

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2562

1. แผนการวิจัย การอนุรักษ์ความหลากหลายของทรัพยากรพันธุกรรมพืช
2. โครงการวิจัย โครงการวิจัยเทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชกรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2 เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ

3. ชื่อการทดลอง การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชสกุลกลอยในรูปหัวจืดในสภาพปลอดเชื้อ

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง นางสาวภทริยา สุทธิเชื่อนาค¹ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมงาน : 1. นางสาวสุพินญา บุญมานพ¹

: 2. นายวรกิจ ห่องแสง¹

5. บทคัดย่อ:

การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชสกุลกลอยในสภาพปลอดเชื้อมีหลายรูปแบบ วิธีการหนึ่งที่น่าสนใจคือการอนุรักษ์ในรูปหัวจืด โดยทำการศึกษาพืชสกุลกลอยที่ใช้หัวในการบริโภค 5 ชนิด ได้แก่ กลอย มันจาวมะพร้าว มันนก มันอ่อน และมันเหน็บ ปลุกเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลกลอยทั้ง 5 ชนิด พบว่า สูตร MS + BA 20mg/l + NAA 4 mg/l + ผงถ่าน จะให้ต้นที่แข็งแรง และมีจำนวนยอดมากกว่า เหมาะที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต้นให้เพียงพอสำหรับการทดลองหาสูตรชักนำให้เกิดหัวจืด ส่วนปริมาณน้ำตาลและสารชะลอการเจริญเติบโต (อาลาร์-8) ไม่มีผลต่อการเกิดหัวจืดในพืชสกุลกลอยทั้ง 5 ชนิด

คำสำคัญ: การชักนำให้เกิดหัวจืดในสภาพปลอดเชื้อ การอนุรักษ์พันธุกรรมพืช พืชสกุลกลอย

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ 85 หมู่ 1 ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

^{1/} Biotechnology Research and Development Office, Rangsit, Thanyaburi, Pathum Thani, 12110

6. คำนำ

พืชสกุลกลอย (Dioscorea) เป็นพืชที่มีการแพร่กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย มีการนำมาใช้ประโยชน์ตามภูมิปัญญาท้องถิ่น ทั้งที่ใช้เป็นอาหาร และยารักษาโรค ส่วนใหญ่จะเก็บจากป่าหรือสภาพธรรมชาติ มีบ้างที่ปลูกแซมใต้ต้นไม้ตามหัวไร่ปลายนา ดังนั้นเมื่อพื้นที่ป่าถูกทำลายมากขึ้นและพื้นที่เมืองขยายตัว พืชสกุลนี้ จึงค่อยสูญหายไปก่อนที่จะเรารู้จักและนำมาใช้ประโยชน์อย่างจริงจัง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพจึงได้เก็บรวบรวมพืชสกุลกลอยจากแหล่งต่างๆมาปลูกรวบรวม เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำแนกชนิดพันธุ์ โดยมีเป้าหมายเพื่ออนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชหัวพื้นเมืองในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช เบื้องต้นได้ศึกษาเทคนิคการเก็บเป็น germplasm เนื่องจากไม่มีเมล็ดพันธุ์ให้เก็บ ซึ่ง Okoli, 1991 ได้กล่าวว่า เป็นการเก็บรวบรวมพันธุ์ที่ปลอดภัย อีกทั้งเป็นวิธีการเก็บสำรองพันธุ์ที่ดี

แต่จากการเกิดมหาอุทกภัยในปี 2554 ทำให้ได้ทราบว่าไม่ได้เป็นตามคำกล่าวนั้นเลยกล่าวคือ การที่น้ำท่วมขังในแปลงรวบรวมพันธุ์สูงกว่าครึ่งเมตรเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน เมื่อน้ำลดจะมีเพียงชนิดพันธุ์ที่มีการลงหัวเร็วเท่านั้นที่รอดชีวิต ส่วนต้น germplasm ในสภาพปลอดภัย เมื่อน้ำท่วมขังห้องปฏิบัติการทำให้ไม่มีไฟฟ้าควบคุมอุณหภูมิและแสงสว่างต้นเหล่านั้นก็ตายหมด จึงจำเป็นต้องหาวิธีการเก็บรักษาพันธุ์กรรมที่ปลอดภัยกว่า โดยชักนำให้เกิดหัว (tuber) ในสภาพปลอดภัย ซึ่งการเก็บรักษาหัวพันธุ์ในช่วงวิกฤติที่ไม่มีไฟฟ้า โอกาสที่จะรอดชีวิตน่าจะสูงกว่าการเก็บแบบ germplasm

7. วิธีดำเนินการ

1. รวบรวมพันธุ์พืชสกุลกลอยที่ใช้หัวในการบริโภค 5 ชนิด ได้แก่ กลอย มันจาวมะพร้าว มันนก มันอ่อน และมันเหน็บ ปลูกเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลกลอยในสูตรอาหาร MSดัดแปลง เพื่อขยายจำนวนต้นให้เพียงพอต่อการทดลองการเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโต และการชักนำให้เกิดหัว

3. ตัดชิ้นส่วนตาข้างสำหรับการทดลองดังนี้

- 3.1 การศึกษาความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักร่วมกับปริมาณน้ำตาล วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ทำการทดลอง 3 ปัจจัย จำนวน 10 ซ้ำ

- 3.1.1 พันธุ์พืชสกุลกลอย 5 ชนิด

- 3.1.2 ธาตุอาหารหลัก MSดัดแปลง 2 สูตร ได้แก่ $\frac{1}{2}$ MS และ $\frac{1}{4}$ MS

- 3.1.3 ปริมาณน้ำตาล 3 ระดับ ได้แก่ 10 50 และ 100 กรัมต่อลิตร

- 3.2 การศึกษาการใช้สารชะลอการเจริญเติบโต (growth regulator) วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ทำการทดลอง 2 ปัจจัย จำนวน 10 ซ้ำ

3.2.1 พันธุ์พืชสกุลกลอย 5 ชนิด

3.2.2 ความเข้มข้นของ อาลาร์-85 5 ระดับ ได้แก่ 0 10 50 100 และ 500 มิลลิกรัม

ต่อลิตร

4. นำต้นอ่อนที่ผ่านการเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ ออกปลูก เพื่อดูอัตราการรอดชีวิต

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. รวบรวมพันธุ์พืชสกุลกลอยที่ใช้หัวในการบริโภค 5 ชนิด

2. นำชิ้นส่วนตาข้างพันธุ์พืชสกุลกลอยทั้ง 5 ชนิด เพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อขยายปริมาณต้น เพื่อใช้ในการทดลองศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโต และการชักนำให้เกิดหัวจืด 2 เทคนิค

3. บันทึกข้อมูลการรอดชีวิตและการเจริญเติบโต และนำต้นอ่อนพืชสกุลกลอยออกปลูกในสภาพโรงเรือน เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินการทดลอง เริ่มตั้งแต่ ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2561

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช กลุ่มวิจัยพัฒนารณาการเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (บางเขน)

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ทำการฟอกฆ่าเชื้อจากตาข้างของกลอย (*Dioscorea alata*) ด้วย Clorox ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ที่ความเข้มข้น 10% 10นาที่ ได้ต้นที่ยังมีชีวิต และปลอดเชื้อ 20% นำต้นที่ได้มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA 5mg/l เพื่อให้เจริญเติบโต จนมีใบ2-3ใบ จึงตัดข้อลงเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเพื่อเพิ่มปริมาณต้น พบว่าเมื่อเลี้ยงไปสัปดาห์1-2 อาหารจะเริ่มเปลี่ยนสีเข้มขึ้น จึงทดลองย้ายลงอาหารสูตรเดิม แต่ใส่ผงถ่าน โดยทดลองเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างสูตรที่มีผงถ่านกับไม่มีผงถ่านสูตรที่ใส่ผงถ่าน ใบจะมีขนาดใหญ่กว่า แต่ลำต้นจะไม่ยืดตัวให้ข้อเพิ่ม ซึ่งไม่ช่วยในการขยายเพิ่มปริมาณสำหรับใช้ในการทดลอง จึงทดลองเลี้ยงกลอยในอาหารสูตร MS + BA 10mg/l + NAA 4 mg/l + ผงถ่าน และสูตร MS + BA 20mg/l + NAA 4 mg/l + ผงถ่าน พบว่า สูตร MS + BA 20mg/l + NAA 4 mg/l + ผงถ่าน จะให้ต้นที่แข็งแรง และมีจำนวนยอดมากกว่า เหมาะที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต้นให้เพียงพอสำหรับการทดลองหาสูตรชักนำให้เกิดหัวจืด อยู่ระหว่างเพิ่มปริมาณต้นกลอยด้วยอาหารสูตร MS + BA 20 mg/l + NAA 4mg/l + ผงถ่าน (รูปภาพที่ 2.6.1)



รูปภาพที่ 2.6.1 ภาพการทดลองเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างสูตรที่มีผงถ่านกับไม่มีผงถ่าน

ทำการทดลองชักนำให้เกิดหัวจืดโดยศึกษาความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ร่วมกับปริมาณน้ำตาล วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ทำการทดลอง 3 ปัจจัย จำนวน 3 ซ้ำ (เนื่องจากยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณต้นกลอยได้พอสำหรับ 10 ซ้ำ) ปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง 3 ปัจจัย ได้แก่

1. พันธุ์พืชสกุลกลอย 5 ชนิด
2. ธาตุอาหารหลัก MS ดัดแปลง 2 สูตร คือ 1/2 MS และ 1/4 MS
3. ปริมาณน้ำตาล 3 ระดับ คือ 10, 50 และ 100 กรัม/ลิตร

พันธุ์พืชสกุลกลอย 5 ชนิด ได้แก่ กลอย มันจาวมะพร้าว มันนก มันอ่อนและมันเหน็บนอกจากนี้ยังได้ทดลองตัดหัวจืด (microfiber) ของมันจาวที่เกิดในเขตเพาะเลี้ยง ใส่ในขวดที่นิ่งฆ่าเชื้อ เพื่อทดลองเก็บในสภาพปลอดเชื้อโดยไม่มีอาหาร ว่าจะสามารถเก็บได้นานกี่เดือน (รูปภาพที่ 2.6.2)



รูปภาพที่ 2.6.2 การทดลองชักนำให้เกิดหัวจืดโดยศึกษาความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ร่วมกับปริมาณน้ำตาล

การศึกษาการลดความเข้มข้นธาตุอาหารหลักร่วมกับปริมาณน้ำตาล

เมื่อทำการเก็บรักษาพืชสกุลกลอย 5 ชนิดในอาหาร MS (1/2MS และ 1/4 MS) ร่วมกับปริมาณน้ำตาล 10, 50 และ 100 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 6 เดือน พบว่าพืชสกุลกลอย 5 ชนิดที่เก็บรักษาในอาหาร 1/2MS และ

1/4 MS ร่วมกับปริมาณน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร คือ จะมีความสูงกว่าที่เติมน้ำตาลในปริมาณ 50 และ 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีการแตกยอดจำนวนมากกว่า แต่ต้นไม่แข็งแรง และไม่พบการเกิดหัวจืดในทุกความเข้มข้น

การศึกษาการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator)

เมื่อทำการเก็บรักษาพืชสกุลกลอย 5 ชนิดในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต อาลาร์-85 ที่ 0 10 50 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าพืชสกุลกลอย 5 ชนิด มีการแตกยอดเพิ่มขึ้น ต้นอ่อนแอลงและเริ่มตายเมื่อเวลา 3 เดือน ไม่พบการเกิดหัวจืดในทุกความเข้มข้น

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ปริมาณน้ำตาล และสารชะลอการเจริญเติบโต อาลาร์-85 ไม่สามารถชักนำให้เกิดหัวจืด แต่จะมีผลต่อความสูงของต้น และการแตกยอดเท่านั้น

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ข้อมูลด้านต่างๆ การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชสกุลกลอยในรูปหัวจืดในสภาพปลอดเชื้อ รวมถึงข้อมูลการใช้ประโยชน์ ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาศักยภาพของพืชสกุลกลอย สำหรับการใช้ประโยชน์ทางการเกษตรด้านต่างๆ ในอนาคต เป็นแนวทางในการใช้ทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่อย่างจำกัดให้คุ้มค่าและเกิดประโยชน์อย่างสูงสุด กลุ่มเป้าหมายคือ นักวิจัย เกษตรกร นักวิชาการนักวิชาการ และนิสิตนักศึกษา ที่ทำงานเกี่ยวกับธนาคารเชื้อพันธุ์พืช หรือ พัฒนาต่อเพื่อให้สามารถนำผลของงานวิจัยไปใช้ปฏิบัติในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืช

11. กิตติกรรมประกาศ

การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชสกุลกลอยในรูปหัวจืดในสภาพปลอดเชื้อ ขอขอบคุณหัวหน้าการทดลอง ผู้ร่วมวิจัย คณะทำงาน และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของกลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และหน่วยงานภายนอกทุกหน่วยงาน ที่มีส่วนช่วยในสนับสนุนการดำเนินงานการทดลองนี้ให้เป็นผลสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

12. เอกสารอ้างอิง

- Leunufna, S. and ERJ. Keller. 2003. Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.) Plant Cell Reports. 21: 1159-1166.
- Martin, F.W. and Degras, L. 1978. Tropical yams and their potential. Part 6. Minor cultivated *Dioscorea* species. USDA agriculture handbook no.538. 23 p.
- Ng, SYC. and N.Q. Ng, 1997. Germplasm conservation in food yams (*Dioscorea* spp.) L Constraints, Application and Future Prospects, In: conservation of plant genetic resources *in vitro*. Vol.I: General Aspects. Science Publishers Inc. U.S.A. pp. 257-286.

13. ภาคผนวก