแปรรูปเพื่อส่งออกสู่ตลาดต่างประเทศด้วย

สรุป

การพัฒนา Somaclone ของกล้วยน้ำว้าพันธุ์สุโขทัย 1 พบว่าสามารถเลือก Somaclone ได้สองสายต้น ได้แก่ STI-1-T5 และ STI-1-T8 ที่ความต้านทานต่อ *Foc Race 1* ในการศึกษาครั้งนี้ FA ที่มีความเข้มข้นสองระดับมีประสิทธิภาพในการคัดเลือก Somaclone กล้วยน้ำว้าพันธุ์สุโขทัย 1 เบื้องต้น ได้แก่ 0.25 mM และ 0.4 mM ส่วนการพัฒนาโซมาโคลนของกล้วยน้ำว้ามะลิองค์มีความต้านทานระดับปานกลาง ซึ่งสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จะนำไปทดสอบความต้านทานในโรงเรือน และแปลงปลูกของกรมวิชาการเกษตร เพื่อประเมินศักยภาพทางการเกษตรก่อนเผยแพร่พันธุ์สู่เกษตรกรต่อไป

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (กองทุนส่งเสริม ววน.) โดยสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกว.) สำหรับแหล่งทุนสนับสนุนงานวิจัย โครงการปรับปรุงพันธุ์กล้วยต้านทานโรคตายพราย และขอขอบคุณทีมผู้ช่วยนักวิจัยทุกท่านที่มีส่วนร่วม ในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2565. พันธุ์รับรอง-พันธุ์แนะนำ 2561-2565. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- ณรงค์ สิงห์บุระอุดม. 2555. การควบคุมโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้า. ภาควิชาโรคพืช, คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อัสนี ปาจิณบุรารณ. 2546. การป้องกันกำจัดโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- อภิรัชต์ สมฤทธิ์, ธารทิพย์ ภาสบุตร และอมรรักษ์ คิดใจเดียว. 2562. การศึกษาพืชอาศัย และเขตการแพร่กระจายของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชในประเทศไทย. ใน: รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ชุดโครงการวิจัย และพัฒนามาตรการสุขอนามัยพืชและการเฝ้าระวังศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร. กรมวิชาการเกษตร.
- Alakonya, A. E., J. Kimunyeb, G. Mahukuc, D. Amaha, B. Uwimanab, A. Brownd, and R. Swennend. 2018. Progress in understanding Pseudocercospora banana pathogens and the development of resistant Musa germplasm. *Plant Pathology*. 67: 759-770.
- Anil, V. S., S. Lobo, and S. Bennur. 2018. Somaclonal variations for crop improvement: selection for disease resistant variants *in vitro*. *Plant Science Today*. 5: 44-54.
- Bacon, C. W., J. K. Porter, W. P. Norred, and J. F. Leslie. 1996. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 4039-4043.
- Bouizgarne, B., H. El-Maarouf-Bouteau, C. Frankart, D. Reboutier, K. Madiona, A. M. Pennarun, M. Monestiez, J. Trouverie, Z. Amiar, J. Briand, M. Brault, J. P. Rona, Y. Ouhdouch, I. El Hadrami, and F. Bouteau. 2006. Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid: toxic and signaling effects. *New Phytologist*. 169: 209-218.
- Buddenhagen, I. 2009. Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and history of introduction of tropical race 4 to better manage banana production. *Acta Horticulturae*. 828: 193-204

- Chen, Y. F., W. Chen, X. Huang, X. Hu, J. T. Zhao, Q. Gong, X. J. Li, and X. L. Huang. 2013. Fusarium Wilt resistant lines of Brazil banana (*Musa* spp., AAA) obtained by EMS – induced mutation in a micro- cross- section cultural system. *Plant Pathology*. 62: 112-119.
- Fourie, G., E. T. Steenkamp, R. C. Ploetz, T. R. Gordon, and A. Viljoen. 2011. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infection, Genetics and Evolution*. 11: 533-542.
- Ferreira, M. D. S., É. R. D. Moura, L. S. M. Lino, E. P. Amorim, J. A. D. Santos-Serejo, and F. Haddad. 2020. Selection of somaclonal variants of the cultivar ‘Prata-Anã’ for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 42: 1-10.
- Ghag, S. B., U. K. S. Shekhawat, and T. R. Ganapathi. 2014. Characterization of *Fusarium* Wilt resistant somaclonal variants of banana cv. Rasthali by cDNA-RAPD. *Molecular Biology Reports*. 41: 7929-7935.
- Hussain, M., Iftikhar, and Manuel J. Reigosa. 2021. Secondary metabolites, ferulic acid and *p*-Hydroxybenzoic acid induced toxic effects on photosynthetic process in *Rumex acetosa* L. *Biomolecules*. 11: article ID 233.
- Hwang, S.-C., and W.-H. Ko. 2004. Cavendish banana cultivars resistant to *Fusarium* Wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. *Plant Disease*. 88: 580–588.
- Jiao, J., B. Zhou, X. Zhu, Z. Gao, and Y. Liang. 2013. Fusaric acid induction of programmed cell death modulated through nitric oxide signalling in tobacco suspension cells. *Planta*. 238: 727-737.
- Khiabani, B. N. 2022. *In Vitro* based mass-screening technique for early selection of banana mutants resistant to Fusarium Wilt. P. 47-64. In: J. Jankowicz-Cieslak, and I. L. Ingelbrecht. *Efficient Screening Techniques to Identify Mutants with TR4 Resistance in Banana*. Springer, Berlin, Germany.
- LI, W., X. Ge, W. Wu, W. Wang, Y. Hu, Y. Mo, and J. Xie. 2005. Identification of defense-related genes in banana roots infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *Euphytica*. 205: 837-849.
- Matsumoto, K., M. Barbosa, L. Souza, and J. Teixeira. 2010. *In vitro* selection for resistance to *Fusarium* Wilt in Banana. P. 101-114. In: IAEA. *Mass screening techniques for selecting crops resistant to diseases*. International Atomic Energy Agency (IAEA).
- Morpurgo, R., S. Lopato, R. Afza, and F. J. Novák. 2010. Selection parameters for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 1 and Race 4 on diploid banana (*Musa acuminata*). P.115-127. In: IAEA. *Mass Screening Techniques for Selecting Crops Resistant to Diseases*, International Atomic Energy Agency (IAEA).
- Mostert, D., A. B. Molina, J. Daniells, G. Fourie, C. Hermanto, C. P. Chao, and C. Li. 2017. The distribution and host range of the banana Fusarium wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, in Asia. *PloSOne*. 12: 1-24.
- Naserian, B., C. Vedadi, H. Afsharmanesh, and A. Eskandari. 2018. *In-vitro* mutation breeding and selection for resistance to *Fusarium* Wilt in Banana. In: *International symposium on plant mutation breeding and biotechnology*, 27–31 August 2018. Vienna, Austria.
- Penna, S., S. B. Ghag, T. R. Ganapathi, and S. M. Jain. 2019. Induced genetic diversity in banana. pp. 273-297. In: D. Nandwani, *Genetic Diversity in Horticultural Plants*, Springer, Cham.
- Pillay, M. 2002. Future challenges in *Musa* breeding. In: *Crop Improvement for the 21st century*. Routledge, London.

- Ploetz, R. C. 2015. Management of *Fusarium* Wilt of banana: a review with special reference to tropical race 4. Crop Protection, Amsterdam. 73: 7-15.
- Portal, N., A. Soler, P. A. M. Alponsine, O. Borrás-Hidalgo, R. Portieeles. L. M. Peña-Rodríguez, and J. D. Walton. 2018. Nonspecific toxins as components of a host-specific culture filtrate from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. Plant Pathology. 67: 467-476.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., L. G. Iglesias-Andreu, J. A. T. Da Silva, M. Luna-Rodríguez, J. C. Noa-Carrazana, J. R. Bautista-Aguilar, and J. Murguía-González. 2019. *In vitro* selection of vanilla plants resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vanillae*. Acta Physiologiae Plantarum. Plant. 41: 40-48.
- Rebouças, T. A., A. de Jesus Rocha, T. S. Cerqueira, P. R. Adorno, R. Q. Barreto, M. D. S. Ferreira, L. S. Morais Lino, V. Batista de Oliveira Amorim, J. Almeida Dos Santos-Serejo, F. Haddad, C. F. Ferreira, and E. P. Amorim. 2021. Pre-selection of banana somaclones resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, subtropical race 4. Crop Protection. 147: article ID 105692.
- Samadi, L., and B. S. Behboodi. 2006. Fusaric acid induces apoptosis in saffron root-tip cells: roles of caspase-like activity, cytochrome c, and H₂O₂. Planta. 225: 223-234.
- Santos, T. T. C., V. B. O. Amorim, J. A. Santos-Serejo, C. A. S. Ledo, F. Haddad, C. F. Ferreira, and E. P. Amorim. 2019. Genetic variability among autotetraploid populations of banana plants derived from wild diploids through chromosome doubling using SSR and molecular markers based on retrotransposons. Molecular Breeding. 39: 95-107.
- Singh, V. K., H. B. Singh, and R. S. Upadhyay. 2017. Role of fusaric acid in the development of ‘*Fusarium* Wilt’ symptoms in tomato: physiological, biochemical and proteomic perspectives. Plant Physiology and Biochemistry. 118: 320-332.
- Sinha, S. K., B. Mishra, D. R. Singh, and B. P. Jain. 1988. Reaction of wilt resistant tomato variety and lines to *Pseudomonas solanacearum*. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), Bacterial Wilt Newsletter. 4: article ID 3.
- Stover, R. H. 1962. *Fusarium* Wilt (Panama Disease) of Bananas and Other *Musa* Species. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- Švábová, L., and A. Lebeda. 2005. *In vitro* selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. The Journal of Phytopathology. 153: 52–64.
- Wu, Y., G. Yi, and X. Peng. 2010. Rapid screening of *Musa* species for resistance to *Fusarium* Wilt in an *In-vitro* bioassay. European Journal of Plant Pathology. 128: 409–415.
- Zakaria, L. 2023. *Fusarium* species associated with diseases of major tropical fruit crops. Horticulture. 9: article ID 322.