รายงานผลการทดลองสิ้นสุด

1.แผนงานวิจัย : วิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

2.โครงการวิจัย : วิจัยการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กิจกรรม : การขยายพันธุ์พืชปลอดโรคเชิงพาณิชย์

3.ชื่อการทดลอง : การขยายพันธุ์มันฝรั่งโดยใช้ระบบ Temporary Immersion Bioreactor

Mass of Potato Propagated Materials using Temporary Immersion Bioreactor

4.คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : ชยานิจ ดิษฐบรรจง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : กษิดิศ ดิษฐบรรจง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

: ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

: ไพฑูรย์ บุปผาดา สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

: ศิริลักษณ์ อินทวงศ์ สำนักวิจัยพัฒนาการเกษตรเขต1

5.บทคัดย่อ

ดำเนินการศึกษาการขยายพันธุ์มันฝรั่งปลอดโรค โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมันฝรั่งให้ได้ส่วนขยายพันธุ์ปลอดโรค พัฒนาหาสูตรอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิด micro shootโดยใช้ระบบ Temporary Immersion Bioreactor (TIB) เพื่อผลิตส่วนขยายพันธุ์มันฝรั่งที่ปลอดโรคในเชิงพาณิชย์ ดำเนินการระหว่างปี 2559-2560 ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเพื่อให้ปลอดโรค การใช้ apical meristem ขนาด 0.1 - 0.2 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ร่วมกับ BA 5 µM สามารถชักนำให้มีการพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ยอด ในพันธุ์แอตแลนติก 36 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์สปุนตา 24 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ PVY ด้วยวิธีเซรุ่มวิทยา พบการปลอดโรคสูงถึง ได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดรวมในระบบ TIB เทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว มันฝรั่งแอตแลนติกและสปุนตา สามารถเพิ่มปริมาณยอดรวมได้สูง 5.2 ยอด และ4.2 ยอด ต่อ 1ชิ้นส่วนพืช ตามลำดับและมีความสูงของยอดในเกณฑ์ปกติ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มี GA3 0.1 mg/l และ NAA 0.1 mg/L ส่วนในระบบ TIB สามารถให้ปริมาณยอดรวมสูงสุด 4.8 ยอดและ 3.6 ยอด ตามลำดับในอาหารสูตรเดียวกัน โดยให้อาหาร 8 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 10 นาที เมื่อศึกษาผลของ BA และน้ำตาลซูโครสต่อการเกิด micro tubers ในอาหารเหลว พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 40 µM และน้ำตาลซูโครส ร่วมกับ 6 -8 เปอร์เซ็นต์ Chlorocholine chloride (CCC) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิด micro tubers ได้มากที่สุดในพันธุ์แอตแลนติก ส่วนพันธุ์สปุนต้า อาหารเหลว MS ที่เติม BA 20 µM และน้ำตาลซูโครส 8 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิด micro tubers ได้ดีที่สุด แต่ในระบบ TIB ยังไม่สามารถสรุปได้ เนื่องจากทั้งแผนงานวิจัยถูกระงับการดำเนินงาน และยังมีปัจจัยที่ต้องศึกษาอีก เช่น ระยะเวลาการให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช และ ความเข้มข้นของ CCC

Masspropagation of disease-free potato has been done using temporary immersion bioreactor (TIB) during 2016-2017. Excised apical meristem explants, 0.1-0.2 cm, have been cultured on MS basal media supplemented with 5 µM benzyladenine (BA) for induction of microshoot (36% in Atlantic and 24% in Spunta). Serology investigation of PVY virus displayed 90% elimination. Multiple shoot formation in liquid culture, MS basal media containing 0.1 mg/l gibberellic acid (GA3) and 0.1 mg/l naphthaleneacetic acid (NAA), resulted in 5.2 microshoots/explant in Atlantic and 4.2 microshoots/explant in Spunta with normal height. In the TIB system, the highest number of shoots was obtained from the similar media composition (4.8 microshoots/explant in Atlantic and 3.6 microshoots/explant in Spunta). The explants have received liquid media 8 times/day or every 3 hours with 10 minutes each time. For production of micro tuber of Atlantic in liquid media, the best media composition was MS basal media supplemented with 40 µM BA, 6-8% (w/v) sucrose and 500 mg/l chlorocholine chloride (CCC). In addition, the best media composition for micro tuber production in Spunta was MS media containing 20 µM BA, 8% (w/v) sucrose and 500 mg/l chlorocholine chloride (CCC). Unfortunately, research on TIB system has not been finished due to the official termination of research program. Various types of factors, including feeding frequency and CCC concentration etc, need further investigation.

6. **คำนำ** มันฝรั่งจัดเป็นพืชที่เศรษฐกิจที่สำคัญในภาคเหนือ เป็นที่นิยมเพื่อการบริโภคและใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการแปรรูป ปัจจุบันความต้องการมันฝรั่งเพื่อป้อนโรงงานสูงถึงปีละหนึ่งแสนสองหมื่นตัน แต่การปลูกมันฝรั่งในประเทศไทยยังต้องนำเข้าหัวพันธุ์มาจากต่างประเทศ คิดเป็นมูลค่ากว่า 75 ล้านบาทต่อปี (http://www.komchadluek.net/2008/11/27/x agi b001_233276.php?news_ id=233276)เนื่องจากไทยผลิตได้ไม่เพียงพอกับความต้องการทั้งหัวพันธุ์มันฝรั่งและหัวมันฝรั่งสดเพื่อการแปรรูป โดยเฉพาะหัวพันธุ์มันฝรั่งประเทศไทยสามารถผลิตได้ปีละ ประมาณ 5,500 ตัน ขณะที่เกษตรกรต้องการใช้หัวพันธุ์เพื่อเพาะปลูกสูงถึง 20,000 ตัน/ปี ถึงแม้ว่าจะมีการขยายพื้นที่ปลูก มีการวิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิต ตลอดจนการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งที่มีคุณภาพภายในประเทศ แต่ก็ยังไม่เพียงพอต่อปริมาณความต้องการ และยังมีปัญหาสำคัญในการผลิตหัวพันธุ์ที่มีคุณภาพคือการติดเชื้อและการเกิดโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส ซึ่งทำความเสียหายรุนแรงต่อผลผลิต และการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง ที่สำคัญคือเมื่อเป็นโรคแล้วยังไม่มีวิธีการใดที่สามารถควบคุมการระบาดของโรคได้ (วงศ์, 2550)

แนวทางหนึ่งที่สามารถใช้ในการป้องกันโรคและเพิ่มผลผลิตของมันฝรั่งก็คือ การใช้หัวพันธุ์ที่ปลอดจากเชื้อสาเหตุโรค การผลิตหัวพันธุ์ที่ปลอดโรคและนำไปให้เกษตรกรเพาะปลูก เป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตให้กับเกษตรกรได้ นอกจากนี้การใช้เทคนิค Temporary Immersion Bioreacter ขยายพันธุ์มันฝรั่ง

ในปริมาณมากจะช่วยประหยัดเวลาแรงงาน และพื้นที่ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์มันฝรั่งในสภาพปลอดเชื้อเชิงพาณิชย์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมันฝรั่งให้ได้ส่วนขยายพันธุ์ปลอดโรค พัฒนาหาสูตรอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิด multiple shootsโดยใช้ระบบ Temporary Immersion Bioreacter เปรียบเทียบกับการชักนำให้เกิด multiple shoots ในอาหารเหลวรวมทั้งมีการปรับสภาพบางอย่างเช่นการชักนำให้เกิด micro tuber ก่อนลงปลูก เพื่อให้มีการพัฒนาความอยู่รอดในสภาพแปลงปลูกในเปอร์เซ็นต์ที่สูงเท่าที่สามารถทำได้

7.อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

1. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเพื่อให้ปลอดโรค

นำส่วนของ ปลายยอด(apical meristem)ของมันฝรั่งพันธุ์แอตแลนติก และพันธุ์สปุนต้าขนาดประมาณ 0.1 -0.2 เซนติเมตรชนิดละ 50 ยอด มาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหาร MS ที่เติม BA หรือ kinetin 5 µM เพื่อชักนำให้เกิด shoot แล้วนำต้นอ่อนที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส PVY โดยใช้ วิธีทางเซรุ่มวิทยา

2. ศึกษาการเพิ่มปริมาณ multiple shoots ในอาหารเหลว

นำต้นอ่อนที่ปราศจากเชื้อไวรัส ที่มีข้อ 3 -4 ข้อ มาเลี้ยงในอาหารแข็งพื้นฐาน MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 0.1 mg / l และ NAA 0.1 mg / l และ combination ของ GA และ NAA เปรียบเทียบกับไม่เติม วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ 4 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 อาหาร MS

กรรมวิธีที่ 2 อาหาร MS + GA_3 0.1 mg /l

กรรมวิธีที่ 3 อาหาร MS + NAA 0.1 mg

กรรมวิธีที่ 4 อาหาร MS + GA_3 0.1 mg / l + NAA 0. 1 mg/L

โดยทุกกรรมวิธีเติม gelrite 0.3 % sucrose 3 % pH 5.7 เลี้ยงในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

บันทึกผล 1. อัตราการเพิ่มปริมาณ multiple shoots

2. ความสูงของ multiple shoots

3. ศึกษาการเพิ่มปริมาณ multiple shoots ในระบบ TIB

3.1 จัดตั้งระบบ TIB

3.2 ศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดรวม (multiple shoots)ในระบบ TIB โดยใช้สูตรอาหารของการทดลองในอาหารเหลว นำไปทดลองเลี้ยงในระบบ TIB โดยใช้อาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตดังกล่าวข้างต้น ให้อาหารสัมผัสเนื้อเยื่อพืช วันละ 8 ครั้ง ๆ ละ3นาที เลี้ยงในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมง และไม่เปลี่ยนอาหารเลย วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 3 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลอง (treatment) มีชิ้นส่วนพืช 12 ชิ้น (6 ยอด)

วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ 4 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 อาหาร MS

กรรมวิธีที่ 2 อาหาร MS + GA_3 0.1 mg /l

กรรมวิธีที่ 3 อาหาร MS + NAA 0.1 mg/l

กรรมวิธีที่ 4 อาหาร MS + GA_3 0.1 mg / l + NAA0.1 mg/L

โดยทุกกรรมวิธีเติม sucrose 3 % pH 5.7 เลี้ยงในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

บันทึกผล 1. อัตราการเพิ่มปริมาณ multiple shoots

2. ขนาดและความสูงของ multiple shoots

4. ศึกษาการเกิด micro tubers

4.1 ศึกษาผลของ BA และ น้ำตาลซูโครสต่อการสะสมแป้งในรากในระบบอาหารเหลว และระบบ TIB

นำมันฝรั่ง ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณยอดอ่อนในอาหาร เหลว MS เติม + GA_3 0.1 mg + NAA 0.1 mg/L นาน 4-6 สัปดาห์ จำนวน 10 ยอดต่อกรรมวิธี (ขวด)มาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มี BAและน้ำตาล ในปริมาณที่เหมาะสมในการเกิด ราก ร่วมกับสารช่วยกระตุ้นให้เกิดการสะสมแป้งในราก ได้แก่ Chlorocholine chloride (CCC) 500 mg/l ซึ่งมีผลทำให้เกิดหัวขนาดเล็ก (micro tubers) ร่วมกับราก นำมาเลี้ยงในที่มืดและที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 8 กรรมวิธี 4 ซ้ำ กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่1. MS + sucrose 60 gm

กรรมวิธีที่2. MS + sucrose 80 gm

กรรมวิธีที่3. MS+ BA 20 μM + sucrose 60 gm

กรรมวิธีที่4. MS+ BA 20 μM + sucrose 80 gm

กรรมวิธีที่5. MS+ BA 40 μM + sucrose 60 gm

กรรมวิธีที่6. MS+ BA 40 μM + sucrose 80 gm

กรรมวิธีที่7. MS+ BA 60 μM + sucrose 60 gm

กรรมวิธีที่8. MS+ BA 60 μM + sucrose 80 gm

บันทึกข้อมูล - ปริมาณการเกิด micro tubers

ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย (ให้ระบุขั้นตอนอย่างละเอียด)

ระยะเวลา : ตุลาคม 2558 – กันยายน 2561

8. ผลการทดลอง และวิจารณ์

1. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเพื่อให้ปลอดโรคโดยวิธี meristem culture

หัวพันธุ์มันฝรั่งพันธุ์แอตแลนติกและสปุนต้า จาก ศวพ.เชียงใหม่ เมื่อนำมาเพาะให้งอกในสภาพโรงเรือนแล้วโดยนำยอดที่งอกออกมายาวประมาณ 3 -5 ซม. ฟอกฆ่าเชื้อภายนอกด้วยคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ตัดชิ้นส่วนปลายยอด (apical meristem) ขนาดประมาณ 1-2 มม. ซึ่งมีความจำเป็นต้องดำเนินการใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ปลายยอดมันฝรั่ง สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารแข็ง ที่เติม BA ทั้ง 2 ระดับ คือที่ความเข้มข้น 1 และ 5 μM ในพันธุ์แอตแลนติก 18 ยอด คิดเป็น 38 % ของยอดที่นำมาเพาะเลี้ยง และ สปุนต้า 12 ยอด คิดเป็น 24% ของยอดที่นำมาเพาะเลี้ยง และเมื่อเลี้ยงต่อไปจนกระทั่งยอดมีการเติบโต สูงประมาณ 6-8 ซม. ตัดใบไปตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ PVY ด้วยวิธีเซรุ่มวิทยาแบบ indirect elisa จำนวนพันธุ์ละ 10 ตัวอย่าง (10ยอด) อ่านค่า OD. 405 นาโนเมตร ที่เวลา 30 และ 60 นาที พบการปนเปื้อนเชื้อ PVY ในมันฝรั่งสปุนตา เพียง 1 ตัวอย่างคือในตัวอย่างที่7 ซึ่งมีค่า OD. 405 นาโนเมตร เฉลี่ยสูงกว่าค่าเฉลี่ยของ positive PVY ในขณะที่พันธุ์แอตแลนติค มีค่า OD ต่ำกว่าค่าเฉลี่ย positive PVY ซึ่งแสดงว่าไม่มีโรคไวรัส (ตารางที่ 1)

การทดลองด้วยวิธี meristem culture ครั้งนี้ให้ผลดี ตามหลักการ เชื้อไวรัสไม่สามารถเคลื่อนย้ายไปสู่เนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตได้ เพราะเนื้อเยื่อดังกล่าวเป็นเพียงกลุ่มเซลล์ ยังไม่มีการพัฒนาเป็น vascular system และนอกจากนี้บริเวณ apical meristem จะมีออกซินสูงซึ่งจะช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสได้ (Morel และ Martin. 1952) อย่างไรก็ตาม apical meristem ยิ่งมีขนาดเล็กจะยิ่งได้ชิ้นส่วนที่ปลอดโรค แต่ยิ่งเล็กเท่าไรโอกาสที่จะเจริญเป็นยอดก็มีน้อยลงมาก จากการทดลองเพาะเลี้ยง apical meristem พันธุ์ละ 50 ชิ้น มีการเติบโตเป็นยอดระหว่าง 12 – 18 ยอดคิดเป็น 24-36 % เท่านั้น และในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของไวรัสตรวจเฉพาะเชื้อ PVY เนื่องจากว่าเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงในมันฝั่งทางภาคเหนือของไทยซึ่งทำให้ใบมันฝรั่งเสียคลอโรฟิลล์ ทำให้ผลผลิตเสียหายมากถึง 80 % ในขณะที่เชื้อ PVX ทำความเสียหายให้ผลผลิตเพียง 20 %

ตารางที่1. ผลการตรวจไวรัส PVY ในมันฝรั่ง แสดงค่า OD. 405 นาโนเมตรที่เวลา 30 และ 60 นาที

sample	ค่า OD. 405 นาโนเมตร ที่เวลา 30 นาที				ค่า OD. 405 นาโนเมตร ที่เวลา 60 นาที			
	rep 1	rep 2	average	result	rep 1	rep 2	average	result
#สปุน 1	0.17	0.16	0.16	N	0.22	0.21	0.21	N
#สปุน 2	0.14	0.15	0.15	N	0.17	0.17	0.17	N
#สปุน 3	0.14	0.14	0.14	N	0.17	0.17	0.17	N
#สปุน 4	0.13	0.14	0.13	N	0.16	0.16	0.16	N
#สปุน 5	0.13	0.14	0.14	N	0.16	0.16	0.16	N
#สปุน 6	0.13	0.14	0.14	N	0.16	0.17	0.16	N
#สปุน 7	1.4	1.33	1.37	P	2.40	2.47	2.43	P
#สปุน 8	0.14	0.14	0.14	N	0.18	0.17	0.18	N
#สปุน 9	0.15	0.14	0.14	N	0.18	0.17	0.17	N
#สปุน 10	0.15	0.13	0.14	N	0.17	0.16	0.16	N
#แอต 1	0.14	0.13	0.13	N	0.16	0.15	0.15	N
#แอต 2	0.15	0.15	0.15	N	0.19	0.18	0.18	N
#แอต 3	0.14	0.14	0.14	N	0.16	0.16	0.16	N
#แอต 4	0.14	0.14	0.14	N	0.16	0.16	0.16	N
#แอต 5	0.14	0.14	0.14	N	0.17	0.16	0.16	N
#แอต 6	0.14	0.13	0.14	N	0.16	0.16	0.16	N
#แอต 7	0.14	0.14	0.14	N	0.18	0.17	0.17	N
#แอต 8	0.14	0.14	0.14	N	0.17	0.17	0.17	N
#แอต 9	0.14	0.14	0.14	N	0.17	0.17	0.18	N
#แอต10	0.13	0.14	0.14	N	0.18	0.18	0.18	N
Positive PVY	1.1	1.19	1.14		1.93	2.05	1.99	
H มันฝรั่ง	0.14	0.13	0.13		0.15	0.15	0.15	
bf	0.12	0.12	0.12		0.13	0.13	0.13	
cut off	0.26				0.30			

2. ศึกษาการเพิ่มปริมาณ multiple shoots และ micro tubers ในอาหารเหลว

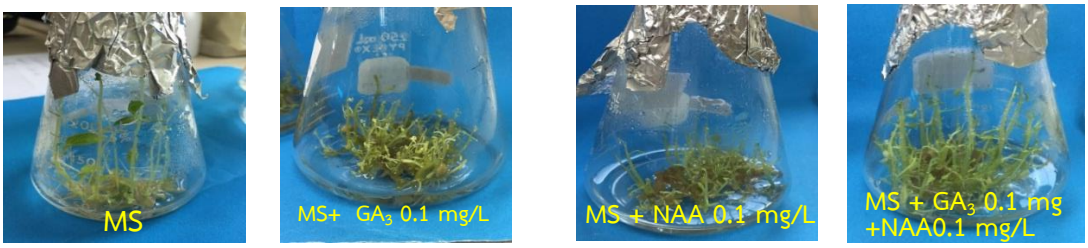
2.1 การเพิ่มปริมาณ multiple shoots

เมื่อนำยอดอ่อนที่ปราศจากเชื้อไวรัส ที่มีข้อ 3 ข้อของมันฝรั่งสปุนต้า และแอตแลนติค ทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวพื้นฐาน MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ GA_3 0.1 mg / l และ NAA 0.1 mg / l และ combination ของ GA_3 และ NAA เปรียบเทียบกับไม่เติม

ผลการทดลองพบว่าในมันฝรั่งแอตแลนติคเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้จำนวนยอดรวมน้อยสุด แต่ยอดมีการเจริญยืดยาวขึ้น โดยจะที่มีสร้าง micro shoot 1.8 ยอดต่อ 1 ชิ้นส่วน โดยยอดมีความสูงเฉลี่ย 3.8 ซม ส่วนการเติม GA_3 0.1 mg/L ให้จำนวนยอดรวมสูงสุด 5.8 ยอด ต่อ 1 ชิ้นส่วนแต่ยอดไม่ยืดยาว มีความสูงเฉลี่ยเพียง 2.4 ซม. การเติม NAA 0.1 mg/l มีจำนวนยอด 4.2 ยอด ความสูงเฉลี่ย 2.8 ซม. ในขณะที่การเติม GA_3 0.1 mg / l และ NAA 0.1 mg / l ลงในอาหารให้ผลดีที่สุด มีการแตก Microshoot เพิ่มขึ้น 5.2 ยอด ต่อ 1ชิ้นส่วน และความสูงของยอดอยู่ในเกณฑ์ปกติ ไม่แตกต่างกับการใช้อาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ภาพที่1 และ ตารางที่2)

มันฝรั่งพันธุ์สปุนตาก็ให้ผลในทำนองเดียวกันคือการเลี้ยงในอาหารทีมี GA_3 0.1 mg + NAA 0.1 mg/L ให้ผลดีที่สุด ได้ยอด 4.2 ยอด ความสูง 2.8 ซม.ถึงแม้จำนวนยอดที่ได้จะน้อยกว่าการเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี GA_3 เพียงอย่างเดียวเล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ความสูงเฉลี่ยมากกว่าและแตกต่างทางสถิติอย่างชัดเจน

ในการวิจัยครั้งนี้ ใช้อาหาร MS เนื่องจากเป็นอาหารพื้นฐานที่ใช้ได้ผลดีในการขยายพันธุ์มันฝรั่ง โดยทั่วไปจะใช้อาหารแข็ง แต่ในกรณีที่ต้องการเพิ่มปริมาณยอดเป็นจำนวนมากมักจะใช้อาหารเหลว นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณยอดและการเจริญเติบโตยังขึ้นกับอุณหภูมิที่เหมาะสม คือที่ 22-25 องศาเซลเซียส และได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน (Wang and Hu .1982) นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มปริมาณยอดของมันฝรั่ง โดยเฉพาะ combination ที่เหมาะสม NAA ที่ใช้เป็นสารควบคุมการเจริญประเภทออกซินซึ่งมีผลส่งเสริมกระตุ้นการแบ่งเซลล์หรือการแตกหน่อ ส่วน GA_3 ช่วยส่งเสริมให้ยอดยืดยาวขึ้น อย่างไรก็ตามยังมีความแปรปรวนขึ้นอยู่กับ genotype และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของมันฝรั่งด้วย (Abbott and Belcher,1986)



ภาพที่ 1. แสดงการเพิ่มปริมาณยอดรวมมันฝรั่งแอตแลนติค ในอาหารชนิดต่างๆ

ตาราง2 เปรียบเทียบสูตรอาหารเหลว ในการเพิ่มปริมาณยอดรวม

สูตรอาหาร	แอดแลนติค		สปุนตา	
	จำนวนยอดเฉลี่ย / ยอด	ความสูง ซม.	จำนวนยอดเฉลี่ย / ยอด	ความสูง ซม.
1. MS	1.8 c	3.8 a	1.2 c	2.9 a
2. MS+ GA_3 0.1 mg/L	5.8 a	2.4 b	4.4 a	1.8 c
3.MS + NAA 0.1 mg/L	4.2 b	2.8 b	3.2 b	2.2 bc
4.MS + GA_3 0.1 mg + NAA0.1 mg/L	5.2 ab	3.7 a	4.2 a	2.8 ab
cv	21	24	26	23

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

2.2 ศึกษาการชักนำให้เกิด micro tubers ในอาหารเหลว

ทำการศึกษาผลของ BA และน้ำตาลซูโคลส ต่อการเกิด micro tubers นำมันฝรั่ง ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณยอดอ่อนในอาหาร เหลว MS เติม + GA_3 0.1 mg + NAA 0.1 mg/L นาน 4-6 สัปดาห์ จำนวน 5 ยอดต่อกรรมวิธี (ขวด) มาทดสอบสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิด micro tuber โดยศึกษาความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาล ระหว่าง 60 – 80 กรัม ต่อลิตร และ ความเข้มข้น BA ระหว่าง 20 -60 µM ร่วมกับ Chlorocholine chloride (CCC) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงในที่มืด นาน 8 สัปดาห์ พบว่าในการเลี้ยงระยะ 3-4-สัปดาห์แรกในทุกสูตรอาหารมีการพัฒนาเพิ่มปริมาณยอดขึ้น เป็นผลของ BA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ต่อจากนั้นจึงเริ่มมีพัฒนาการเป็นหัวขนาดเล็ก (micro tuber) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 5 เป็นต้นไป และเมื่อวัดผลในสัปดาห์ที่8 พบว่า ในพันธุ์แอตแลนติก การเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 40 µM และน้ำตาล 8 เปอร์เซ็นต์ ได้ micro tubers เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 8.6 หัว น้ำหนักรวม 5.1 กรัม แต่ก็ไม่ต่างทางสถิติกับอาหารที่เติม BA 40 µM และน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารที่ไม่เติม BA จำนวน micro tubers ที่เกิดขึ้นจะน้อยที่สุด ในขณะที่พันธุ์สปุนตา มีการสร้าง micro tubers ในอาหาร MS ที่เติม BA 20 µM และน้ำตาล 8 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนหัวเฉลี่ยต่อขวดมากสุดเท่ากับ 7.1 หัว จะเห็นได้ว่าน้ำตาลในปริมาณความเข้มข้นสูง จะมีแรงดันออสโมซิสเพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลให้พืชเข้าสู่ระยะ maturity และเข้าสู่ระยะสร้าง micro tubers (Hassain et al,. 2006) นอกจากนี้ ในการทดลองดังกล่าวข้างต้น ได้เติม Chlorocholine chloride 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสารประกอบ compound ที่นิยมใช้ในการเลี้ยงพืชในสภาพปลอดเชื้อจะมีส่วนช่วยให้มันฝรั่งมีการสร้าง micro tubers โดยจะช่วยควบคุมการเจริญของพืชทางด้าน vegetative ส่งเสริมให้มีการสะสมแป้งในราก (Neerja et al.,1998)

ตารางที่ 3 . ผลของ BA และน้ำตาลซูโครส ต่อการชักนำให้เกิด micro tubers ในอาหารเหลว

สูตรอาหาร	แอตแลนติก		สปุนตา	
	จำนวนหัว *	นน. รวม กรัม *	จำนวนหัว *	นน.รวม กรัม.*
1. MS + sucrose 60 gm	1.6 d	0.6 d	1.1 e	0.2 e
2. MS + sucrose 80 gm	3.2 c	1.2 c	2.8 d	1.8 d
3. MS+ BA 20 µM + sucrose 60 gm	6.8 b	3.6 b	6.8 ab	4.2 a
4. MS+ BA 20 µM + sucrose 80 gm	7.4 b	4.2 ab	7.1 a	3.9 a
5. MS+ BA 40 µM + sucrose 60 gm	8.2 a	4.3 ab	5.3 bc	3.8 ab
6. MS+ BA 40 µM + sucrose 80 gm	8.6 a	5.1 a	4.8 c	2.9 bc
7. MS+ BA 60 µM + sucrose 60 gm	6.3 b	4.1 b	2.9 d	2.3 cd
8. MS+ BA 60 µM + sucrose 80 gm	7.6 ab	4.7 a	3.1 d	1.9 d
CV	24	30	29	31

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

* ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ยจำนวนหัว และน้ำหนักต่อ 1 กรรมวิธี (ขวด)

ภาพที่2 ลักษณะและการชักนำให้เกิด micro tubers ของมันฝรั่งแอตแลนติก

ภาพที่ 3 mini tuber ที่ได้นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อ break dormancy เป็นเวลา 3 เดือนแล้ว นำไปปลูกในกระถางเพื่อทดสอบความงอก พบว่า มีอัตราการงอกเฉลี่ย 83 % ตามภาพ

4. การชักนำให้เกิด multiple shoots และ micro tubers ในระบบ TIB

4.1 จัดตั้งระบบการเลี้ยงแบบ Temporary immersion Bioreacter ใช้ระบบ SETIS ™

ประกอบด้วยขวดแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 3000 ml. 12 คู่

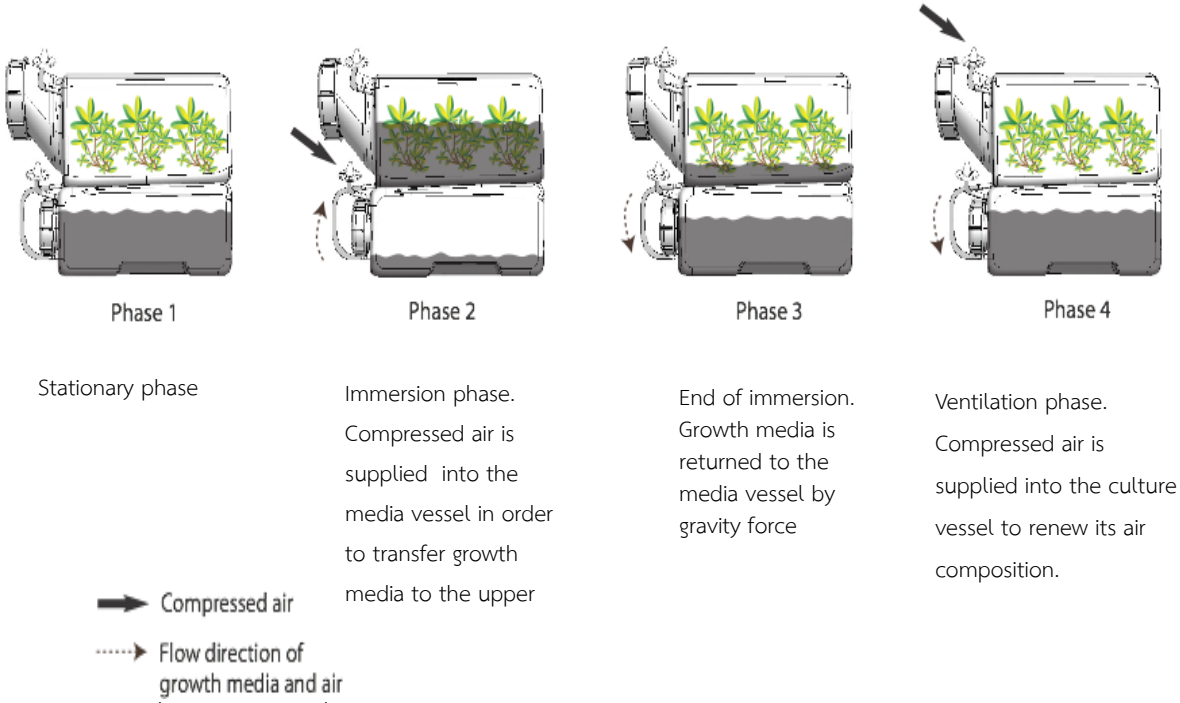
Air pump 1 ชุด

Cellulose nitrate filter 24 ตัว

วาลว์ปรับระดับอากาศ 12 ตัว

Standing 1 ตัว

สายซิลิโคน



ภาพที่4 ระบบTIB ที่ประกอบด้วยขวดแก้วขนาดความจุ 3 ลิตร

ระบบ Temporary Immersion Bioreactor (TIB) เป็นวิการหนึ่งที่ใช้เลี้ยงต้นอ่อนเพื่อเพิ่มปริมาณในสภาพปลอดเชื้อ เป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวทั้งหมด ระบบการเลี้ยงแบบนี้ประกอบด้วย ขวดใส่พืช (plant vessel) และขวดใส่อาหาร (medium vessel) ซึ่งขวดทั้งสองจะเชื่อมต่อกันทางสายยาง โดยขวดที่ใส่อาหารเหลวจะอยู่ในระดับต่ำกว่า เมื่อต้องการจะให้อาหารชิ้นส่วนพืชจะทำการอัดแรงดันลมผ่านไปทางขวดใส่อาหาร โดยใช้แรงดันอากาศ ตั้งแต่ 1 – 30 นาที ขึ้นกับชนิดพืช และปริมาณอาหาร แรงดันลมจะดันอาหารให้ไหลขึ้นไปยังขวดใส่ชิ้นส่วนพืช โดยในขั้นตอนนี้อากาศที่อยู่ในขวดใส่ชิ้นส่วนพืชจะถ่ายเทออกไปด้วย และเมื่อครบกำหนดเวลาที่ให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช ทำการปิดแรงลม อาหารที่อยู่ในขวดใส่ชิ้นส่วนพืช จะไหลกลับมายังขวดใส่อาหารตามแรงโน้มถ่วง ดังนั้นอาหารจะเคลือบอยู่บนผิวของชิ้นส่วนพืช ซึ่งพืชจะใช้ในการเจริญเติบโตต่อไป

เมื่อจัดตั้งระบบ TIB แล้ว ทำการทดสอบประสิทธิภาพของระบบ ในการเพิ่มยอดรวมมันฝรั่งทั้ง 2 ชนิด ดังนี้

4.1 ศึกษาการเพิ่มปริมาณ ยอดรวมของมันฝรั่งสปุนตา และแอตแลนติกในระบบ TIB

การศึกษาครั้งนี้ใช้อาหารสูตรที่ใช้ในการทดลองอาหารเหลวเพื่อทำการเปรียบเทียบ คือ MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ GA_3 0.1 mg / l และ NAA 0.1 mg / l และ combination ของ GA_3 และ NAA และให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช วันละ 8 ครั้ง ๆละ 10 นาที ปริมาณอาหารต่อขวดเท่ากับ 1.5 ลิตร

จากการศึกษาหลังการเลี้ยงในระบบ นาน 8 สัปดาห์ พบว่ามันฝรั่งแอตแลนติก สามารถเพิ่มจำนวนยอดรวมสูงสุด 5.2 ยอด ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น เมื่อใช้อาหาร MS+ GA0.1 mg/L รองลงมาได้แก่อาหาร MS+ GA_3 0.1 mg + NAA 0.1 mg/L ได้จำนวนยอดรวม 4.8 ยอดต่อชิ้นส่วน แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่อาหาร MS+ GA_3 0.1 mg/l + NAA 0.1 mg/Lนี้ยอดมันผรั่งเจริญเติบโตตามปกติ มีความสูง 3.2 ซม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารที่เติม GA อย่างเดียว ในมันฝรั่งสปุนตาก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน การเลี้ยงในอาหาร MS เติม GA_3 0.1 mg/L และ MS ที่มีส่วนผสมของ GA_3 0.1 mg และ NAA 0.1 mg/L จะให้จำนวนยอด 3.8 และ 3.6 ยอด โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่อาหารที่มีส่วนผสมของ GA_3 0.1 mg และ NAA 0.1 mg/ ยอดจะมีความสูง 2.9 ซมมากกว่าในอาหาร ที่เติม GA_3 เพียงอย่างเดียว (ตารางที่4)

ตารางที่4 ผลของ GA และ NAA ต่อจำนวนยอดรวมและความสูงของยอดในระบบ TIB

สูตรอาหาร	แอตแลนติก		สปุนตา	
	จำนวนยอด เฉลี่ย /ชิ้นส่วน	ความสูง ซม.	จำนวนยอด เฉลี่ย / ชิ้นส่วน	ความสูง ซม.
1. MS	1.5 c	3.6 a	1.4 c	2.8 a
2. MS+ GA_3 0.1 mg/L	5.2 a	2.2 b	3.8 a	1.8 b
3.MS+ NAA 0.1 mg/L	3.9 b	2.4 b	2.7 b	3.1 a
4.MS+ GA_3 0.1 mg + NAA 0.1 mg/L	4.8 a	3.2 a	3.6 a	2.9 a
CV	25	24	29	30

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเพิ่มปริมาณยอดรวมในอาหารเหลว และในระบบ TIB จะเห็นว่าปริมาณยอดรวมในระบบTIB น้อยกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว ทั้งนี้เนื่องจาก ในระบบ TIB ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายอาหาร และระยะเวลาที่ให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช นอกจากนี้การปั้มอาหารเหลวให้สัมผัสชิ้นส่วนพืชวันละ 8 ครั้งละ 10 นาที ชิ้นส่วนมันฝรั่งไม่ได้สัมผัสอาหารตลอดเวลาเหมือนกับการเลี้ยงในอาหารเหลว อาจจะยังไม่เพียงพอสำหรับความต้องการธาตุอาหาร จำเป็นจะต้องปรับสูตรอาหารในระบบ TIB ใหม่ ให้มีปริมาณความเข้มข้นของสารอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต รวมทั้งระยะเวลาในการให้อาหารให้นานขึ้นกว่าเดิม ซึ่งจะต้องทดลองต่อไป แต่ไม่สามารถดำเนินการได้เนื่องจากการทดลองไม่ได้รับงบประมาณสนับสนุนจาก วช.

การเพิ่มปริมาณ ยอดรวมด้วยระบบ TIB เป็นการรวมข้อดีของการเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลวเข้าด้วยกัน โดยที่ในระบบอาหารแข็ง ชิ้นส่วนพืชจะสัมผัสกับอากาศแต่ไม่สัมผัสอาหารทั้งชิ้นส่วน ส่วนในอาหารเหลวพืชจะสัมผัสอาหารอยู่ตลอดเวลา ไม่สัมผัสอากาศ จึงทำให้เกิดการบวมหรือฉ่ำน้ำ (Smith and Spoomer,1995 ; Aitken et al. 1995) ส่วนการขยายพันธุ์ในระบบ TIB วิธีการนี้เป็นการให้อาหารพืชอย่างต่อเนื่อง มีการให้ชิ้นส่วนสัมผัสอาหารอย่างทั่วถึงเป็นเวลา

ข้อดีของการขยายเพิ่มปริมาณยอดรวมด้วยระบบ TIB สามารถลดแรงงานและเวลาในการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ต้นอ่อนที่ได้จะใช้เวลาในการเจริญเติบโตเร็วกว่าอาหารแข็ง (Etienne and Berthouly, 2002) นอกจากนี้ยังสามารถลดจำนวนขวดและพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง รวมทั้งลดการ Sub –culture อีกด้วย (Chu , 1995) แต่อย่างไรก็ตาม ยังคงมีข้อจำกัด วิธีนี้จะง่ายต่อการปนเปื้อนของเชื้อในระบบ เนื่องจากมีรอยรั่วบริเวณฝาปิด และการเชื่อมต่อสายยางซิลิโคน แรงดันลมสูงเกินไป การดำเนินการจึงต้องใช้ความระมัดระวังเป็นพิเศษ และในพืชแต่ละชนิดจะต้องศึกษาสารอาหาร และช่วงเวลาที่เหมาะสมในการให้อาหาร นอกจากนี้ การปรับระดับความดันอากาศที่จะเข้าสู่ขวดแต่ละขวด ต้องมีความเหมาะสม แรงดันที่สูงเกินไปอาจไปลดประสิทธิภาพ ของ Air filter จะทำให้ปนเปื้อนง่ายขึ้น

4.2 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งขนาดจิ๋วด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว

ทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาล ร่วมกับ CCC และ BA ต่อการชักนำให้เกิด micro tubesr ในการให้อาหารของระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว (SETIS) โดยใช้ชิ้นส่วนของ micro shoot ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว MS เติม NAA 0.1 µM GA_3 0.1 µM ใช้ชิ้นส่วนกรรมวิธีละ 50 ยอด

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design or CRD) โดย ทำการศึกษาในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว (SETIS) โดยทำการทดลอง 3 กรรมวิธี ๆละ 4 ซ้ำ กรรมวิธีได้แก่ ความเข้มข้นของน้ำตาล 3 ระดับ คือ 60 70 และ 80 กรัม ต่อลิตร ในแต่ละกรรมวิธี ใช้อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA 40 µM ร่วมกับ CCC 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนครั้งในการให้อาหาร คือ 8 ครั้งต่อวัน แต่ละครั้งนาน 10 นาที ทำการเลี้ยงในที่มืด นาน 8 สัปดาห์

ผลการทดลอง เกิดการปนเปื้อนในระบบ TIB จำนวน 3 คู่ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ผลทางสถิติได้ แต่ในส่วนที่เหลือพบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยการใช้ ความเข้มข้นของน้ำตาล ทั้ง 3 ระดับ คือ 60 70 และ 80 กรัมต่อลิตร ให้ผลในการเกิด micro tubers น้อยกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมน้ำตาลในทุกระดับ ตามภาพที่5 แต่จะมีการเจริญเป็นยอดมากกว่า อย่างไรก็ตามจำเป็นที่จะต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยศึกษาระยะเวลาในการให้อาหารสัมผัสกับชิ้นส่วนพืช ร่วมกับความเข้มข้นของน้ำตาล และความเข้มข้นของ CCC

ภาพที่ 5 เปรียบเทียบการเกิด micro tubers ในระบบอาหารเหลว (A) และระบบ TIB (B) และ (C)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเพื่อให้ปลอดโรค การใช้ apical meristem ขนาด 0.1 - 0.2 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ร่วมกับ BA 5 μM สามารถชักนำให้มีการพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ยอด ในพันธุ์แอตแลนติก 36 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์สปุนตา 24 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ PVY ด้วยวิธีเซรุ่มวิทยา พบการปลอดโรคสูงถึง ได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์

2. การเพิ่มปริมาณยอดรวม (multiple shoots) ในอาหารเหลว และระบบTIB

มันฝรั่งแอตแลนติกและสปุนตา สามารถเพิ่มปริมาณยอดรวมได้สูง 5.2 ยอด และ4.2 ยอด ต่อ 1ชิ้นส่วนพืช ตามลำดับและมีความสูงของยอดในเกณฑ์ปกติ เฉลี่ยเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มี GA3 0.1 mg/l และ NAA 0.1 mg/L ส่วนในระบบ TIB สามารถให้ปริมาณยอดรวมสูงสุด 4.8 ยอดและ3.6 ยอด ตามลำดับ ในอาหารสูตรเดียวกัน

3. เมื่อศึกษาผลของ BA และน้ำตาลซูโครสต่อการเกิด micro tubers ในอาหารเหลว พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 40 μM และน้ำตาลซูโครส 6-8 เปอร์เซนต์ร่วมกับ Chlorocholine chloride (CCC) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิด micro tubers ได้มากสุด ในพันธุ์แอตแลนติก ส่วนพันธุ์สปุนต้าอาหารเหลว MS ที่เติม BA 20 μM และน้ำตาลซูโครส 8 เปอร์เซนต์ สามารถชักนำให้เกิด micro tubers ได้ดีที่สุดแต่ในระบบ TIB ยังไม่สามารถสรุปได้ มีปัจจัยที่ต้องศึกษาอีก เช่น ระยะเวลาการให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช และความเข้มข้นของ CCC

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้หัวพันธุ์มันฝรั่งปลอดโรค PVY ขนาดเล็ก (micro tubers) สำหรับนำไปขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณต่อได้
2. ได้เทคโนโลยีการชักนำให้เกิด micro tubers ในระบบอาหารเหลว

11. เอกสารอ้างอิง

วงศ์ บุญสืบสกุล. 2550. การควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง ใน น.ส.พ. กสิกร. 80(4): 96-97.

Abbott, A.J. and R. Belcher.1986. Potato tuber formation *in vitro*. In: Plant Tissue Culture and Its Agriculture Application. Lobdon: Butt Worth. 113 -132.

Aitken-Christie J, Kozai T, Takayama S. 1995. Automation in plant tissue culture – General introduction and over view. In : Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp1-18.

Chu I.1995. Economic analysis of automated micropropagation . In: Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp19-27

Etienne H and Berthouly M. 2002. Temporary immersion system in plant micro propagation . Plant Cell, Tissue Org . Culture. 69:215 -231 .

Hussain I., Chaudhry Z.,Muhamma A., Asghar R., Naqvi S.M.S. and Rashid H. Effect of chlorocholine chloride , sucrose and BAP on In vitro tuberlization in Potato Micro Tubers Induction. Pak.J.Bot.,38(2) 275-282

Morel,G. and C. Martin. 1952. Guerison de dahlias atteints d'une maladie a virus. Comptes Rendus de l' Académie des . Sciences, 235: 1324-1325

Neerja,S.,N.Kaur and Anil K. Gupta.1998. Effect of chlorocholine chloride sprays on the carbohydrate composition and activities of sucrose metabolizing enzyme in potato. Plant growth Regulation . Volumn 26,Issue 2, pp 97-103

Smith MA. and Spoomer LA.1995 . Vessels, gels, liquid media and support systems. In: Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp371-405

Wang,P.J. and C.Y. Hu.1982 . In vitro mass tuberization and virus free seed potato production in Taiwan. AMPotato J. 59:33-39

Zuraida AR,Nurul Shahnadz AH, Harteeni A, Che Radziah CMZ and Sreeramanan S. 2011. A novel approach for rapid micropropagation of Maspine pineapple (Ananas comosus L.) Affican Journal of Biotechnology Vol.10(19), pp. 3859-3866.