

การผลิตหัวมันฝรั่งในสภาพปลอดเชื้อ

ประสาทพร สมิตะมาน ปัจฉิมา สมิตะมาน และวิษณุ สมทรัพย์

IN VITRO MICROTUBERS POTATO PRODUCTION

*Prasartporn Smitamana, Pajchima Smitamana
and Visanu Somsap*

ABSTRACT: Insect-proof nurseries and the combination of heavy using of insecticides are needed for the virus-free seed potato production, which made quite a high cost of production. Besides these problems, transportation of planting material from the nurseries to the field, in the case of rapid multiplication by using single-node cutting, has to be considered. This experiment was oriented to solve the above difficulties therefore the aseptic microtuber production technique, which needs only small space, easy to transport and storage, and could purely protect the reinfection of viruses, was used. Modified Murashige and Skoog's medium (1962) was used as a basic medium. For the shoot multiplication, medium supplied with IAA 0.3 ppm, Adenine sulphate 80 ppm and 2-ip 30 ppm provided the strong and healthy shoots and leaves, but gave the significant lower number of shoot than medium supplied with IAA 0.3 ppm, GA₃ 0.1 ppm. and Adenine sulphate 80 ppm. Most of the media used in this experiment, except one which GA₃ was added in the shoot multiplication step, could induce the tuberization. Size and number of microtuber in each bottle depended on the age of the plant material and the sucrose concentration. The average number of tubers obtained from this experiment was 4-12 tubers per bottle.

บทคัดย่อ: การผลิตท่อนพันธุ์มันฝรั่งปลอดโรคไวรัส เพื่อที่ทำการวิจัยในขณะนี้ส่วนมากต้องอาศัยการปลูกในโรงเรือนกันแมลง หรือใช้ยาป้องกันกำจัดแมลงอย่างมาก นอกจากปัญหาในด้านดังกล่าวแล้ว การผลิตท่อนพันธุ์โดยการตัดชำนั้น ยังพบปัญหาในด้านการขนส่งไปยังจุดปลูกที่อยู่ห่างไกล การทดลองครั้งนี้จึงได้หาสูตรในการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งในสภาพปลอดเชื้อซึ่งเป็นการประหยัดพื้นที่ ให้ความสะดวกในการขนส่ง และสามารถป้องกันการติดโรคไวรัสใหม่ได้อย่างแน่นอน การทดลองแบ่งเป็น 2 ภาค คือ การกระตุ้นให้สร้างยอดของมันฝรั่งซึ่งพบว่า อาหารที่ดัดแปลงจากของ Murashige and Skoog (1962) โดยเพิ่ม IAA 0.3 ppm Adenine sulphate 80 ppm และ 2-ip 30 ppm ให้ผลในด้านความสมบูรณ์ของต้นและใบดีที่สุด แต่ปริมาณยอดที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ผสม IAA 0.3 ppm GA₃ 0.1 ppm และ Adenine sulphate 80 ppm แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในด้านการกระตุ้นให้มันฝรั่งสร้างหัวนั้นพบว่า มันฝรั่งสามารถสร้างหัวได้ในอาหารทุกสูตร เว้นแต่มันฝรั่ง

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50002
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50002

ที่เลี้ยงในอาหารที่มี GA_3 มาก่อน นอกจากนี้ขนาดและปริมาณหัวของมันฝรั่งที่สร้างจะขึ้นอยู่กับอายุของต้น ปริมาณน้ำตาลและ BAP อีกด้วย ปริมาณหัวโดยเฉลี่ยจะประมาณ 4-12 หัวต่อขวด

คำนำ

มันฝรั่งเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากชนิดหนึ่งของประเทศไทย และนับวันจะเพิ่มบทบาทมากขึ้นเรื่อย ๆ โดยเฉพาะในภูมิภาคตอนบนของประเทศที่มีอุณหภูมิต่ำจึงเหมาะกับการปลูกและขยายพันธุ์มันฝรั่งมากกว่าภาคอื่นๆ บทบาททางด้านการเมือง มันฝรั่งเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับการส่งเสริมให้ชาวไทยภูเขาปลูกเพื่อเป็นการทดแทนการปลูกฝิ่นด้วยเช่นกัน เท่าที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน พันธุ์มันฝรั่งที่กสิกรปลูกจะนำมาจากต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศเนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา การที่ต้องส่งหัวพันธุ์เข้ามานี้เองทำให้ราคาของหัวพันธุ์สูงมาก (ประมาณ กิโลกรัมละ 25 บาท) จึงทำให้เกิดการสูญเสียเงินตราต่างประเทศมากตามไปด้วย นอกจากนี้หัวพันธุ์ที่นำเข้าบางครั้งก็ไม่ปลอดจากโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคอันเกิดจากเชื้อไวรัส จากการสำรวจในฤดูการปลูกที่ผ่านมา พบว่ามีเชื้อไวรัสที่ติดมาพร้อมกับหัวพันธุ์หลายชนิด ที่พบมากคือ Potato Virus Y, Potato Virus X, Potato Virus S และ Potato Leafroll Virus ดังนั้น การผลิตท่อนพันธุ์มันฝรั่งที่ปลอดโรคไวรัสจึงเป็นความจำเป็นเร่งด่วนที่จะส่งเสริมให้มีการค้นคว้าวิจัยขึ้นภายในประเทศ งานในด้านนี้ได้รับแหล่งทุนสนับสนุนจากทั้งภาครัฐบาลและภาคเอกชนให้ทำการวิจัยทั้งในมหาวิทยาลัยและกรมกองต่าง ๆ มากขึ้น และประสบความสำเร็จค่อนข้างดี

หลังจากที่หน่วยงานต่าง ๆ สามารถผลิตท่อนพันธุ์มันฝรั่งที่ปลอดจากเชื้อไวรัสโดยอาศัยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว ขั้นตอนถัดมาคือการขยายพันธุ์มันฝรั่งที่ได้โดยวิธีการดังกล่าวให้มีปริมาณมากพอกับความต้องการของกสิกร ซึ่งอาจทำได้โดย

1. การปักชำ
2. การปลูกในแปลงให้ลงหัวตามธรรมชาติ

ทั้งสองวิธีที่กล่าวมาแล้วนั้น นอกจากจะต้องอาศัยโรงเรือนกันแมลงและปัญหาของการได้รับเชื้อไวรัสใหม่ในโรงเรือนอันเนื่องจากการปฏิบัติดูแลของเจ้าหน้าที่หรือการถ่ายทอดไวรัสจากแมลงที่เล็ดลอดเข้ามาในโรงเรือน ตลอดจนปัญหาในด้านการขนส่งท่อนพันธุ์ในกรณีของการปักชำ ยังพบว่ามีปัญหาการตายของกลัมันฝรั่งในแปลงปลูกของกสิกรอีกด้วยสาเหตุต่างๆ เหล่านี้เองจึงทำให้มีผู้สนใจหาวิธีการแก้ปัญหาโดยการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งขนาดเล็กในสภาพปลอดเชื้อ และเก็บไว้จำหน่ายแก่กสิกรในช่วงฤดูปลูกที่เหมาะสม

การกระตุ้นให้มันฝรั่งสร้างหัวในสภาพปลอดเชื่อนั้น เริ่มทำการค้นคว้ามาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1953 โดย Barker แต่ไม่ประสบความสำเร็จมากนัก การศึกษาในช่วงแรกจะมุ่งความสนใจต่อสภาพแวดล้อม เช่น แสง และอุณหภูมิเป็นหลัก จนกระทั่ง Oshima and Livingston (1959) and Oshima and Livingston (1963) พบว่า Gibberellin ที่ระดับ 25-100 ppm.

สามารถกระตุ้นให้ตาข่ายฝรั่งงอกได้ดี ในขณะที่ Naphthalene Acetic Acid (NAA) จะกระตุ้นให้เกิดการงอกของรากได้ ต่อมา Palmer and Smith (1969) ได้ทำการทดลองกระตุ้นให้มันฝรั่งสร้างหัวโดยใช้ Cytokinin ชนิดต่าง ๆ และพบว่า Kinetin (6-furfuryl aminopurine) ในระดับ 2.5 ppm ให้ผลดีกว่า Cytokinin ทุกชนิด นอกจากนี้ยังพบว่า BA (Benzyladenine) ที่ระดับ 0.25 และ 2.5 ppm ก็สามารถกระตุ้นให้มันฝรั่งสร้างหัวได้เช่นกันแต่ได้ผลไม่ดีเท่ากับ Cytokinin

ผู้ที่ประสบความสำเร็จในการกระตุ้นให้มันฝรั่งสร้างหัวในสภาพปลอดเชื้อคือ Schilde-Rentschler *et al.* (1984a) Schilde-Rentschler *et al.* (1984 b) และ Schilde-Rentschler *et al.* (1984 c). ที่สามารถผลิตหัวได้ประมาณ 0.4-0.8 หัวต่อต้น โดยเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลาประมาณ 60 วัน

การทดลองครั้งนี้จึงมุ่งที่จะหาวิธีการและชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งในสภาพปลอดเชื้อโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1. การหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการทวีจำนวนของยอด
2. การหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างหัว

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การทดสอบอาหารที่เหมาะสมกับการสร้างยอด

อาหารที่ใช้ในการทดลองคือ อาหารมาตรฐานของ Murashige and Skoog (1962) โดยการเปลี่ยนแปลงในส่วนที่เป็นสารอินทรีย์และฮอร์โมนพืชบางอย่าง คือ

อาหารสูตรที่ 1	Indole 3-acetic acid (IAA)	0.30	mg/l
	Adenine sulphate	80.0	mg/l
	N-Isopentenylaminopurine (2-ip)	30.0	mg/l
อาหารสูตรที่ 2	Indole 3-acetic acid (IAA)	0.30	mg/l
	Gibberellic acid (GA ₃)	0.10	mg/l
	Adenine sulphate	80.0	mg/l
อาหารสูตรที่ 3	6-Benzylaminopurine (BAP)	0.54	mg/l
	Indole 3-acetic acid (IAA)	1.50	mg/l
	Gibberellic acid (GA ₃)	0.10	mg/l

อาหารสูตรที่ 4	Indole 3-acetic acid (IAA)	0.30 mg/l
	Gibberellic acid (GA ₃)	0.10 mg/l
	Adenine sulphate	80.0 mg/l
	Benzylaminopurine (BAP)	0.10 mg/l

อาหารทุกชนิดบรรจุในขวดแก้วใส ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซม. และสูง 10 ซม. ขวดละ 12 มล. อบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121°ซ 15 นาที ในแต่ละขวดจะใส่ท่อนพันธุ์มันฝรั่งที่ปลูกในสภาพปลอดเชื้อ 15 คา เก็บไว้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปรับอุณหภูมิ $26 \pm 1^{\circ}$ ซ และให้แสงนาน 16 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนยอดภายหลังที่เลี้ยงได้ 30 วัน

2. การกระตุ้นให้มันฝรั่งสร้างหัวในสภาพปลอดเชื้อ

หลังจากที่ท่อนพันธุ์มันฝรั่งเจริญเติบโตได้พอสมควรแล้ว ถ่ายอาหารที่จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างหัวลงไปแทนอาหารเดิม ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ อาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารที่ได้จากการดัดแปลงจากของ Murashige and Skoog (1962) โดยการเพิ่มน้ำตาล Sucrose ในระดับ 80, 100 และ 120 g/l และใช้ BAP ในระดับ 0 หรือ 5 mg/l หลังจากเปลี่ยนอาหารแล้ว เก็บไว้ในที่มีที่อุณหภูมิ $26 \pm 1^{\circ}$ ซ ตรวจสอบปริมาณหัวที่เกิดทุก 30, 60 และ 90 วัน

ผลการทดลอง

มันฝรั่งที่เลี้ยงในอาหารแต่ละชนิด มีการเจริญเติบโตแตกต่างกันในแง่ของอัตราการเจริญเติบโต และปริมาณของยอดที่เกิดขึ้นหลังจากเลี้ยงในอาหารแล้ว 30 วัน (ตารางที่ 1) ในแง่ของความสมบูรณ์ของต้นนั้น พบว่าอาหารสูตรที่ 1 เป็นอาหารที่ท่อนพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ใบมีลักษณะแผ่เต็มที่และมีสีเขียวเข้ม ลำต้นอวบ แข็งแรง ส่วนอาหารที่ให้ผลใกล้เคียงในด้านความสมบูรณ์ของต้น คือ อาหารสูตรที่ 2 และที่ 4 แต่จะมีลักษณะลำต้นเรียวเล็กกว่าอาหารสูตรที่ 1 ส่วนอาหารสูตรที่ 3 นั้น พบว่ามีการเจริญเติบโตต่ำที่สุด ใบเรียวเล็กและลำต้นพอม

Table 1. Means shoot of virus-free potato obtained from different media after 30 days.

Media	shoots
1	32.67 ^a
2	52.00 ^b
3	30.67 ^c
4	40.67 ^d

Column means with different superscribe are significantly different ($p < 0.05$)

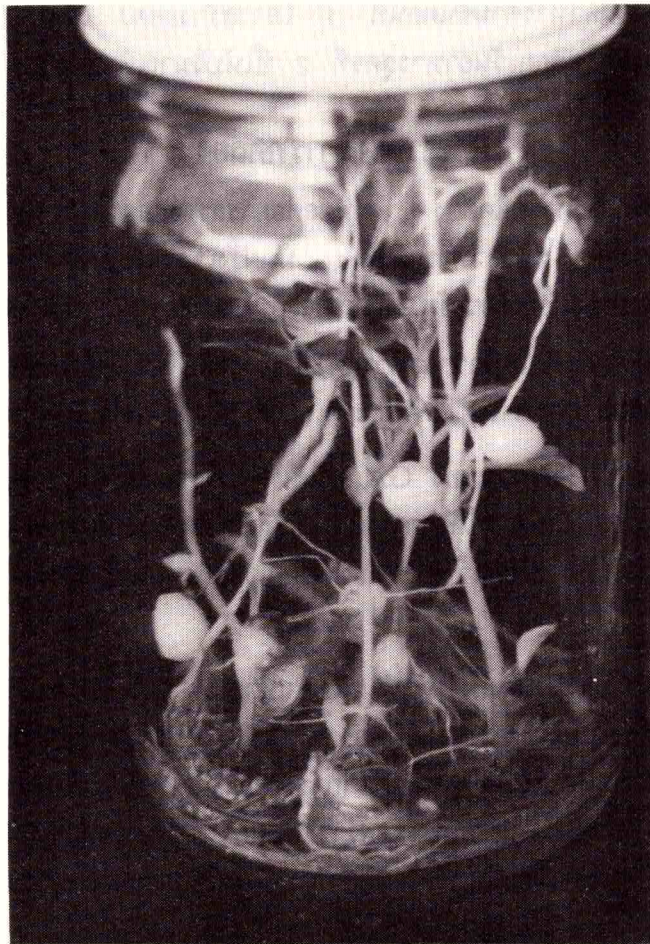


Figure 1. *In vitro* microtuber potato in liquid medium.

ในด้านการกระตุ้นให้สร้างหัวนั้นพบว่า มันฝรั่งจะเริ่มสร้างหัว หลังจากที่ถูกเก็บในที่มืดเพียง 5 วัน และการสร้างหัวนี้จะยังคงติดต่อไปถึงช่วงเกินกว่า 60 วัน ในอาหารบางชนิด ปริมาณและขนาดของหัวที่สร้างในอาหารแต่ละชนิดนั้นจะแตกต่างกันตามชนิดของอาหารที่ใช้ นอกจากนี้ลักษณะการสร้างหัวจะสามารถสร้างทั้งส่วนรากที่ติดกับโคนต้นหรือส่วนบนเหนืออาหาร โดยมีความสมบูรณ์ของหัวไม่แตกต่างกัน (ดังภาพที่ 1) เว้นแต่ในส่วนปลายยอดมักพบว่าหัวมีขนาดเล็กกว่าหัวที่เกิดบริเวณอื่น ๆ โดยเฉลี่ยแล้วปริมาณหัวที่พบจะมีจำนวนตั้งแต่ 4-10 หัวต่อขวด และพบว่าในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลสูงจะให้หัวมีขนาดหัวใหญ่กว่าอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลต่ำ

หลังจากเก็บมันฝรั่งที่สร้างหัวแล้วต่อไปอีกจนถึง 60 และ 90 วัน พบว่ามันฝรั่งจะสร้างหัวจากเดิมที่สร้างได้ 8.7 หัว เพิ่มขึ้นเป็น 10.8 และ 11.1 หัวตามลำดับ (ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ)

มันฝรั่งที่เลี้ยงในอาหารตามขั้นตอนที่ 1 (การสร้างยอด) เกือบทุกชนิดสามารถนำมา กระตุ้นให้มันฝรั่งสร้างหัวได้ดี ยกเว้นอาหารสูตรที่ 2 ที่ให้ปริมาณหัวต่อขวดต่ำมาก

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดสอบอาหารชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการสร้างยอดนั้น พบว่าอาหารสูตรที่ 2 มีปริมาณยอดต่อขวดสูงสุด ส่วนอาหารสูตรที่ 1 มันฝรั่งเจริญเติบโตได้ดีมีความสมบูรณ์ของต้น และใบตลอดจนลักษณะของใบที่เขียวเข้ม ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากการเพิ่ม GA_3 ในอาหารสูตร ที่ 2 จึงทำให้ส่วนลำต้นยึดตัวได้ดีกว่าอาหารสูตรที่ 1 ดังนั้นจึงทำให้เกิดการแตกหน่อของแต่ละ ตาได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้ BAP แทน 2-ip นั้น ให้ผลไม่ดีเท่าการใช้ 2-ip โดยตรง

เป็นที่น่าสังเกตว่า ปริมาณของ GA_3 ที่ใช้ในการทดลองนี้ (0.1 ppm) จะให้ผลดีใกล้เคียงกับที่ Westcott *et al.* (1977) ได้รายงานไว้ ในขณะที่ Westcott *et al.* (1977) ได้ใช้ GA_3 ถึง 3 ppm ความแตกต่างดังกล่าวอาจเนื่องจากขนาดของท่อนพันธุ์มันฝรั่งที่ใช้ในการทดลอง แตกต่าง กัน

ในด้านการเจริญเติบโตของท่อนพันธุ์ในอาหารเหลวเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารแข็ง ปรากฏว่ามันฝรั่งที่เลี้ยงในอาหารเหลวจะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่ามันฝรั่งที่เลี้ยงในอาหาร แข็งถึงเท่าตัว ดังนั้นอาหารเหลวจึงเหมาะแก่การขยายพันธุ์มันฝรั่งในสภาพปลอดเชื้อ แต่ อาหารเหลวมีข้อเสีย คือ ท่อนพันธุ์มันฝรั่งจะสร้าง Callus มากบริเวณที่สัมผัสกับอาหารโดยตรง และอาจเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในขณะปฏิบัติงานได้ง่ายกว่าอาหารแข็ง

สำหรับการกระตุ้นให้มันฝรั่งสร้างหัวนั้นพบว่า อาหารที่ผสม BAP จะให้หัวมันฝรั่งมี ขนาดโตกว่าอาหารที่ปราศจาก BAP ในระดับน้ำตาลที่เท่ากัน เช่นเดียวกับที่ Palmer and Smith (1969) ได้รายงานไว้ อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้พบว่าหลังจากเก็บมันฝรั่งไว้ในที่มีด นานกว่า 30 วัน มันฝรั่งยังสามารถสร้างหัวต่อไปได้อีก ซึ่งขัดแย้งกับงานของ Palmer and Smith (1969) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้ BAP ในปริมาณที่แตกต่างกัน (2.5 และ 5 ppm) ตามลำดับ

อิทธิพลของ GA_3 ที่มีต่อการสร้างหัว พบว่าถ้าเลี้ยงมันฝรั่งในระยะแรก ในอาหารที่มี GA_3 อยู่ในปริมาณมาก เช่นใน อาหารสูตรที่ 2 จะไม่สามารถสร้างหัวเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหาร ที่กระตุ้น ให้สร้างหัว ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณ GA_3 ที่คงเหลืออยู่ในต้นจะมีผลยับยั้งอิทธิพลของ BAP ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างหัวในที่มืดได้

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลงานวิจัยนี้ สรุปได้ว่า การผลิตหัวมันฝรั่งในสภาพปลอดเชื้อสามารถทำได้โดยการ เลี้ยงท่อนพันธุ์มันฝรั่งในอาหารสูตรของ Murashige and Skoog (1962) ซึ่งดัดแปลงโดยเพิ่ม ปริมาณของน้ำตาล Sucrose มีซอร์โโมน Benzylaminopurine (BAP) เป็นองค์ประกอบ

ควรเก็บไว้ในที่มีด ประโยชน์ที่ได้รับคือช่วยให้ประหยัดพื้นที่ในการขยายพันธุ์ การเก็บรักษาพันธุ์ ตลอดจนป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ๆ อีกทั้งยังเป็นการสะดวกในการขนส่ง สิ่ง que ควรศึกษาต่อไปคือ ระยะพักตัวของหัวมันฝรั่ง การทดสอบความงอก การตรวจสอบการเจริญเติบโตของต้น รวมทั้งผลผลิตจากแปลงทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ และการตรวจสอบทางด้านพันธุกรรม เพื่อเปรียบเทียบกับ การปลูกมันฝรั่งด้วยวิธีดั้งเดิม

เอกสารอ้างอิง

- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Palmer, O.E and Smith, O.E. (1969). Cytokinins and tuber initiation in the potato *Solanum tuberosum* L. *Nature* 221 : 279-280.
- Schilde-Rentschler, L., Spinoza, N.E. and Estrada, R. (1984 a). Induction of tubers *in vitro* and their utilization for storage and distribution of potato germplasm. Conference of the European Association of Potato Research, Inter-laken. 6pp.
- Schilde-Rentschler, L., Spinoza, N.E. Estrada, R. (1984 b). Pathogen elimination in potato. Method utilized in tissue culture lab. at CIP. 6 pp.
- Schilde-Rentschler, L. and Schmiediche, P.E. (1984 c). Tissue culture; past, present and future. CIP Circular 12 : 4-5.
- Westcott, R.J., Henshaw, G.G. and Roca, W.M. (1977). Tissue culture storage of potato germplasm : culture initiation and plant regeneration. *Plant Sci. Lett.* 9 : 309-315.
-

