รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

.....

1. **แผนงานวิจัย** 178 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** 304 วิจัยการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

   กิจกรรม 1. การขยายพันธุ์พืชปลอดโรคเชิงพาณิชย์

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) -
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** 1.2 การชักนำให้เกิดยอดรวมในอ้อย (*Saccharum* spp.) ที่ปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้ชิ้นส่วนของใบอ่อน

   03-08-59-04-01-00-02-59

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Multiple shoot formation in phytoplasma-free sugarcane (*Saccharum* spp.) using immature leaf roll.
4. **คณะผู้ร่วมงาน**

หัวหน้าการทดลอง	**นายกษิดิศ ดิษฐบรรจง**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางชยานิจ ดิษฐบรรจง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายไพฑูรย์ บุปผาดา	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายวีระพล พลรักดี	ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

5. **บทคัดย่อ**

การชักนำให้เกิดยอดรวม (multiple shoot formation) ในอ้อย (*Saccharum* spp.) ที่ปลอดเชื้อไฟโตพลาสมา โดยใช้ส่วนใบอ่อนจากยอดที่ยังไม่คลี่ (immature leaf roll) สามารถทำได้บนอาหารกึ่งแข็ง (semi solid media) และในระบบ temporary immersion bioreactor (TIB) ในระบบกึ่งแข็งสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมสูงสุด ได้แก่สูตรอาหารที่ประกอบด้วย อาหาร MS ที่เติม 3-6 μM benzyladenine (BA) และ 2 μM naphthalene acetic acid (NAA) ได้ 47.5-51.6 ยอดอ่อน/ชิ้นส่วนพืช ภายในระยะเวลา 2 เดือน สำหรับการใช้ระบบ TIB สูตรอาหารที่ให้จำนวนยอดสูงสุด คือ อาหาร MS ที่เติม 3-6 μM BA and 2 μM NAA ได้ 22.1-16.2 ยอดอ่อน/ชิ้นส่วนพืช ภายในระยะเวลา 1 เดือน ซึ่งระบบ TIB สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้เร็วกว่าและยอดอ่อนมีขนาดใหญ่กว่าการใช้อาหารกึ่งแข็ง ยอดอ่อนที่ได้สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีบนอาหารสูตร ½MS+4-8 μM indole-3-butyric acid (IBA) ต้นอ่อนที่มีรากที่สมบูรณ์สามารถย้ายปลูกลงในเวอร์มิคูไลท์เพื่อปรับสภาพและปลูกในโรงเรือนระบบปิด โดยมีอัตราการอยู่รอดสูงกว่า 80%

Abstract

The multiple shoot formation in sugarcane (*Saccharum* spp.), that free from phytoplasma, has been done using immature leaf roll as explants. The induction was employed in two processes, on semi solid media and in temporary immersion bioreactor (TIB). In semi solid media, the highest number of shoots was obtained on MS basal media supplemented with 3-6 μM benzyladenine (BA) and 2 μM naphthalene acetic acid (NAA), 47.5-51.6 microshoots/explant within 2 months. For TIB system, the highest number of shoots was found in MS liqiud media supplemented with 3-6 μM BA and 2 μM NAA (22.1-16.2 microshoots/explant within 1 month) that was faster than those obtained on the semi solid media. Microshoots produced in the TIB system also displayed larger size than on semi solid media. Successful rooting of the microshoots was obtained in ½MS+4-8 μM indole-3-butyric acid (IBA). Plantlets were transferred in closed-system greenhouse with above 80% survival.

6. คำนำ

ปัจจุบันการเกษตรได้ใช้ประโยชน์จากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในหลายๆ ด้าน ได้แก่ การขยายพันธุ์พืชให้เพิ่มปริมาณมากและมีความสม่ำเสมอ (uniformity) ในระยะเวลาสั้น การผลิตพืชที่ปราศจากเชื้อโรค (disease-free plants) ตลอดจนการปรับปรุงหรือพัฒนาพันธุ์พืช (crop improvement) สามารถสร้างพันธุ์พืชต่างๆได้ตามความประสงค์ อ้อย (*Saccharum* spp.) เป็นพืชสำคัญที่มีมูลค่าการผลิตเพื่อการบริโภคและส่งออกที่สำคัญ ใช้เป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล มีมูลค่าการส่งออก 20,000-30,000 ล้านบาทต่อปี การปลูกอ้อยมีปัญหาเรื่องท่อนพันธุ์อ้อยที่ใช้ปลูกปนเปื้อนด้วยเชื้อไฟโตพลาสมา (phytoplasma) ทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตและผลผลิตลดลงอย่างมาก

งานวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยส่วนมากนำชิ้นส่วนพืช (explant) มาชักนำให้เกิดแคลลัส (callus) ก่อน ตามด้วยการเพิ่มปริมาณแคลลัส จากนั้นจึงชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอดอ่อน (microshoot) หรือ somatic embryo (Distabanjong et al., 2012) ซึ่งวิธีการดังกล่าวโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ (somaclonal variation) สูง เนื่องจากระยะที่เซลล์เป็นแคลลัสเป็นระยะที่ง่ายต่อการกลายพันธุ์ ดังนั้นจึงควรหลีกเลี่ยงขั้นตอนของการเกิดแคลลัส ปัญหาในปัจจุบันนี้ส่วนขยายพันธุ์อ้อย ได้แก่ ท่อนพันธุ์ มีการปนเปื้อนจากเชื้อไฟโตพลาสมา สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพร่วมกับศูนย์โคเปียประจำประเทศไทย (KOPIA Thailand Center) ได้ทำการคัดเลือกต้นอ้อยปลอดไฟโตพลาสมาโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้นำลงปลูกในเรือนทดลองปิดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนซ้ำ (reinfection)

งานวิจัยเรื่องนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อขยายพันธุ์อ้อยปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยไม่ผ่านขั้นตอนของการเกิดแคลลัส (direct shoot formation/direct organogenesis) และนำระบบ temporary immersion

bioreactor (TIB) มาใช้เป็นเครื่องมือช่วยการขยายพันธุ์ สามารถเพิ่มปริมาณส่วนขยายพันธุ์อ้อยที่ปลอดโรคนี้สามารถทำได้ในปริมาณมากภายในเวลาสั้นและยังช่วยประหยัดเวลาและแรงงานได้

7. วิธีดำเนินการ

- **อุปกรณ์**

1. ต้นอ้อยพันธุ์ ขอนแก่น 3 และ อู่ทอง 12 ที่คัดเลือกแล้วว่าไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาที่ได้จากโครงการวิจัยอ้อยไทย-เกาหลี ในปี พ.ศ. 2555-2557 (ค.ศ. 2012-2014)
2. สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
   benzyladerine (BA), naphthalene acetic acid (NAA)

- **วิธีการ**

งานวิจัยเรื่องการชักนำให้เกิดยอดรวม (multiple shoot formation) ได้นำชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อโรค phytoplasma ที่ได้จากโครงการวิจัยอ้อยไทย-เกาหลี (KOPIA-DOA Sugarcane Project) ระหว่างปี ค.ศ. 2012-2014 ผลสำเร็จของโครงการสามารถได้ต้นอ้อยที่ปลอดเชื้อ phytoplasma โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับชีวโมเลกุล ทั้งนี้การปลูกอ้อยปลอดโรคทำให้อ้อยเจริญเติบโตเร็ว แข็งแรง สามารถให้ผลผลิตสูง (Sood et al., 2006)

การชักนำให้เกิดยอดรวม แบ่งเป็น 2 การทดลอง

การทดลองที่ 1 เป็นการทดลองโดยชักนำให้เกิดยอดรวมบนอาหารกึ่งแข็ง (semi solid media) ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ คือ ใบอ่อนจากยอดที่ยังไม่คลี่ (immature leaf roll) ของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 เตรียมชิ้นส่วนพืชโดยตัดส่วนยอดอ่อนของอ้อย ลอกใบด้านนอกออกจนเหลือยอดอ่อนที่ติดกับข้อแรกของต้น จากนั้นนำไปล้างน้ำ 30 นาที แล้วฆ่าเชื้อภายนอกด้วยไฮเตอร์® (Haiter®;sodium hypochlorite 6% w/w as available chlorine) ความเข้มข้น 20% (v/v) นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเพื่อล้างไฮเตอร์® ออกจากผิวชิ้นส่วนพืช นำชิ้นส่วนทั้งหมดแช่ในสารปฏิชีวนะ nystatin (Sigma) ความเข้มข้น 250 มก./ล. เพื่อกำจัดเชื้อรา และ cefotexime (Sigma) ความเข้มข้น 250 มก./ล.เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย นาน 1 ชั่วโมง นำส่วนยอดอ่อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อภายนอกและแช่ในสารปฏิชีวนะแล้ว (ซึ่งมีความยาวประมาณ 10 ซม.) มาตัดตามขวาง (transverse section) หนาชิ้นละประมาณ 1-2 มม. ตำแหน่งที่ตัดอยู่ที่เหนือข้อแรกของยอดอ่อน อาหารเลี้ยงชิ้นส่วนพืชประกอบด้วย อาหารสูตร MS (Muashige and Skoog, 1962) casein hydrolysate (CH) 500 มก./ล. (Ali et al., 2012) น้ำตาลซูโครส (sucrose) 30 ก./ล. และ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) 2 ชนิด คือ benzyladerine (BA) และ naphthalene acetic acid (NAA) อาหารเลี้ยงพืชปรับ pH ที่ 5.7 ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ

สูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดยอดรวม

1. MS
2. MS+3μM BA
3. MS+6μM BA
4. MS+9μM BA
5. MS+3μM BA+2μM NAA
6. MS+6μM BA+2μM NAA
7. MS+9μM BA+2μM NAA

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 4 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลอง (treatment) มี 32 ชิ้นส่วนพืช (explant) เลี้ยงชิ้นส่วนพืชในสภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อุณหภูมิ 25°C ภายใต้สภาพแสง 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง ทำการบันทึกข้อมูล 2 เดือนหลังเลี้ยงและเปลี่ยนอาหารทุก 3 สัปดาห์เมื่อพบอาการ browning ในอาหารหรือบนชิ้นส่วนพืช

การทดลองที่ 2 เป็นการทดลองโดยชักนำให้เกิดยอดรวมในอาหารเหลวระบบ temporary immersion bioreactor (TIB)

นำชิ้นส่วนใบอ่อนจากยอดที่ยังไม่คลี่ (immature leaf roll) ของอ้อยพันธุ์ ขอนแก่น 3 โดยการเตรียมชิ้นส่วนพืชเหมือนกับการทดลองที่ 1 มาเลี้ยงในขวดเลี้ยงระบบ TIB ชนิด RITA® สูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดยอดรวมในระบบ TIB ประกอบด้วย อาหาร MS น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. CH 500 มก./ล. (Ali et al., 2012) สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่

1. MS
2. MS+3μM BA
3. MS+6μM BA
4. MS+9μM BA
5. MS+3μM BA+2μM NAA
6. MS+6μM BA+2μM NAA
7. MS+9μM BA+2μM NAA

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 4 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลองมี 24 ชิ้นส่วนพืช เลี้ยงชิ้นส่วนพืชในสภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อุณหภูมิ 25°C ภายใต้สภาพแสง 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง ทำการบันทึกข้อมูล 1 เดือนหลังเลี้ยง การทดลองนี้ให้อาหารเหลวกับชิ้นส่วนพืชทุก 3 ชั่วโมง (ซึ่งเท่ากับ 8 ครั้ง/วัน) แต่ละครั้งให้อาหารเหลวนาน 3 นาที (Distabanjong et al., 2018)

การชักนำให้เกิดราก

นำยอดอ่อนที่ได้จากการเพิ่มปริมาณความสูงประมาณ 5-8 ซม. มาเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดรากที่ประกอบด้วย อาหาร ½MS น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. และ indole-3-butyric acid (IBA) ความเข้มข้นต่างๆ 0, 2, 4, 6 และ 8 μM วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 4 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลองมี 48 ยอดอ่อน (microshoot) เลี้ยงชิ้นส่วนพืชในสภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อุณหภูมิ 25°C ภายใต้สภาพแสง 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมง บันทึกจำนวนรากต่อยอดอ่อนหลังเลี้ยง 1 เดือน

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 **(2 ปี)**

สถานที่ดำเนินงาน **สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี**

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ก่อนทำการทดลองในระบบ TIB ได้ทำการทดลองชักนำให้เกิดยอดรวมบนอาหารกึ่งแข็ง เพื่อทราบแนวโน้มและความเป็นไปได้ของการเกิดยอดรวมโดยไม่ผ่านการเกิดแคลลัส พบว่าการชักนำให้เกิดยอดรวมบนอาหารกึ่งแข็งสามารถชักนำได้ดีบนอาหาร MS ที่เติม 3-6 μM BA และ 2 μM NAA (47.5-51.6 ยอดอ่อน/ชิ้นส่วนพืช, ภาพที่ 1) การใช้ NAA ร่วมกับ BA สามารถเพิ่มจำนวนการเกิดยอดรวมได้สูงกว่าการใช้ BA เพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ali et al. (2012) ที่รายงานว่า NAA ช่วยส่งเสริมการเกิดยอดรวมและทำให้ยอดอ่อนมีการยืดตัว เป็นการตอบสนองแบบบวก (positive effect) ของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสอง เมื่อทำการทดลองในระบบ TIB พบว่า การชักนำให้เกิดยอดรวมสามารถชักนำได้ในอาหาร MS ที่เติม 3-6 μM BA และ 2 μM NAA (22.1-16.2 ยอดอ่อน/ชิ้นส่วนพืช, ตารางที่ 2) เป็นจำนวนยอดที่น้อยกว่าที่ได้จากอาหารกึ่งแข็ง แต่ระบบ TIB สามารถชักนำให้เกิดได้ภายในระยะเวลาที่น้อยกว่าการชักนำบนอาหารแข็ง ระบบ TIB สามารถชักนำได้ภายในระยะเวลา 1 เดือนหลังการเลี้ยง ส่วนในอาหารกึ่งแข็งสามารถชักนำได้ 2 เดือนขึ้นไป นอกจากนี้ต้นอ่อนที่ได้ในระบบ TIB จะมีความแข็งแรงและขนาดต้นสูงกว่าต้นอ่อนที่ได้จากอาหารกึ่งแข็ง (ภาพที่ 2) ชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอดอ่อนของการทดลองนี้ใช้ใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ ซึ่งได้ผลดีเช่นเดียวกับผลการวิจัยที่ผ่านมา (Ali et al., 2012, Gill et al., 2006, Snyman et al., 2008)

ตารางที่ 1. จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชบนอาหารกึ่งแข็ง (semi solid) สูตรต่างๆ

สูตรอาหาร	# ยอด/ชิ้นส่วนพืช[1]	% ชิ้นส่วนพืชที่ตอบสนอง[2]
1. MS	2.2 d	28
2. MS+3μM BA	10.8 c	60
3. MS+6μM BA	14.4 c	60
4. MS+9μM BA	19.2 bc	66
5. MS+3μM BA+2μM NAA	**47.5 a**	**70**
6. MS+6μM BA+2μM NAA	**51.6 a**	**82**
7. MS+9μM BA+2μM NAA	25.2 b	76

[1] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างที่ระดับ 5 % โดย DMRT

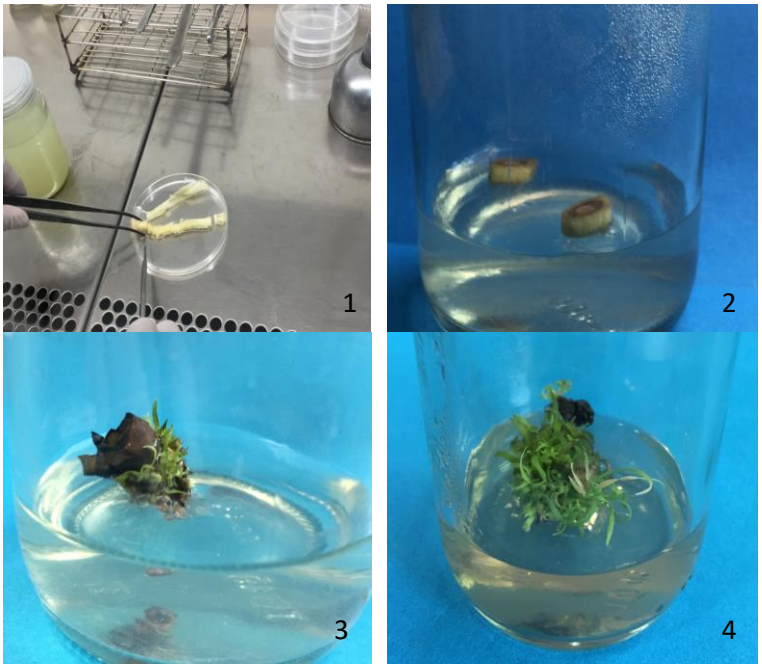
[2] จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชบันทึกเฉพาะยอดที่มีขนาดยาวกว่า 0.5 ซม. **บันทึกข้อมูล 2 เดือนหลังเลี้ยง**

ตารางที่ 2. จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชในอาหารเหลวสูตรต่างๆโดยระบบ temporary immersion bioreactor (TIB)

สูตรอาหาร	# ยอด/ชิ้นส่วนพืช[1]	% ชิ้นส่วนพืชที่ตอบสนอง[2]
1. MS	2.4 d	25
2. MS+3μM BA	3.6 cd	56
3. MS+6μM BA	6.4 bc	54
4. MS+9μM BA	8.2 b	59
5. MS+3μM BA+2μM NAA	**22.1 a**	**74**
6. MS+6μM BA+2μM NAA	**16.2 a**	**71**
7. MS+9μM BA+2μM NAA	11.4 b	69

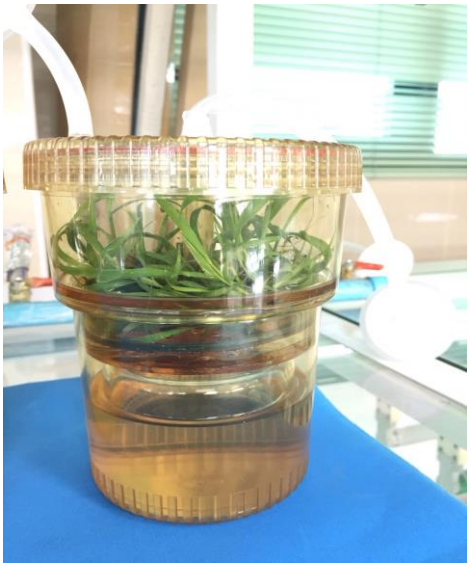
[1] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างที่ระดับ 5 % โดย DMRT

[2] จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชบันทึกเฉพาะยอดที่มีขนาดยาวกว่า 0.5 ซม.**บันทึกข้อมูล 1 เดือนหลังเลี้ยง**



ภาพที่ 1. การเกิดยอดรวมจากชิ้นส่วนใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ (immature leaf roll) เลี้ยงบนอาหาร MS ที่ประกอบด้วย 6 μM BA และ 2 μM NAA

1. ชิ้นส่วนใบอ่อนอ้อย ความยาวประมาณ 10 ซม.
2. ใบอ่อนตัดตามขวาง (transverse section) เลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดยอด
3. เกิดยอดรวม (multiple shoot) บนรอยตัด
4. ยอดรวมพัฒนาสมบูรณ์



ภาพที่ 2. การชักนำให้เกิดยอดรวมในระบบ TIB ในอาหาร MS+6 μM BA+2 μM NAA

การชักนำให้เกิดรากโดยใช้ IBA พบว่า สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้ได้จำนวนราก/ยอดอ่อนสูงสุด คือ อาหารสูตร ½MS + 4-8 μM IBA (ตารางที่ 3 และภาพที่ 3) แต่ที่ความเข้มข้นของ IBA 8 μM รากจะมีลักษณะบวมและไม่ยืดยาว ไม่เหมาะสำหรับการย้ายปลูก ดังนั้นความเข้มข้นของ IBA ที่เหมาะสมควรเป็น 4-6 μM ต้นอ่อนที่มีรากที่สมบูรณ์สามารถย้ายปลูกในเวอร์มิคูไลท์เพื่อปรับสภาพและปลูกในโรงเรือนระบบปิด โดยมีอัตราการอยู่รอดสูงกว่า 80% (ภาพที่ 4) สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชในกลุ่มออกซิน (auxin) สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี NAA สามารถชักนำให้เกิดรากในอ้อยได้ดี (Ali et al. 2012, Ali et al. 2010) แต่ในการทดลองนี้ใช้ IBA ชักนำให้เกิดราก ซึ่งจะได้รากที่มีขนาดเล็กเป็นฝอยละเอียด (ภาพที่ 3) และมีปริมาณมากกว่าเมื่อใช้ NAA (ไม่ได้แสดงผล)

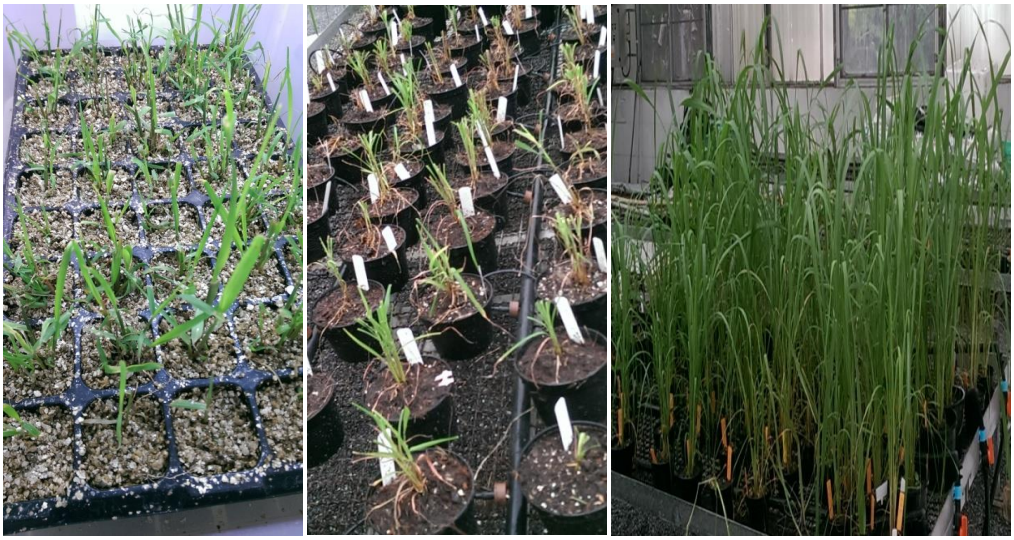
ตารางที่ 3. การชักนำให้เกิดรากในอาหารที่มี IBA ความเข้มข้นต่างๆ

IBA (μM)	**จำนวนราก/ยอดอ่อน**	
	ขอนแก่น 3	**อู่ทอง 12**
0	9 b	14 b
2	13 b	16 b
4	21 a	26 a
6	28 a	25 a
8	26 a	29 a

[1] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างที่ระดับ 5 % โดย DMRT

[2] จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชบันทึกเฉพาะยอดที่มีขนาดยาวกว่า 0.5 ซม.**บันทึกข้อมูล 1 เดือนหลังเลี้ยง**

ภาพที่ 3. การเกิดรากของยอดอ่อนอ้อยในอาหาร ½ MS+4 μM indole-3-butyric acid (IBA)



ภาพที่ 4. การย้ายปลูกต้นอ่อนอ้อยในโรงเรือนระบบปิด (closed-system green house)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การชักนำให้เกิดยอดรวมในอ้อย สามารถทำได้บนอาหารกึ่งแข็งและในระบบ TIB การใช้ TIB สามารถได้ยอดอ่อนในระยะเวลาที่สั้นกว่าการชักนำบนอาหารแข็ง แต่ระบบ TIB ชักนำให้เกิดยอดอ่อนได้ในปริมาณที่น้อยกว่าบนอาหารแข็ง (16.2-22.1 vs 47.5-51.6 ยอด/ชิ้นส่วนพืช) นอกจากนี้ควรทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อไฟโตพลาสมาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้แน่ใจว่าต้นพันธุ์ (stock plant) ปลอดโรค (ภาพผนวกที่ 1 และภาพผนวกที่ 2)

10. การนำเสนอผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยเรื่องนี้ได้นำเสนอในชื่อเรื่อง Production of phytoplasma-free plants in sugarcane (*Saccharum* spp.) using temporary immersion bioreactor โดยนำเสนอ oral presentation ใน **International Symposia on Tropical and Subtropical Horticulture** ที่เมือง Cairn เครือรัฐออสเตรเลีย ระหว่างวันที่ 20-25 พฤศจิกายน 2559 เรื่องเต็มได้ผ่านการตรวจจาก editorial board และจะลงตีพิมพ์ใน Acta Horticulturae ปี 2018.

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

ขอขอบคุณศูนย์โคเปียประจำประเทศไทย (KOPIA Thailand Center) สำหรับการสนับสนุนทางด้านวิชาการ โดยส่งผู้เชี่ยวชาญสาขาต่างๆ มาฝึกอบรมเกี่ยวกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อกำจัดเชื้อไวรัสและไฟโตพลาสมา

12. เอกสารอ้างอิง

Ali, S. M.S. Khan and J. Iqbal. 2012. In vitro direct plant regeneration from cultured young leaf segment of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). J. Animal & Plant Sci. 22 (4) : 1107-1112.

Ali, S., J. Iqbal and M.S. Khan. 2010. Genotype independent in vitro regeneration system in elite varieties of sugarcane. Pakistan J. Bot., 42 (6) : 3783-3790.

Distabanjong, C., K. Distabanjong, J.-G. Woo and S.-W. Jang. 2018. Production of phytoplasma-free plants in sugarcane (*Saccharum* spp.) using temporary immersion bioreactor. Acta Hort. (in press).

Distabanjong, K., C. Distabanjong, P. Wanichchananan, W. Polrakdee and S.-W. Jang. 2012. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Khon Kaen Agri. J. (Suppl.). 40 : 214-221.

Gill, R, P.K. Malhotra and S.S. Gosal. 2006. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 84 : 227-231.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497.

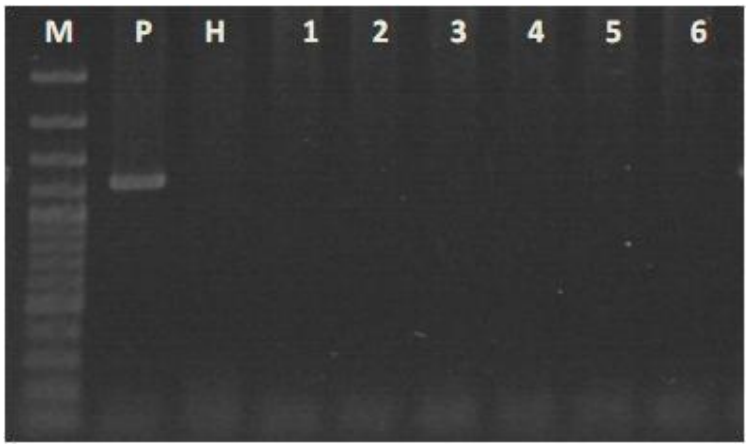
Snyman, S.J., G.M. Meyer, M. Banasiak, T.L. Nicholson,T. van Antwerpen, P. Naidoo and J.D. Erasmus. 2008. Micropropagation of sugarcane via NovaCane® : Preliminary steps in commercial application. Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass. 81 : 513-516.

Sood N., P. K. Srivastava and S. S. Gpsal. 2006. Microppropagated and conventionally propagated sugarcane plants. Plant Tissue Cult. and Biotech. 16 (1) : 25-29.

13. ภาคผนวก

ภาพผนวกที่ 1. การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นอ้อยที่ปลูกในโรงเรือนระบบปิด เพื่อใช้เป็นชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเทคนิค nested-polymerase chain reaction (nested-PCR) ใช้ 2 primers คือ R16mF2/R16mR1 และ R16F2/R16R2

Lane 1-20 – **ไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา**
W – น้ำกลั่น N – ต้นอ้อยปกติไม่มีเชื้อไฟโตพลาสมา P – positive control (1,250 bp)
M – 100 bp DNA ladder plus, Fermentas
ผล : ไม่พบการติดเชื้อซ้ำ (reinfection)



ภาพผนวกที่ 2. การตรวจสอบซ้ำในต้นอ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบ TIB โดยเทคนิค nested-polymerase chain reaction (nested-PCR) ใช้ 2 primers คือ R16mF2/R16mR1 และ R16F2/R16R2

M – 100 bp DNA ladder plus, Fermentas P – positive control (1,250 bp)
H – พืชปกติไม่เป็นโรค (healthy plant)
ผล : ไม่พบการติดเชื้อ