ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 26 : 1 - 5 (2535)

ผลของยีโนมกล้วยที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

In Vitro Culture of Different Genomic Bananas

เบญจมาศ ศิลาย้อย และ สุภาพร แก้วสมพงษ์ [1]

Benchamas Silayoi and Supaporn Kaewsompong [1]

ABSTRACT

Suckers of different genomes of fourteen banana cultivars viz : 'Klaui Khai' (AA), K. Homchan (AA), K. Nam Thai (AA), K. Leb Mu Nang (AA), K. Lakatan (AAA), K. Nak (AAA), K. Khai Bong (AAA), K. Hom Maew (AAA), K. Hom Thong (AAA), K. Roi Wi (AAB), K. Nga Chang (AAB), K. Namwa (ABB), K. Hin (ABB) and K. Teparod (ABBB). Each sucker was cut into one cubic inch and surface sterilized in 10% chlorox for 20 minutes. Each of them was sectioned into 4 pieces and cultured on MS medium suplemented with 15% coconut water and 5 mg/l of BA. The CRD with 14 treatments 6 replications was designed and analysed with Duncan's New Multiple Range Test. The results shown significant difference on development of plantlet from different gonomic bananas, those were AA, AAA, AAB gemome explants were proliferated better than ABB and ABBB. Number of plantlets per explant were non-significant, but period of proliferation of AA, AAA and AAB were shorter than ABB, ABBB

Key words : in vitro, genome, Kluai

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของยีโนมในกล้วยที่มีต่อการขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำชิ้นส่วนของหน่อกล้วย 14 พันธุ์คือ กล้วยไข่ (AA) กล้วยหอมจันทน์ (AA) กล้วยน้ำไท (AA) กล้วยเล็บมือนาง (AA) กล้วยลากาทาน (AAA) กล้วยนาก (AAA) กล้วยไข่บอง (AAA) กล้วยหอมแม้ว (AAA) กล้วยหอมทอง (AAA) กล้วยร้อยหวี (AAB) กล้วยงาช้าง (AAB) กล้วยน้ำว้า (ABB) กล้วยหิน (ABB) และกล้วยเทพรส (ABBB) มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ตัดแบ่งหน่อเป็น 4 ส่วน วางแผนการทดลองแบบ Completly Randomized Design มี 14 การทดลอง 6 ซ้ำ โดยวิเคราะห์แบบ Duncan's New Mutliple Range Test ทุกการทดลองนำไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962) ซึ่งเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า กล้วยที่มียีโนมต่างกันจะมีความสามารถในการงอกเป็นต้นกล้วยใช้วเลาต่างกัน กล้วยที่มีการรวมตัวของยีโนม B มาก มีผลทำให้จำนวนวันที่งอกเป็นต้นโดยเฉลี่ยช้ากว่ากล้วยที่มีการรวมตัวของยีโนม A แต่อย่างเดียว จำนวนต้นที่งอกทั้งหมดต่อชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อกล้วยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ใช้เวลาในการงอกทั้งหมดต่างกันทางสถิติ กล่าวคือ กล้วยที่มียีโนม B ประกอบจะใช้เวลาในการงอกนานกว่า นั่นคือ ยีโนมของกล้วยมีผลต่อการเกิดต้นอ่อนของต้นกล้วยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1 ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture. Kasetsart University Bangkok 10900

คำนำ

กล้วยที่ปลูกอยู่ในปัจจุบันเกิดจากการกลายพันธุ์และผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ กล้วยดั้งเดิมที่ถือว่าเป็นบรรพบุรุษของกล้วยปัจจุบัน คือ กล้วยป่า 2 ชนิด คือ กล้วยป่า *Musa acuminata* Colla ซึ่งมียีโนม AA และกล้วยตานี *Musa balbisiana* Colla ซึ่งมียีโนม BB (Simmonds & Shepherds 1955) และกล้วยปลูกที่เกิดจากการกลายพันธุ์ ผสมพันธุ์ตามธรรมชาตินั้น มียีโนม AA, AAA, AAB, ABB, ABBB และ BBB (Valmayor *et al* 1991) ประเทศไทยมีกล้วยประมาณ 59 สายพันธุ์ โดยมีชุดของยีโนมดังกล่าว (Silayoi and Babpraserth, 1983) จากการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติโดยทั่วไปมักใช้หน่อที่แตกออกมาจากต้นแม่ ในกล้วยต้นหนึ่งๆ มีการแตกหน่อต่างกัน กล้วยบางชนิดให้หน่อมาก และบางชนิดให้หน่อน้อย ในการขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็เช่นเดียวกันปริมาณการแตกหน่อ จำนวนวันที่ชิ้นส่วนที่นำไปเพาะเลี้ยงจะแตกเป็นต้นจะต่างกัน ดังเช่น Vessay and Rivera (1981) รายงานว่าการเกิดกลุ่มหน่อนั้นเกิดหลังจากเพาะเลี้ยงแล้ว 1 เดือน ในอาหาร MS แต่ Olivia และ Barba (1984) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงกล้วย Dwarf Cavendish ในอาหารสูตรเดียวกันแต่เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และ BA 22 ไมโครโมลาร์ จะได้ต้นใน 2 เดือน ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองเลี้ยงหน่อของกล้วยหอมแกรนด์เนน ซึ่งเลี้ยงในอาหาร MS ที่ผสมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (กัลยาณี 2533) แต่ในกล้วยไข่พบว่าจะเริ่มมีการแตกเป็นต้นใน 6 อาทิตย์ ในอาหารสูตร MS ผสมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ BAP 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (สุภาพร 2532)

สำหรับการเพิ่มปริมาณต้นนั้น ประภาสินี (2529) ได้ทดลองเลี้ยงหน่อของกล้วยไข่พระตะบองในอาหารสูตร MS ที่ผสมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีการตัดแบ่ง และย้ายอาหารทุก 4 สัปดาห์ จะสามารถเพิ่มปริมาณได้ 1,025 หน่อในเวลา 20 สัปดาห์ แต่ Dore Swamy *et al* (1983) ได้ใช้อาหารสูตรเดียวกันแต่เติม BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีการเกิดยอดอ่อนเพียงต้นเดียวเท่านั้น

ดังนั้นจะเห็นได้ว่ากล้วยต่างชนิดกัน ซึ่งมียีโนมที่เหมือนกันหรือต่างกัน ใช้เวลาในการเกิดต้นอ่อน และจำนวนการเกิดหน่อต่างกัน ในอาหารสูตรเดียวกันแต่มีปริมาณฮอร์โมนที่ต่างกัน ดังนั้น ถ้าหากได้มีการนำกล้วยต่างชนิด ซึ่งมียีโนมที่ต่างกันมาทดสอบอาหารชนิดเดียวกันจะทำให้เห็นถึงความแตกต่างกันได้ชัดเจน

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยจากปลายยอดกล้วย ทั้งหมด 14 พันธุ์ คือ กล้วยไข่ กล้วยหอมจันทน์ กล้วยน้ำไท กล้วยเล็บมือนาง กล้วยลากาทาน กล้วยนาก กล้วยไข่บอง กล้วยหอมแม้ว กล้วยหอมทอง กล้วยร้อยหวี กล้วยงาช้าง กล้วยน้ำว้า กล้วยหิน และกล้วยเทพรส โดยทำการลอกกาบด้านนอกของกล้วยออก แล้วตัดให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์นิ้ว นำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง นำแต่ละส่วนไปเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ซึ่งมีน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับ pH ที่ 6.1 และวุ้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที นำไปเลี้ยงในสภาพที่ให้ความเข้มแสงประมาณ 1500-2000 lux อย่างต่อเนื่อง อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์

วางแผนการทดลองแบบ Completly Ramdomized Design มี 14 treatment 6 ซ้ำ ทำการบันทึกจำนวนวันที่เริ่มงอกเป็นต้นกล้วย จำนวนวันที่งอกเป็นต้นกล้วยวันสุดท้าย จำนวนวันที่งอกเป็นต้นโดยเฉลี่ย และจำนวนต้นที่งอกทั้งหมด นำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์สถิติและวิเคราะห์หาความแตกต่างของแต่ละการทดลองโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test ระยะเวลาเริ่มทำการทดลองเดือนมิถุนายน 2533 สิ้นสุดการทดลองเดือนธันวาคม 2533 สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยทั้ง 14 พันธุ์ บนสูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์และ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื้อเยื่อกล้วยทั้ง 14 พันธุ์สามารถขยายขนาดและมีการเปลี่ยนแปลงสีคือจากสีขาวเป็นสีเขียว ภายในระยะเวลาประมาณ 7 วัน จากนั้นก็จะมีขนาดเพิ่มขึ้นและมีการปล่อยสาร Phenolic compound ซึ่งมีสีดำออกมาตรงส่วนฐาน ถ้าสาร Phenolic compound นี้ มีจำนวนมากก็จะขัดขวางการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกล้วย ถ้าพบว่าพันธุ์ไหนมี Phenolic compound มากก็ควรทำการย้ายเนื้อเยื่อลงบนอาหารใหม่และทำการตัดส่วนที่มีสีดำทิ้งไป และในการพัฒนาเป็นต้นนั้น Skoog and Miller (1957) กล่าวว่าในการพัฒนาเป็นต้นหรือรากนั้นขึ้นกับความสมดุลย์ของสารเร่งการเจริญเติบโต คือ auxin และ cytokinin พบว่า ในความเข้มข้นที่เหมาะสม auxin จะช่วยเร่งให้เกิดราก ส่วน cytokinin นั้นจะเร่งให้เกิดต้น จากการทดลองนี้พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ทำให้กล้วยมีการพัฒนาเป็นต้นได้ทั้ง 14 พันธุ์

จาก Table 1 ในการพัฒนาเป็นต้นของกล้วยทั้ง 14 พันธุ์ เมื่อพิจารณาจำนวนวันที่เริ่มงอกเป็นต้นอ่อน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาจำนวนวันที่เนื้อเยื่อกล้วยชิ้นสุดท้ายสามารถงอกเป็นต้นกล้วยเล็กๆ ได้จะมีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% เช่นเดียวกับจำนวนวันที่งอกเป็นต้น โดยเฉลี่ยจากตารางสามารถแบ่งกล้วยตามระยะเวลาที่ใช้ในการงอกเป็นต้นได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม AA, AAA และ AAB กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่ม ABB และ ABBB โดยกล้วยในกลุ่ม AA, AAA และ AAB สามารถพัฒนาตาข้างที่อยู่ตรงซอกใบ (axillary bud) ให้งอกออกมาเป็นต้นอ่อนได้เร็วกว่ากล้วยในกลุ่ม ABB และ ABBB ซึ่งถ้าสังเกตจากยีโนมก็สามารถแบ่งได้ว่า กล้วยที่มียีโนม A เป็นองค์ประกอบสามารถพัฒนาตาข้างตรงซอกใบให้เกิดเป็นต้นเล็กๆ ได้เร็ว เช่น กล้วยลากาทาน มียีโนม AAA ใช้ฉลาในการงอกเป็นต้นเพียง 23.8 วัน และกล้วยที่มียีโนม B เป็นองค์ประกอบมาก สามารถพัฒนา

Table 1 Proliferation time and number of plantlet produced from the explant of different genomic bananas on a Modified Murashige and Skoog (1962) media containing 15% coconut water and 5 mg/l BA.

Genome	Cultivars	Proliferation time (days)			Number of plantlet/explant
		First plantlet	Last plantlet	Average	
AA	Khai	48	79[a1/]	66.4[a]	2.2
	Homchan	33	103[a]	70.6[a]	1.8
	Namthai	32	53[a]	45.8[a]	1.5
	Leb Mu Nang	41	61[a]	49.8[a]	2
AAA	Lakatan	20	31[a]	23.8[a]	1.8
	Nak	20	56[a]	42.6[a]	1
	Khai Bong	28	35[a]	31.8[a]	1.8
	Hom Maew	53	56[a]	54.2[a]	1.2
	Hom Thong	59	111[a]	73.8[a]	2.2
AAB	Roi wi	49	60[a]	54.0 [a]	2
	Nga Chang	29	50[a]	36.2[a]	1.3
ABB	Namwa	52	223[c]	144.0 [b]	2
	Hin	43	121[b]	91.8[b]	2
ABBB	Teparod	81	130[b]	96.4[b]	1
F-test		NS	**	**	NS

1/ = mean separation within column by Duncan's Multiple Rang Test (p = 0.05)
** = highly significance (p = 0.01)
NS = Non significance

ตาข้างตรงซอกใบเกิดเป็นต้นอ่อนได้ช้ากว่า เช่น กล้วยน้ำว้ามียีโนม ABB ใช้เวลาในการงอกเป็นต้นเฉลี่ยนานถึง 144 วัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Banerjee (1985) ที่รายงานว่า การรวมกันของยีนมีผลต่อการงอกของกล้วยที่มียีโนมต่างกัน โดยกล้วยที่มีการรวมตัวของยีโนม B จะใช้เวลาในการงอกเป็นต้นนานกว่ากล้วยที่มียีโนม A ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกล้วยที่มียีโนม B มักจะมีสารประกอบ phenolic มากกว่ากล้วยที่มียีโนม A (Simonds. 1962) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กล้วยที่มียีโนม B งอกเป็นต้นอ่อนได้ช้า เพราะสารนี้มีผลไปขัดขวางการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช

สำหรับจำนวนต้นทั้งหมดที่เกิดขึ้นต่อเนื้อเยื่อกล้วยจำนวน 1 ชิ้นนั้น พบว่า กล้วยทั้ง 14 พันธุ์มีจำนวนต้นทั้งหมดที่เกิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่า ในกล้วยทั้ง 14 พันธุ์นี้ วันที่เริ่มงอกเป็นต้นและจำนวนต้นทั้งหมดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนจำนวนวันที่งอกเป็นต้นโดยเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติ นั่นคือ กล้วยที่มียีโนมต่างกัน จำนวนต้นที่เกิดมีจำนวนใกล้เคียงกันแต่จะแตกต่างกันทางสถิติ นั่นคือ กล้วยที่มียีโนมต่างกัน จำนวนต้นที่เกิดมีจำนวนใกล้เคียงกันแต่จะแตกต่างกันเฉพาะจำนวนวันที่งอกเป็นต้นอ่อนเฉลี่ย อย่างไรก็ตามถ้าหากเปรียบเทียบจำนวนต้นที่งอกกับช่วงเวลาที่ใช้ทั้งสิ้นจะพบว่ากล้วยที่มียีโนม AA จะให้จำนวนต้นที่มากกว่า AAB, ABB, ABBB ในช่วงฉลาอันสั้นกว่า กล่าวคือ กล้วยไข่ได้จำนวนต้น 2.2 ต้นในเวลา 66.4 วัน และกล้วยเล็บมือนางได้จำนวน 2 ต้นในเวลา 49.8 วัน แต่กล้วยน้ำว้าได้จำนวนต้น 2 ต้นแต่ใช้เวลานานถึง 144 วัน และกล้วยหินได้จำนวน 1 ต้นและใช้เวลานานถึง 91.8 วัน ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า กล้วยที่มียีโนม AA, AAA ให้จำนวนต้นมากกว่ากล้วยที่มียีโนม AAB, ABB, ABBB

อนึ่งในการทดลองนี้ใช้เนื้อเยื่อที่มียีโนมต่างกันเลี้ยงบนสูตรอาหารเดียวกัน ทำให้เชื่อได้ว่า ยีโนมน่าจะมีผลต่อช่วงเวลาในการเกิดต้นอ่อนและจำนวนของต้นอ่อน

สรุป

การศึกษาการเกิดเป็นต้นของเนื้อเยื่อกล้วยที่มียีโนมต่างกัน ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์และ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ากล้วยที่มียีโนมต่างกันจะมีความสามารถในการงอกเป็นต้น โดยใช้เวลาต่างกัน กล้วยที่มียีโนม AA, AAA และ AAB จะสามารถงอกเป็นต้นอ่อนได้ภายใน 58.2 วัน 45.2 และ 45.1 วัน ส่วนกล้วยที่มียีโนม ABB, ABBB จะสามารถงอกเป็นต้นอ่อนได้ภายใน 117.9 วัน และ 96.4 วัน ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

กัลยาณี อรรถฉัตร. 2533. การเพิ่มปริมาณต้นและการเจริญเติบโตของกล้วยหอมพันธุ์ Grand Nain โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 28 หน้า.

ประภาสินี รัตโนภาส. 2529. เทคนิคการขยายพันธุ์กล้วยโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปัญหาพิเศษปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 26 หน้า.

สุภาพร แก้วสมพงษ์. 2532. ผลของ 6-Benzylaminopurine ต่อการเกิดหน่อของกล้วยไข่บนอาหารสังเคราะห์ ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 15 หน้า.

Banerjee, N. and E. De Langhe. 1985. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (Banana and plantain). Plant Cell Reports. 4 : 351-354.

Dore Swamy, R, N.K. Srinivasa Rao. and E.K. Chacko. 1983. Tissue culture propagation of banana. Scientia. Hort. 18 : 247-252.

Murashige, T. and Skoog. F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473-479.

Olivia, P.D. and R.C. Barba, 1984. *In vitro* culture of Saba banana [*Musa* sp. c.v. *Saba* (BBB)]. The

Philippine Agriculturist. 63 : 351-358.

Silayoi, B. and C. Babprasert. 1983. Banana Genetic Resources Exploration in Thialand. Report submitted to IBPGR/FAO. Kasetsart Univ. Bangkok.

Simmonds, N.W. and Shepherd 1955. The taxonomy and origins of the cultivated banana. J. Linn. Soc. (Botany) *55* : 302-312.

Simmonds, N.W. 1962. The evolution of the banana. Longman London.

Skoog, F. and C.O. Miller, 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture *in vitro* Sym. Soc. Exp. Biol. 11 : 118-131.

Valmayor, R.V., B. Silayoi, S.H. Jamaluddin, S. Kusumo, R.R.C. Espino and O.C. Pascua 1991. Banana classification and commercial cultivars in Southeast Asia. Bull no. 24. PCARRD.

Vessey, J.C. and J.A. Rivera. 1981. Meristem culture of banana. Turrialba. 31 (2) : 162-163.