บทความวิจัย (Research Article)

ผลของอะดีนีนซัลเฟตและชนิดน้ำตาลต่อการเจริญและพัฒนาชักนำการเกิดยอดของแคลลัสมะละกอในสภาพปลอดเชื้อ

อดิศักดิ์ อินทนุ[1*], เพียงพิมพ์ ชิดบุรี[1] และ อภิชาติ ชิดบุรี[2]

Effects of adenine sulfate and sugar type on the growth and development of shoots induction of papaya callus *in vitro*

Adisak Intanu[1*], Piengpim Chidburee[1] and Aphichat Chidburee[2]

[1] Faculty of Science and Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Lanna, Lampang, 52000

[2] Agricultural Technology Research Institute, Rajamangala University of Technology Lanna, Lampang, 52000

[*] Corresponding author: tolr51100@gmail.com

Health Science, Science and Technology Reviews. 2023;16(2):67-79.

Received; 10 October 2022; Revised: 13 March 2023; Accepted: 26 July 2023

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นที่แตกต่างกันของอะดีนีนซัลเฟต (Adenine sulfate; Ads) และชนิดของน้ำตาลต่อการเจริญและพัฒนาการชักนำการเกิดยอดของชิ้นส่วนแคลลัสมะละกอ มี 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 การศึกษาระดับความเข้มข้นของ Ads ที่แตกต่างกัน คือ ไม่เติม (ชุดควบคุม), 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมในอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) บันทึกผลหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากผลการทดลองพบว่า ชิ้นส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Ads ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดยอดใหม่ได้มากที่สุด (7.00 ยอดต่อชิ้นส่วน) และความยาวของยอดใหม่มากที่สุด (5.15 มิลลิเมตร) ส่วนการทดลองที่ 2 การศึกษาชนิดของน้ำตาล 2 ชนิด คือ ซูโครสและกลูโคส เปรียบเทียบกับที่ไม่เติมน้ำตาล (ชุดควบคุม) พบว่าร้อยละการเกิดยอดใหม่และจำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนไม่มีความแตกต่างเพื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลทั้งสองชนิด แต่แตกต่างจากการที่ไม่เติมน้ำตาล (ชุดควบคุม) ถึงอย่างไรชิ้นส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมกูลโคสร้อยละ 3 มีจำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนเพิ่มขึ้น

คำสำคัญ: อะดีนีนซัลเฟต, น้ำตาล, แคลลัส, มะละกอ, ในสถาพปลอดเชื้อ

[1] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดลำปาง 52000

[2] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดลำปาง 52000

Abstract

The aim of this research work was to study the different concentrations of adenine sulfate (Ads) and sugar types on papaya's growth and development of shoot-induced callus explants. There were two experiments. The first experiment studied different Ads concentrations: no fill (control), 25, 50 and 75 mg/l. Ads was added to the Murashige and Skoog (MS) medium. Data was recorded for four weeks after culture. The results showed that the callus explants cultured on MS medium added with 50 mg/l Ads have the highest number of new shoots per explant (7.00 shoots per explant) and shoot length (5.15 mm). The second experiment examined two types of sugars, sucrose and glucose, compared with no sugar added (control). The result showed that the percentage of new shoots and the number of new shoots per explant were not different when cultured on both sugar-added media but were different from no sugar added (control). The callus explant cultured on 3% glucose added has an increased number of new shoots per explant.

Keywords: Adenine sulfate, Sugar, Callus, Papaya and *In vitro*

บทนำ

มะละกอ (Papaya) เป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งมีการผลิตมะละกอเพื่อการบริโภคภายในประเทศและเพื่อการส่งออก โดยประเทศไทยมีปริมาณและมูลค่าการส่งออกและผลิตภัณฑ์ของมะละกอ ปี 2564 จำนวน 5,334 ตัน คิดเป็นมูลค่า 481.893 ล้านบาท [1] การขยายพันธุ์มะละกอสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การเพาะเมล็ด การปักชำ การติดตา การตอนกิ่ง และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเกษตรกรส่วนมากนิยมใช้วิธีการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ด เนื่องจากสามารถปฏิบัติได้ง่ายรวดเร็ว และต้นทุนต่ำ เมื่อเทียบกับผลผลิตที่ได้รับ [2] เมล็ดพันธุ์มะละกอที่เกษตรกรเก็บไว้เอง เมื่อนำมาปลูกมีโอกาสเป็นต้นสมบูรณ์เพศ ประมาณร้อยละ 70 ที่เหลือร้อยละ 30 เป็นต้นเพศเมีย และการปลูกมะละกอ ต้องใช้ต้นกล้า จำนวน 3 ต้นต่อหลุม เมื่ออายุ 3-4 เดือน ออกดอกถึงจะทราบเพศของมะละกอ สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ได้กำหนดมาตรฐานรูปทรงผลมะละกอว่า ต้องเป็นผลที่พัฒนามาจากดอกสมบูรณ์เพศชนิด elongata จัดว่าเป็นผลที่มีรูปทรงปกติไม่บิดเบี้ยว ดังนั้นเกษตรกร จะต้องผลิตต้นกล้าจำนวนมาก ส่งผลต่อต้นทุนในกระบวนการผลิต [3]

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชวิธีหนึ่งที่ขยายเพิ่มได้จำนวนมากในระยะเวลาที่รวดเร็ว ด้วยการนำชิ้นส่วนของพืชที่ยังมีชีวิตอยู่ มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อที่มีการควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และแสง โดยชิ้นส่วนของพืชนั้นสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ ซึ่งมีทั้งส่วนใบ ลำต้น และรากที่สามารถย้ายออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้ [4,5] ซึ่งสูตรอาหารมาตรฐานที่นิยมใช้ คือ Murashige and Skoog (MS) แล้วปรับสูตรอาหารให้มีธาตุอาหารตรงตามความต้องการของพืช สูตรอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีองค์ประกอบของสารอาหารที่สำคัญได้แก่ ธาตุอาหารอนินทรีย์ สารประกอบพวกคาร์บอนที่ให้พลังงาน วิตามิน และสารอื่นๆ เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโต และสารอนินทรีย์ที่ได้จากธรรมชาติ โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นสารอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อการแบ่งเซลล์และการขยายเซลล์ นับเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการชักนำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ ได้แก่ ออกซิน ไซโทไคนิน จิบเบอเรลลิน และสารชะลอการเจริญเติบโต ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโทไคนินที่นิยมใช้ คือ 6-benzylaminopurine (BAP) 6-furfurylaminopurine (kinetin) มีส่วนสำคัญในการชักนำให้เกิดยอดและต้น ส่วนกลุ่มของออกซิน คือ Indole-3-acetic acid (IAA) Indole-3-butyric acid (IBA) naphthaleneacetic acid (NAA) มีผลในการชักนำให้เกิดราก ขณะที่อะดีนีนซัลเฟต (Adenine sulfate; Ads) เป็นแหล่งให้ไนโตรเจนที่พืชสามารถรับได้เร็วกว่าสารอนินทรีย์ชนิดอื่น นอกจากนี้ยังมีสารอนุพันธ์ของเพียวรีน (purine) หรือ 6-aminopurine [6] เป็นสารที่

ใส่เพื่อช่วยกระตุ้นการเกิดยอดในพืชบางชนิดที่เกิดยอดได้ค่อนข้างยาก มีรายงานวิจัยของ Afshan *et al.* [7] ทำการศึกษาผลของ Ads ต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการเกิดยอดและการยับยั้งการตายของเซลล์เนื้อบริเวณปลายยอดภายใต้สภาพในหลอดทดลองของต้นหว้า พบว่า อะดีนีนซัลเฟต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Benzyladenine (BA) 10 ไมโครโมลาร์ เป็นตัวกลางชักนำการเกิดยอดสูงที่สุด (14 ยอด) และยับยั้งการตายของเซลล์เนื้อบริเวณปลายยอด รายงานของ Jaiswal *et al*. [8] การเพิ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการเพาะเลี้ยงแคลลัสของชะเอมเทศด้วยการเพิ่มการสะสมสาร ชีวมวล ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Ads สำหรับการสะสมชีวมวลสูงสุด 16.79 กรัมต่อขวดปริมาตร พบว่า ความเข้มข้นที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดยอดใช้เวลาจำนวน 20 วัน นอกจากนี้ยังพบว่า Ads ช่วยกระตุ้นปริมาณสารที่แตกต่างกันเป็น 3-4 เท่า ในเนื้อเยื่อแคลลัสเมื่อเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาที่เติม Ads ลงในอาหารเพาะเลี้ยงพืช เช่น สับปะรด [9] และมะละกอ [10] ส่วนน้ำตาลมีความจำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอน [11] ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะใส่น้ำตาลเพื่อทำให้เกิดการเจริญเติบโตของพืช และกระบวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอในระยะต่างๆ โดยน้ำตาลที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ ซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส มอลโตส แลกโตส กาแลกโตส กลีเซอรอล ซอร์บิทอล และแมนนิทอล [12] โดยซูโครส (Sucrose) เป็นน้ำตาลประเภทไดแซ็กคาไรด์ มี 1 โมเลกุลที่ประกอบไปด้วยมอโนแซ็กคาไรด์ 2 โมเลกุล คือ กลูโคส และฟรุคโตส [13] ส่วนกลูโคส (Glucose) เป็นน้ำตาลประเภทโมโนแซ็คคาไรด์ มีความสำคัญในการสร้างคาร์โบไฮเดรต เป็นผลผลิตจากการสังเคราะห์แสง และยังมีผลต่อการหายใจของเซลล์ [14,15] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของอะดีนีนซัลเฟตและชนิดของน้ำตาลต่อการเจริญและพัฒนาการชักนำเกิดยอดของมะละกอในสภาพปลอดเชื้อ

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ใช้อาหารกึ่งแข็งสูตร MS หลังจากนั้นเติมอะดีนีนซัลเฟต (Ads) ที่ระดับความเข้มข้นตามกรรมวิธี ส่วนในการทดลองชนิดของน้ำตาล คือ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครส ร้อยละ 3 เติมเสริมด้วย BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA (Gibberellic acid) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในแต่ละการทดลองปรับความเป็นกรดเป็นด่าง ให้ได้ 5.7 แล้วนำอาหารใส่ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางเมตร เป็นเวลา 15 นาที [16]

การเตรียมพืชทดลอง

นำชิ้นส่วนแคลลัสมะละกอสายพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ได้เป็นเวลา 8 สัปดาห์มาทำการตัดชิ้นส่วนแคลลัสมะละกอให้เป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมมีขนาดกว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาว 0.5 เซนติเมตร และลึก 0.5 เซนติเมตร

การศึกษาทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของระดับความเข้มข้นแตกต่างกันของ Ads คือ ไม่เติม (ชุดควบคุม: control), 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design :CRD) มี 4 กรรมวิธี ๆ ละ 10 ซ้ำ (ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วน) นำชิ้นส่วนแคลลัสมะละกอที่ได้เตรียมไว้ปักในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารของแต่ละกรรมวิธี

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของชนิดน้ำตาล 2 ชนิด คือ ซูโครส และ กลูโคส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์มี 3 กรรมวิธี ๆ ละ 10 ซ้ำ (ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วน) ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนแคลลัสมะละกอลงในอาหารของแต่ละกรรมวิธีโดยใช้ขนาดแคลลัสมะละกอเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

หลังจากนั้นนำอาหารที่ได้จากทั้ง 2 การทดลอง ไปวางเลี้ยงบนชั้นในห้องที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที และความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ ร้อยละ 70-80

การบันทึกข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ ทำการบันทึกข้อมูล ได้แก่ ร้อยละการเกิดยอดใหม่ จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน (ยอดต่อชิ้นส่วน) ความยาวเฉลี่ยของยอดใหม่ (มิลลิเมตร) โดยวัดจากโคนไปยังปลายยอด น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของชิ้นส่วน (กรัม) โดยบันทึกน้ำหนักแห้งของชิ้นส่วนหลังจากนำชิ้นส่วนเข้าตู้อบลมร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 วัน แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในชิ้นส่วน [17] แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ MiniTab 22 เพื่อหาค่าความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย LSD (Least Significant Difference) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

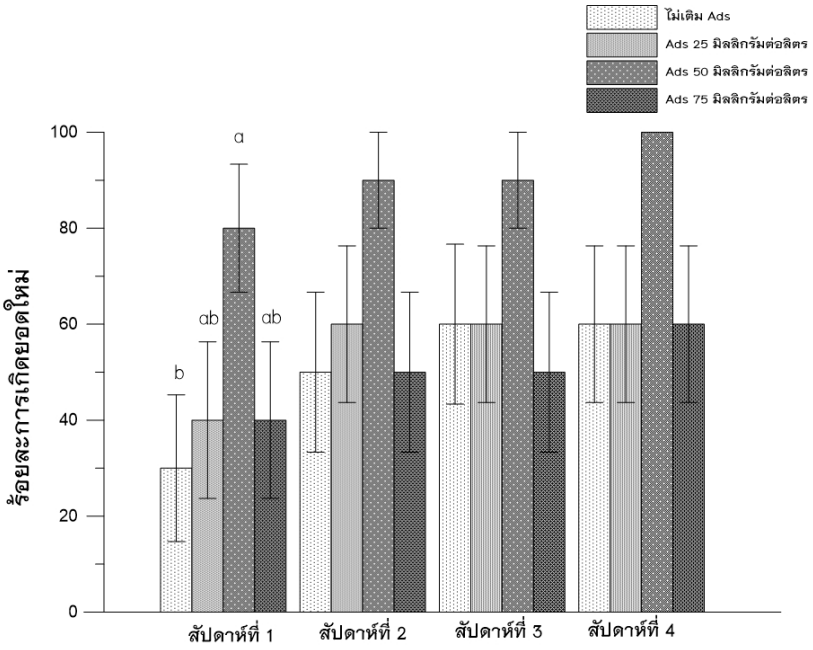
ผลการศึกษา

ผลของระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ Ads พบว่า ร้อยละการเกิดยอดใหม่ในสัปดาห์ที่ 1 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Ads ความเข้มข้น 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร (ร้อยละ 40, 80 และ 40 ตามลำดับ) โดย Ads ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีร้อยละการเกิดยอดใหม่มากกว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม Ads ส่วนกรรมวิธีต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 2-4 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 4 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Ads ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ร้อยละการเกิดยอดใหม่มากที่สุด (ร้อยละ 100) (ภาพ 1) สำหรับจำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วน เมื่อเพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 1-2 ของแต่ละกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกัน (อยู่ในช่วง 2.67±0.67-3.50±0.29 และ 2.80±0.58-4.80±0.58 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ) ส่วนสัปดาห์ที่ 3 และ 4 ในแต่ละกรรมวิธีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่สัปดาห์ที่ 3 หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Ads ความเข้มข้น 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดยอดใหม่มากที่สุด คือ 5.89±1.14 และ 5.80±0.48 ยอดต่อชิ้นส่วน ส่วนสัปดาห์ที่ 4 ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม Ads ความเข้มข้น 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร (4.50±1.28, 7.00±1.33 และ 6.33±0.95 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ) มีจำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนที่มากกว่ากรรมวิธีที่ไม่เติม Ads (ภาพ 2) เช่นเดียวกับความยาวของยอดใหม่ กรรมวิธีที่เติม Ads ความเข้มข้น 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร (4.03±1.13, 5.15±0.50 และ 3.87±0.89 มิลลิเมตร ตามลำดับ) และมีความยาวของยอดใหม่ที่มากกว่าที่ไม่เติม Ads (ภาพ 3) ส่วนน้ำหนักสดของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ พบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Ads ความเข้มข้น 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักสดของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมากที่สุด คือ 0.3225±0.0132 และ 0.2575±0.05603 กรัม ตามลำดับ (ภาพ 4) เช่นเดียวกับน้ำหนักแห้งของชิ้นส่วน พบว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Ads ความเข้มข้น 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักแห้งของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมากที่สุด คือ 0.0276±0.00196 และ 0.0218±0.00398 กรัม ตามลำดับ (ภาพ 5) นอกจากนี้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ บี และ รวมของชิ้นส่วนในทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่พบว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Ads ความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ บี และ รวมมากที่สุด (ตาราง 1)

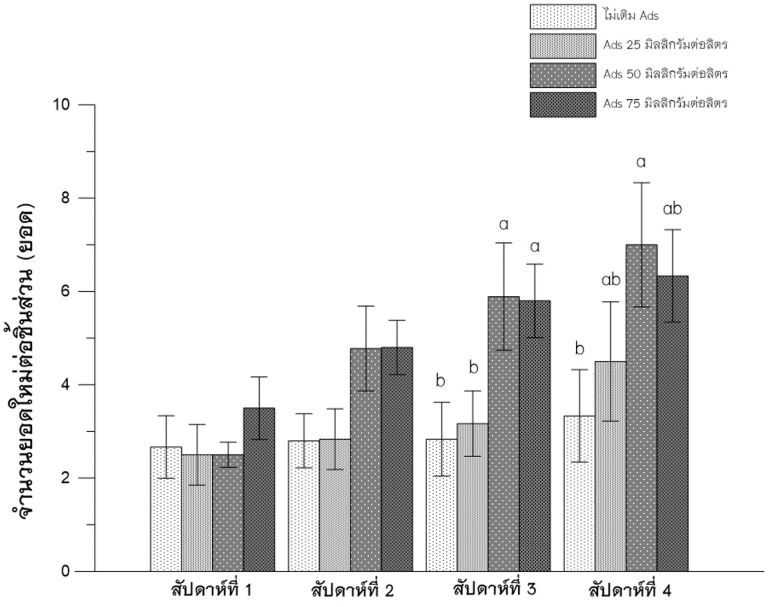
สำหรับผลของชนิดน้ำตาล พบว่า ร้อยละการเกิดยอดใหม่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครส ในสัปดาห์ที่ 1-4 มีมากกว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมน้ำตาล (ชุดควบคุม) แต่การเติมน้ำตาลทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพ 6) เช่นเดียวกับจำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วน ในสัปดาห์ที่ 1 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสัปดาห์ที่ 2-4 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลกูลโคส และน้ำตาลซูโครส มีจำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนมากกว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมน้ำตาล (ชุดควบคุม) แต่การเติมน้ำตาลทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาพ 7) ส่วนความยาวของยอดใหม่และน้ำหนักสดของชิ้นส่วนในทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกัน แต่น้ำหนักแห้งของชิ้นส่วนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่

เติมน้ำตาลทั้งสองมีน้ำหนักแห้งมากกว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมน้ำตาล ทำนองเดียวกับปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และรวมของชิ้นส่วน (ตาราง 2)

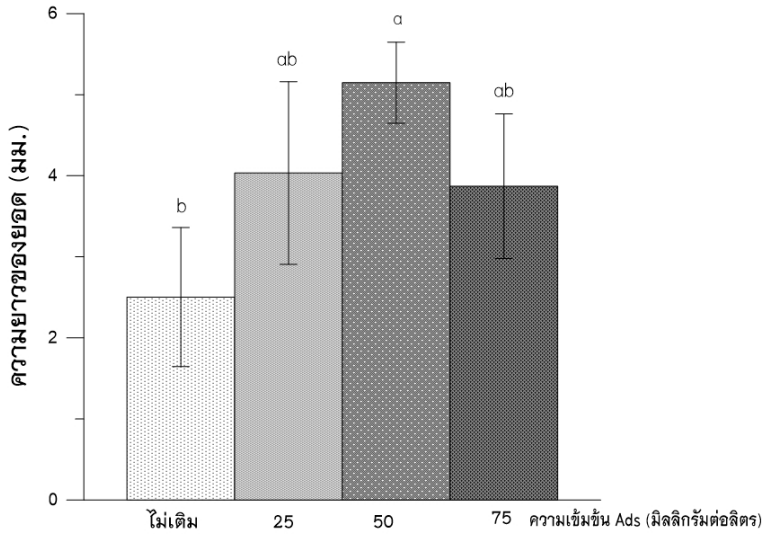
ลักษณะการเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนแคลลัสมะละกอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Ads ความเข้มข้นต่างๆ และน้ำตาลชนิดที่แตกต่างกัน ในแต่ละสัปดาห์ (ภาพ 8 และภาพ 9)



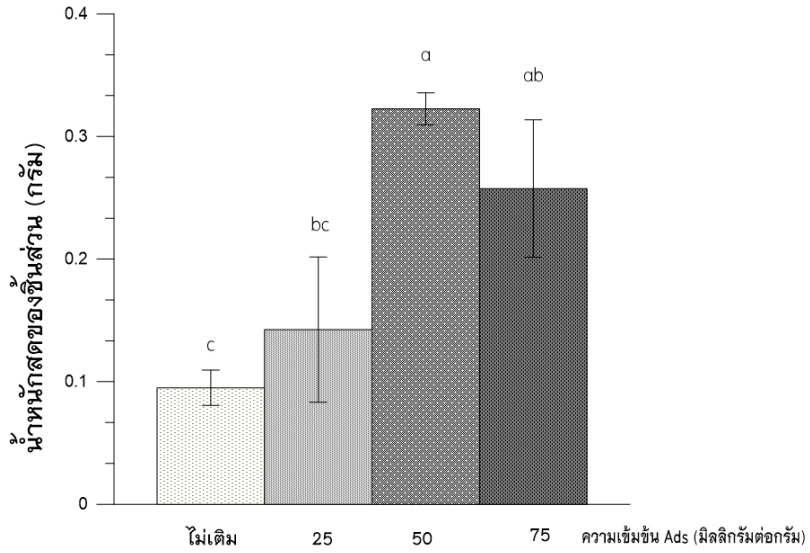
ภาพ 1 ร้อยละการเกิดยอดใหม่ ของชิ้นส่วนแคลลัสมะละกอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Ads ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์



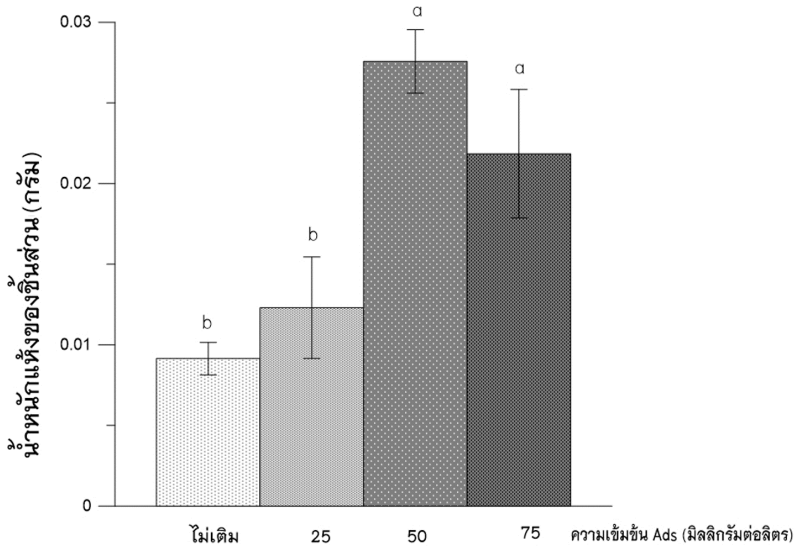
ภาพ 2 จำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนแคลลัสมะละกอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Ads ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพ 3 ความยาวของยอดใหม่ ของชิ้นส่วนแคลลัสมะละกอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Ads ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพ 4 น้ำหนักสดของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมะละกอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Ads ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

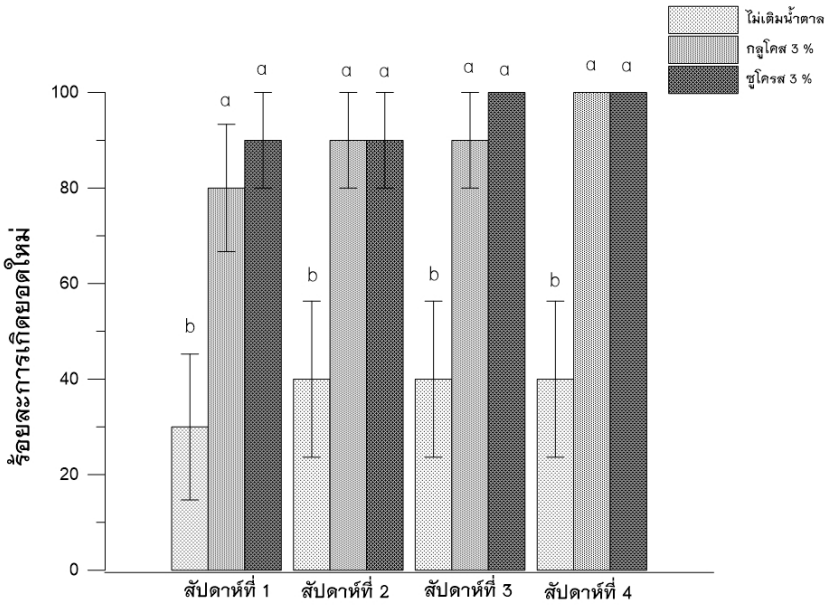


ภาพที่ 5 น้ำหนักแห้งของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมะละกอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Ads ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

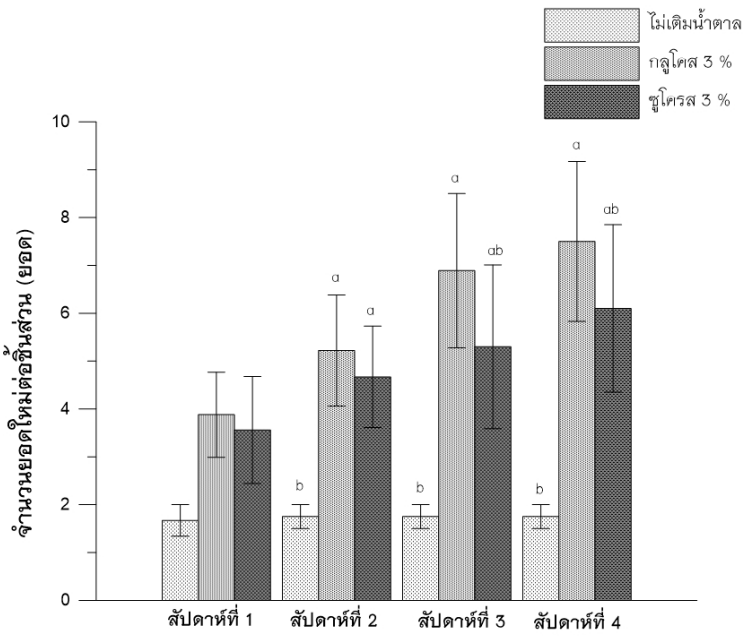
ตาราง 1 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และรวมของชิ้นส่วนแคลลัสมะละกอที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม Ads ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ระยะความเข้มข้นของ อะดีนีนซัลเฟต (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาณคลอโรฟิลล์ของชิ้นส่วน (มิลลิกรัมต่อกรัม)		
	เอ	บี	รวม
ไม่เติม (ชุดควบคุม)	0.1644±0.0727ab[1/]	0.0690±0.0993 [ns]	0.2334±0.1240 [ns]
25	0.0188±0.0034b	0.0400±0.0132	0.2164±0.1453
50	0.0798±0.0551ab	0.0147±0.1060	0.2268±0.1610
75	0.2051±0.0091a	0.0801±0.1270	0.2498±0.1543
$LSD_{0.05}$	0.1496	0.3153	0.4789

หมายเหตุ: [ns] = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (not significant), [1/] = ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (*P<0.05*), ค่าเฉลี่ย (mean) ±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (SE) (n=10)



ภาพ 6 ร้อยละการเกิดยอดใหม่ ของชิ้นส่วนแคลลัสมะละกอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

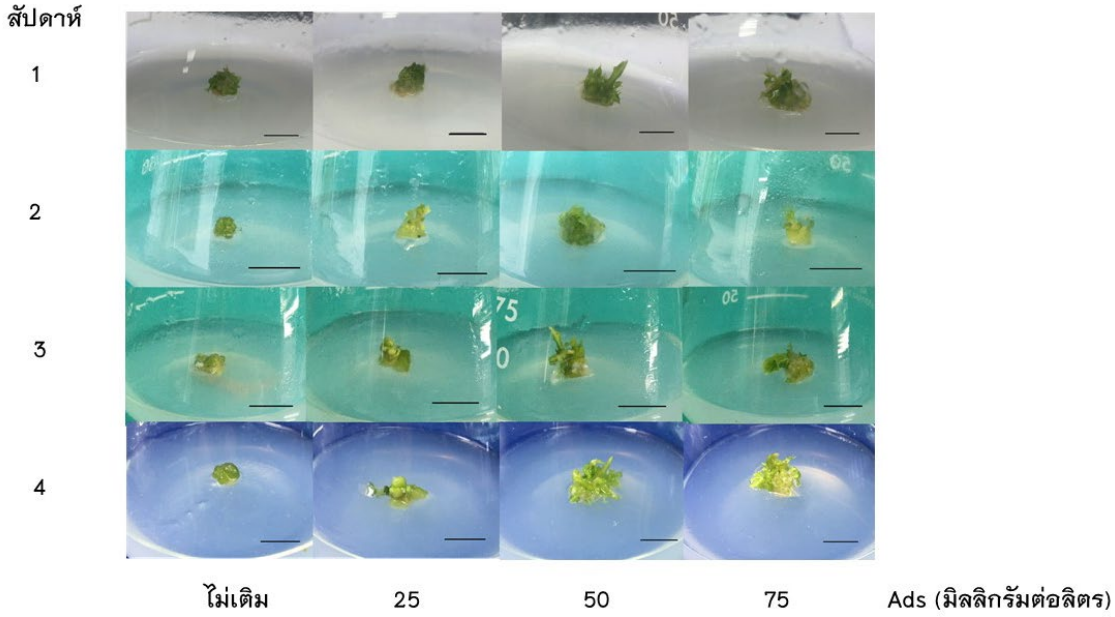


ภาพ 7 จำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนแคลลัสมะละกอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

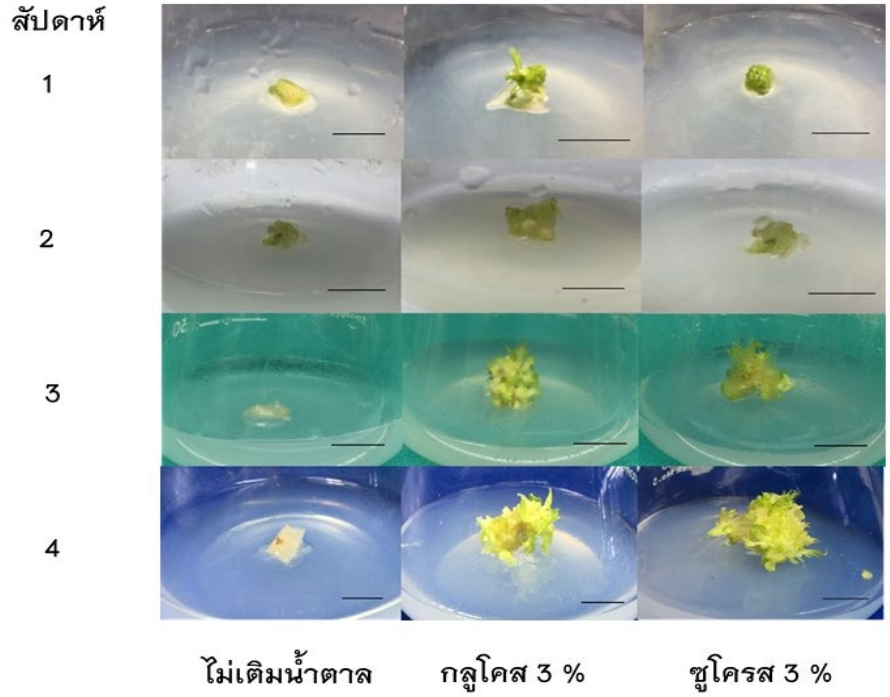
ตาราง 2 ความยาวของยอด น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของชิ้นส่วน และปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และรวมของชิ้นส่วนแคลลัสมะละกอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ชนิดน้ำตาล	ความยาวของยอดใหม่ (มิลลิเมตร)	น้ำหนักชิ้นส่วน (กรัม)	
		น้ำหนักสด	น้ำหนักแห้ง
ไม่เติมน้ำตาล(ชุดควบคุม)	2.50±1.35^{ns}	0.18±0.01^{ns}	0.0025±0.0001b$^{1/}$
กลูโคส 3 %	3.68±0.56	0.64±0.22	0.0477±0.0072a
ซูโครส 3 %	3.48±0.92	0.66±0.20	0.0404±0.0097a
$LSD_{0.05}$	2.08	0.56	0.0223
	ปริมาณคลอโรฟิลล์ของชิ้นส่วน (มิลลิกรัมต่อกรัม)		
	เอ	บี	รวม
ไม่เติมน้ำตาล(ชุดควบคุม)	- 0.1072±0.0090b$^{1/}$	0.1961±0.0165b$^{1/}$	- 0.3047±0.0241c$^{1/}$
กลูโคส 3 %	0.1818±0.0821a	0.0425±0.0386ab	0.1393±0.0441b
ซูโครส 3 %	0.1322±0.0968ab	0.2525±0.1905a	0.3847±0.1096a
$LSD_{0.05}$	0.2542	0.3898	0.2409

หมายเหตุ : ^{ns} = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (not significant), $^{1/}$ = ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (*P<0.05*), ค่าเฉลี่ย (mean) ±ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (SE) (n=10)



ภาพ 8 ลักษณะการเจริญ และพัฒนาการของยอดใหม่จากชิ้นส่วนแคลลัสมะละกอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Ads ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (แถบ = 1 เซนติเมตร)



ภาพ 9 ลักษณะการเจริญ และพัฒนาการของยอดใหม่จากชิ้นส่วนแคลลัสมะละกอที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลชนิดต่าง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (แถบ = 1 เซนติเมตร)

สรุปผลและอภิปรายผล

จากการศึกษาผลระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ Ads ต่อร้อยละการเกิดยอดและการชักนำการเกิดยอดจากชิ้นส่วนแคลลัสไม่แตกต่างกัน โดยความเข้มข้นของ Ads ที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเติมลงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ทำให้มีจำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนที่เพิ่มมากขึ้น โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการไม่เติม Ads ซึ่งสอดคล้องกับ Sermsiri *et al.* [18] ที่ได้ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของสักในสภาพหลอดทดลอง เมื่อเติม Ads ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด จำนวน 5.83 ยอดต่อข้อ ซึ่งมากกว่าการไม่เติม Ads และเช่นเดียวกับการศึกษาของ Namita *et al.* [19] ทำการศึกษาวิธีขยายพันธุ์พืช *Capparis decidua* เพื่อการค้าและ Priyanka *et al*. [20] ศึกษาการขยายพันธุ์ส้ม (*Citrus reticulata* Blanco) สำหรับการเจริญเติบโตของชิ้นส่วน ความยาวของยอดใหม่ น้ำหนักสดของชิ้นส่วนและน้ำหนักแห้งของชิ้นส่วน ไม่มีความแตกต่างกันในทุกกรรมวิธี แต่ความเข้มข้นของ Ads ที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยความยาวของยอดใหม่ น้ำหนักสดของชิ้นส่วน และน้ำหนักแห้งของชิ้นส่วนมากกว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม Ads สอดคล้องกับงานวิจัยของ Umnouysin *et al* [21] ได้ทำการเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง พบว่า Ads ทำให้มันสำปะหลังมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด ทั้งในด้านความสูงและน้ำหนักสด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการไม่เติม Ads เนื่องจาก Ads มีส่วนช่วยควบคุมการเจริญเติบโตซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มไซโทไคนิน และเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีอิทธิพลต่อการสร้างโปรตีน ทำให้ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ยอด ลำต้น และใบ ทำให้มีปริมาณเซลล์สูงขึ้น [22,23] เกิดการพัฒนารูปร่างของเซลล์พืช และส่งผลการเจริญเติบโตของพืช [24] ส่วนปริมาณของคลอโรฟิลล์ ด้านคลอโรฟิลล์ เอ ไม่แตกต่างกัน แต่ความเข้มข้น Ads ที่ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยสูงสุด ส่วนด้านคลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวม ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ อาจจะเนื่องมาจากความเข้มข้นของ Ads ไม่มากพอ สำหรับการเป็นสารอนินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์เนื่องจาก Ads มีสารอนุพันธ์ของไนโตรจีนัสเบส (nitrogenous base) อะดีนีน [25]

ส่วนการศึกษาผลของชนิดน้ำตาล คือ ซูโครส และกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 3 พบว่า ร้อยละการเกิดยอดใหม่ไม่แตกต่างกัน แต่ในสัปดาห์ที่ 3 ของการใช้น้ำตาลซูโครสร้อยละ 3 มีร้อยละการเกิดยอดใหม่ ร้อยละ 100 และในสัปดาห์ที่ 4 น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นร้อยละ 3 ร้อยละการเกิดยอดใหม่มากที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิตกับไม่เติมน้ำตาล ส่วนจำนวนยอดของชิ้นส่วนไม่แตกต่างกัน การเติมน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 3 ทำให้แคลลัสมะละกอมีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนสูงสุด เช่นเดียวกับน้ำตาลซูโครส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mohanty *et al.* [26] ศึกษา *Curcuma aromanic* โดยเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 3 ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS พบว่า สามารถทำให้แคลลัสเกิดเป็นยอดใหม่ได้ ส่วน Jala [27] ศึกษาการชักนำยอดใหม่ของ *Curcuma longu* บนอาหารสูตร MS ที่เติม น้ำตาลซูโครส ร้อยละ 3 ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้แคลลัสเกิดเป็นยอดใหม่จำนวนมาก ด้านการเจริญเติบโต ความยาวของยอด และน้ำหนักสด ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ น้ำหนักแห้ง พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต โดยน้ำตาลซูโครสและกลูโคสร้อยละ 3 มีค่าน้ำหนักแห้งมากที่สุด ขณะที่ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ บี และคลอโรฟิลล์รวม ของชิ้นส่วนยอด พบว่า น้ำตาลซูโครสร้อยละ 3 มีปริมาณคลอโรฟิลล์รวมมากที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต สอดคล้องกับการรายงานของ Vu *et al*. [28] รายงานว่าน้ำตาลซูโครสเป็นพวก non-reducing sugar และยังทำหน้าที่ในการพาสารอื่น ๆ ด้วย จึงทำให้เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง และก่อให้เกิดการสังเคราะห์และการสะสมโปรตีน

การศึกษาระดับความเข้มข้นของ Ads และชนิดของน้ำตาลต่อการเจริญและพัฒนาการชักนำการเกิดยอดของมะละกอในสภาพปลอดเชื้อ สรุปว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม Ads ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 3 เป็นสูตรที่เหมาะสมที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร และสถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ที่ช่วยอนุเคราะห์สถานที่ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

[1] Office of Agricultural Economics. Exports of agricultural products and products of Thailand. In the report of Thai agricultural products trade with foreign countries for the year 2021. Office of Agricultural Economics 2022;1-75.

[2] Yingyong P. Plant Propagation. 1thed. Bangkok: Baanlaesuan Publishing; 2019.

[3] Penkhae R, Kiriya S and Kanjana L. Propagation of papaya (*Carica papaya* L.) cv. Holland in tissue culture. Khon Kaen AGR. J 2019;47(3):459-66.

[4] Petcharat C. Plant tissue culture technology for agriculture. Bangkok: Bangkok Thonburi University;2023.

[5] Phongyuth N, Aphichat C and Pitak P. Plant Propagation by Plant Tissue Culture Technique. Rajamangala Institute of Technology 2019;40 p.

[6] Noguchi L, Uscharee R, Somkiat S and Somchai W. Effect of disinfectants and plant growth regulator in aquatic plant *Bucephalandra* sp. micropropagation. King Mongkut's Agricultural Journal 2017;35:95-103.

[7] Afshan N, Anwar S, and Mohammad A. Effect of adenine sulphate interaction on growth and development of shoot regeneration and inhibition of shoot tip necrosis under *In Vitro* condition in adult *Syzygium cumini* L.—a multipurpose tree. Appl Biochem Biotechnol 2014;173:90–102.

[8] Nancy J, Yashodhara V and Pragati M. Elicitation enhanced the production of bioactive compound and biomass accumulation in callus cultures of *Glycyrrhiza glabra* L. *In Vitro*. Cellular and Developmental Biology – Plant 2021;58:427–436.

[9] Badou BT, Agbidinoukoun A, Cacai GTH, Dossoukpevi RC and Ahanhanzo C. Effects of system benzylaminopurine-adenine sulphate in combination with naphthalene acetic on *in vitro* regeneration and proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Mill var. comosus). Int. J. Pure, Appl, Biosci 2017;9:1-15.

[10] Siriwan B, Vanida C, and Supat A. Effects of plant growth regulators on papayas (*Carica papaya*) cultured *in vitro*. Kasetsart Journal (Natural Sciences) (Thailand) 1988;22(5):1-6.

[11] Bonga JM, and Aderkas P. In vitro culture of trees. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers, Chicago;1992;236 p.

[12] Akhtar A, Zink D and Becker PB. Chromodomains are protein-RNA interaction modules. Nature 2000;407(6802):405-409.

[13] Yudkin J, Edelman J and Hough L. Sugar: Chemical, Biological and Nutritional Aspects of Sucrose, Butterworth 1973;ISBN 978-0-408-70172-3.

[14] Ponomarev VV, and Migarskaya LB. Heats of combustion of some amino-acids. Russ. J. Phys, Chem, (Engl. Transl.) 1960;34:1182–3.

[15] Boerio-Goates J. Heat-capacity measurements and thermodynamic functions of crystalline α-D-glucose at temperatures from 10K to 340K. J. Chem, Thermodynam.1991;23(5):403–9.

[16] Biondi S and Thorpe TA. Clonal propagation of forest tree species. In: Rao, A.N. (ed.): Proceedings COSTED Symposium on Tissue Culture of Economically Important Plants. ANBS, National University, Singapore 1981;pp.197-204.

[17] Moran R. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with. N,N-dimethylformamide. Journal of Plant Physiology 1982;69:1376-81.

[18] Sermsiri C, Yaowaphan S, Prakay O and Sontichai C. Shoots induction from *in vitro* node of teak. King Mongkut's Agricultural Journal 2018;36(2):126-34.

[19] Namita V, Sarita A and Arya ID. Rapid and mass propagation of the economically important desert plant capparis decidua for its afforestation program. Journal of Arid Land Studies 2014;24-1:33-6.

[20] Priyanka S, Swati C, Anita RG, Poonam D, Jyoti R, Kavita S, et al. Effects of adenine sulphate, glutamine and casein hydrolysate on *in vitro* shoot multiplication and rooting of Kinnow mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). African Journal of Biotechnology Vol 2012;11(92):15852-62.

[21] Umnouysin S, Thepsithar C and Obsuwan K. The comparative study on an appropriate medium for in vitro growth of cassava (*Manihot esculenta* Cratz). Agricultural Sci. J 2009;40(1):169-72.

[22] Somboon T. Plant physiology. green fence publishing house, Bangkok;1995.206 p.

[23] Murashige T. Plant propagation through tissue culture. Annu. Rev, Plant Physiol 1974;25:135–66.

[24] Waraporn C. Plant growth regulators. Faculty of Science and Technology Nakhon Sawan Rajabhat University;2010.147 p.

[25] Siwapong C. Plant tissue culture. Faculty of Science and Technology Rajabhat Institute Udon Thani, Udon Thani;2003.

[26] Mohanty S, Panda MK, Subudhi E and Nayak S. Plant regeneration from callus culture of curcuma aromatica and *in vitro* detection of somaclonal variation through cytophotometric analysis. Biol, Plant 2008;52:783-6.

[27] Jala A. Effects of NAA, BA and sucrose on shoot induction and rapid micro-propagation by trimming shoot of *Curcuma longa* L. Amer. Trans, Eng, Appl, Sci 2011;3(2):101-9.

[28] Vu JCV, Niedz RP and Yelenosky G. Glycerol stimulation of chlorophyll synthesis, embryogenesis andcarboxylation and sucrose metabolism enzymes in nucellar callus of “Hamlin” sweet orange. Plant Cell Tissue Org, Cult 1993;33:75-80.