รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนามะละกอ

โครงการวิจัย โครงการวิจัยและพัฒนามะละกอ (โครงการวิจัยเดี่ยว)

ระยะเวลาเริ่มต้น 2554 **สิ้นสุด** 2558 **รวม** 5 **ปี**

กิจกรรมที่ 1

ชื่อการทดลอง: การศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมะละกอในสภาพปลอดเชื้อ (Tissue Culture) และสภาพเยือกแข็ง (Cryopreservation)

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ศิริลักษณ์	พุทธวงค์	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น
ผู้ร่วมงาน	สิทธิพงศ์	ศรีสว่างวงศ์	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น

บทคัดย่อ

การเก็บรักษาเนื้อเยื่อมะละกอในสภาพปลอดเชื้อและเยือกแข็งเพื่อเป็นฐานพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ และการอนุรักษ์ไม่ให้สูญหายเนื่องจากการกลายพันธุ์และการกระบาดของโรคจุดวงแหวน การเก็บรักษาเนื้อเยื่อมะละกอในสูตรอาหารอนุรักษ์ในสภาพปลอดเชื้อ สามารถรักษาเนื้อเยื่อมะละกอในสภาพปลอดเชื้อได้นาน 15 – 24 เดือน และไม่สามารถรักษาเนื้อเยื่อมะละกอที่เก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง ดังนั้นในการวิจัยครั้งต่อไปควรศึกษาส่วนของเนื้อเยื่อที่นำมาเก็บรักษา และการปรับปรุงสูตรอาหารสูตรอนุรักษ์ที่สามารถเก็บรักษาเนื้อเยื่อได้เป็นเวลานานขึ้น

คำนำ

การปลูกมะละกอในปัจจุบันต้องพบกับปัญหาผลผลิตและคุณภาพต่ำ ส่วนหนึ่งเกิดจากการระบาดของโรคจุดวงแหวนมะละกอที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Papaya ringspot virus* (PRSV) โดยเชื้อไวรัสสามารถเข้าทำลายได้ทุกระยะการเจริญเติบโต เมื่อมะละกอได้รับเชื้อไวรัสจุดวงแหวนจะแสดงอาการใบเหลืองด่าง บิดเบี้ยว และผิวของผลมีอาการเป็นจุดวงแหวน เมื่ออาการรุนแรงผลจะบิดเบี้ยว เนื้อแข็งกระด้าง ผลสุกเนื้อเป็นไตมีรสขม และผลผลิตลดลงอย่างมาก ซึ่งมะละกอสายพันธุ์ที่เป็นที่นิยมในท้องตลาดล้วนอ่อนแอต่อโรคนี้มาก เพื่อไม่ให้มะละกอสายพันธุ์การค้าที่มีอยู่ในประเทศไทยสูญหาย หรือกลายพันธุ์ไปเนื่องจากโรคจุดวงแหวนมะละกอและความแปรปรวนของสภาวะอากาศอันเนื่องมาจากภาวะโลกร้อน จึงจำเป็นต้องศึกษาหาวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมะละกอให้สามารถคงลักษณะประจำพันธุ์เดิมให้อยู่ได้นาน

การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืช (Germplasm conservation, gene bank) เป็นการเก็บรักษาพันธุ์พืช คือ เก็บแคลลัสของพืชที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส (cryopreservation) ควบคุมโดยใช้ไนโตรเจนเหลว สามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลานาน และเมื่อนำมาบังคับให้เกิดต้น ต้นที่ได้ไม่มีการกลายพันธุ์ หรือการเก็บรวบรวมพันธุ์พืชโดยบังคับให้พืชโตช้า ๆ ในขวด (minimal growth) การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชในขวดนี้ใช้พื้นที่น้อย นอกจากจะอยู่ในสภาพปลอดเชื้อแล้ว ยังปลอดจากภัยธรรมชาติอีกด้วย

วิธีการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง (Cryopresercation) เป็นการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส(Withers and Engelmann, 1997) ซึ่งในการเก็บรักษาพันธุกรรมในสภาพที่อุณหภูมิต่ำทำให้การแบ่งเซลล์และขบวนการ metabolism ต่าง ๆ ภายในเซลล์หยุดการทำงาน ทำให้สามารถเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชไว้ได้นาน (Engelmann, 2004) การเก็บรักษาพันธุกรรมด้วยวิธีนี้นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากสามารถเก็บรักษาพันธุกรรมได้เกือบทุกชิ้นส่วน และสามารถขยายระยะเวลาในการเก็บรักษาไว้ได้ การทำ encapsulation (Hirai *et al*., 1998) วิธีนี้ไม่เป็นพิษต่อพืชและสามารถป้องกันชิ้นส่วนระหว่างการดึงน้ำออกจากเซลล์ (Niino and Sakai. 1992)

จำรัส กัณหา (http://www.lib.kps.ku.ac.th/SpecialProject/Agricultural_Biotechnology/2546/Bs/JamratKa/ JamratKaAll.pdf)
ได้ทดสอบผลของการใช้สาร cryoprotectant ที่สามารถรักษาความมีชีวิตของเนื้อเยื่อขิง เมื่อเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยการนำเนื้อเยื่อของขิงที่ตัดให้มีขนาด 2-3 มิลลิเมตร จากส่วนของแง่ง มาทดสอบความมีชีวิตเมื่อเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวโดยใช้สาร cryoprotectant คือ ซูโครส ความเข้มข้น 0.5, 0.6, 0.7,0.8 ,0.9และ 1.0 M พบว่าที่เวลา 30นาที ซูโครส 0.5 M ทำให้เนื้อเยื่อขิงมีอัตราการมีชีวิตสูงสุด และที่เวลา 60นาที ซูโครส 0.7 M ทำให้เนื้อเยื่อขิงมีอัตราการมีชีวิตสูงสุด ส่วนการใช้ DMSO 10% ผสมกับ ซูโครส 0.25 M และ 0.5 M ที่เวลา 30 นาทีแล้วเทสารละลายออก DMSO 10% ผสมกับ ซูโครส 0.5 M เนื้อเยื่อขิงมีอัตราการมีชีวิตสูงสุด ส่วนที่ 30 นาทีแล้วไม่เทสารละลายออกใช้ DMSO 10% ผสมกับ ซูโครส 0.25 Mเนื้อเยื่อขิงมีอัตราการมีชีวิตสูงสุด และการทดสอบ glycerol 10, 20, 30, 40 และ 50% พบว่าที่เวลา 30 นาทีแล้วเทสารละลายออกglycerol 20%ทำให้เนื้อเยื่อขิงมีอัตราการมีชีวิตสูงสุด ส่วนที่เวลา 30 นาทีแล้วไม่เทสารละลายออก glycerol 40%ทำให้เนื้อเยื่อขิงมีอัตราการมีชีวิตสูงสุด และวิธีที่ทดสอบโดยใช้ glycerol 30% ผสมกับ ซูโครส 0.25 M และ 0.5 M นั้นพบว่าที่เวลา 30นาทีแล้วเทสารละลายออก และ ไม่เทสารละลายออกนั้น glycerol 30%ผสมกับ ซูโครส 0.25 Mทำให้เนื้อเยื่อขิงมีอัตราการมีชีวิตสูงสุดเช่นเดียวกัน

วัตถุประสงค์

7.1 เพื่อทราบวิธีการเก็บรักษาเนื้อเยื่อมะละกอในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้สามารถเก็บได้นานและคงสภาพเดิม

7.2 เพื่ออนุรักษ์พันธุ์มะละกอในรูปเชื้อพันธุกรรม

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

ศึกษาการเก็บพันธุ์มะละกอ โดยการเก็บเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ และสภาพเยือกแข็ง ให้สามารถเก็บพันธุกรรมได้นาน มีประสิทธิภาพสูง และประหยัด โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. พัฒนาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมะละกอในสภาพปลอดเชื้อ และสภาพเยือกแข็ง
2. ทดสอบผลการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในสภาพปลอดเชื้อ และสภาพเยือกแข็ง ระยะเวลาต่างๆ

3. ความสามารถในการเจริญเป็นต้นพืชได้หลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลานาน (Recovery) โดยการนำกลับมาเพาะเลี้ยงในสูตร MS

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

1. บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต ลักษณะเชื้อพันธุกรรม

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเก็บรักษาเนื้อเยื่อมะละกอในสภาพปลอดเชื้อ

ทำการทดสอบการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมะละกอโดยการทดสอบหาสูตรอาหารสำหรับลดอัตราการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ สามารถคัดเลือกสูตรอาหารดัง ภาคผนวก : สูตรอาหารอนุรักษ์ ทำการเก็บรักษาเนื้อเยื่อมะละกออย่างน้อย 14 พันธุ์ในอาหารสูตรอนุรักษ์ในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นทดสอบการคืนสภาพเนื้อเยื่อหลังการเก็บรักษาในระยะต่างๆ โดยการนำกลับมาเพาะเลี้ยงในสูตร MS พบว่าสามารถรักษาเนื้อเยื่อมะละกอในสภาพปลอดเชื้อได้นาน 15 – 24 เดือน

การเก็บรักษาเนื้อเยื่อมะละกอในสภาพ

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะละกออย่างน้อย 14 พันธุ์ พันธุ์ละอย่างน้อย 20 ต้นในอาหารสูตร MS ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อใช้ในการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง เก็บรักษาเป็นเวลา 30 60 90 และ 120 วัน จากนั้นทดสอบการคืนสภาพเนื้อเยื่อหลังการเก็บรักษาในระยะต่างๆ โดยการนำกลับมาเพาะเลี้ยงในสูตร MS พบว่าทุกระยะการเก็บไม่สามารถรักษาเนื้อเยื่อมะละกอในสภาพเยือกแข็งได้ อาจเนื่องจากการเตรียมเนื้อเยื่อมะละกอทำให้เนื้อเยื่อไม่แข็งแรง

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การเก็บรักษาเนื้อเยื่อมะละกอในสภาพปลอดเชื้อและเยือกแข็งเพื่อเป็นฐานพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ และการอนุรักษ์ไม่ให้สูญหายเนื่องจากการกลายพันธุ์และการกระบาดของโรคจุดวงแหวน

การเก็บรักษาเนื้อเยื่อมะละกอในสูตรอาหารอนุรักษ์ในสภาพปลอดเชื้อ สามารถรักษาเนื้อเยื่อมะละกอในสภาพปลอดเชื้อได้นาน 15 – 24 เดือน และไม่สามารถรักษาเนื้อเยื่อมะละกอที่เก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง ดังนั้นในการวิจัยครั้งต่อไปควรศึกษาส่วนของเนื้อเยื่อที่นำมาเก็บรักษา และการปรับปรุงสูตรอาหารสูตรอนุรักษ์ที่สามารถเก็บรักษาเนื้อเยื่อได้เป็นเวลานานขึ้น

เอกสารอ้างอิง

จำรัส กัณหา (http://www.lib.kps.ku.ac.th/SpecialProject/Agricultural_Biotechnology/ 2546/Bs/JamratKa/ JamratKaAll.pdf)

ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ กรมวิชาการเกษตร. 2540. การพัฒนาพันธุ์มะละกอทนทานโรคจุดวงแหวนมะละกอ. 31 หน้า

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น (ชื่อเดิม: สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ส่วนแยกพืชสวน) มปพ. มะละกอพันธุ์ ” แขกดำท่าพระ” ทนทานโรคจุดวงแหวน. เอกสารเผยแพร่

วิไล ปราสาทศรี. 2552. โรคจุดวงแหวนมะละกอและการป้องกันกำจัด. โรงพิมพ์ หจก.ขอนแก่นการพิมพ์. 97 หน้า

วิไล ปราสาทศรี. มปพ. เอกสารเผยแพร่ “มะละกอ”. ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตขอนแก่น. 2 หน้า.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. โรงพิมพ์อติสรรค์. 133 หน้า.

สุภาภรณ์ ภัทรสุทธิ นพรัตน์ หยีดจันทร์. ศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กล้วยไม้เอื้องปากนกแก้วในสภาพเย็นและสภาพเยือกแข็ง. http://www.doa.go.th/biotech/pdf-ktk/ktk%2827%29.pdf

ภาคผนวก

ภาพที่ 1 การเก็บรักษาเนื้อเยื่อมะละกอในสภาพปลอดเชื้อ ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น ปี 2555

ภาพที่ 2 การทดสอบการคืนสภาพเนื้อเยื่อโดยการเลี้ยงในสูตรอาหาร MS เพื่อกระตุ้นให้เกิดรากก่อนย้ายปลูกในกระถาง ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น ปี 2555

ภาพที่ 4 การทดสอบการคืนสภาพเนื้อเยื่อโดยการเลี้ยงในสูตรอาหาร MS และย้ายปลูกในกระถาง ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น ปี 2556

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร อนุรักษ์

Defossard Min (# 3)

DF Min I (50X) ปริมาตร 500 ml

1 . NH_4NO_3 40.02 g
2. KNO_3 50.55 g
3. $NaH_2PO_4.2H_2O$ 7.8 g
4. $MgSO_4.7H_2O$ 18.49 g

DF Min II (50X) ปริมาตร 500 ml

1. $CaCl_2.2H_2O$ 2.19 g

DF Min III (100X) ปริมาตร 500 ml

1. H_3BO_4 0.46 g
2. $MnSO_4.H_2O$ 0.84 g
3. $CuSO_4.5H_2O$ 0.02 g
4. $ZnSO_4.7H_2O$ 0.57 g
5. $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ 0.06 g
6. $CoCl_2.6H_2O$ 0.01 g
7. KI 0.04 g

DF Min IV (100X) ปริมาตร 500 ml

1. FeNaEDTA 1.83 g

Defossard Vits (#6)

DF Vit I (100X) ปริมาตร 500 ml

1. Inositol 5.4 g
2. Nicotinic acid 0.25 g
3. Pyridoxine HCl 0.06 g
4. Thiamine HCl 0.67 g
5. Glycine 0.19 g

DF Vit I I(100X) ปริมาตร 500 ml

1. Biotin 0.01 g
2. Folic acid 0.04 g
3. Riboflavin 0.19 g

DF Vit III (100X) ปริมาตร 500 ml

1. D-Pantothenic Ca-salt 0.12 g
2. Ascorbic acid 0.09 g
3. Choline chloride 0.07 g
4. L-Cysteine HCl 0.95 g

สูตรอนุรักษ์ (GM) 1 ลิตร

DF Min (#3) I, II 20 ml
DF Min (#3) III, IV 10 ml
DF Vit (#6) I,II, III 10 ml
Fructose 10 g
วุ้น 9 g
pH 5.8 ด้วย 1N KOH

Drew (สูตร D) 1 ลิตร

DF Min (#3) I, II20 ml
DF Min (#3) III, IV 10 ml
DF Vit (#6) I,II, III 10 ml
NAA (stock 100 mg) 0.9 ml
BA (stock 100 mg) 1.1 ml
น้ำตาล 20 g
วุ้น 9 g
pH 5.8 ด้วย 1 NKOH

Drew (สูตร S) 1 ลิตร

DF Min (#3) I, II 20 ml
DF Min (#3) III, IV 10 ml
DF Vit (#6) I,II, III 10 ml
น้ำตาล 20 g วุ้
น 9 g
pH 5.65 ด้วย 1 NKOH

สูตร Rooting (RD) 1 ลิตร

DF Min (#3) I 10 ml
DF Min (#3) IV 5 ml
DF No. ← 20 ml

DF No. ↑	10	ml
DF No. →	10	ml
DF No. ↓	10	ml
DF No. °	10	ml
IBA	20	ml
น้ำตาล	20	กรัม
วุ้น	9	กรัม

pH 5.65 ด้วย 1 NKOH