นิพนธ์ต้นฉบับ

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยน้ำว้า [*Musa* (ABB group)]

อรอุมา บุญมี[1] และ สมปอง เตชะโต[2]

Abstract

Boonmee, O. and Te-chato, S.

Somaclonal variation in tissue culture of banana cv. 'Kluai Num Wa' [*Musa* (ABB group)]

Songklanakarin J. Sci. Technol., May 2007, 29(Suppl. 2) : 219-228

Two types of cytokinins, 6-Benzyladenine (BA) and/or coconut water (CW) and pH of medium were studied for their effects on shoot formation, growth and somaclonal variation of banana tissue culture. The cultures were carried out on Murashige and Skoog (MS) medium for 30 days. The average shoot length (5.82 cm) was obtained in liquid medium supplemented with 15% CW. While a high number of shoots at 3.8 shoots/explant were obtained in liquid medium supplemented with 5 mg/l BA. For fresh weight, liquid medium supplemented with 5 mg/l BA in combination with 15% CW gave the best results (2.26 g/shoot). An optimum pH for promotion shoot length (5.67 cm) was 5.6 whereas the lower value (pH 4) promoted a high number of shoot formation (3.89 shoots/explant). The highest fresh weight of 1.33 g/shoot was obtained on medium adjusted pH to 8. After maintaining the shoots by successive subculturing (3-4 week-intervals) on MS medium with 5 mg/l BA several morphological abnormalities were obtained. Among those, chlorotic leaves (1.5%) were firstly observed in the first subculture and increased to 3% in the second subculture.

Department of Plant Science, Faculty of Natural resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

[1]นักศึกษาหลักสูตร วท.ม. สาขาพืชศาสตร์ [2]Ph.D. (Plant Cell Technology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

ติดต่อ : onouma_boonmee@yahoo.co.th

รับต้นฉบับ 21 เมษายน 2549 รับลงพิมพ์ 7 พฤศจิกายน 2549

Moreover, a narrow leaf at 25.76% was also observed in this period. Further subculture, more somaclonal variation, such as a thin long shoots, nodular shoots and bamboo-like leaf, appeared. Isozyme marker revealed a difference in zymogram patterns among those somaclonal variants.

Key words : Kluai Num Wa, *Musa*, somaclonal variation, isozyme, benzyladenine, coconut water

บทคัดย่อ

อรอุมา บุญมี และ สมปอง เตชะโต

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยน้ำว้า [*Musa* (ABB group)]

ว. สงขลานครินทร์ วทท. พฤษภาคม 2550 29(ฉบับพิเศษ 2) : 219-228

การศึกษาผลของ 6-Benzyladenine (BA) และ/หรือ น้ำมะพร้าว (CW) ต่อการสร้างยอดรวม และการเจริญของกล้วยน้ำว้าบนอาหารแข็งหรืออาหารเหลวสูตร Murashige and Skoog (MS) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่า ความสูงของต้นกล้วยสูงสุด 5.82 เซนติเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม CW เข้มข้น 15% BA เข้มข้น 5 มก./ลิตร ชักนำยอดได้สูงสุด 3.8 ยอด/ชิ้นส่วน ในอาหารเหลวเติม BA เข้มข้น 5 มก./ลิตร ร่วมกับ CW เข้มข้น 15% ให้น้ำหนักสดยอดสูงสุด 2.26 กรัม/ชิ้นส่วน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ความเป็นกรด-ด่าง 5.6 ส่งเสริมความสูงของต้นกล้วยได้ดีที่สุด 5.67 ซม. ระดับ pH 4 ชักนำจำนวนยอดได้สูงสุด 3.89 ยอด/ชิ้นส่วน และที่ระดับ pH 8 สามารถชักนำให้ยอดกล้วยมีน้ำหนักสด 1.33 กรัม/ชิ้นส่วน จากการศึกษาความแปรปรวนของกล้วยน้ำว้าบนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA เข้มข้น 5 มก./ลิตร pH 5.6 โดยทำการย้ายเลี้ยงทุก ๆ 3-4 สัปดาห์ พบว่าหลังการย้ายเลี้ยงในครั้งแรกต้นกล้วยมีลักษณะผิดปกติคือ ใบสีซีด 1.5% ในการย้ายเลี้ยงครั้งที่สองพบต้นกล้วยลักษณะผิดปกติ 2 ลักษณะ คือ ใบสีซีดและใบดาบ 3 และ 25.76% ตามลำดับ และในการย้ายเลี้ยงครั้งที่สาม พบต้นกล้วยมีลักษณะผิดปกติเพิ่มขึ้น คือ ลำต้นยืดยาว หน่อปม และใบเป็นเส้นม้วนงอ เมื่อนำมาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้ไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส (PER) พบความแตกต่างของรูปแบบเอนไซม์ในแต่ละลักษณะ

กล้วย (*Musa* spp.) เป็นพืชที่ชอบอากาศร้อนชื้น ถิ่นกำเนิดของกล้วยจึงอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีคุณค่าทางอาหาร ทุกส่วนของกล้วยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง เป็นพืชที่เจริญเติบโตได้เร็วให้ผลในระยะสั้นและดูแลรักษาง่าย เหมาะกับสภาพดินฟ้าอากาศในประเทศไทย อีกทั้งประเทศไทยยังเป็นประเทศผู้ส่งออกกล้วยรายใหญ่ (ปวีณา และคณะ, 2533) ปัจจุบันมีการขยายพื้นที่การปลูกกล้วยเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ แต่ก็ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาดกล้วยทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ ในการขยายพื้นที่ปลูกจึงจำเป็นต้องใช้หน่อกล้วยในการปลูกเป็นจำนวนมาก อีกทั้งยังมีปัญหาในเรื่องของโรคที่สำคัญคือ โรคตายพราย และโรคใบจุดของกล้วย (บุญยืน และรัชนี, 2533) การขยายพันธุ์กล้วยด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นวิธีที่สามารถขยายพันธุ์กล้วยได้ในปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น ปราศจากโรค และมีความสม่ำเสมอ เพื่อให้ได้ผลผลิตที่เพิ่มขึ้นและมีคุณภาพ เป็นวิธีที่เหมาะในการทำเป็นการค้า (กัลยาณี, 2536) มีรายงานผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงปลายยอดกล้วยจำนวนมากเพื่อการขยายพันธุ์ ดังรายงานของ Bhayalakshmi และ Signh (1995) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดของกล้วย 3 ชนิด คือ Cavendish, Bluggoe และ Silk บนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) เติม 6-Benzyladenine (BA) 8.9 μM และ Indoleacetic acid (IAA) 0.98 μM ในอาหารที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ อาหารวุ้น อาหารเหลวที่มีการเขย่า และอาหารเหลวอยู่กับที่ พบว่าในอาหารเหลวอยู่กับที่มีการสร้างและการเจริญเติบโตของยอดได้มากที่สุด แต่ในอาหารวุ้นมีอัตราการรอดชีวิตนอกหลอดทดลองสูงที่สุด ประภาสินี (2529) ได้ทดลองเลี้ยงหน่อของกล้วยไข่พระ

ตะบองในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว (CW) 15% และ BA 5 มก./ลิตร และมีการตัดแบ่งและย้ายอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณได้ 1,025 หน่อในเวลา 20 สัปดาห์ จรินทร์ (2537) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยพันธุ์แกรนเนนบนอาหารสูตร MS เติม BA 5 มก./ลิตร ศึกษาความเข้มข้นของระดับน้ำตาลซูโครส น้ำมะพร้าว และขนาดของขวด พบว่าน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3% น้ำมะพร้าวความเข้มข้น 15% และขวดขนาดเล็กมีความเหมาะสมที่สุดในการชักนำยอด หน่อ น้ำหนักสดยอด และความสูงของต้นอ่อน สำหรับในกล้วยน้ำว้ายังมีรายงานน้อย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อนำมาเลี้ยงให้เกิดเป็นต้นพืช พบว่าพืชที่เกิดเป็นต้นใหม่มีลักษณะแตกต่างไปจากเดิม การแปรผันที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง หรือในพืชที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง เรียกว่าโซมาโคลนอลแวริเอชัน (somaclonal variation) (สิรนุช, 2540) ในกล้วยพันธุ์ต่าง ๆ ที่เพาะเลี้ยงพบอัตราการผันแปรที่แตกต่างกัน (กัลยาณี, 2533) Hwang และ Ko (1988) ยังพบว่าการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากปลายยอดกล้วยหอม (AAA) สามารถก่อให้เกิดการผันแปรในลักษณะต่าง ๆได้ 3% จากต้นที่ได้ทั้งหมด 42,260 ต้น และยังพบต้นที่ต้านทานต่อโรคตายพรายอีกด้วย ส่วนในกล้วยคาเวนดิช (AAA) เมื่อเพาะเลี้ยงปลายยอดบนอาหารสูตร MS เติม 6-Benzylaminopurine (BAP) 5 มก./ลิตร พบต้นกล้วยที่มีลักษณะผันแปรไปจากเดิมและยังเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรค Yellow Sigatoka อีกด้วย (Trujillo and Gracia, 1996) Christina และ Rodrigues (2004) เพาะเลี้ยงปลายยอดกล้วย Pacovan (AAB) บนอาหารสูตร MS เติม BAP 2.5 มก./ลิตร หลังการย้ายเลี้ยงในครั้งที่ 5 ไปสู่อาหารสูตร MS เติม BAP 4 มก./ลิตร พบความผันแปร 5.8% ในการตรวจสอบความแปรปรวนของกล้วยโดยทั่วไปนิยมใช้ 3 วิธีการ คือ พิจารณาจากลักษณะสัณฐาน เทคนิคทางเซลล์วิทยา (Simmonds and Shepherds, 1955) และการใช้เทคนิคทางชีวเคมี เช่น isozyme technique (Bhat และคณะ, 1992)

ไอโซไซม์ (isozyme) คือ เอนไซม์ (enzyme) ที่มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (subtrate) ตัวเดียวกันจึงเร่งปฏิกิริยาเดียวกัน ในสิ่งมีชีวิตเดียวกัน แต่มีรูปแบบของโมเลกุล และคุณสมบัติบางประการที่ต่างกันโดยมีสาเหตุสำคัญมาจากพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (วิไลวรรณ และอมรรัตน์, 2533; มนตรี และคณะ, 2542) โดยด้านพืชสามารถใช้เทคนิคไอโซไซม์เป็นดัชนีระบุความแปรผันทางพันธุกรรมสายพันธุ์ การตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ และการวินิจฉัยโรคพืชต่าง ๆ (พรรณี, 2543) ดังเช่น Ramalakshmi และคณะ (2003) ทำการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกล้วย 6 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นกล้วยที่เกิดความแปรปรวนจากจำนวนการย้ายเลี้ยงที่ต่างกันด้วยเทคนิคไอโซไซม์ พบว่า ไอโซไซม์ระบบ esterase สามารถจำแนกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน แต่ไม่แสดงแถบสีในระบบ peroxidase และ acid phosphatase เกษมศักดิ์ (2535) ได้จำแนกยีโนมของกล้วยด้วยวิธีชีวเคมี โดยการสกัดเอนไซม์จากใบกล้วย 107 ชนิด เพื่อตรวจแยกพันธุ์กล้วยชนิดต่าง ๆ พบว่า แถบสีของไอโซไซม์ peroxidase สามารถแยกกล้วยซึ่งมีชุดโครโมโซม AA AAA และAAB ออกจาก ABB ABBB และ BBB และสามารถแยกกล้วยซึ่งมีชุดโครโมโซม ABB ออกจาก ABBB และ BBB ได้ และแถบสีของไอโซไซม์ glutamate oxaloacetate transaminase สามารถแยกกล้วยซึ่งมีชุดโครโมโซม AA ABBB BB ออกจาก BBB ได้

ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงได้ศึกษาอิทธิพลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตในการนำมาเพาะเลี้ยงตลอดจนการศึกษา pH ที่มีผลต่อการพัฒนาของยอดกล้วย รวมทั้งศึกษาการแปรปรวนทางพันธุกรรมของกล้วยน้ำว้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และตรวจสอบความแปรปรวนดังกล่าวโดยการใช้เทคนิคไอโซไซม์ ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาการขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์กล้วยน้ำว้าให้ได้ผลผลิตที่ดี และมีคุณภาพสูงต่อไป

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาผลของประเภทอาหาร BA และน้ำมะพร้าวต่อการสร้างยอดรวมและการเจริญของยอด

ใช้ยอดรวมกล้วยในหลอดทดลองซึ่งชักนำจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเจริญส่วนยอดจากหน่อ ย้ายเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารใหม่สูตรเดิมทุกเดือน เป็นเวลา 12 เดือน ตัดแยกยอดมาตกแต่งส่วนของกาบใบออก (ลำต้นเทียม) ผ่าปลายยอดแบ่งครึ่ง ย้ายเลี้ยงบนอาหารแข็งหรืออาหารเหลวสูตร MS เติม BA 5 มก./ลิตร หรือ CW 15% หรือเติมทั้ง BA 5 มก./ลิตร และ CW 15% pH 5.6 สำหรับอาหาร

เหลวเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 100 รอบ/นาที ภายใต้การให้แสงนาน 16 ชั่วโมง/วัน ที่ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±2°C เป็นเวลานาน 1 เดือน บันทึกอัตราการสร้างยอดรวม และตรวจสอบจำนวนยอดรวม น้ำหนักสดเฉลี่ยและความสูง เปรียบเทียบกันในแต่ละสิ่งทดลอง โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design: CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด (ขวดละ 2 ชิ้น)

2. ศึกษาผลของ pH ต่อการสร้างยอดรวมและการเจริญของยอด

เพาะเลี้ยงปลายยอดบนอาหารสูตร MS ที่ดีที่สุดที่ได้จากการศึกษาที่ 1 เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี pH ต่างกัน คือ 4, 5, 5.6, 6, 7 และ 8 สำหรับอาหารเหลวเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 100 รอบ/นาที ภายใต้การให้แสงนาน 16 ชั่วโมง/วัน ที่ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±2°C เป็นเวลานาน 1 เดือน บันทึกอัตราการสร้างยอดรวมและตรวจสอบจำนวนยอดรวม น้ำหนักสดเฉลี่ยและความสูง เปรียบเทียบกันในแต่ละสิ่งทดลอง โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด (ขวดละ 2 ชิ้น)

3. ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกล้วยน้ำว้า

เพาะเลี้ยงปลายยอดกล้วยน้ำว้าบนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA 5 มก./ลิตร pH 5.6 ในขวดขนาด 8 ออนซ์ วางเลี้ยงขวดละ 2 ชิ้น ภายใต้การให้แสงนาน 16 ชั่วโมง/วัน ที่ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±2°C เป็นเวลานาน 1 เดือน และทำการย้ายเลี้ยงทุกๆ 3-4 สัปดาห์ บันทึกลักษณะทางสัณฐานของกล้วยน้ำว้าที่แปรปรวนไป คำนวณเป็นอัตราการกลาย ดังสมการ

$$\text{ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้นที่มีลักษณะแปรปรวน}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$$

นำต้นกล้วยที่มีลักษณะปกติและแปรปรวนไปในลักษณะต่างๆ มาตรวจสอบทางชีวเคมี (ไอโซไซม์) โดยวิธีการดังนี้คือ นำใบไปบดในโกร่งบดที่เก็บในอุณหภูมิ 4°C สกัดด้วยบัฟเฟอร์สำหรับสกัดเอนไซม์ในโกร่งเย็นจนละเอียด จากนั้นจึงนำของเหลวที่ได้เทใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ดูดสารละลายส่วนใสส่วนบนออกใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ที่สะอาด แล้วนำมาแยกเอนไซม์ด้วยเครื่องอิเลคโตรโฟริซิสแนวตั้ง โดยใช้ตัวกลางหรือตัวค้ำจุนเป็นเจลโพลีอะคริลาไมด์แบบไม่ต่อเนื่อง โดยมีเจลชั้นบน (stacking gel) ซึ่งประกอบด้วย 0.3% Acrylamide และเจลชั้นล่าง (separating gel) ซึ่งประกอบด้วย 3% Acrylamide ดูดสารละลายส่วนใสที่สกัดจากตัวอย่างกล้วยมา 15 µl ผสมกับ loading buffer 2 µl หยอดใส่ร่องหวีบนแผ่นเจลที่เตรียมไว้ซึ่งแต่ละแผ่นเจลสามารถใส่ตัวอย่างได้ 10 ช่อง หรือ 10 ตัวอย่าง ทดลองพร้อมกันครั้งละ 2 แผ่น แล้วแยกเอนไซม์ในสารละลายอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ ภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือสังเกตจากแถบของ bromphenol blue เคลื่อนที่มาถึงขอบล่างของเจลนำแผ่นเจลมาย้อมสีเพื่อตรวจสอบเอนไซม์ 2 ระบบ คือ ระบบเปอร์ออกซิเดส (peroxidase; PER) และระบบแอลฟาเอสเตอเรส (α-esterase; EST) การย้อมสีเอนไซม์ข้างต้นทำในสภาพมืดบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบ/นาที รอจนเห็นไซโมแกรมชัดเจน คงที่ ไม่เปลี่ยนแปลงจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง เปรียบเทียบความแตกต่างของไซโมแกรมในแต่ละลักษณะที่แปรปรวนไป

ผลการศึกษา

1. ผลของประเภทอาหาร BA และน้ำมะพร้าว ต่อการสร้างยอดรวมและการเจริญของยอด

จากการเพาะเลี้ยงปลายยอดบนอาหารแข็งหรืออาหารเหลวสูตร MS เติม BA 5 มก./ลิตร หรือ CW 15% หรือ เติมทั้ง BA 5 มก./ลิตร และ CW 15% pH 5.6 เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า อาหารทุกสูตรสามารถชักนำการพัฒนาเป็นต้นได้ อาหารเหลวสูตร MS เติม BA 5 มก./ลิตร ชักนำยอดได้ดีที่สุด 3.8 ยอด/ชิ้นส่วน แต่ให้ความสูงของต้นน้อยที่สุด 3.11 ซม. อาหารเติม CW 15% ให้ต้นกล้วยสูงสุด 5.82 ซม. แต่ให้ยอดรวมต่ำสุด 1.5 ยอด/ชิ้นส่วน การเติม BA 5 มก./ลิตร ร่วมกับ CW 15% ให้น้ำหนักสดเฉลี่ยยอดสูงสุด 2.26 กรัม/ชิ้นส่วน สำหรับการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA 5 มก./ลิตร

ชักนำยอดได้ดีที่สุด 2.43 ยอด/ชิ้นส่วน แต่ให้ความสูงของต้นน้อยที่สุด 1.64 ซม. ในขณะที่ความสูงและน้ำหนักสดของต้นกล้วยสูงสุด 3.94 ซม. และ 0.58 กรัม ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมน้ำมะพร้าว 15% แต่สามารถชักนำยอดได้น้อยที่สุด 1.2 ยอด/ชิ้นส่วน (Table 1)

2. ผลของ pH ต่อการสร้างยอดรวมและการเจริญของยอด

หลังจากเพาะเลี้ยงปลายยอดในอาหารแข็งสูตร MS เติม BA 5 มก./ลิตร ปรับ pH ต่างกัน คือ 4, 5, 5.6, 6, 7 และ 8 เป็นระยะเวลา 1 เดือน สามารถชักนำการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ โดย pH 8 ให้น้ำหนักยอดรวมสูงสุดเฉลี่ย 1.33 กรัม/ชิ้นส่วน ในขณะที่ระดับ pH 4 มีน้ำหนักยอดรวมเฉลี่ยน้อยที่สุด 0.29 กรัม/ชิ้นส่วน ที่ระดับ pH 6 และ 7 ให้น้ำหนักยอดรวมเฉลี่ยมีค่าใกล้เคียงกันคือ 0.85 และ 0.87 กรัม/ชิ้นส่วน ตามลำดับ (Figure 1) ที่ระดับ pH 4 ส่งเสริมให้กล้วยน้ำว้าสร้างยอดรวมสูงสุด 3.89 ยอด/ชิ้นส่วน ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ในขณะเดียวกันมีความสูงของยอดกล้วยน้อยที่สุด 1.59 ซม. แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และที่ระดับ pH 5.6 ส่งเสริมให้กล้วยมีความสูงของยอดสูงที่สุด 5.67 ซม. แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ในขณะที่มีการสร้างยอดรวมน้อยที่สุด 1.78 ยอด/ชิ้นส่วน แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

3. ผลของความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกล้วยน้ำว้า

จากการเพาะเลี้ยงปลายยอดกล้วยน้ำว้าบนอาหารแข็งสูตร MS และเติม BA 5 มก./ลิตร pH 5.6 เป็นเวลานาน 1 เดือน และทำการย้ายเลี้ยงทุกๆ 3-4 สัปดาห์ พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมดังนี้

3.1 ลักษณะทางสัณฐาน

หลังการย้ายเลี้ยงในครั้งแรก พบกล้วยที่มีลักษณะปกติ (Figure 3a) และกล้วยที่มีลักษณะแตกต่างไปจากเดิม คือ ใบมีสีซีด/เผือก 1.5% (Figure 3b) เมื่อทำการย้ายเลี้ยงต้นกล้วยปกติในครั้งที่สองนาน 1 เดือน พบกล้วยที่มีลักษณะแตกต่างไปจากเดิม 2 ลักษณะ คือ ลักษณะใบซีด และใบดาบ 3% และ 25.76% ตามลำดับ (Table 2, Figure 3b, 3c)

และหลังจากย้ายเลี้ยงต้นกล้วยครั้งที่ 3 นาน 1 เดือน พบกล้วยที่มีลักษณะแตกต่างไปจากเดิม 6 ลักษณะ คือ ลักษณะใบซีด ใบดาบ ลำต้นยืดยาว หน่อเหมือนไม้ไผ่

Table 1. Effect of cytokinins and types of medium on multiple shoot formation and growth of banana.

BA/coconut water	Nunber of shoots per explant	Fresh weight (g)	Shoot length (cm)
Liquid MS medium			
15% CW	1.5 c	0.99 b	5.82 a
5 mg/l BA	3.8 a	2.12 a	3.11 c
15% CW + 5 mg/l BA	3.7 a	2.26 a	3.24 c
Average	3.0	1.79	4.06
Solid MS medium			
15% CW	1.20 c	0.58 c	3.94 b
5 mg/l BA	2.43 b	0.41 c	1.64 d
15% CW + 5 mg/l BA	1.53 c	0.25 c	1.65 d
Average	1.72	0.41	2.41
F-test	**	**	**
C.V. (%)	10.33	16.48	11.54

**** Significant difference at p<0.01**
Means not sharing common letter within columns differ significantly by Duncan's multiple range test

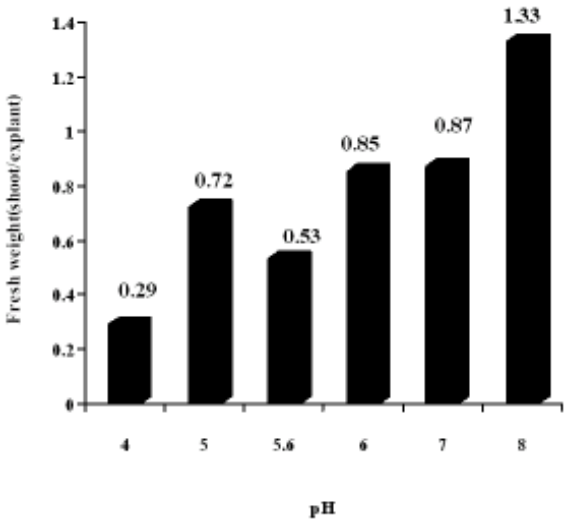

Figure 1. Effect of pH on fresh weight (g) of banana cv. Kluai Num Wa cultured on MS supplemented with 5 mg/l BA for one month.

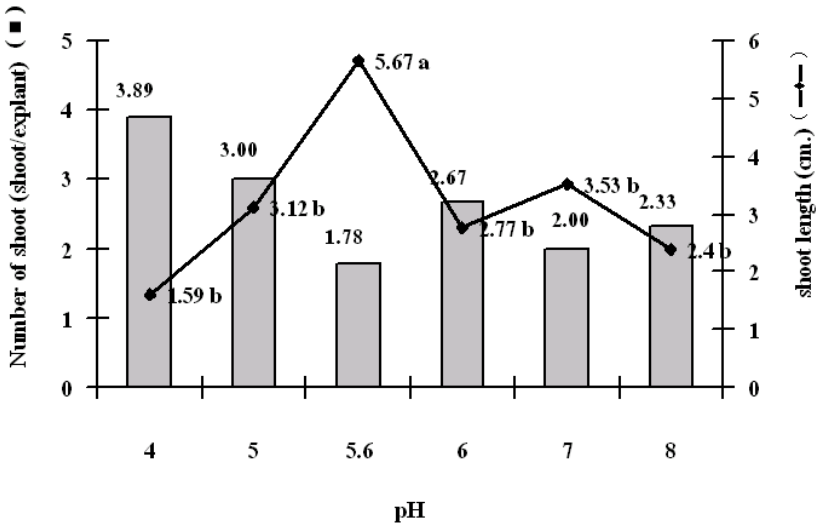

Figure 2. Effect of pH on multiple shoot formation and average height of shoots on MS medium supplemented with 5 mg/l BA for one month.

ปม และใบเป็นเส้นม้วนงอในอัตรา 3%, 4.5%, 18.18%, 3%, 12% และ 4.5% ตามลำดับ (Table 3, Figure 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g)

3.2 การตรวจสอบความแปรผันโดยใช้ไอโซไซม์

เมื่อย้อมสีเจลโพลีอะคริลาไมด์ที่ผ่านการแยกเอนไซม์ ด้วยระบบสีย้อมเอนไซม์ 2 ระบบ คือ ระบบเอนไซม์ PER และ EST ของต้นกล้วยที่มีลักษณะที่แปรผันไปจากเดิมทั้งหมด พบว่า เมื่อย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ PER แผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ติดสีให้ไซโมแกรมชัดที่สุด (Figure 4) มีรูปแบบเอนไซม์ 3 โซนในชุดควบคุม (กล้วยปกติ) ลักษณะใบดาบ ลักษณะคล้ายหน่อ ลักษณะสีซีด และลักษณะปมคือ PER1, PER2 และ PER3 แต่กล้วยที่มีลักษณะลำต้นยืดยาวมีรูปแบบเอนไซม์ 2 โซน คือ PER1 และ PER3 รูปแบบของเอนไซม์ในโซน PER2 และ PER3 ในแต่ละ

Table 2. Morphological abnormalities of shoots obtained from culturing on MS medium supplemented with 5 mg/l BA after one of culture in the first subculture.

Morphological abnormalities	percentage
Albino	3.00
Narrow leaf	25.76

ลักษณะที่แปรผันไปของกล้วยมีความแตกต่างที่เห็นได้อย่างชัดเจน คือ กล้วยที่มีลักษณะปมมีแถบเอนไซม์ PER2 2 แถบ และกล้วยที่มีลักษณะลำต้นยืดยาวไม่พบแถบเอนไซม์ในโซนนี้ ซึ่งต่างกับลักษณะอื่น ๆ ที่มีแถบเอนไซม์ในโซน PER1 1 แถบ ส่วนรูปแบบเอนไซม์ในโซน PER3 ของกล้วยลำต้นยืดยาว ลักษณะสีซีด ลักษณะปม มีแถบเอนไซม์ 2 แถบ ซึ่งแตกต่างกับกล้วยปกติ ลักษณะใบดาบ และลักษณะคล้ายหน่อที่มีแถบเอนไซม์ PER3 3 แถบ

ลักษณะของเอนไซม์ในแต่ละโซนมีความชัดเจนของเอนไซม์แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากในกล้วยแต่ละลักษณะมีกิจกรรมเอนไซม์ที่แตกต่างกัน และเมื่อย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ EST พบว่าเจลไม่ติดสี

วิจารณ์ผล

จากการศึกษาชนิดอาหาร BA และน้ำมะพร้าวต่อการเจริญเติบโตของกล้วยน้ำว้า พบว่าอาหารเหลวสามารถชักนำการเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นยอดรวมได้ดีกว่าอาหารแข็ง ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานทดลองของ Bhayalakshmi และ Signh (1995) ทำการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดของกล้วย 3 ชนิด คือ Cavendish, Bluggoe และ Silk บนอาหารสูตร MS เติม BA 8.9 µM และ IAA 0.98 µM พบว่า อาหารเหลวมีการสร้างและการเจริญเติบโตของยอดได้มากที่สุด ในทำนองเดียวกัน บุญยืนและรัชนี (2533) พบว่าสามารถชักนำการเกิดยอดเล็กๆ ได้เป็นจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดกล้วยหอมทองในอาหารเหลวสูตร MS เติม BAP 5 มก./ลิตร ทั้งนี้อาจเนื่องจากในอาหารเหลวช่วยให้มีการดูดธาตุอาหารเป็นไปได้ดี ทุกส่วนสัมผัสอาหาร และแลกเปลี่ยนแก๊สกับบรรยากาศเพื่อการเจริญของยอดได้ดีกว่า การเติมน้ำมะพร้าวในอาหารส่งเสริมการยืดยาวของต้นกล้วยได้ดีกว่าและมีการสร้างรากเป็นจำนวนมาก ในขณะที่อาหารที่เติม BA สามารถสร้างยอดได้เป็นจำนวนมาก ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมะพร้าวมีสารพวก myoinositol, 1-3-diphenylurea และ leucoanthocyanin ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนินเช่นเดียวกับ BA มีความสามารถในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเจริญของตายอดและส่งเสริม apical dominance ซึ่งในกล้วยสามารถชักนำให้เกิดยอดและเจริญได้ดี (กัลยาณี และคณะ, 2533) อย่างไรก็ตาม น้ำมะพร้าวเป็นสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติที่ไม่ทราบองค์ประกอบทั้งหมดที่แน่นอนมีความผันแปรภายในองค์ประกอบมาก (คำนูณ, 2540) การใช้จึงอาจให้ผลที่ไม่แน่นอน ศศิธร (2535) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงปลายยอดกล้วยน้ำว้าบนอาหารสูตร MS เติม BA 5 มก./ลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15% สามารถเพิ่มจำนวนต้นได้มากที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างกับการศึกษาในรายงานนี้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันจึงทำให้กล้วยมีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปการใช้ BA ร่วมกับน้ำมะพร้าวส่งเสริมการสร้างยอดรวมในกล้วยพันธุ์แกรนเนน (จรินทร์, 2537) กล้วยไข่พระตะบอง (ประภาสินี, 2529; อรดี และสุภัทรา, 2530)

Table 3. Morphological abnormalities of shoots obtained from culturing on MS medium supplemented with 5 mg/l BA in the third subculture (three months after culture).

Morphological abnormalities	percentage
Albino	3.00
Narrow leaf	4.50
thin long shoot	18.18
bud to appear	3.00
nodular shoot	12.00
bamboo-like	4.50

ในการศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญเติบโตของกล้วย พบว่า ระดับ pH 4-8 สามารถชักนำการพัฒนาของชิ้นส่วนปลายยอดได้ที่ระดับ pH 4 และ 5 สามารถชักนำยอดได้ดีกว่า pH อื่นๆ ยอดที่พัฒนาในอาหารปรับระดับ pH ต่ำไม่มีการยืดยาว ในขณะที่ pH 5.6-8 ส่งเสริมการยืดยาวของ

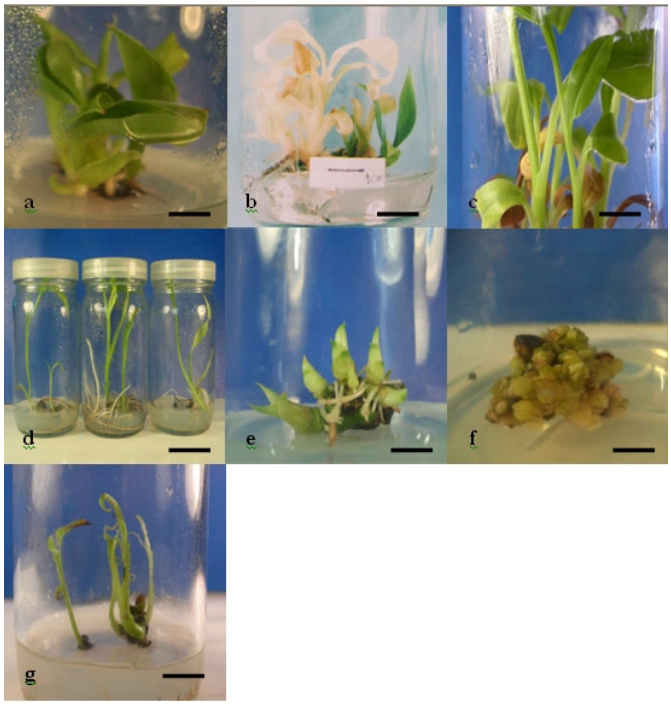

Figure 3. Morphological abnormalities of banana shoot at 3rd subculture on MS medium supplemented with 5 mg/l BA: (a) normal plant, (b) albino, (c) narrow leaf, (d) thin long shoot, (e) bamboo-like shoots, (f) nodular shoot and (g) leaf-curl shoots. (bar = 1 cm.)

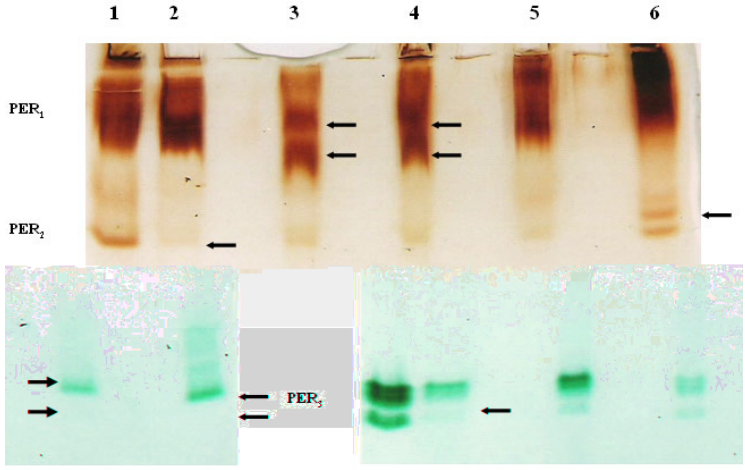

Figure 4. Enzyme pattern of somaclonal variation on banana. The extracts of banana tissue culture were analyzed with polyacrylamide gel electrophoresis and were detected by PER activity to staining (arrows showthe different zymogram pattern).

1 : normal plant **4 : bamboo-like shoot**
2 : thin long shoot **5 : albino**
3 : narrow leaf **6 : nodular shoot**

[Color figure can be viewed in the electronic version]

กล้วยได้ใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับการทดลองของ อรดีและสุภัทรา (2530) ซึ่งเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไข่พระตะบองบนอาหารสูตร MS เติมน้ำมะพร้าว 15% และ BA 5 มก./ลิตร pH 5.6 เหมาะสมที่สุด ทั้งนี้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยในแต่ละพันธุ์นั้นมีการตอบสนองต่อ pH แตกต่างกันออกไปขึ้นกับชนิดของกล้วย

ในการศึกษานี้ เมื่อเพาะเลี้ยงยอดกล้วยน้ำว้าที่บนอาหารสูตร MS เติม 5 มก./ลิตร เป็นเวลา 1 เดือน ทำการย้ายเลี้ยงทุกๆ 3-4 สัปดาห์ 3 ครั้ง พบลักษณะความผิดปกติที่ปรากฏบางลักษณะ เช่น ลักษณะใบม้วนงอเป็นเส้นและลำต้นยืดยาว เป็นจำนวน 18.18 และ 4.50% ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของ กัลยาณี (2533) ซึ่งพบความผันแปรจากต้นกล้วยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกล้วยหอม 5 พันธุ์ คือ กล้วยหอมทอง โฮชูชู แกรด์เนน หอมค่อม และหอมเขียว เป็นจำนวน 22.34, 20.80, 18.40, 10.39 และ 8.00% ตามลำดับ บนอาหารสูตร MS เติมน้ำมะพร้าว 15% และ BA 5 มก./ลิตร อย่างไรก็ตามอัตราความแปรผันแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากกล้วยทั้ง 5 พันธุ์มีจีโนม AAA แต่กล้วยน้ำว้ามีจีโนม ABB จึงส่งผลให้อัตราความผันแปรแตกต่างกัน ภายหลังการย้ายเลี้ยงในครั้งแรกพบลักษณะผิดปกติเพียงลักษณะเดียวคือ ลักษณะใบซีดหรือต้นเผือก เมื่อย้ายเลี้ยงในครั้งที่ 2 พบลักษณะผิดปกติเพิ่มขึ้นเป็น 2 ลักษณะคือ ลักษณะใบซีดและใบดาบ โดยพบลักษณะใบซีดมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า และหลังจากย้ายเลี้ยงในครั้งที่ 3 พบลักษณะที่ผิดปกติเพิ่มมากขึ้นเป็น 6 ลักษณะคือ ลักษณะใบซีด ใบดาบ ลำต้นยืดยาว หน่อคล้ายไม้ไผ่ ปมและใบเป็นเส้นม้วนงอ ลักษณะใบซีดเริ่มมีจำนวนคงที่ แต่มีลักษณะผิดปกติแบบอื่นเพิ่มขึ้น Ahloowalia และ Maluszynski (2001) รายงานว่าในกระบวนการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของชิ้นส่วนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถตรวจการ กลายพันธุ์ได้หลังรุ่นที่ V_3-V_4 (*in vitro*$_3$ - *in vitro*$_4$) โดยกระบวนย้ายเลี้ยงหลายๆ ครั้งอาจให้ลักษณะทางพันธุกรรมแปรปรวนไป

การตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยวิธีทางชีวเคมีหรือการใช้เทคนิคไอโซไซม์ในการศึกษานี้ใช้ระบบเอนไซม์จำนวน 2 ระบบ คือ PER และ EST พบว่า เมื่อย้อมสีด้วยระบบเอนไซม์ EST ไม่พบการติดสี ส่วนการย้อมสีเจลด้วยระบบเอนไซม์ PER แผ่นเจลติดสีดีที่สุดและสามารถนำมาใช้ในการแยกความแตกต่างได้ อาจเนื่องจากเอนไซม์ของกล้วยน้ำว้ามีความเหมาะสมกับปฏิกิริยาของระบบ PER มากที่สุด ในขณะที่ Ramalakshmi และคณะ (2003) ทำการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกล้วย 6 สายพันธุ์ คือ Giant Govenor, Dweart Cavendish, Robusta, Champa, Kachakel และ Chatim พบว่า ไอโซไซม์ระบบ esterase สามารถจำแนกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน แต่ไม่แสดงแถบสีในระบบ peroxidase และ acid phosphatase เหตุผลดังกล่าว Werner (1992) รายงานว่า พืชแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อระบบเอนไซม์แต่ละชนิดแตกต่างกัน

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนในระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

เอกสารอ้างอิง

กัลยาณี อรรถฉัตร. 2533. ศึกษาการเพิ่มปริมาณของหน่อกล้วยหอม 5 พันธุ์ โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ปัญหาพิเศษปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร-ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กัลยาณี อรรถฉัตร. 2536. การชักนำและการพัฒนาของแคลลัสจากใบอ่อนกล้วยหอมแกรนเนน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กัลยาณี อรรถฉัตร กวิศร์ วานิชกุล และจุลภาค คุ้นวงศ์. 2533. การเติบโตและเพิ่มปริมาณต้นของกล้วยหอมพันธุ์ Grand Nain โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ว. วิชาการเกษตร 8 : 2-9.

เกษมศักดิ์ ผลการ. 2535. การจำแนกยีโนมของกล้วยด้วยวิธีเคมี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 137 หน้า.

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและอวัยวะพืช. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 209 หน้า.

จรินทร์ โตเจริญ. 2537. การศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส น้ำมะพร้าว และขนาดของขวดต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยพันธุ์แกรนเนน. รายงานการ

ฝึกงานภาคสนามพืชศาสตร์ ภาควิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

บุญยืน กิจวิจารณ์ และรัชนี ฉวีราช. 2533. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยหอมทองในสภาพปลอดเชื้อ. ว. วิทย. มข. 18 : 111-115.

ปวีณา ปาณะวร รุ่งทิพย์ โตสกุล มณฑกาญน์ ตันนานนท์ สุชาดา จิตรภิรมย์ศรี นงเยาว์ อรุณรุ่งสันติ และดำเกิง แสงไฟ. 2533. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยหอม. ข่าวสารเกษตรศาสตร์ 9 : 22-27.

ประภาสินี รัตโนภาส. 2529. เทคนิคการขยายพันธุ์กล้วยโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ปัญหาพิเศษปริญญาโทภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรรณี อัศวตรีรัตนกุล. 2543. การประยุกต์ใช้เทคนิคไอโซไซม์ในการจำแนกสายพันธุ์กล้วยไม้. รายงานการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

มนตรี จุฬาวัฒนทล ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์ ยงยุทธ ยุทธวงศ์ ภิญโญ พานิชพันธ์ ประหยัด โกมารทัต พิณทิพ รื่นวงษา ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล บุรชัย สนธยานนท์ สุมาลี ตั้งประดับกุล และมธุรส พงษ์ลิขิตมงคล. 2542. ชีวเคมี. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัดจิรรัชการพิมพ์ 589 หน้า.

วิไลวรรณ โชติเกียรติ และอมรรัตน์ พงศ์ดารา. 2533. การศึกษาโปรตีนและไอโซไซม์ในสารสกัดใบปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนร่า. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 12 : 21-28.

ศศิธร ทองมา. 2535. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยน้ำว้า. โครงงานทางชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 39 หน้า.

สมปอง เตชะโต และราตรี สุจารีย์. 2542. การชักนำการกลายพันธุ์มังคุดโดยใช้โคลชิซินกับใช้ตายอดที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 21: 155-167.

สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 205 หน้า.

อรดี สหวัชรินทร์ และสุภัทรา ศุภเมธี. 2530. การสร้างกล้วยพันธุ์ใหม่โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Ahloowalia, B.S. and Maluszynski, M. 2001. Induced mutations a new paradigm in plant breeding. Euphytica 118: 167-173.

Bhat, K.V., Bhat, S.R. and Chandel, K.P.S. 1992. Survey of isozyme polymorphism for clonal identification in *Musa*. II. Peroxidase, superoxide dismutase, shikimate dehydrogenase and malate dehydrogenase. J. Hort. Sci. 67 :737-744.

Bhagyalakshmi and Signh, N.S. 1995. Role of liquid versus agar-gells media in mass propagation and *ex vitro* survival in bananas. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 41 : 71-73.

Christina, C. and Rodrigues, V. 2004. Somaclonal variation event on micropropagated Pacovan banana seedling (*Musa* spp. AAB group). Bragentia. Campinas 63 : 201-205.

Hwang, S.C. and Ko, W.H. 1988. *In vitro* somaclonal variation in banana and its application for screening for resistance to fusarial wilt. Plant. Prot. Bull. (Taiwan) 107:1-9.

Ramalakshmi, D.Y., Gangopadhyay, G., Das, S., Dutta, B.K. and Mukherjee, K.K. 2003. Esterase as a marker to study the genetic fidelity of micropropagated banana. Biol. Plant. 47 : 421-424.

Simmonds, N.W. and Shepherds, K. 1955. The texonogy and origin of the cultivated bananas. J. linn. Soc. (Bot.) 55 : 302-312.

Trujillo, I. and Gracia, E. 1996. Stategies for obtaining somaclonal variants resistant to yellow Sigatoka (*Mycosphaerella musicols*). INFOMUSA 5 : 12-13.

Werner, D.W. 1992. Catalase polymorphism and inheritance in peach. Hort. Science 27: 41-43.