# วิจารณ์ผลการทดลอง

## การทดลองที่ 1 ศึกษาพันธุ์กล้วยท้องถิ่นภาคใต้ของประเทศไทย

ผลงานที่มีมาก่อนในส่วนของพันธุ์กล้วยนั้นได้มีผู้รวบรวมไว้พอสมควร เช่น เต็ม สมิติ นันทน์ (2523) พบกล้วยสกุล *Musa* จำนวน 12 ชนิด สะอาด บุญเกิด และคณะ (2525) รวบรวมพืชวงศ์กล้วยจำนวน 11 ชนิด วีระชัย ณ นคร (2538ก และ 2538ข) รวบรวมพืชวงศ์กล้วย จำนวน 7 ชนิด พานิชย์ ยศปัญญา (2541) ศึกษาพืชวงศ์กล้วย จำนวน 2 สกุล คือ สกุล *Ensete* และ สกุล *Musa* สำหรับภาคใต้ของประเทศไทยมีกล้วยป่าและกล้วยกินได้อยู่มากมาย เช่น กล้วยเล็บมือนาง จากการสำรวจและรวบรวมพันธุ์กล้วยทั้งกล้วยป่าและกล้วยปลูกในประเทศไทยพบว่ามีประมาณ 56 สายพันธุ์ (เบญจมาศ, 2534) ในการศึกษาครั้งนี้รวบรวมพันธุ์กล้วยท้องถิ่นภาคใต้ได้ 14 สายพันธุ์ จำแนกเป็น *Musa acuminata* (AA group) จำนวน 4 สายพันธุ์ *Musa acuminata* (AAB group) จำนวน 3 สายพันธุ์ *Musa acuminata* (ABB group) จำนวน 2 สายพันธุ์ *Musa acuminata* (AAA group)จำนวน 2 สายพันธุ์ *Musa balbisiana* (BB group)จำนวน 2 สายพันธุ์ และ *Musa balbisiana* (BBB group) จำนวน 1 สายพันธุ์

## การทดลองที่ 2 การเพิ่มจำนวนกล้วยแต่ละพันธุ์ในห้องปฏิบัติการด้วยเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

### การทดลองที่ 2.1

การทดลองเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ได้แก่ ตายอด และตาข้าง เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น เพื่อชักนำให้เกิดต้นโดยใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเนื้อเยื่อมีการขยายขนาดเพิ่มขึ้นและสามารถชักนำให้เกิดต้นได้โดยที่ตายอดและตาข้างมีการพัฒนาเป็นต้นได้ภายใน 60 วัน ทั้งนี้เนื่องจาก BA และน้ำมะพร้าวมีสารพวก Myo-inositol 1-3-Diphenylurea และ Leucoanthocyanin มีความสามารถในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเกิดตา (กัลยาณีและคณะ, 2533) ดังนั้นชิ้นส่วนตายอดและตาข้างจึงมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kanchanapoom และ Chanadang (2000) ทดลองชักนำต้นจากส่วนต่างๆ ได้แก่ ตายอด ตาข้าง และปลี ของกล้วยหอมทอง (*Musa acuminata* 'Kluai Hom Thong') โดยใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่มี BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ตายอดและตาข้างเกิดต้นหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 42 วัน ส่วนปลีเกิดต้นหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 7 เดือน นอกจากนี้งานวิจัยของ Silayoi (2001) ซึ่งทดลองชักนำต้นจากส่วนตายอด และปลีของกล้วยไข่ (*Musa acuminata* 'Kluai Khai') โดยใช้อาหารเหลวและ

อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS ที่มี BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่า ชิ้นส่วนตายอดที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวเกิดต้นเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน และ 45 วัน เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ส่วนปลีที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวใช้เวลาในการเกิดต้น 52 วัน และ 130 วันสำหรับอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว

ชิ้นส่วนที่เลี้ยงในระยะแรกมีการปล่อยสารสีดำซึ่งเป็นพวกสารประกอบฟีโนลิก สอดคล้องกับรายงานของ Chinsuk และ Silayoi (2001) Kanchanapoom และ Chanadang (2000) และรายงานของ Jarret และคณะ (1985) โดยสารสีดำนี้มีผลในการชะลอการเจริญพัฒนาของชิ้นส่วน แต่ปัญหาเหล่านี้สามารถแก้ไขได้โดยการย้ายเลี้ยงสู่อาหารใหม่ทุกๆ 3 สัปดาห์ ทั้งนี้ Fett-Neto และคณะ (1992) อ้างโดย Zhong (1995) รายงานว่า การปล่อยสารสีดำหรือสารประกอบฟีโนลิกสู่อาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัสของ Taxus การเติมสารลดหรือสารดูดซับฟีนอลในอาหาร เช่น Polyvinylpyrrolidone (PVP) สามารถลดปัญหาดังกล่าวได้ Jordan และคณะ(1991) อ้างโดย zur Erlangung des akademischen Grades (2000) เปรียบเทียบความสามารถในการลดสารประกอบฟีโนลิกของสารแอนติออกซิแดนซ์ ได้แก่ กรดซิตริก กรดแอสคอบิก กรดอะมิโนออกซิอะซิติก กลูตาไธโอน ซิสเตอีน และ PVP พบว่า PVP สามารถลดการปล่อยสารฟีโนลิกของชิ้นส่วนข้อของ *Annona cherimola* ได้

จากการทดลองชักนำรากต้นกล้วยที่มีใบเกิดขึ้นประมาณ 2-3 ใบ โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช พบว่าต้นกล้วยเกิดรากภายในเวลา 3 สัปดาห์ โดยมีจำนวนรากโดยเฉลี่ย 8 รากต่อต้น ความยาวรากโดยเฉลี่ย 3 เซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wong (1986) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากล้วยสามารถเกิดรากได้โดยไม่ต้องเติมออกซินในอาหารที่เลี้ยง เนื่องจากที่ปลายยอดมีการสังเคราะห์สารออกซินและมีการส่งไปยังส่วนอื่นๆ ของต้นได้ นอกจากนี้ Jarret และคณะ (1985) รายงานว่าสามารถชักนำรากต้นกล้วยกล้วยพันธุ์ 'Saba' และ 'Pelipita' ได้หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แต่เมื่อชักนำด้วยอาหารสูตร MS ที่มีผงถ่าน 0.1 หรือ 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่มีการเกิดรากและยังยับยั้งการพัฒนาของต้นอีกด้วย ในขณะที่ Hwang และคณะ (1984) ชักนำรากต้นกล้วย 'Cavendish' ได้หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารสูตร Smith and Murashige ที่มีผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยเกิดรากจำนวนมาก มีความยาวเฉลี่ย 5-8 เซนติเมตร และ Vuylsteke และ Ortiz. (1988) รายงานว่าใช้เวลาในการชักนำรากนานถึง 2-3 เดือน เมื่อเลี้ยงต้นกล้วยกล้วยพันธุ์ 'Agbagba' ด้วยอาหารสูตร MS ที่มี NAA 0.19 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.23 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดรากมีความยาวโดยเฉลี่ย 1-4 เซนติเมตร จะเห็นว่าความสามารถในการเกิดรากขึ้นอยู่กับพันธุ์ของกล้วย โดยที่กล้วยบางพันธุ์จำเป็นจะต้องได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตช่วยในการชักนำราก แต่สำหรับ

กล้วยในการทดลองนี้สามารถเกิดรากได้เองโดยไม่จำเป็นต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินในอาหารที่เลี้ยง

จากการทดลองปรับสภาพต้นกล้วยหลังจากเกิดรากโดยนำต้นที่ได้มาล้างวุ้นให้สะอาด เพาะเลี้ยงในเวอร์มิคูไลต์ปลอดเชื้อ รดน้ำกลั่นพอชุ่มชื้น ปิดฝา แล้วเก็บรักษาไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเปิดฝาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จึงย้ายลงในกระถางที่มีดินผสมแกลบเถ้าและขุยมะพร้าว วางเลี้ยงในสภาวะเดิมเป็นเวลา 2-3 วัน จึงย้ายลงแปลงปลูกพบว่าต้นกล้วยมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ มีความแข็งแรง และเจริญเติบโตได้ดี โดยมีความสูงประมาณ 0.5 เมตร เมื่อปลูกลงแปลงเป็นเวลา 2 เดือน ดังนั้นวิธีนี้มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการปรับสภาพต้นกล้วย นอกจากนี้ยังมีวิธีการปรับสภาพต้นกล้วยประเภท 'Cavendish' โดย Hwang และคณะ (1984) รายงานว่าก่อนปลูกลงดิน จุ่มต้นกล้วยลงใน Dithane M-45 0.3 เปอร์เซ็นต์ และปลูกในกระถางที่มีส่วนผสมของเวอร์มิคูไลต์ 60 เปอร์เซ็นต์ ทราย 30 เปอร์เซ็นต์ และปุ๋ยอินทรีย์ 10 เปอร์เซ็นต์ และให้ปุ๋ย Nutricote (14N-14P-14K) เป็นเวลา 2-3 เดือน ก่อนปลูกลงแปลง

**การทดลองที่ 2.2**

การทดลองวิเคราะห์ DNA ต้นกล้วยทั้ง 14 สายพันธุ์ด้วยโฟลไซโทเมทรีโดยเปรียบเทียบปริมาณ 2C DNA ระหว่างต้นกล้วยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงตายอดและตาข้าง กับต้นกล้วยจากแหล่งธรรมชาติโดยใช้ *Zea mays* CE-777 ซึ่งมี 2C=5.43 pg DNA เป็น Internal reference standard พบว่าปริมาณ 2C DNA ของต้นกล้วยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงตายอดและตาข้างกับปริมาณ 2C DNA ของต้นกล้วยจากแหล่งธรรมชาติอยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน Lysak และคณะ (1999) รายงาน Nuclear DNA content ของต้นกล้วย ที่มีจีโนม A และ B ที่วิเคราะห์โดยโฟลไซโทเมทรีว่ามีความแตกต่างในเรื่องขนาด โดยจีโนม B จะมีขนาดเล็กกว่าประมาณ 12% ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าไม่เกิด Intraspecific variation ระหว่างต้นกล้วยจากการเพาะเลี้ยงกับต้นกล้วยจากแหล่งธรรมชาติและโฟลไซโทเมทรีเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบปริมาณ DNA

**การทดลองที่ 3 การเก็บรักษาสายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ในห้องปฏิบัติการ**

พืชที่มีความสำคัญหลายชนิดซึ่งไม่สามารถเก็บรักษาในรูปแบบเมล็ดหรือสามารถทำได้แต่มีความยุ่งยาก หรือเป็นพวกที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ดังนั้นการเก็บรักษาในแปลงปลูกซึ่งเป็นวิธีการเก็บแบบดั้งเดิม อาจทำให้เสี่ยงต่อความเสียหายที่เกิดจากธรรมชาติ การติดเชื้อ หรือถูกละเลย นอกจากนี้การเก็บรักษาพันธุ์พืชในแปลงปลูกต้องการพื้นที่มากในการปลูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับพืชที่มีขนาดใหญ่ รวมถึงแรงงาน และค่าใช้จ่าย จึงมีการพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาพันธุ์พืชขึ้น

หลายวิธี โดยสามารถเก็บรักษาส่วนต่างๆ ของพืชไม่ว่าจะเป็นเมล็ด ยอด ราก เอ็มบริโอ แคลลัส เซลล์ หรือโพรโทพลาสต์ได้เป็นเวลานาน และอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์ใช้ ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ทำให้การเก็บรักษาพันธุ์พืชมีประสิทธิภาพสูง (Rao, 1997)

การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในอนุรักษ์พันธุ์พืช อาจทำได้โดยการแช่เยือกแข็งในไนโตรเจนเหลวที่-196 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดการเจริญเติบโต (Cryopreservation) หรือชะลอการเจริญเติบโต (Slow growth) อาจทำได้โดยการชักนำให้เกิดแรงดันออสโมติก โดยใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ การจำกัดคาร์โบไฮเดรตให้ต่ำกว่าระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การลดอุณหภูมิหรือความเข้มแสง หรือการใช้สารยับยั้งการเจริญเติบโตโดยเติมในอาหารที่ใช้เลี้ยง เช่น กรดแอบซิสสิค (Abscisic acid) ไซโคลเซล (Cyclocel) เป็นต้น

การชะลอการเจริญเติบโตต้นกล้วยทั้ง 14 ชนิดที่ได้เก็บรวบรวมไว้ โดยทดลองในอาหารสูตรต่างๆ พบว่าในอาหารสูตร MS ที่ลดธาตุอาหารหลักลง ½ เติมวุ้น1.4% และน้ำตาล 9% เป็นสูตรที่ดีที่สุดสามารถเก็บรักษาต้นกล้วยได้ประมาณ 7 เดือน ต้นกล้วยที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการสามารถเลี้ยงได้นานเพียง 2-3 เดือน จากนั้นต้องทำการย้ายเลี้ยง ไม่เช่นนั้นต้นกล้วยจะตาย แต่ภายใต้สภาวะที่ทดลองสามารถเลี้ยงได้นาน 7-8 เดือนโดยไม่ต้องย้ายเลี้ยง ปกติกล้วยป่า (Wild bananas) ไม่อาจเก็บรักษาเป็นเวลานานๆได้เท่าพวกกล้วยกินได้ (Edible bananas) แต่จากการทดลองนี้ไม่พบปัญหานั้น อาจเนื่องมาจากความแตกต่างกันของโครงร่างจีโนม และความผันแปรทางพันธุกรรมภายในพวกที่มีโครงร่างจีโนมกลุ่มเดียวกัน จึงทำให้กล้วยแต่ละพันธุ์สามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลาไม่เท่ากัน (Van den houwe *et al.*, 1995)

การลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักลงครึ่งหนึ่ง ทำให้การเจริญลดลงได้อาจเป็นผลจากการทำให้เกิด Dormancy (Bonnier and Van Tuyl, 1997) ในขณะที่น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นที่สูง (9 %) ทำให้ลดการเจริญได้ดีเช่นกันอันอาจเป็นผลมาจาก Osmotic stress (Grout, 1991) สุจิตรา โพธิ์ปาน (2541) เก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมกล้วย 'Abaca' (*Musa textiles* Nee.) ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าเนื้อเยื่อปลายยอดที่เก็บบนอาหารแข็งสูตร ½ MS ที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ BA 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 75 เปอร์เซ็นต์ Bonnier and Van Tuyl (1997) ศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรม (Germplasm) ของลิลลี่ (*Lilium*) 10 พันธุ์ (Asiatic hybrids, Oriental hybrids, *L. longiflorum* และ *L. henryi*) ที่อุณหภูมิ -2 และ 25 องศาเซลเซียส ในอาหารสูตร ¼MS ที่มีซูโครส 9 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถเก็บลิลลี่ได้ทุกพันธุ์ ที่อุณหภูมิ -2 องศาเซลเซียส สามารถเก็บลิลลี่พันธุ์ Asiatic และ Oriental hybrids ได้ 28 เดือน แต่สามารถเก็บพันธุ์ *L. longiflorum* และ *L. henryi* ได้ 6 เดือนเท่านั้น Watt *et al.* (2000) เก็บรักษาชิ้นส่วนยอดของยูคาลิปตัส (*Eucalyptus*

*grandis*) เป็นเวลา 10 เดือน บนอาหารแข็งสูตรและสภาวะต่างๆ กัน พบว่า ชิ้นส่วนที่เก็บบนอาหารสูตร ½MS ที่มีซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ความเข้มแสง 200 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 24-28 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดชีวิตและการเพิ่มจำนวนหลังจากเก็บรักษาสูงสุด 13 ต้นต่อหนึ่งชิ้นส่วนเริ่มต้น

น้ำตาลซูโครสทำให้ใบกลายเป็นสีเหลืองเหมือนที่พบในต้นมันฝรั่ง Chokecherry และ Saskatoon ซึ่งในพืชเหล่านี้ ถ้าใบยิ่งเหลืองก็จะมีการ Re-grow ได้ดี (Pruski *et al.*, 2000) นอกจากนี้ Mezzetti *et al.* (1991) รายงานว่า ความเหมาะสมของน้ำตาลแต่ละชนิดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขึ้นอยู่กับความสามารถของเนื้อเยื่อในการใช้คาร์โบไฮเดรต เช่น Ko และคณะ (1991)ได้ทำการเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดของกล้วยพันธุ์ 'Cavendish' (*Musa acuminata* Colla cv. Cavendish, AAA) ภายในขวดทดลองโดยวางเนื้อเยื่อบนสำลีที่มีสารละลายน้ำตาลชนิดต่างๆ พบว่าชิ้นส่วนปลายยอดมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดเท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายน้ำตาลไรโบส จากการทดลองนี้พบว่า น้ำตาลซูโครสมีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยทั้ง 14 ชนิด Garcia *et al.* (2002) รายงานว่าโดยปกติน้ำตาลซูโครสเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ถูกเลือกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อาจเป็นเพราะซูโครสเป็นน้ำตาลตัวหลักที่มีการลำเลียงในพืชหลายชนิด นอกจากนี้ Marino *et al.* (1993) รายงานว่า น้ำตาลซูโครสมีประสิทธิภาพในการชักนำราก เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ Apricot ได้มากกว่าน้ำตาลซอร์บิทอล แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่าในการเพิ่มจำนวนต้น Welander *et al.* (1989) รายงานว่า คาร์โบไฮเดรตมีอิทธิพลต่ออัตราความมีชีวิตของชิ้นส่วน โดยชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของพืช เช่นน้ำตาล แมนนิทอล และน้ำตาลซูโครสเหมาะสำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนของ *Syringa* น้ำตาลกลูโคสเหมาะสำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนของ *Alnus* ส่วนน้ำตาลซอร์บิทอลและน้ำตาลฟรุกโทสเหมาะสำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนของ *Malus* เป็นต้น

การเติมวุ้นในปริมาณที่มาก (1.4%) ลงในอาหาร ทำให้ค่า Osmotic pressure ในอาหารเพิ่มขึ้นและไปลด Water potential ของอาหาร ภายใต้สภาวะนี้ทำให้ต้นกล้วยดูดน้ำและสารอาหารไปใช้ได้น้อยลง เนื่องจากน้ำและสารอาหารถูกวุ้นตรึงไว้ (Noggle and Fritz, 1983) Bhagyalakshmi และ Singh (1995) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของกล้วย 3 พันธุ์ ได้แก่พันธุ์ 'Cavendish' (AAA) 'Bluggoe' (ABB) และ 'Silk' (AAB) ด้วยอาหารสูตร MS เพื่อศึกษาอิทธิพลของการมีและไม่มีวุ้นในอาหารต่อความมีชีวิตของต้นกล้วยเมื่อปลูกลงแปลงพบว่า ต้นกล้วยที่เลี้ยงในอาหารเหลว (ไม่มีวุ้น) มีการเพิ่มจำนวนต้นได้ดีกว่าเลี้ยงบนอาหารแข็ง (มีวุ้น) ในขณะที่การเลี้ยงบนอาหารแข็งจะช่วยให้ต้นกล้วยมีอัตราการรอดชีวิตเมื่อปลูกลงแปลงสูงกว่าเลี้ยงด้วยอาหารเหลว