

การผลิตมันเทศปลอดไวรัส SPFMV และ SPCSV โดยใช้เทคนิค การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Production of SPFMV-free and SPCSV-free Sweet Potato Using Tissue Culture Techniques

ชฎาพร ไชยลังกา¹ ศิริมาศ ชัยชม² เสาวลักษณ์ พิมพันธ์² และ เกวาลิน คุณาศักดากุล^{1*}

Chadaporn Chailangka¹, Sirimas Chaichom², Saowalak Phimkhan² and Kaewalin Kunasakdakul^{1*}

¹ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

¹Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืช มูลนิธิโครงการหลวง จ. เชียงใหม่ 50200

²Plant Biotechnology Research Center, Royal Project Foundation, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author: Email: kaewalin.k3@gmail.com

(Received: 8 November 2018; Accepted: 31 January 2019)

Abstract: Two varieties of sweet potato cultivars SP02 (purple flesh) and SP08 (yellow flesh) were collected from Royal Agricultural Station Inthanon, Chiang Mai province, and planted under greenhouse condition. The plant samples showed viral leaf symptoms, chlorosis and purpling were clearly observed after planting for 90 days. Infections were proved by PCR for both *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) and *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV). Five criteria severity levels 0-4 (healthy normal-severest) were used to evaluate the diseases in 100 leaf-samples of each variety, results showed no healthy normal detection, severity at level 2 was the major percentage found at 48 and 45% for SP02 and SP08, respectively. Accordingly, the tissue culture plantlets were produced (culturing on MS medium) and used for virus-free production trials using meristem tip cultures with and without thermotherapy (kept under 37 ± 1 °C for 30 days). Excision of the meristem tip from the plantlets at the sizes of 0.3, 0.5 and 1 mm then cultured on the same medium for 90 days after that PCR were used for virus-free evaluation. The trials with thermotherapy of both varieties at the size 0.5 and 1 mm were succeeded to produce high rate of virus-free at 90.9-100% . However, excising of 0.3 mm meristem with thermotherapy trials affected survival rate of plant decreasing to 37.5%. Mass-production of virus-free plantlets testing for various concentrations of plant growth regulators supplemented in MS medium, after culturing for 30 days, the greatest number of node per plantlet of SP02 and SP08 were 11.1 and 13.8 respectively, on the medium supplemented with indole-3-acetic acid (IAA) at the concentration of 0.5 ppm and gibberellin (GA₃) at the concentration of 1 ppm.

Keywords: Sweet potato, SPFMV and SPCSV, virus-free plantlets

บทคัดย่อ: เก็บรวบรวมพันธุ์มันเทศจากสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ SP02 (เนื้อสีม่วง) และ SP08 (เนื้อสีเหลือง) นำมาปลูกภายในโรงเรือนเป็นเวลา 90 วัน พบใบพืชแสดงอาการจุดสีเหลืองและจุดสีม่วง เมื่อตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR พบว่าเกิดจากการเข้าทำลายร่วมกันของไวรัส *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) และ *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) การประเมินความรุนแรงของอาการโรคดังกล่าวด้วยเกณฑ์ 5 ระดับ ที่ 0-4 (ปกติ-รุนแรงที่สุด) ในตัวอย่างใบมันเทศแต่ละสายพันธุ์ ๆ ละ 100 ใบ ไม่พบใบพืชที่ปกติ ระดับความรุนแรงที่พบมากที่สุดในสายพันธุ์ SP02 และ SP08 คือระดับ 2 เท่ากับ 48 และ 45% ตามลำดับ จากการนำต้นมันเทศในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้ความร้อน (37°C เป็นเวลา 30 วัน) และไม่ใช้ความร้อน มาตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3, 0.5 และ 1 mm เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS และตรวจสอบการปลอดไวรัสด้วยเทคนิค PCR พบว่าการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.5 และ 1 mm มีการปลอดไวรัสทั้งสองชนิด 90.9-100% อย่างไรก็ตามการใช้ความร้อนและการตัดเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.3 mm ส่งผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของพืชต่ำลงเหลือเพียง 37.5% ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณมันเทศปลอดไวรัส พบว่า อาหาร MS ที่เติม IAA 0.5 mg/l และ GA₃ 1 mg/l สามารถเพิ่มปริมาณมันเทศได้ดีที่สุดในทั้งสองสายพันธุ์ มีจำนวนข้อเฉลี่ย 11.1 และ 13.8 ข้อต่อต้น ตามลำดับ

คำสำคัญ: มันเทศ ไวรัส SPFMV และ SPCSV ต้นอ่อนพืชปลอดไวรัส

คำนำ

มันเทศ (*Ipomoea batatas* L. Lam.) จัดอยู่ในวงศ์ Convolvulaceae เป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญอันดับที่ 7 ของโลก รองจากข้าวสาลี ข้าว ข้าวโพด มันฝรั่ง ข้าวบาร์เลย์ มันสำปะหลัง มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนแถบอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกมันเทศ รวมประมาณ 20,302 ไร่ ผลผลิตรวม 352,999 ตัน ผลผลิตเฉลี่ย 2,673 กิโลกรัม ต่อไร่ (Department of Agricultural Extension, 2017) มันเทศเป็นพืชหัวที่ให้ผลผลิตสูงสามารถนำมาใช้เชิงอุตสาหกรรมการแปรรูปเป็นแป้ง และอาหารเลี้ยงสัตว์ เป็นแหล่งอาหารที่อุดมไปด้วย คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งปริมาณสารอาหารที่สำคัญแปรตามสีเนื้อ เช่น เนื้อสีเหลือง และสีส้มจะมี provitamin A carotenoid ในระดับที่สูงเทียบเท่ากับในแครอท (Woolfe, 1992) ปัจจุบันมูลนิธิโครงการหลวงมีการส่งเสริมเกษตรกรให้ปลูกมันเทศเพิ่มมากขึ้นแต่ประสบปัญหาสำคัญจากการเข้าทำลายของไวรัสที่ติดกับท่อนพันธุ์ที่ใช้เพาะปลูก ส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิต ไวรัสที่สำคัญ ได้แก่ *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) และ *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) ทำให้พืชสร้างหัวลดลง

ส่งผลเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (Kokkinos and Clark, 2006) ไวรัสสามารถแพร่ระบาดโดยติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ และแมลงพาหะ เช่น แมลงหวี่ขาวและเพลี้ยอ่อน การใช้หัวพันธุ์หรือท่อนพันธุ์ปลอดไวรัสในการเพาะปลูกนับเป็นวิธีการที่ดีในการแก้ไขปัญหา ดังนั้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตต้นแม่พันธุ์มันเทศปลอดไวรัสด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อสนับสนุนการผลิตท่อนพันธุ์มันเทศ สายพันธุ์ SP02 และ SP08 ปลอดไวรัส สำหรับใช้ประโยชน์ในงานส่งเสริมการผลิตมันเทศของเกษตรกรต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมพันธุ์มันเทศ

รวบรวมหัวพันธุ์มันเทศสายพันธุ์ SP02 และ SP08 จากสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ หน่วยวิจัยขุนห้วยแห้ง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ นำมาปลูกภายใต้สภาพโรงเรือนกันแมลง ในกระถาง ขนาด 12 นิ้ว ที่บรรจุดินอบฆ่าเชื้อ ดูแลให้ปุ๋ยและน้ำตามวิธีการของมูลนิธิโครงการหลวง มันเทศสายพันธุ์ SP02 มีเนื้อสีม่วง ใบเป็นรูปฐานแยกหรือสองหยัก (lobed) ส่วนสายพันธุ์ SP08 มีเนื้อสีเหลือง ใบเป็นรูปหัวใจ (cordate) (Figure 1)



Figure 1. Leaf shape, tuber shape and tuber section of sweet potato cultivars, SP02: purple flesh (A) and SP08: yellow flesh (B)

พื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่ ได้แก่ สถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ หน่วยวิจัยขุนห้วยแห้ง และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหมอกจ๋าม อำเภอแม่ฮ้อย จังหวัดเชียงใหม่

2. ลักษณะอาการโรคไวรัส และการตรวจวินิจฉัย

2.1 การประเมินความรุนแรงของโรคไวรัส

สังเกตอาการและบันทึกระดับความรุนแรงของโรคบนใบมันเทศทั้ง 2 สายพันธุ์ เมื่อต้นมันเทศอายุ 90 วันหลังปลูก สายพันธุ์ละ 10 ต้น (ซ้ำ) ต้นละ 10 ใบ รวมจำนวน 100 ใบ โดยใช้เกณฑ์การประเมินพื้นที่ใบที่แสดงอาการจุดสีเหลืองและจุดสีม่วงเทียบกับพื้นที่ใบทั้งหมด แบ่งเป็น 5 ระดับ คือ ระดับ 0 ไม่แสดงอาการ ระดับ 1: 1-25% ระดับ 2: 26-50% ระดับ 3: 51-75% และระดับ 4: 76-100% (Figure 2)

2.2 การตรวจสอบชนิดไวรัสด้วยเทคนิค PCR

สุ่มใบมันเทศแต่ละสายพันธุ์ ที่แสดงอาการใบจุดสีเหลืองปนจุดสีม่วงจำนวน 20 ตัวอย่างมาตรวจสอบหาชนิดของเชื้อไวรัส โดยใช้การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ใช้คู่ primer สำหรับการตรวจหาเชื้อ SPFMV และ SPCSV โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Kwak *et al.* (2014)

3. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศ

3.1 การเพาะเลี้ยงส่วนขยายพันธุ์เริ่มต้น

นำมันเทศสายพันธุ์ SP02 และ SP08 ที่เพาะเลี้ยงในสภาพโรงเรือนกันแมลงมาตัดส่วนตายอดและตาข้าง ความยาว 1 cm ล้างด้วยน้ำไหล 10 นาที จุ่มขึ้นพีชใน 70% ethanol เป็นเวลา 30 วินาที ก่อนนำไปแช่ใน 1% electrolyzed oxidizing water (EO) ที่ผสม 2-3 หยด ของ Tween 20 เขย่าเบา ๆ 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) pH 5.6 ที่เติม BAP เข้มข้น 1 mg/l และ GA₃ เข้มข้น 0.5 mg/l นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุณหภูมิ 25 ± 2 °C แสง 1200 lux 16 ชั่วโมง/วัน สังเกตและบันทึกการเจริญหลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน

3.2 ศึกษาการพัฒนาสูตรอาหาร MS

นำส่วนของยอดมันเทศทั้ง 2 สายพันธุ์ ความยาว 1 cm จากต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากข้อ 3.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เปรียบเทียบกับชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญ 3 ชนิด ได้แก่ 6-benzylaminopurine (BAP), indole-3-acetic acid (IAA) และ gibberellic acid (GA₃) ความเข้มข้น 0-2 mg/l จำนวนรวม 14 กรรมวิธี ๆ ละ 10 ซ้ำ ดังนี้

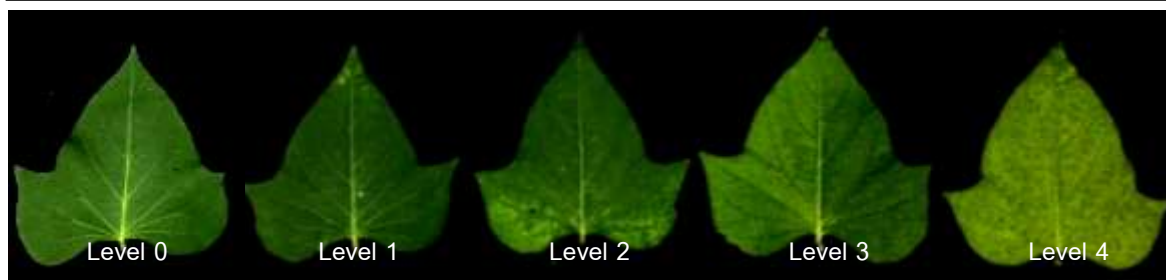


Figure 2. Five criteria severity levels of chlorosis symptom on sweet potato leaves comparing to total leaf-area: 0 = no symptom; 1= 1-25%; 2 = 26-50%; 3 = 51-75% and 4 = 76-100%

- กรรมวิธีที่ 1 MS free hormone
กรรมวิธีที่ 2 MS + 0.5 mg/l IAA
กรรมวิธีที่ 3 MS + 1 mg/l IAA
กรรมวิธีที่ 4 MS + 1 mg/l BAP
กรรมวิธีที่ 5 MS + 2 mg/l BAP
กรรมวิธีที่ 6 MS + 1 mg/l GA₃
กรรมวิธีที่ 7 MS + 1 mg/l GA₃ + 0.5 mg/l IAA
กรรมวิธีที่ 8 MS + 1 mg/l GA₃ + 1 mg/l IAA
กรรมวิธีที่ 9 MS + 1 mg/l GA₃ + 1 mg/l BAP
กรรมวิธีที่ 10 MS + 1 mg/l GA₃ + 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA
กรรมวิธีที่ 11 MS + 1 mg/l GA₃ + 1 mg/l BAP + 1 mg/l IAA
กรรมวิธีที่ 12 MS + 1 mg/l GA₃ + 2 mg/l BAP
กรรมวิธีที่ 13 MS + 1 mg/l GA₃ + 2 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA
กรรมวิธีที่ 14 MS + 1 mg/l GA₃ + 2 mg/l BAP + 1 mg/l IAA

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) บันทึกลักษณะการเจริญ ความสูง จำนวนข้อ จำนวนใบ หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน พร้อมทั้งจำนวนร้อยละของการมีชีวิตรอดหลังออกปลูกเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (MS)

4. การกำจัดไวรัส SPFMV และ SPCSV

4.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Wondimu *et al.* (2012)

โดยนำต้นมันเทศทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ให้ได้ขนาด 0.3, 0.5 และ 1 mm นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญ เก็บในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ จากนั้นย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BAP 1 mg/l ให้แสง 1200 lux 16 ชั่วโมง/วัน ตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเนื้อเยื่อเจริญ หลังเพาะเลี้ยง 30 วัน และนำต้นที่เจริญสมบูรณ์ไปใช้ในการตรวจสอบการปลอดไวรัส เช่นเดียวกับข้อ 2.2

4.2 การใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Feyissa and Dugassa (2011) นำต้นมันเทศที่เพาะเลี้ยงในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อายุ 30 วัน ไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ $37 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นนำมาตัดส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ให้ได้ขนาด 0.3, 0.5 และ 1 mm นำไปเพาะเลี้ยงตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเนื้อเยื่อเจริญหลังเพาะเลี้ยง 30 วัน และนำต้นที่เจริญสมบูรณ์ไปใช้ในการตรวจสอบการปลอดไวรัสเช่นเดียวกับข้อ 2.2

5. การตรวจสอบการปลอดโรคไวรัส

นำต้นกล้านมันเทศที่ผ่านการทำให้ปลอดไวรัสด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และ การใช้ความร้อนร่วมกับการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด มาตรวจสอบการปลอดไวรัสด้วยเทคนิค PCR เช่นเดียวกับข้อ 2.2

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะอาการของโรคไวรัสในมันเทศและการตรวจวินิจฉัย

จากการศึกษาอาการโรคไวรัสบนใบมันเทศ หลังการเพาะปลูกได้ 90 วัน พบอาการจุดสีเหลือง และจุดสีเหลืองสลับม่วงบนใบมันเทศทั้งสองสายพันธุ์ และมักพบจุดสีเหลืองสลับม่วงบนใบล่าง (Figure 3) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kokkinos and Clark (2006) ที่กล่าวว่าอาการดังกล่าวเกิดจากการเข้าทำลายของ SPFMV และการเจริญเติบโตช้าลง จากการประเมินความรุนแรงพบความรุนแรงระดับ 2 มากที่สุด 48 และ 45% ในสายพันธุ์ SP02 และ SP08 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค PCR พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาว 356 และ 583 คู่เบส ตรงกับขนาดนิวคลีโอไทด์ผลผลิตจากคู่ไพรเมอร์ SPFMV 1-F, SPFMV 1-R และ SPCSV uni-f1, SPCSV uni-r1 ที่ใช้ในการตรวจสอบ ตามลำดับ แสดงถึงการเข้าทำลายร่วมกันของไวรัสทั้ง 2 ชนิด

2. สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศ

2.1 การเพาะเลี้ยงส่วนขยายพันธุ์เริ่มต้น

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตายอด และตาข้าง ของสายพันธุ์ SP02 และ SP08 ในอาหาร MS เป็นเวลา 30 วัน พบต้นมันเทศมีความสูงเฉลี่ย เท่ากับ 6.20 และ 5.15 cm ตามลำดับ และการเพาะเลี้ยงตายอดมีการเจริญของลำต้นและรากเร็วกว่าการใช้ตาข้าง

2.2 การพัฒนาสูตรอาหาร MS

จากการทดสอบสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญ จำนวน 14 กรรณวิธี เป็นเวลา 30 วัน (Figure 4) พบว่า กรรณวิธีที่ 7 ที่เติม IAA 0.5 mg/l ร่วมกับ GA₃ 1 mg/l สามารถเพิ่มจำนวนตาข้างของสายพันธุ์ SP02 และ SP08 มากที่สุด 11.1 และ 13.8 ข้อต่อต้น และมีอัตราการรอดหลังการนำออกปลูกมากที่สุด 60 และ 50% ตามลำดับ กรรณวิธีที่ 4 ทำให้ความยาวรากของมันเทศสายพันธุ์ SP02 มีความยาวรากยาวที่สุด 9.59 cm

3. การกำจัดไวรัส SPFMV และ SPCSV

3.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

จากการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของทั้ง 2 สายพันธุ์ให้มีขนาด 0.3, 0.5 และ 1 mm เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน พบการมีชีวิตรอดเฉลี่ย 50, 87.5 และ 95% ตามลำดับ และหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 65 วัน เนื้อเยื่อเจริญสามารถพัฒนาไปอ่อนนุ่มได้ และสามารถจะเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ขนาดเล็กและเกิดรากบนอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม BAP เข้มข้น 1 mg/l ในเวลา 75 วัน (Figure 5) จากนั้นนำต้นมันเทศที่เจริญจากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดทั้ง 3 ขนาด ที่นำออกปลูกเป็นเวลา 1 เดือน มาสังเกตอาการโรคไวรัสบนใบ พบว่า ต้นกล้าไม่แสดงอาการโรค (Figure 6) เช่นเดียวกับ Wang and Valkonen (2008) ที่รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของมันเทศขนาด 0.5 และ 1 mm มีอัตราการมีชีวิตรอด 100% และการตัดเนื้อเยื่อเจริญขนาดเล็กมีร้อยละการปลอดโรคมากกว่าขนาดใหญ่



Figure 3. Viral symptoms on leaves of sweet potato cultivars SP02 and SP08 after planting for 90 days:
(A) mild chlorosis; (B) chlorosis and purpling on older leaves

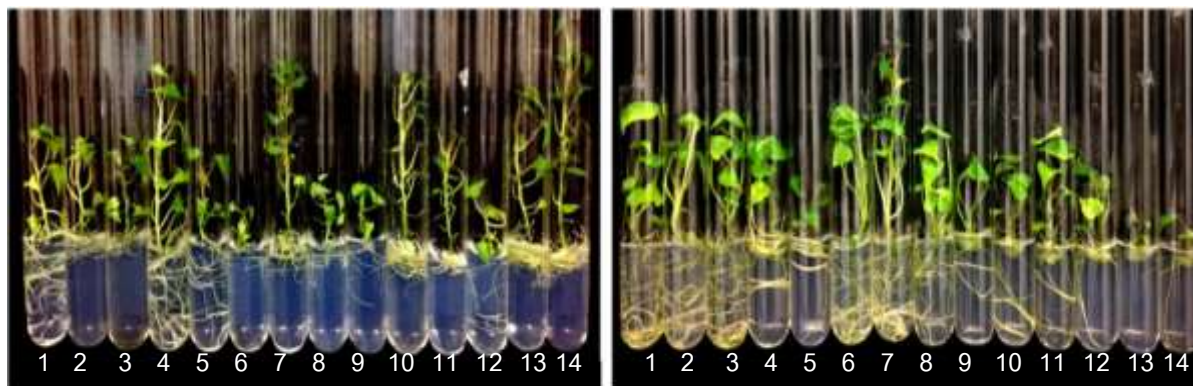


Figure 4. Growth of sweet potato plantlets after 30-day cultured on MS medium supplemented with various concentrations of plant growth regulators in 14 treatments, SP02 (A) and SP08 (B)

- | | |
|--|--|
| 1 = MS free hormone | 2 = MS + 0.5 mg/l IAA |
| 3 = MS + 1 mg/l IAA | 4 = MS + 1 mg/l BAP |
| 5 = MS + 2 mg/l BAP | 6 = MS + 1 mg/l GA ₃ |
| 7 = MS + 1 mg/l GA ₃ + 0.5 mg/l IAA | 8 = MS + 1 mg/l GA ₃ + 1 mg/l IAA |
| 9 = MS + 1 mg/l GA ₃ + 1 mg/l BAP | 10 = MS + 1 mg/l GA ₃ + 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA |
| 11 = MS + 1 mg/l GA ₃ + 1 mg/l BAP + 1 mg/l IAA | 12 = MS + 1 mg/l GA ₃ + 2 mg/l BAP |
| 13 = MS + 1 mg/l GA ₃ + 2 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA | 14 = MS + 1 mg/l GA ₃ + 2 mg/l BAP + 1 mg/l IAA |



Figure 5. Development stages of meristem tip culture of sweet potato: (A) meristem after cultured for 45 days, (B) 65 days and (C) 75 days



Figure 6. Sweet potato virus-free plantlets after transplanting for 45 days under net-proved house: (A) SP02 and (B) SP08

3.2 การใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

จากการเก็บต้นมันเทศในตู้ควบคุมอุณหภูมิ $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 วัน พบว่า ต้นมันเทศมีลักษณะใบเหลืองเล็กน้อยแต่เนื้อเยื่อของต้นยังคงมีความแข็งแรงเมื่อนำมาตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดให้มีขนาด 0.3, 0.5 และ 1 mm พบว่าหลังการเพาะเลี้ยงระยะเวลา 30 วัน การมีชีวิตรอดเฉลี่ย 37.5, 75 และ 87.5% ตามลำดับ และหลังเลี้ยง เป็นเวลา 60 วัน เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นได้และไม่แสดงอาการโรคเช่นเดียวกับข้อ 3.1

4. การตรวจสอบการปลอดไวรัส

จากการตรวจสอบการปลอดไวรัส SPFMV และ SPCSV ด้วยเทคนิค PCR ในมันเทศทั้งสองสายพันธุ์ ที่ผ่านการตัดเนื้อเยื่อเจริญ พบว่าสายพันธุ์ SP02 ที่เจริญ

จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.3, 0.5 และ 1 mm มีการปลอดไวรัส 100, 90.9 และ 94.2% ตามลำดับ (Table 1) และสายพันธุ์ SP08 ที่เจริญจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.5 และ 1 mm มีการปลอดไวรัส 100% (Figure 7) เช่นเดียวกับการรายงานของ Wang and Valkonen (2008) ที่พบว่าการตัดเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.5-1 mm สามารถทำให้ต้นมันเทศปลอดไวรัส 87-100% ขณะที่การใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.3 mm มักมีอัตราการรอดเป็นศูนย์ ส่วนขนาด 0.5 และ 1 mm มีการปลอดไวรัส 100% (Table 1) (Figure 7) เช่นเดียวกับการรายงานของ Feyissa and Dugassa (2011) ที่กล่าวว่าการใช้ความร้อนร่วมกับการตัดเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.5 และ 1 mm สามารถกำจัดไวรัสได้ 88.99-100% แต่การใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญขนาดเล็กมักมีอัตราการรอดชีวิตต่ำมาก

Table 1. Survival rates, regrowth and virus elimination percentages of two sweet potato cultivars after excisions of various size meristem tips with or without thermotherapy treatments

Treatments ^a	Survival rates (%) ^b		Regrowth rates (%) ^c		Virus elimination (%) ^d			
					SPCSV		SPFMV	
	SP02	SP08	SP02	SP08	SP02	SP08	SP02	SP08
Without thermotherapy :								
0.3 mm	50.0	45.0	5.0	11.1	100	100	100	100
0.5 mm	87.5	85.0	94.3	97.0	90.9	100	87.9	90.0
1 mm	95.0	95.0	92.1	92.1	94.3	100	88.6	97.1
$37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 30 days								
0.3 mm	37.5	37.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5 mm	75.0	70.0	83.3	89.3	100	100	100	100
1 mm	87.5	87.5	94.3	94.3	100	100	100	100

^a A total of 120 meristem tips of each size were included in three replicates of 40 meristem tips in each treatment

^b Data were collected after 4 weeks of post-culture on MS medium

^c Data were collected after 3 months of post-culture on MS+BAP 1 mg/l

^d Number of virus free plantlets, detection with PCR technique

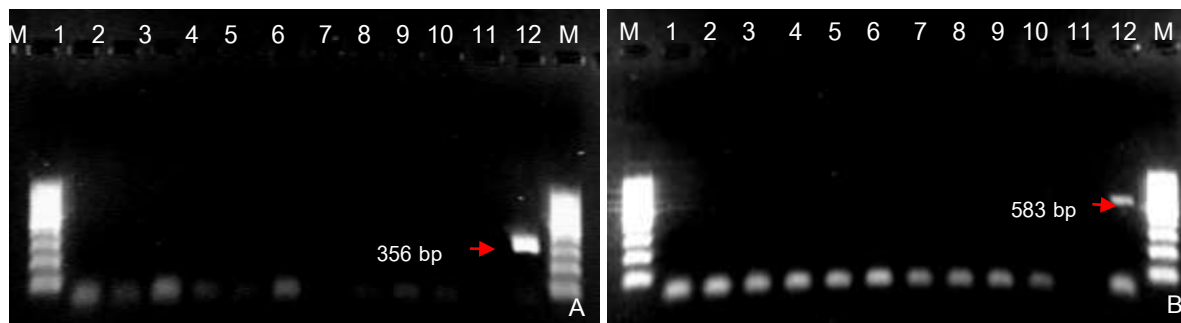


Figure 7. Detection for virus-free plantlets derived from meristem tip cultured with or without thermotherapy treatments by PCR technique. The expected sizes of amplification products from SPFMV and SPCSV were 356 and 583 nucleotides, respectively, (A) SPFMV: (Lane 1-5) SP02 plantlet trials of 0.3, 0.5, 1 mm without thermotherapy and 0.5 and 1 mm with thermotherapy; (Lane 6-10) SP08 plantlet trials of 0.3, 0.5, 1 mm without thermotherapy and 0.5 and 1 mm with thermotherapy; (B) SPCSV: (Lane 1-5) SP02 plantlet trials of 0.3, 0.5, 1 mm without thermotherapy and 0.5 and 1 mm with thermotherapy; (Lane 6-10) SP08 plantlet trials of 0.3, 0.5, 1 mm without thermotherapy and 0.5 and 1 mm with thermotherapy; (M) gene ruler DNA ladder mix; (Lane 11A, 11B) nuclease-free water (negative control); (Lane 12A, 12B) SPFMV and SPCSV (positive control), respectively

สรุป

จากการศึกษาอาการของโรคบนใบและตรวจสอบไวรัสในตัวอย่างมันเทศ สายพันธุ์ SP02 และ SP08 ด้วยเทคนิค PCR พบไวรัส SPFMV และ SPCSV เป็นสาเหตุโรค เมื่อนำต้นมันเทศดังกล่าวมาทำให้ปลอดไวรัสด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ขนาด 0.3, 0.5 และ 1 mm ทั้งแบบใช้และไม่ใช้ความร้อน สามารถกำจัดไวรัสทั้ง 2 ชนิดออกจากพืชได้ 87.9-100% และพบว่าเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาดใหญ่ที่ 0.5-1 mm ส่งผลดีต่ออัตราการมีชีวิตรอดและการเจริญของพืช เมื่อใช้ความร้อนร่วมด้วย ทำให้สามารถกำจัดไวรัสทั้ง 2 ชนิดได้ถึง 100% และการมีชีวิตรอดหลังตัดเนื้อเยื่อเจริญสูงถึง 70% ขึ้นไป อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 mm ทั้งการใช้และไม่ใช้ความร้อนร่วมกันมีโอกาสในการกำจัดไวรัสทั้งสองชนิดได้ถึง 100% เช่นกัน หากแต่มีอัตราการมีชีวิตรอดและการเจริญค่อนข้างต่ำ สำหรับการเพาะเลี้ยงมันเทศปลอดไวรัสในอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม IAA 0.5 mg/l GA_3 1 mg/l เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนมันเทศทั้งสองสายพันธุ์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Taiwan ICDF Project in Royal Project Foundation (Thailand) โครงการ Gloriosa, Sweet Potato Virus-free Seedling and Grape Root Stock Production Project ที่ให้การสนับสนุนทุนในการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Department of Agriculture Extension. 2017. Sweet potato. (Online). Available: <http://www.agriinfo.doae.go.th/year60/plant/rotror/agronomy/29.Sweet%20potato.pdf> (December 1, 2018). (in Thai)
- Feyissa, T. and G. Dugassa. 2011. *In vitro* production of virus-free sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) by meristem culture and thermotherapy. SINET: Ethiopian Journal of Science 34(1): 17-28.

- Kwak, H.R., M.K. Kim, J.C. Shin, Y.J. Lee, J.K. Seo, H.U. Lee, M.N. Jung, S.H. Kim and H.S. Choi. 2014. The current incidence of viral disease in Korean sweet potatoes and development of multiplex RT-PCR assays for simultaneous detection of eight sweet potato viruses. *Plant Pathology Journal* 30(4): 416-424.
- Kokkinos, C.D. and C.A. Clark. 2006. Interactions among *Sweet potato chlorotic stunt virus* and different potyviruses and potyvirus strains infecting sweet potato in the United States. *Plant Disease* 90(10): 1347-1352.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Wang, Q.C. and J.P.T. Valkonen. 2008. Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato by shoot tip culture and cryotherapy. *Journal of Virological Methods* 154: 135-145.
- Wondimu, T., T. Feyissa and G. Bedada. 2012. Meristem culture of selected sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) cultivars to produce virus-free planting material. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 87(3): 255-260.
- Woolfe, J.A. 1992. *Sweet Potato: An Untapped Food Resource*. Cambridge University Press, Cambridge. 643 p.
-