ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

พืชสวน	พืชสวน
สาขา	ภาควิชา

เรื่อง การชักนำให้กล้วยไข่กลายพันธุ์ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย colchicine และ oryzalin

Induced Mutation of Kluai Khai (*Musa* AA group) through Tissue Culture by Colchicine and Oryzalin Treatment

นามผู้วิจัย นายภาสันต์ ศารทูลทัต

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ..... วันที่ 9 เดือน มิย พ.ศ. 2540

(ศาสตราจารย์เบญจมาศ ศิลาย้อย, วท.ม.)

กรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์วิจิตร วังใน, B.S.)

กรรมการ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์กวิศร์ วานิชกุล, Dr.agr.)

กรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, วท.ม.)

หัวหน้าภาควิชา.....

(ศาสตราจารย์เบญจมาศ ศิลาย้อย, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

.....

(ศาสตราจารย์ธรรมศักดิ์ สมมาตย์, Ph.D.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 10 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2540

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การชักนำให้กล้วยไข่กลายพันธุ์ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย colchicine และ oryzalin

Induced Mutation of Kluai Khai (*Musa* AA group) through Tissue Culture by Colchicine and Oryzalin Treatment

โดย

นายภาสันต์ ศารทูลทัต

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2540

ภาสันต์ ศารทูลทัต 2540 : การชักนำให้กล้วยไข่กลายพันธุ์ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย colchicine และ oryzalin ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน ภาควิชาพืชสวน ประธานกรรมการที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์เบญจมาศ ศิลาย้อย, วท.ม. 70 หน้า

ทำการชักนำต้นอ่อนกล้วยไข่ให้กลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้สาร colchicine 0, 0.5, 0.75, 1.0 เปอร์เซ็นต์ และ oryzalin 0, 15, 30, 45 μM ร่วมกับ DMSO 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 2.5, 5.0, 7.5 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์เพิ่มมากขึ้นและระยะเวลาที่ได้รับสารนานขึ้นทำให้มีอัตราการรอดชีวิตลดลง การใช้ colchicine 0.4-0.75 เปอร์เซ็นต์ และ oryzalin 13-22 μM ทำให้ต้นอ่อนกล้วยมีอัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ การเกิดหน่อใหม่หลังจากเปลี่ยนอาหารพบว่าชั่ว VM_1 ต้นที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์มีการเกิดหน่อใหม่ 0.2-1.2 หน่อ ซึ่งต่ำกว่าต้นควบคุม แต่ในชั่ว VM_2 และ VM_3 นั้นไม่มีความแตกต่างกัน บางหน่อที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์พบลักษณะผิดปกติแบบ chimera และเซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่มากกว่าต้นควบคุม ทำการคัดเลือกต้นที่เซลล์ปากใบมีขนาดตั้งแต่ 28 ไมโครเมตร นำไปศึกษาโครโมโซม พบว่าต้นควบคุมมีจำนวนโครโมโซม 2n=22 และสามารถคัดเลือกต้น tetraploid (2n=44) ได้ 3 หมายเลข ซึ่งได้จากการใช้ colchicine 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 7.5 ชั่วโมง และ oryzalin 45 μM นาน 2.5 ชั่วโมง จากนั้นนำต้นพันธุ์กลายที่ได้มาตัดแบ่งและเปลี่ยนอาหาร พบว่าพันธุ์กลายทั้งสามหมายเลขเกิดหน่อใหม่ได้น้อยกว่าต้นควบคุม การเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำต้นอ่อนกล้วยไข่ทุกหมายเลขให้เกิดรากได้ดี หลังจากย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ พบว่าต้นควบคุมและพันธุ์กลายที่ได้จากการใช้ colchicine มีความสูงมากกว่าพันธุ์กลายที่ได้จากการใช้ oryzalin ซึ่งต้นเตี้ยและมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ การเจริญเติบโตหลังจากย้ายปลูกในแปลงทดลองพบว่าคล้ายกันกับในสภาพเรือนเพาะชำ พันธุ์กลายทั้งสามหมายเลขมีใบหนาและมุมการกางของใบมากจึงทำให้ใบโค้งลง เซลล์ปากใบมีขนาดใหญ่ แต่จำนวนปากใบต่อพื้นที่น้อยกว่าต้นควบคุม สำหรับจำนวนใบและจำนวนหน่อของทั้งต้นควบคุมและพันธุ์กลายไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

04 / 06 / 97

Parson Saradhuldhat 1997 : Induced Mutation of Kluai Khai (*Musa* AA group) through Tissue Culture by Colchicine and Oryzalin Treatment. Master of Science (Agriculture), Major Field Horticulture, Department of Horticulture. Thesis Advisor : Professor Benchamas Silayoi, M.S. 70 pages.

Polyploidy of *In vitro* Kluai Khai plantlets were induced by 0, 0.5, 0.75 and 1.0% colchicine or 0, 15, 30, 45 μM oryzalin containing 2% DMSO for 2.5, 5.0, 7.5 hours. The result showed the higher the mutagent dose and longer treatment duration, the less the survival rates. After treated plantlets with colchicine and oryzalin at 0.4-0.75% and 13-22 μM, respectively the results showed that the survival rate was 50%. In VM_1, adventitious bud initiation of mutagenic treatment yielded 0.2-1.2 sucker which was lower than those in the controls while VM_2 and VM_3 were not significantly different from each other. Treated buds were abnormal in chimera and stomata size was larger than those of the controls. The plantlets with stomata over 28 μm were selected for chromosome count. The controls were diploid (2n = 22) whereas three selected clones were tetraploid (2n = 44) derived from 1% colchicine 7.5 hours and 45 μM oryzalin 2.5 hours. The mutants were subcultured. The number of suckers of mutants was less than those of the controls. MS medium without plant growth regulator was observed to give the best rooting of all treatments. After transfer to greenhouse, the height of the controls and the cochicine-treated plants were significantly different from the oryzalin-treated ones which were shorter with low survival rate. The results obtained in the field were similar to those in the greenhouse. The foliage of all mutants were more drooping, with larger stomata cells, lower in stomata number per area and thicker than those of the controls. The number of leaves and suckers of each mutant was not significantly different from the controls.

Parson Saradhuldhat. B. Silayoi 04 / 06 / 97

Student's signature Thesis Advisor's signature

คำนิยม

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์เบญจมาศ ศิลาย้อย ประธานกรรมการที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์วิจิตร วังใน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กวิศร์ วานิชกุล กรรมการสาขาวิชาเอก และรองศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ กรรมการสาขาวิชารอง ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำในการศึกษาวิจัยวิทยานิพนธ์นี้ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประภา ศรีพิจิตต์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ออมทรัพย์ นพอมรบดี ศาสตราจารย์ ดร.สายชล เกตุษา รองศาสตราจารย์ ดร.พีรเดช ทองอำไพ ที่ได้กรุณาสนับสนุนและให้คำแนะนำแนวทางการศึกษา ตลอดจนคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาการให้แก่ข้าพเจ้าจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ได้สนับสนุนทุนการศึกษาและทำวิจัย ขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย และเพื่อนๆ ที่ให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์นี้จนเสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณปู่ และขอขอบคุณญาติๆพี่น้องทุกคนที่ได้สนับสนุน ช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดมา

ภาสันต์ ศารทูลทัต

มิถุนายน 2540

สารบาญ

	หน้า
สารบาญ	(1)
สารบาญตาราง	(2)
สารบาญภาพ	(3)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	18
ผลและวิจารณ์	23
สรุป	59
เอกสารอ้างอิง	60
ภาคผนวก	68

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนกล้วยไข่ VM_1 หลังได้รับสารก่อกลายพันธุ์	24
2	ค่าเฉลี่ยการเกิดหน่อใหม่ของกล้วยไข่ ชั่ว VM_1-VM_3	29
3	จำนวนต้นที่คัดเลือกได้จากการวัดความยาวเซลล์ปากใบ	37
4	ค่าเฉลี่ยการเกิดหน่อใหม่ของพันธุ์กลายในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	41
5	คะแนนความสมบูรณ์ของรากกล้วยไข่พันธุ์กลายที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS	46
6	ความสูงของต้นกล้วยไข่หลังจากนำออกปลูกในเรือนเพาะชำ 1 และ 2 เดือน	50
7	ความสูงของต้นหลังจากปลูกในแปลงทดลอง ที่อายุ 1-6 เดือน	52
8	เส้นรอบวงโคนต้น จำนวนใบ และจำนวนหน่อเฉลี่ยของต้นกล้วยไข่	55

ตารางผนวกที่

1	รายงานผลการวิเคราะห์ดินพื้นฐานแปลงปลูกกล้วย	69
2	ข้อมูลอุตุนิยมวิทยา ตั้งแต่ สิงหาคม 2539 - มีนาคม 2540	70

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	อัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนกล้วยไข่ ที่อายุ 1 เดือน หลังได้รับสาร colchicine	25
2	อัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนกล้วยไข่ ที่อายุ 1 เดือน หลังได้รับสาร oryzalin	26
3	การเกิดหน่อใหม่หลังได้รับสาร colchicine	30
4	การเกิดหน่อใหม่หลังได้รับสาร oryzalin	31
5	ลักษณะต้นกล้วยไข่ปกติในสภาพปลอดเชื้อ	33
6	ลักษณะผิดปกติของต้นอ่อนกล้วยไข่ที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ	34
7	เซลล์ปากใบจากต้นอ่อนกล้วยไข่ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ	36
8	โครโมโซมจากปลายรากของต้นอ่อนกล้วยไข่	39
9	การเกิดหน่อใหม่ของต้นควบคุมและพันธุ์กลาย	42
10	ลักษณะกล้วยไข่ต้นควบคุมและพันธุ์กลายในสภาพปลอดเชื้อ	43
11	การเกิดรากของต้นอ่อนกล้วยไข่บนอาหารสูตร MS	47
12	ลักษณะใบด่างหลังย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ	48
13	ต้นอ่อนกล้วยไข่อายุ 2 เดือน หลังย้ายออกปลูก	49
14	ความสูงของต้นกล้วยไข่ในแปลงทดลอง อายุ 1-6 เดือน	53
15	ลักษณะของต้นกล้วยไข่ในแปลงทดลอง	58

การชักนำให้กล้วยไข่กลายพันธุ์ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย colchicine และ oryzalin

Induced Mutation of Kluai Khai (*Musa* AA group) through Tissue Culture by Colchicine and Oryzalin Treatment

คำนำ

กล้วยไข่ [*Musa* (AA group)'Kluai Khai'] เป็นไม้ผลที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายและผูกพันกับประเพณีของไทยมานาน และเป็นกล้วยที่นิยมปลูกกันมากชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากมีรสชาติหอมหวาน (เบญจมาศ, 2538) ในปัจจุบันนี้กล้วยไข่เป็นผลไม้ที่มีศักยภาพในการส่งออกชนิดหนึ่ง เนื่องจากผลมีขนาดเล็กแตกต่างไปจากกล้วยในตลาดการค้าสากลซึ่งเป็นกลุ่ม Cavendish ที่มีผลขนาดใหญ่ ผู้บริโภคมีแนวโน้มจะให้ความสนใจเพิ่มขึ้นกับกล้วยที่มีผลขนาดเล็ก ทำให้ประเทศไทยมีโอกาสผลิตและส่งกล้วยไข่ไปขายในตลาดต่างประเทศได้มากยิ่งขึ้น (เดช และ ชำนาญ, 2536)

อย่างไรก็ตามเนื่องจากกล้วยไข่มีเปลือกบางจึงทำให้บอบช้ำได้ง่าย เกิดความเสียหายได้มากในการบรรจุหีบห่อและการขนส่ง ประกอบกับปัญหาทางด้านคุณภาพและความสม่ำเสมอผลผลิตยังอยู่ในระดับต่ำ จึงทำให้เป็นอุปสรรคในการขายทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ การพัฒนาปรับปรุงพันธุ์กล้วยไข่ให้มีความต้านทานโรค เปลือกผลหนามากขึ้น และมีคุณภาพที่ดีจะเป็นการช่วยเพิ่มศักยภาพทางการค้ากล้วยไข่ให้มากยิ่งขึ้นด้วย

การปรับปรุงพันธุ์กล้วยด้วยวิธีการผสมพันธุ์ (conventional breeding) ใช้เวลานานและกระทำได้ยากเนื่องจากกล้วยส่วนใหญ่เป็นหมันทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมีย และความเป็นหมันนี้อาจเกิดจากความแตกต่างของจำนวนชุดโครโมโซม(ploidy level) และเกิดจาก unreduced gamete ทำให้ติดเมล็ดยากหรือไม่ติดเมล็ด การใช้เทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) เช่น การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์(induced mutation) ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช(plant tissue culture) จึงเป็นวิธีที่สะดวกเหมาะสม สามารถคัดเลือกต้นได้รวดเร็วและประสบความสำเร็จมากยิ่งขึ้น (Novak, 1992)

การชักนำให้พืชเกิดการกลายพันธุ์นั้นทำได้โดยทางฟิสิกส์(physical mutagent) เช่น การฉายรังสี หรือการใช้สารเคมี(chemical mutagent) สารเคมีก่อกลายพันธุ์มีหลายชนิด เช่น สาร

colchicine เป็นสารก่อกลายพันธุ์ชนิดหนึ่งที่ใช้กับพืชหลายชนิดทำให้พืชมีจำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้นทำให้รูปร่างลักษณะของพืชผิดไปจากเดิม นอกจากนี้ สาร oryzalin ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดวัชพืชก็อาจใช้เป็นสารก่อกลายพันธุ์ได้อีกชนิดหนึ่งด้วย (สิรนุช, 2536 ; Novak และคณะ,1993)

การวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้สาร colchicine และ oryzalin ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับกล้วยไข่ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยต่อไป

ตรวจเอกสาร

กล้วยไข่ [*Musa* (AA group)'Kluai Khai'] อยู่ในกลุ่ม Sucrier มีชื่อพ้องว่า กล้วยกระ, เจ็กบอง, กล้วยไข่กำแพงเพชร, Pisang Mas (มาเลเซียและอินโดนีเซีย), Lady's finger(ฮาวาย), Inarnibal (ฟิลิปปินส์), Sagale nget-pyaw(พม่า), Sucrier, Honey Figue (อินดิสตะวันตก) เป็นไม้ผลเขตร้อนมีถิ่นกำเนิดจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (วิจิตร, 2530) มีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=22 คาดว่ามีวิวัฒนาการมาจากการผสมพันธุ์ระหว่าง *Musa acuminata* Colla *burmanica* กับ Pisang Linlin (ซึ่งมาจาก *M. acuminata* Colla *malaccensis*) จึงเป็นกล้วยลูกผสม diploid ของ Acuminata type (AA group) จากนั้นมีการคัดเลือกโดยมนุษย์เพื่อให้ได้ลักษณะการเป็นหมันและไม่มีเมล็ด (เบญจมาศ, 2538)

ลำต้นของกล้วยไข่มีสีเขียวปนเหลือง ประดำไม่มีไข กาบต้นด้านในสีขาว ขอบก้านใบสีชมพูแผ่ออก ก้านใบสีเขียวปนเหลือง ใบมีนวลน้อย(waxless foliage) ขอบใบสีชมพู ก้านเครือสีเขียวเข้มห้อยลง ขนมาก ใบประดับ(ปลี)รูปไข่ ปลายค่อนข้างแหลม ด้านบนสีแดงอมม่วง ด้านล่างที่โคนกลีบสีซีด กาบปลีม้วนงอขึ้นเมื่อบาน ผลป้อมสั้น ขนาดเล็ก เปลือกบาง ผิวสีเหลืองทองเมื่อสุก เนื้อผลสีเหลือง กลิ่นหอม รสหวาน ต้านทานต่อโรคตายพราย อ่อนแอต่อโรคใบจุด ลำต้นเทียมมีขนาดความสูงเฉลี่ยประมาณ 200-220 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางที่ระดับความสูงจากพื้นดิน 50 เซนติเมตร เฉลี่ย 10-12 เซนติเมตร จำนวนหน่อโดยเฉลี่ย 6-8 หน่อต่อต้น ออกดอกหลังปลูก 6-8 เดือน ระยะเวลาจากออกดอกถึงเก็บเกี่ยวประมาณ 60 วัน รวมระยะเวลาจากปลูกถึงเก็บเกี่ยวประมาณ 8-10 เดือน ผลผลิตในหนึ่งเครือจะมีประมาณ 5-7 หวี จำนวนผลต่อหวีเฉลี่ย 18 ผล จำนวนผลต่อเครือเฉลี่ย 90-130 ผล นิยมบริโภคสดเป็นเครื่องเคียงข้าวเม่าคลุกและกระยาสารทหรือใช้ทำขนมกล้วยบวชชี กล้วยเชื่อม ข้าวเม่าทอด (เบญจมาศ, 2538 ; กวิศร์ และคณะ, 2536)

กล้วยไข่สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทยตลอดทั้งปี แหล่งที่ปลูกมากเป็นการค้าได้แก่ จังหวัดกำแพงเพชร สุโขทัย พิจิตร ตาก นครสวรรค์ เพชรบุรี (ฉลองชัย, 2532) ผลผลิตในท้องตลาดมีมากในช่วงเดือนกันยายนถึงพฤศจิกายน ตลาดส่งออกต่างประเทศที่สำคัญ ได้แก่ ฮ่องกง บรูไน ญี่ปุ่น ฝรั่งเศส (ศิริพร, 2533) ตั้งแต่ปี 2533-38 ประเทศไทยสามารถส่งออกผลกล้วยสดทุกชนิดเป็นปริมาณ 2,435 2,141 2,241 2,804 1,957 และ 2,153 ตัน คิดเป็นมูลค่า 18.6 , 17.0 , 15.6

, 16.5 , 27.3 และ 24.7 ล้านบาท ตามลำดับ โดยในปี 2535-38 ส่งออกเฉพาะกล้วยไข่เป็นปริมาณ 2,140 2,550 1,215 และ 1,463 ตัน คิดเป็นมูลค่าถึง 13.6 , 11.5 , 8.8 และ 10.2 ล้านบาท ตามลำดับ(ที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร และกรมเศรษฐกิจการพานิชย์)

<u>การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย</u>

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยเพื่อการขยายพันธุ์ได้เริ่มทำมาตั้งแต่ปี พ.ศ.2517 โดยใช้ชิ้นส่วนจากเนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายยอดของลำต้นหรือหน่อ นอกจากนี้ยังใช้เนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายช่อดอกตัวผู้หรือปลีได้อีกด้วย (Berg และ Bustamante, 1974) สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยส่วนมากใช้สูตรอาหารของ Murashige & Skoog (1962) ซึ่งอาจดัดแปลงโดยเพิ่มเติมสารบางชนิดลงไปด้วย เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่างๆ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีส่วนช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชเป็นอย่างดี เช่น การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรม, การชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม, ลดระยะเวลาการสร้างสายพันธุ์แท้, ช่วยในการคัดเลือกพืชพันธุ์กลายที่มีลักษณะตามต้องการ (ประดิษฐ์, 2537 ; เบญจมาศ, 2538 ; Novak, 1991)

Cronauer และ Krikorian (1984) ได้ศึกษาการเพิ่มจำนวนกล้วยและกล้าย (plantain) โดยการเพาะเลี้ยงปลายยอด พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณกล้วย Philippine Lacatan, Grand Nain, Saba และ Pelipita ด้วยการเพาะเลี้ยงปลายยอดบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำให้เกิดรากโดยใช้ NAA, IBA, IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ ผงถ่าน 0.025 เปอร์เซ็นต์

Olivia และ Barba (1984) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วย Saba (BBB) บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ และการเปลี่ยนอาหารทุก 8 สัปดาห์ จะทำให้เพิ่มต้นอ่อนได้ถึง 200,000 ต้น ภายในเวลาเพียง 10 เดือน

Jarret และคณะ (1985) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย Saba และ Pelipita พบว่า สามารถเพาะเลี้ยงปลายยอดบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ใน 4 สัปดาห์จำนวนยอดจะเพิ่มขึ้น 3-5 เท่า เมื่อตัดแบ่งย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุก 4-6 สัปดาห์ ยอดเล็กๆจะเพิ่มมากขึ้น และชักนำให้เกิดรากด้วยอาหารสูตร MS

ประภาสินี (2529) ศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์กล้วยไข่พระตะบองด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า ตาข้างระหว่างซอกใบมีการเจริญเติบโตเป็นหน่อเล็กๆได้บนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วย Bangulan คือ pH 5.6 น้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ หรือ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ kinetin 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะกับการเพิ่มปริมาณหน่อ และ IAA หรือ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะกับการเกิดราก

Cronauer และ Krikorian (1987) ศึกษาการเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยง calloid ของกล้วย โดยเลี้ยงปลายยอดขนาด 2 มิลลิเมตร ของกล้วย triploid clone ได้แก่ Philippine Lacatan, Grand Nain และ Highgate บนอาหารสูตร MS ที่เติมเหล็ก, sucrose, myo-inositol, สารควบคุมการเจริญเติบโต, kinetin และ p-chlorophenoxyacetic (PCPA) พบว่า PCPA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิด compact callus ได้ อาหารสูตรที่ไม่มี kinetin จะชักนำให้เกิดรากได้ PCPA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ต้นยืดยกเว้น Highgate จะเกิด pearly white callus หลังจาก 14 สัปดาห์ จากนั้นย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดราก

Fitchet และ Winnaar (1987) นำเนื้อเยื่อเจริญของกล้วย Dwarf Cavendish และ Williams มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เหมาะสมซึ่งประกอบด้วย IBA, NAA, kinetin, ammonium sulphate และถ่าน ย้ายเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งและเหลวตามลำดับทุก 4 สัปดาห์ ย้ายต้นที่เกิดขึ้นใหม่เลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดรากนาน 3 สัปดาห์ สามารถนำออกปลูกได้

Garcia และคณะ (1987) ทำการศึกษาความเข้มข้นของเกลือต่างๆ วิตามิน กรดอะมิโน แหล่งคาร์โบไฮเดรต และความสว่างของแสง พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นเกลือแร่เป็นสองเท่าทำให้จำนวนยอดเพิ่มขึ้นแต่จำนวนรากลดลง การเพิ่มวิตามินและกรดอะมิโนจะทำให้จำนวนยอดและรากลดลง แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ดีที่สุดทำให้เกิดยอดได้มากคือ lactose ส่วนsucrose เหมาะที่จะใช้ในการเปลี่ยนอาหารครั้งต่อๆไป การเพิ่มระยะเวลาให้แสงจาก 12 เป็น 24 ชั่วโมง ก็จะเป็นประโยชน์กับพืชได้มากขึ้น

Balakrishnamurthy และ Rangasamy (1988) ศึกษาการเกิดเป็นต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายช่อดอกกล้วยพันธุ์ Robusta และ Montnan พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณต้นได้โดย

เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นสามารถชักนำให้เกิดรากบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เวลาประมาณ 7-10 วัน

Cronauer และ Krikorian (1988) รายงานว่าสามารถเลี้ยง zygotic embryonic callus ของกล้วย *M. ornata* Roxb. ได้บนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 0.5-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ และเจริญเป็น somatic embryo ได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร Schenk & Hildebrandt (SH) ที่เติมน้ำตาล 3 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นย้ายเลี้ยงต้นอ่อนที่เกิดขึ้นมาบน filter paper bridge บนอาหารเหลวสูตร 1/2SH ที่มีน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์

Mateille และ Foncelle (1988) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วย Poyo (AAA) ที่ Ivory Coast ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4.5, 9.0, 22.5 และ 45 mM พบว่า BA ที่ความเข้มข้น 22.5 mM สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ทุก 3 สัปดาห์ ในอัตรา 2.8 ต้นต่อหนึ่งชิ้นส่วน

Aaouine (1989) ทำการเพาะเลี้ยงตาข้างและตายอดกล้วย Giant Cavendish บนอาหาร MS ที่เติม IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ได้จำนวนเพิ่มขึ้น 5 เท่าทุกๆ 6 สัปดาห์ จากนั้นชักนำให้เกิดรากบนอาหารที่เติม kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเกิดรากย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำมีอัตราการรอดตาย 98 เปอร์เซ็นต์ และพบ somaclonal variation ในบางต้น

Escalant และ Teisson (1989) ศึกษา somatic embryogenesis จาก immature zygote ของกล้วย *Musa acuminata* และ *M. balbisiana* พบว่า immature zygotic embryo ที่เลี้ยงบนอาหาร MS สามารถเกิด callus ได้โดยการเติม picloram 7.5 mM และ gelrite 2 กรัมต่อลิตร จากนั้นย้าย callus มาเลี้ยงบนอาหารที่มี picloram 7.5 mM หรือ NAA 5.3 mM กล้วยสองชนิดนี้เกิด somatic embryo ที่แตกต่างกัน และสามารถเจริญได้ดีบนอาหารที่มี NAA 5.3 mM zygotic และ somatic embryo มีโครงสร้างที่เหมือนกัน

สุภาพร (2532) ศึกษาผลของ 6-benzylaminopurine ต่อการเกิดหน่อของกล้วยไข่ พบว่า อาหารสูตร MS ซึ่งเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร และ BAP 10 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากหน่อ ส่วนอาหารสูตร MS ซึ่งมีน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ BAP 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณต้นในสภาพปลอดเชื้อ

Cote และคณะ (1990) รายงานว่ากล้วย Poyo สามารถเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวได้ 4.5 ต้นภายใน 20 วัน ซึ่งกล้วย Cavendish ได้ 1.5-3 ต้น ส่วนกล้าย Orishele เพิ่มปริมาณได้เมื่อเติม cytokinin ร่วมกับเพิ่มการหมุนเวียนอากาศ และใช้สารยับยั้งเอธิลีน อัตราการเพิ่มปริมาณจะสูงขึ้นถ้ามีการตัดเนื้อเยื่อเจริญเพื่อลดการข่มจากตายอด การเพิ่มความเข้มแสงจาก 50 เป็น 350 mE/m/s ช่วยให้พืชเพิ่มปริมาณได้เร็วและมีความแข็งแรงมากขึ้น มีปริมาณคลอโรฟิลและการสังเคราะห์แสงเพิ่มมากขึ้น การหมุนเวียนอากาศในระบบดีขึ้น

Kwa และ Ganry (1990) ได้ทำการทดลองที่ไต้หวัน, คอสตาริกา, อิสราเอล, ไอวอรีโคสต์ และคาเมรูน พบว่าการขยายพันธุ์กล้วยในสภาพปลอดเชื้อจะเป็นประโยชน์มากกว่าวิธีดั้งเดิม พืชมีความแข็งแรงมากขึ้น มีความสม่ำเสมอ น้ำหนักเครือ จำนวนผลและหวีมากขึ้นกว่าเดิม ความผันแปรของขนาดผลและรูปร่างลดลง ทำให้เพิ่มเปอร์เซ็นต์การส่งออกได้มากขึ้น ความสูงขณะออกดอกของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพันธุ์ Poyo และ Giant Cavendish จะสูงเท่ากับหรือมากกว่าต้นที่ขยายพันธุ์แบบเดิม ส่วนพันธุ์ Grand Nain ต้นจะเตี้ยลงกว่าเดิม

Ling และคณะ (1990) ได้เลี้ยงปลายช่อดอกของกล้วย *Musa acuminata* (AAA) 'Pai Yu' 'Viet Nam' และ *M. paradisiaca* (ABB) บนอาหารสูตรต่างๆ พบว่า 2,4-D, 2,4,5-T, BA และ kinetin สามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อได้โดยใช้ระยะเวลามากกว่า 2-3 เดือน ซึ่งในช่วงแรกนี้เนื้อเยื่อจะไม่ตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตเลย จากนั้นแล้วทุกๆส่วนของชิ้นพืชสามารถเกิด adventitious bud ขึ้นได้

กวี (2533) ศึกษาผลของ NAA, ผงถ่าน และความเข้มข้นของวุ้น ต่อการเกิดรากและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยพันธุ์ Grand Nain พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นวุ้น 5 กรัมต่อลิตร เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของต้นอ่อนมากที่สุด อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการเกิดรากและการเจริญเติบโตของต้นอ่อน ผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร และวุ้น 5 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้ต้นอ่อนที่แข็งแรง มีจำนวนใบและรากมากพอ

กัลยาณี (2533) ศึกษาการเพิ่มปริมาณต้นและการเจริญเติบโตของกล้วยหอมพันธุ์ Grand Nain โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า การเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื้อเยื่อปลายยอดที่ตัดเป็น 4 ส่วนตามยาวจะเพิ่มขนาดตายอดและตาข้างระหว่างซอกใบมีการเจริญเติบโตเป็นหน่อขนาดเล็กภายในเวลา 2 เดือน เมื่อตัดแบ่งหน่อเป็น 2 ส่วนตามยาว ย้ายลงอาหารใหม่ จะเพิ่มปริมาณหน่อได้ 2.44 หน่อต่อชิ้น

ศรีสังวาลย์ (2533) ศึกษาผลของ pH ต่อการเกิดหน่อของกล้วยไข่ โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยไข่บนอาหารสูตร MS ที่มี pH 4.5, 5.0, 5.6, 6.0 และ 6.5 พบว่า เนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารที่ pH 5.6 มีการเจริญเติบโตดีที่สุด คือ มีการเพิ่มขนาด แตกหน่อ และมีการพัฒนาเป็นต้นที่แข็งแรง ใบใหญ่ มีรากเกิดขึ้นดี

ศิริลักษณ์ (2533) ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นวุ้น และ supporting agent ต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไข่ พบว่าเนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้นข้นของวุ้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ จะมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบผลของการใส่และไม่ใส่ supporting agent พบว่า เนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ไม่ใส่ supporting agent และวางบนเครื่องเขย่า ต้นอ่อนจะมีความสูง น้ำหนัก และเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่าการใส่ supporting agent

Alvard และคณะ (1993) ศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยในอาหารแข็งและเหลวชนิดต่างๆ คือ (1)ใช้เจล (2)เลี้ยงพืชให้จมในอาหารเหลว (3)เลี้ยงพืชบน cellulose ในอาหารเหลว (4)เลี้ยงพืชให้มีบางส่วนจมอยู่ในอาหารเหลว (5)เลี้ยงพืชในอาหารเหลวที่เติมอากาศ (6)เลี้ยงพืชให้จมในอาหารเหลวนาน 20 นาที ทุกๆ 2 ชั่วโมง จากนั้น 20 วันพบว่าวิธีที่ (2)และ(3) มีการเพิ่มปริมาณต่ำสุด วิธีที่ (1)(4)และ(5) มีอัตราการเพิ่มปริมาณได้ 2.2-3.1 ต้น วิธีที่ (6) มีอัตราการเพิ่มปริมาณมากกว่า 5 ต้น วิธีที่ (1)-(4) ได้น้ำหนักแห้งประมาณ 0.5 กรัม ส่วน (5)-(6) จะมีน้ำหนักแห้งมากกว่า 2-5 เท่า

สุภาภรณ์ (2536) ศึกษาการเกิดหน่อของกล้วยหอม 8 พันธุ์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่ากล้วยกลุ่มคาเวนดิชจะมีระยะเวลาที่เนื้อเยื่อปลายยอดเริ่มเจริญเร็วกว่ากลุ่มกรอสมิเชล การตัดแบ่งเนื้อเยื่อเป็น 4 ส่วนตามยาวจะทำให้ได้จำนวนต้นทั้งหมดต่อหน่อสูงสุด กล้วยหอมกลุ่มกรอสมิเชลให้จำนวนต้นทั้งหมดต่อชิ้นและจำนวนต้นทั้งหมดต่อหน่อน้อยกว่ากล้วยหอมกลุ่มคาเวนดิช

มุจลินท์ (2537) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยพื้นเมืองบางพันธุ์ พบว่า การเพาะเลี้ยงปลายยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร กล้วยครั่งเกิดหน่อได้เร็วที่สุด กล้วยตีบมุกดาหารเกิดหน่อช้าที่สุด การผ่าหน่อจะช่วยให้ได้จำนวนต้นอ่อนเพิ่มมากขึ้น การเพิ่มปริมาณหน่อกล้วยตานี โดยใช้ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้จำนวนหน่อสูงสุด 1.7 หน่อ ในเวลา 1 เดือน ซึ่งไม่แตกต่างกับการใช้ BA 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

<u>การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์</u>

การปรับปรุงพันธุ์โดยการชักนำให้การกลายพันธุ์เป็นวิธีการที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่ต้องการเพียง 1-2 ลักษณะกับพืชที่เป็นพืชปลูกเดิม โดยยังคงรักษาลักษณะส่วนใหญ่เอาไว้ วิธีการนี้มีความสำคัญในการชักนำให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมของกล้วยซึ่งเป็นพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีไม่ใช้เพศ (Novak และคณะ,1993)

มีสารเคมีหลายชนิดที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนโครโมโซม เมื่อเซลล์ได้รับสารเหล่านั้นนานกว่า 1 ชีพจักร (cell cycle) แล้วจำนวนโครโมโซมอาจจะเพิ่มขึ้นโดยไม่เกิดการแบ่งเซลล์ (Griesbach, 1987) สารเคมีที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางคือ colchicine ซึ่งเป็นสารประเภท alkaloid ที่สกัดได้จากพืช Colchicum (*Colchicum autumnale*) ซึ่งพบในแถบทะเลเมดิเตอเรเนียน มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้าง spindle fiber ในระยะที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิส โดย colchicine จะไปรวมกับองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนของ microtubule ภายในเซลล์ ทำให้ microtubule ไม่สามารถต่อกันเป็นสายใย spindle fiber ที่จะช่วยดึงโครโมโซมให้แยกออกจากกันในระยะเมตาเฟสได้ โครโมโซมจึงไม่เคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วเซลล์และมีจำนวนเพิ่มขึ้นอีกเท่าตัว (สิรนุช, 2536 ; อมรา, 2536)

สาร oryzalin (ชื่อสามัญ) หรือ surflan, ryzelan (ชื่อการค้า) สูตรโมเลกุล $C_{12}H_{18}N_4O_6S$ มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองส้ม มักใช้เป็นสารกำจัดวัชพืช (selective preemergence herbicide) ที่ความเข้มข้น 4 lb/gal (Worthing และ Walker, 1987) และยังมีคุณสมบัติเป็น antimitotic agent คล้ายกับ colchicine (Hassawi และ Liang, 1991)

นอกจากนี้สิ่งก่อกลายพันธุ์อื่นที่ใช้ได้แก่ รังสีแกมมา รังสีเอ็กซ์ trifluralin ethyl methanesulphonate (EMS) amiprophosmethyl (APM) pronamide เป็นต้น มีผู้วิจัยหลายท่านได้รายงานการชักนำให้พืชกลายพันธุ์ด้วยสิ่งก่อกลายพันธุ์ต่างๆ กัน อาทิเช่น

Chen และ Coeden-Kallemeyn (1979) ศึกษาการชักนำแคลลัส Day Lily ด้วยcolchicineเพื่อให้ได้ต้น tetraploid พบว่า แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ colchicine 0, 10, 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมืด 3 วัน ที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดยอด นับจำนวนโครโมโซม ปากใบ และอับเกสรตัวผู้ สามารถเกิด tetraploid ที่สมบูรณ์ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดย colchicine ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

ปาริชาติ (2526) ศึกษาผลของสิ่งก่อกลายพันธุ์ต่อกล้วยหอมทองที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า การเพิ่มปริมาณรังสีทำให้การเจริญเติบโตของกล้วยลดลง และเกิดลักษณะผิดปกติต่างๆ รังสี 3.5 Krad ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมจาก triploid (2n=33) เป็น aneuploid (2n=36) เมื่อแช่ปลายยอดใน colchicine 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 0-8 ชั่วโมง พบว่า การแช่ที่ 2 ชั่วโมง ชักนำให้จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น hexaploid (2n=66) ในบางต้น

สุรวิช (2526) ศึกษาผลของรังสีและสารเคมีต่อกุหลาบหินพันธุ์ลาร์โกในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า รังสีทำให้เกิดลักษณะใบ การเรียงตัวของใบและความยาวปล้องที่ผิดปกติ รังสี 3.5 Krad ทำให้เกิดลักษณะผิดปกติมากที่สุด แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม การใช้ colchicine เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่า การใช้ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 24 ชั่วโมง ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่าได้เช่นกัน

รงรอง (2528) ศึกษาการชักนำให้เยอบีรากลายพันธุ์ในหลอดทดลอง พบว่ารังสีทำให้เกิดลักษณะที่ผิดปกติบางอย่าง แต่จำนวนโครโมโซมไม่เปลี่ยนแปลง การใช้ colchicine เข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ จะมีอัตราการรอดตายสูง และพบต้นที่เป็น tetraploid (4x=100) และ mixoploid

Epp (1987) ศึกษา somaclonal variation โดยนำเนื้อเยื่อเจริญของกล้วย Umalog มาฉายรังสีและให้สาร EMS แล้วนำหน่อที่เกิดใหม่ทดสอบความต้านทานต่อ *Fusarium oxysporum* sp. cubense พบว่าหน่อใหม่ที่เกิดขึ้นจำนวน 4 clone มีความต้านทานต่อโรคได้ดีในแปลงทดสอบแม้ว่าผลผลิตไม่ได้เพิ่มขึ้นก็ตาม clone ที่ได้มีความไวต่อ fusaric acid 10^{-4}-10^{-5} M ซึ่งต่ำกว่าเดิม

Omar และคณะ (1989) ศึกษาผลของ ethyl methanesulphonate (EMS) ต่อเนื้อเยื่อปลายยอดของกล้วย SH3362 clone (AA diploid) และ Grand Nain mutant GN-60Y/A (AAA triploid) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ EMS เพิ่มมากขึ้นจำนวนหน่อที่เกิดใหม่จะลดลง การใช้ EMS ร่วมกับ Dimethylsulphoxide (DMSO) มีผลต่อการเจริญของปลายยอด ระยะเวลาการใช้ DMSO เป็น carrier agent มีผลต่อการดูดซึมสารก่อกลายพันธุ์ และยืนยันได้ว่ามีการสะสมของสารก่อกลายพันธุ์ที่ shoot apical meristem, leaf primordia และ corm ซึ่งจะเจริญเติบโตต่อไป

เสริมศิริ (2532) ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์เก๊กฮวยด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้ colchicine 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 1-5 ชั่วโมง พบว่า ได้ต้น tetraploid ที่มีลักษณะแคระแกรนซึ่งไม่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ส่วนการชักนำโดยรังสีแกมมา 1- 1.5 Krad ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้มาก

Matsumoto และ Yamaguchi (1990) สามารถคัดเลือกกล้วยที่ทนทานต่ออะลูมิเนียมจาก mutant protocorm like bodies (Plbs) ของกล้วย Cavendish cv.Nanicao (AAA) โดยนำ Plbs ไปฉายรังสีแกมมา 2 Krad และเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เติม aluminium chloride ที่ pH 4.6 ซึ่งคล้ายสภาพดินกรดที่แสดงความเป็นพิษของอลูมิเนียม จากการคัดเลือกได้ 1 Plb line ที่มีความสามารถในการทนทานต่ออลูมิเนียมได้มากกว่าเดิม

Novak และคณะ (1990) ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของกล้วย 7 clone (genome AA, AAA, AAAA) กล้าย (AAB) และกล้วยหักมุก (Bluggue) (ABB) โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่ประกอบด้วย leaf primordia 2 คู่ จากนั้นฉายรังสีแกมมาปริมาณ 15, 30, 45 และ 60 Gy อัตรา 8 Gy ต่อนาที ความไวต่อรังสี (radiosensitivity) ซึ่งวัดได้จากน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นและการพัฒนาของยอดที่เกิดขึ้นในแต่ละ clone จะต่างกันขึ้นกับจำนวนของ ploidy และการรวมกันของ genome A (acuminata) และ B (balbisiana) การศึกษา electrophoresis จากใบแสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมของต้นที่กลายพันธุ์แตกต่างไปจาก clone เดิม

Verhoeven และคณะ (1990) ศึกษา spindle toxin ในระยะเมตาเฟสและการเกิด micronuclei โดยใช้ colchicine, oryzalin และ amiprofos-methyl (APM)กับเซลล์แขวนลอยของ *Nicotiana plumbaginifolia* พบว่า oryzalin และ APM จะยับยั้งการสร้าง spindle ได้มากกว่า colchicine และทำให้เกิด micronuclei ในเซลล์ได้มากกว่าด้วย

Tulman Neto และคณะ (1990) ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของกล้วย Maca ในสภาพ *in vivo* โดยนำ rhizome ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร มาเลี้ยงในเรือนเพาะชำ 1 สัปดาห์ จากนั้นนำส่วน leaf sheath และ meristem apex ออก แล้วตัดแบ่งตามยาวเป็นสองส่วนเพื่อกระตุ้นการเจริญของตาข้างพบว่าบริเวณที่ตัดตาออกจะพัฒนาเป็น callus และต้นใหม่ สามารถนำไปปลูกต่อไปได้ จากนั้นทดสอบความต้านทานต่อ *F. oxysporum* sp.cubense กระบวนการนี้ใช้เวลา 8.5 เดือน และได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญบนอาหารที่มี BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร pH 5.7 แล้วนำไปฉายรังสีแกมมา พบว่าค่า LD_{50} เท่ากับ 40 Gy ซึ่งเทคนิคนี้มีประโยชน์ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ หลีกเลี่ยงการเกิด chimera และสามารถคัดเลือกต้นต้านทานโรคได้เร็วกว่าด้วย

ทิวา (2533) ศึกษาผลของcolchicineต่อการกลายพันธุ์ของแกลดิโอลัสในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ความเข้มข้น 0, 50, 100 และ 200 ppm นาน 6, 12, 24 และ 36 ชั่วโมง พบว่า ความเข้มข้นของ colchicine มีผลต่อน้ำหนัก ขนาดแคลลัส ความสูงต้น ความหนาใบ เมื่อศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายราก พบว่า จำนวนโครโมโซมไม่มีการเปลี่ยนแปลง (2n=46)

สุภัทรา (2533)[1] ศึกษาการชักนำให้กล้วยหอมพันธุ์ Williams เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีและคัดพันธุ์ทนเค็ม พบว่า ปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการ การเจริญเติบโตลดลง อัตราการตายสูงขึ้น สามารถคัดพันธุ์ทนความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ จากการฉายรังสีแกมมา 2 Krad 2 ครั้ง

Ramulu และคณะ (1991) รายงานว่า oryzalin, amiprophosmethyl (APM) และ colchicine ซึ่งเป็นสาร antimicrotubule สามารถหยุดกระบวนการไมโตซิสในเซลล์แขวนลอยของมันฝรั่ง ทำให้ micronuclei และโครโมโซมเพิ่มขึ้น หลังจากได้รับสาร oryzalin และ APM ความเข้มข้น 15-32 μM มีผลยับยั้งในระยะ metaphaseได้มากกว่า colchicine 0.5-5 μM เมื่อเปลี่ยนอาหารและตรวจสอบด้วย flow cytometry เพื่อหาปริมาณ DNA ในระยะ interphase และจำนวนโครโมโซมของเซลล์ พบว่าสารที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนโครโมโซมได้ดีที่สุดคือ oryzalin รองลงมาคือ APM และ colchicine ตามลำดับ

Wan และคณะ (1991) ศึกษาการใช้ antimicrotubule herbicides คือ APM, pronamide, oryzalin และ trifluralin ในการสร้างต้น double haploid plant callus ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร (anther) ของข้าวโพดหลังจากตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับ ploidy ด้วย flow cytometry พบว่า haploid callus ที่ได้รับ APM 5-10 μM หรือ pronamide 10 μM นาน 3 วัน สามารถเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น diploid ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้ง APM และ pronamide ในความเข้มข้นนี้ไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัส และแคลลัสยังสามารถพัฒนาไปเป็นต้น(regenerate)ได้มาก oryzalin มีประสิทธิภาพในการชักนำได้มากแต่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโต ส่วน trifluralin สามารถชักนำได้ที่ความเข้มข้นต่ำ (0.5-1 μM)

Hassawi และ Liang (1991) ศึกษา antimitotic agents กับการทวีจำนวนโครโมโซมของข้าวสาลีที่เป็น haploid โดยการใช้สาร colchicine 0.0125 และ 0.025 เปอร์เซ็นต์, trifluralin 5 และ 10 μM, oryzalin 5 และ 10 μM พบว่าข้าวสาลีพันธุ์ Povon สามารถตอบสนองต่อสารก่อกลายพันธุ์ได้ดี โดยที่ colchicine จะมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิด doubled haploid (2n=6x=42) ได้มากกว่า trifluralin และ oryzalin

Novak และคณะ (1993) ศึกษาการชักนำให้กลายพันธุ์จากเนื้อเยื่อปลายยอดของกล้วยในสภาพปลอดเชื้อที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญ และ leaf primordia 2 คู่ นำมาฉายรังสีแกมมา พบว่าความไวต่อรังสี (radiosensitivity) ขึ้นกับระดับของ ploidy และการรวมตัวของ genome A และ B ระดับรังสีแกมมาที่เหมาะสมสำหรับฉายให้กับกล้วย dipolid, AAA triploid, AAB ABB tripolid และ AAAA tetraploid คือ 25, 35, 40 และ 50 Gy ตามลำดับ พันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำกล้วย Grand Nain คือ GN60A ซึ่งมีการออกดอกเร็วขึ้น เครือตั้งตรง คุณภาพและน้ำหนักเครือมากขึ้น ต้นเตี้ยลงและองค์ประกอบภายในผลต่างไปจากเดิม นอกจากนี้ยังใช้สาร EMS กับกล้วย diploid และ triploid โดยแช่ shoot tip ใน EMS 0.2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ DMSO 2เปอร์เซ็นต์ นาน 3 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้อีกด้วย

Smith และคณะ (1993) รายงานว่ากล้วย Dwarf Perfitt ซึ่งต้านทานเชื้อ *Fusarium oxysporum* race 4 เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีแกมมา ต้นกลายพันธุ์ที่ได้ตกเครือได้เร็วและทนต่ออากาศเย็นได้ดีกว่าเดิม และยังคงต้านทานต่อเชื้อได้ด้วย นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาเทคนิคการชักนำให้เกิด tetraploid จาก diploid clone SH3362 โดยใช้ colchicine 0.5

เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ DMSO 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 2-4 ชั่วโมง ทำให้ได้ต้น tetraploid 12 ต้น ซึ่งมีบางต้นกลับไปเป็น diploid ตามเดิม ลักษณะที่ปรากฏคือ ราก ลำต้นหนา และใบกว้างกว่าปกติ และเมื่อมีการเข้าทำลายของเชื้อก็ไม่พบต้นตาย แต่จะไม่ทนต่อความหนาวเย็นเหมือน SH3362

เยาวพา (2536) ศึกษาการชักนำหม่อนให้กลายพันธุ์ด้วยการใช้สารละลาย colchicine และการฉายรังสีแกมมาเพื่อคัดเลือกพันธุ์ทนเค็มโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า อัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของตาข้างลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายและระยะเวลาเพิ่มขึ้น การแช่สาร colchicine 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 วัน สามารถชักนำให้เกิดต้น tetraploid ได้มาก ซึ่งมีขนาดของเซลล์ปากใบ ความหนาใบมากกว่าต้น diploid มีจำนวนโครโมโซม 2n=4x=56 ส่วนรังสีแกมมาทำให้ได้ต้นเตี้ยแคระแกรน จำนวนโครโมโซมไม่เปลี่ยนแปลง

สุภาพร (2536) ศึกษาผลของ colchicine ต่อกล้วยไข่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอด พบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับสารละลาย colchicine เข้มข้น 500, 1000 และ 1500 ppm นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จะมีการตายเพิ่มมากขึ้น การแตกหน่อลดลง ความเข้มข้นของสารและระยะเวลาในการแช่สารมีผลต่อการเจริญเติบโตในแปลงปลูก แต่ปริมาณและคุณภาพผลผลิตไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ไม่สามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมได้

วิชชุตา (2537) ศึกษาผลของ colchicine และรังสีแกมมาต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์ Double Spathe พบว่า รังสี 5 เกรย์ทำให้เกิดลักษณะผิดปกติมากที่สุด แต่ความยาวปากใบของต้นที่ฉายรังสีไม่แตกต่างกับต้นไม่ได้ฉายรังสี จำนวนโครโมโซมไม่เปลี่ยนแปลง ส่วนการใช้ colchicine 0.01, 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 และ 48 ชั่วโมง ทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลง เกิดลักษณะใบด่าง จำนวนโครโมโซมไม่เปลี่ยนแปลงเช่นกัน

การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมในพืชนั้นนอกจากจะเกิดจากการชักนำให้กลายพันธุ์แล้ว ยังสามารถเกิดได้จาก somaclonal variation การผสมพันธุ์โดยมนุษย์หรือเกิดตามธรรมชาติ ซึ่งพันธุ์กลายหรือลูกผสมที่ได้จะมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไป อาทิเช่น

Stover และ Buddenhagen (1986) ศึกษาการผสมพันธุ์กล้วยโดยใช้ Gros Michel 'Highgate' (3x) และ *Musa acuminata* (2x)ทำให้ได้ต้น tetraploid (4x) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่

สำนักหอสมุด
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สามารถพัฒนาให้เป็นการค้าได้ ต้น tetraploid ที่ได้ยังอ่อนแอต่อโรค Panama และเสนอว่าควรสร้างต้น tetraploid(4x) จากต้น diploid(2x) และใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้าช่วยในการเพิ่ม gene

Stover (1987) ศึกษา somaclonal variation จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย Grand Nain และ Saba ในช่วงอนุบาล ปลูกในแปลง จนถึงระยะเก็บเกี่ยว พบว่ากล้วย Saba ไม่มีการกลายพันธุ์เลยจากจำนวนทั้งหมด 500 ต้น ส่วนกล้วย Grand Nain พบความผิดปกติของการออกดอกและการสุกแก่ของผล 25 เปอร์เซ็นต์ คือ มีความผิดปกติที่ดอกและผล เกิดต้น tetraploid และ aneuploid พร้อมทั้งได้คัดเลือกต้นที่มีลักษณะดีเก็บไว้

Hwang และ Ko (1988) ศึกษา somaclonal variation จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย Giant Cavendish โดยคัดเลือกต้นที่ต้านทานต่อ Fusarium wilt จาก 18,000 ต้น พบ 45 ต้นที่ไม่มีเชื้อ *F. oxysporum* f. sp.cubense ในหน่อตามที่สองพบ 6 clone ที่ยังคงมีความต้านทานโรคสูงและมีความแตกต่างของความสูง สีและรูปร่างใบ clone ที่ได้นี้ให้ผลผลิตต่ำ (20-24 กิโลกรัมต่อเครือ) กว่าต้นปกติที่ไม่เป็นโรค (26 กิโลกรัมต่อเครือ)

Zeng และคณะ (1989) ศึกษากล้วยที่ Guandong ประเทศจีน ตั้งแต่ 1980-87 พบว่ามีการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวางในกลุ่มลูกผสม *Musa acuminata* x *M. balbisiana* ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มคือ ผลสีเขียวปลีสีแดง ผลและปลีสีเขียว ผลสีเขียวปลีสีเหลือง ผลสีแดงปลีสีแดง และผลสีเหลืองแดงปลีสีแดง ซึ่งทั้งหมดมีจำนวนโครโมโซม 2n=22 และพบว่ามี 2 ตัวอย่างที่มี arm ratio และ isoperoxidase band ต่างไปเล็กน้อย และยังพบ tetraploid จาก *M. balbisiana* x *M.* (AAB) plantain

<u>ผลของ genome ในกล้วย</u>

กล้วยที่รับประทานได้ส่วนใหญ่มีจำนวนโครโมโซม 3 ชุด (triploid หรือ 3x) ได้แก่ กล้วยหอม กล้วยน้ำว้า กล้วยหักมุก กล้าย(plantain) ฯลฯ และกล้วยที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด (diploid หรือ 2x) เพียงบางพันธุ์ เช่น กล้วยไข่ กล้วยเล็บมือนาง กล้วยหอมจันทน์ ซึ่งความแตกต่างของจำนวนชุดโครโมโซมนี้มีผลต่อขนาดเซลล์ปากใบ ลักษณะใบ ความแข็งแรงต้น การเจริญของผล ตลอดจนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการศึกษาขนาดเซลล์ปากใบของต้นกล้วยที่โตเต็มที่พบว่ากล้วย diploid จะมีความยาวปากใบเฉลี่ยน้อยที่สุดคือ 22.9 μm กล้วย triploid(3x) tetraploid(4x) pentaploid(5x) จะมีขนาดความยาวปากใบเป็น 29.3 30.7 และ 34.7 μm ตามลำดับ (เบญจมาศ, 2538) ส่วนความหนาแน่นของปากใบต่อตารางมิลลิเมตร กล้วย diploid จะมีมากที่สุดคือ 46.9 และน้อยลงเป็น 34.6 18.3 13.5 ในกล้วย triploid tetraploid pentaploid ตามลำดับ ดังนั้นขนาดและจำนวนปากใบต่อพื้นที่อาจใช้ในการตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกกล้วยที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นกว่าปกติได้

กล้วยที่เป็น diploid triploid tetraploid pentaploid จะมีความหนาของแผ่นใบมากขึ้นตามลำดับซึ่งสามารถสังเกตจากการสัมผัสได้ ใบของกล้วยที่มีจำนวนโครโมโซมหลายชุดจะมีปริมาณน้ำค่อนข้างมากทำให้มีน้ำหนักมากขึ้น ใบจึงกางออกและโค้งต่ำลงมามากกว่าใบกล้วย diploid ส่วนน้ำหนักแห้งของก้านใบจะลดลงจาก 2x ไปยัง 5x จึงทำให้ใบกล้วยที่มีจำนวน ploidy มากๆไม่แข็งแรงมีอัตราเหี่ยวแห้งและการแตกหักของใบเพิ่มขึ้น

กล้วย triploid ที่มีกำเนิดจาก *M. acuminata* จะมีความแข็งแรงใกล้เคียงกับ tetraploid แต่มากกว่า diploid ส่วนกล้วยที่มี ploidy มากถึง 6x 7x ความแข็งแรงจะลดลงอาจเจริญได้ในระยะแรกเท่านั้น กล้วยลูกผสมที่มาจากกล้วยตานี (Balbisiana) และเป็น 3x 4x ก็จะมีความแข็งแรงมากกว่า 5x เช่นกัน ขนาดรังไข่ของกล้วยที่มีโครโมโซม 3x 4x จะใหญ่กว่า 2x ประมาณสองเท่า การเจริญก็จะมีมากกว่าด้วย ส่วนจำนวนผลต่อเครืออาจไม่แตกต่างกันนักขึ้นกับพันธุ์ แต่มีแนวโน้มว่ากล้วยที่มีจำนวนชุดโครโมโซมมากก็จะมีจำนวนผลต่อเครือมากด้วย (เบญจมาศ, 2538)

สุภาพร (2534) ได้ศึกษาผลของจำนวนชุดโครโมโซมต่อการขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ากล้วยที่มีชุดโครโมโซมต่างกันจะเจริญเป็นต้นโดยใช้เวลาต่างกัน กล้วยที่มี genome B รวมอยู่ด้วยจะเจริญเป็นต้นได้ช้ากว่ากล้วยที่มี genome A เพียงอย่างเดียว แต่จะได้จำนวนยอดที่เจริญขึ้นมาทั้งหมดไม่ต่างกัน

Valsalakumari และ Nair (1988) ศึกษาความมีชีวิตและขนาดของเกสรเพศผู้ ซึ่งได้รับอิทธิพลจาก genome และระดับ ploidy พบว่ากล้วย genome AB ทุกพันธุ์, genome AAB และ ABB บางพันธุ์สร้างเกสรเพศผู้ไม่ได้ ส่วนกล้วย *Musa balbisiana* (BB) สร้างเกสรเพศผู้ที่มีชีวิตได้มากที่สุด

รองมาคือ tetraploid ส่วน triploid สร้างเกสรเพศผู้ขนาดใหญ่สุด ในแต่ละระดับ ploidy เดียวกันพันธุ์ที่มี genome A รวมอยู่ด้วยจะมีขนาดเกสรเพศผู้ใหญ่ ซึ่งน่าจะใช้เป็น male parent ในการผสมพันธุ์

Rodriguez และคณะ (1987) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการให้ผลผลิตของกล้วยพันธุ์ต่างๆในช่วง 4 ปี บนพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำใน Guantanamo ซึ่งได้แก่พันธุ์ Giant Cavendish, Dwarf Cavendish, Valery, Robusta, Parecido al Rey, Tetraploid 64-2596 และ UC-RS พบว่าพันธุ์ Parecido al Rey, Giant Cavendish, Valery, และ Tetraploid 64-2596 ให้ผลผลิตสูง คือ 23.5 22.5 21.7 และ 21.4 กิโลกรัมต่อเครือ ตามลำดับ ผลผลิตในปีต่อๆ มาจะลดลงยกเว้นพันธุ์ Tetraploid 64-2596 ซึ่งให้ผลผลิตสูงสุดในปีที่ 4 และมีการปรับตัวได้ดี ใช้เป็นพันธุ์แนะนำให้ปลูกบริเวณเชิงเขาและต้านทานต่อ *Fusarium oxysporum* f.sp.cubense และ *Mycosphaerella musicola* ด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ต้นอ่อนกล้วยไข่ในสภาพปลอดเชื้อ
2. อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ สำหรับเตรียมอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งหยาบ และเครื่องชั่งละเอียด, เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง, เครื่องกรองแบคทีเรีย, หม้อนึ่งความดันไอน้ำ, เตาแก๊ส, ภาชนะตวง เช่น กระบอกตวง บิกเกอร์ ปิเปต แท่งแก้ว, ภาชนะใส่อาหาร เช่น ขวดรูปชมพู่ ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ฯลฯ
3. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการย้ายเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ, ปากคีบ, มีดผ่าตัด, ตะเกียงแอลกอฮอล์, จานแก้ว ฯลฯ
4. สารเคมี ได้แก่
   - สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962)
   - สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช เช่น BA, NAA
   - สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ 70% , คลอรอกซ์ 10%
   - สาร colchicine, oryzalin, DMSO
   - สารเคมีสำหรับการศึกษาโครโมโซม เช่น aceto-carmine, Carnoy's fluid
5. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,500-3,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน
6. อุปกรณ์สำหรับการศึกษาปากใบและโครโมโซม เช่น ยาทาเล็บ กล้องจุลทรรศน์ กระจกสไลด์ สีย้อม ฯลฯ
7. อุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกกล้วย เช่น ถุงพลาสติกดำ ดินผสม ปุ๋ยคอก ปุ๋ยเคมี สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เทปวัด ฯลฯ

วิธีการ

การทดลองที่ 1 ผลของสาร colchicine และ oryzalin ต่อกล้วยไข่ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพิ่มปริมาณต้นอ่อนกล้วยไข่

เพิ่มปริมาณต้นกล้วยไข่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยการผ่าแบ่งต้นอ่อนตามยาวและย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ pH 5.8 นำไปไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำการตัดแบ่งเนื้อเยื่อและเปลี่ยนอาหารทุก 1 เดือน จนได้จำนวนต้นเพียงพอ

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

1. เตรียมสารก่อกลายพันธุ์ โดยเตรียมสารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.5 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (12.5 18.8 25.0 mM) ร่วมกับ DMSO 2 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และเตรียมสารละลาย oryzalin ความเข้มข้น 15 30 และ 45 μM ร่วมกับ DMSO 2 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเช่นกัน จากนั้นกรองด้วยชุดกรองแบคทีเรีย

2. คัดเลือกต้นอ่อนกล้วยไข่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีขนาดใกล้เคียงกัน นำมาตัดปลายยอดให้มีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ซึ่งประกอบด้วยตายอดและตาข้าง จำนวนสิ่งทดลองละ 18 ชิ้น

3. แช่ชิ้นส่วนดังกล่าวในสารก่อกลายพันธุ์ที่เตรียมไว้ในแต่ละระดับความเข้มข้นนาน 2.5 5.0 และ 7.5 ชั่วโมง ซึ่งแทนด้วยสัญญลักษณ์ดังนี้

colchicine	0.5 %	นาน 2.5 ชั่วโมง	A1
	(12.5 mM)	นาน 5.0 ชั่วโมง	A2
		นาน 7.5 ชั่วโมง	A3
	0.75 %	นาน 2.5 ชั่วโมง	B1
	(18.8 mM)	นาน 5.0 ชั่วโมง	B2
		นาน 7.5 ชั่วโมง	B3

	1.0 %	นาน 2.5 ชั่วโมง	C1
	(25.0 mM)	นาน 5.0 ชั่วโมง	C2
		นาน 7.5 ชั่วโมง	C3
oryzalin	15 μM	นาน 2.5 ชั่วโมง	X1
		นาน 5.0 ชั่วโมง	X2
		นาน 7.5 ชั่วโมง	X3
	30 μM	นาน 2.5 ชั่วโมง	Y1
		นาน 5.0 ชั่วโมง	Y2
		นาน 7.5 ชั่วโมง	Y3
	45 μM	นาน 2.5 ชั่วโมง	Z1
		นาน 5.0 ชั่วโมง	Z2
		นาน 7.5 ชั่วโมง	Z3
control			control

4. ล้างชิ้นส่วนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ย้ายชิ้นส่วนพืชเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ pH 5.8 นำไปไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อครบ 1 เดือน แยกหน่อ VM_2 ที่เกิดขึ้นมาใหม่จากตาข้าง ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม

5. บันทึกการรอดชีวิตและการเกิดหน่อใหม่ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงไปนาน 1 เดือน เพื่อหาอัตราการรอดชีวิต และการเจริญเติบโต

<u>การคัดเลือกต้นที่มีการเปลี่ยนแปลง</u>

1. บันทึกลักษณะผิดปกติที่อาจพบได้ เช่น ใบอวบหนา ต้นเตี้ย ฯลฯ

2. กำหนดรหัสต้น VM_2 ในแต่ละสิ่งทดลอง เช่น A1-1, A1-2, A1-3,...แล้ววัดความยาวเซลล์ปากใบทุกต้น โดยใช้ยาทาเล็บป้ายที่ด้านหลังแผ่นใบ เมื่อแห้งค่อยๆ ลอกยาทาเล็บที่มีร่อยปากใบติดอยู่ออกแล้ววัดความยาวใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ ocular micrometer

3. คัดเลือกต้นที่ความยาวปากใบประมาณ 1.5 เท่า ของต้นปกติ จากนั้นเพิ่มปริมาณต้นโดยการตัดแบ่งและเปลี่ยนอาหารทุก 1 เดือน จนถึงชั่ว VM_4 บันทึกการเกิดหน่อใหม่ในแต่ละสิ่งทดลอง

4. ย้ายเลี้ยงต้น VM_4 บนอาหาร MS ที่เติม NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 3 สัปดาห์ เพื่อชักนำการเกิดราก

5. ตัดปลายรากมาศึกษาจำนวนโครโมโซมโดยวิธี squash methodเพื่อคัดเลือกต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น

6. นำต้นที่คัดเลือกไว้มาตัดแบ่งและเพิ่มปริมาณเพื่อให้ได้จำนวนต้นมากขึ้น และศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

<u>การทดลองที่ 2 การชักนำให้เกิดรากและย้ายปลูกในเรือนเพาะชำ</u>

<u>การชักนำให้เกิดราก</u>

ย้ายต้นอ่อนในแต่ละหมายเลขไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดราก เมื่อครบ 1 เดือน เปรียบเทียบการเกิดรากและความสมบูรณ์ของรากด้วยการให้คะแนนความสมบูรณ์ของราก โดยให้คะแนน 1 เมื่อเกิดราก 0-1 ราก และให้คะแนนเพิ่มขึ้นตามระดับความสมบูรณ์ของรากจนถึง 5 คะแนน

<u>การเจริญเติบโตหลังย้ายปลูกในเรือนเพาะชำ</u>

นำต้นอ่อนที่ได้ย้ายออกจากขวด ล้างรากให้สะอาด ชุบสารป้องกันเชื้อราแล้วปลูกในถุงพลาสติกดำขนาด 3x4 นิ้ว ใช้วัสดุปลูกคือทราย : ปุ๋ยหมัก = 1:1 คลุมด้วยถุงพลาสติกใสขนาดใหญ่เพื่อรักษาความชื้น จากนั้นนำไปเลี้ยงในเรือนเพาะชำ รดน้ำและปุ๋ยสูตร 46-0-0 ทุกสัปดาห์ เมื่อครบ 1 เดือน เปิดถุงพลาสติกออกเพื่อลดความชื้น บันทึกอัตราการรอดชีวิตหลังย้ายปลูก 1 เดือน และการเปลี่ยนแปลงความสูงเมื่ออายุ 1 และ 2 เดือน ตลอดจนลักษณะความผิดปกติต่างๆ

<u>การทดลองที่ 3 การศึกษาลักษณะในแปลง</u>

1.เตรียมแปลงปลูกขนาด 16x16 เมตร เก็บตัวอย่างดินและส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

2.นำต้นกล้วยไข่จากเรือนเพาะชำซึ่งมีอายุประมาณ 3 เดือน ปลูกในหลุมขนาด 30x30 เซนติเมตร รองก้นหลุมด้วยปุ๋ยคอก โดยใช้ระยะปลูก 2x2 เมตร

3.ใส่ปุ๋ยสูตร 21-0-0 ทุกๆเดือน พ่นสารป้องกันกำจัดแมลงและโรคตามความจำเป็น

4.บันทึกผล ได้แก่

- ความสูงของลำต้นเทียม
- จำนวนใบ
- จำนวนหน่อใหม่
- เส้นรอบวงโคนต้น
- ขนาดและจำนวนเซลล์ปากใบ
- มุมองศาระหว่างลำต้นเทียมกับใบ
- ข้อมูลอุตุนิยมวิทยา
- ความหนาของแผ่นใบ

<u>สถานที่ทำการทดลอง</u>

1. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยและเรือนเพาะชำ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ

2. แปลงทดลองภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม

<u>ระยะเวลาทำการทดลอง</u>

พฤศจิกายน 2538 ถึง มีนาคม 2540

ผลและวิจารณ์

<u>การทดลองที่ 1 ผลของสารก่อกลายพันธุ์ต่อกล้วยไข่ในสภาพปลอดเชื้อ</u>

1) <u>อัตราการรอดชีวิต</u>

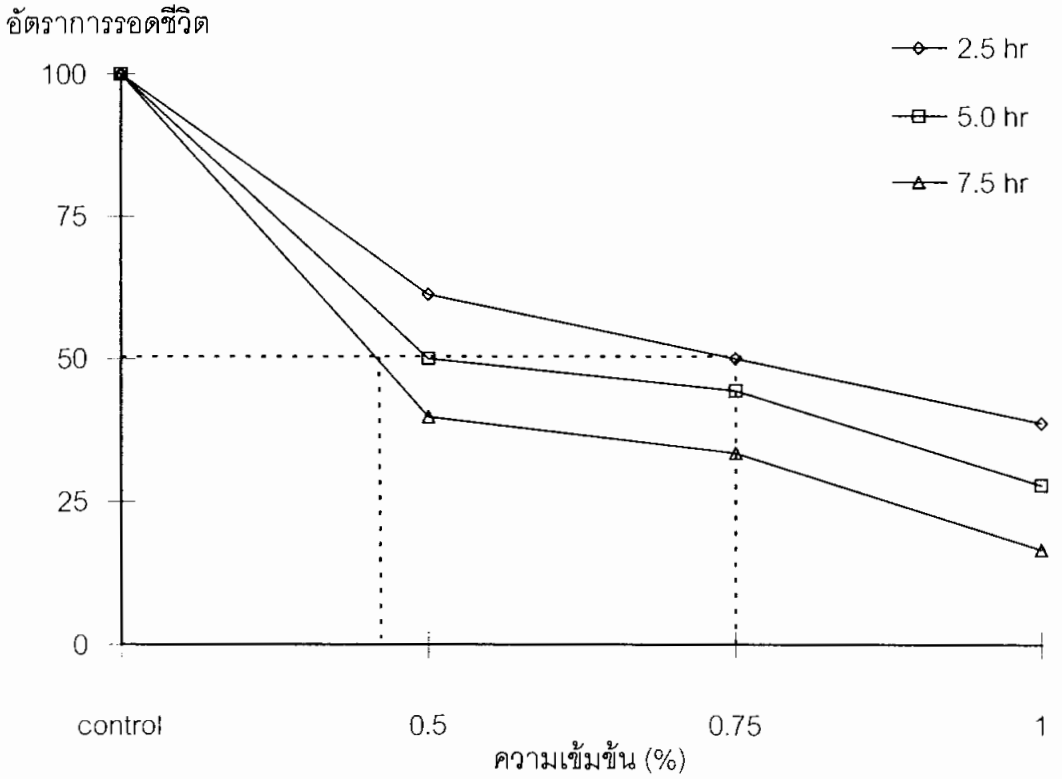
นำต้นอ่อนกล้วยไข่ในสภาพปลอดเชื้อหลังจากได้รับสารละลายก่อกลายพันธุ์ทั้งสองชนิด คือ colchicine 0.5, 0.75, 1.0 เปอร์เซ็นต์ และ oryzalin 15, 30, 45 μM ร่วมกับ DMSO 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 2.5, 5.0 และ 7.5 ชั่วโมง ตามลำดับ ย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 1 เดือน พบว่า ต้นอ่อนกล้วยไข่ที่ไม่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ (control) สามารถรอดชีวิตได้ทั้งหมด ซึ่งเทียบเป็นอัตราการรอดชีวิต (survival rate) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ต้นอ่อนกล้วยไข่ที่ได้รับสาร colchicine 0.5, 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย 50.33, 42.59 และ 27.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาที่ได้รับสารนาน 2.5, 5.0 และ 7.5 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย 50.00, 40.74 และ 29.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ต้นอ่อนกล้วยไข่ที่ได้รับสาร oryzalin 15, 30 และ 45 μM มีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย 51.85, 25.93 และ 22.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาที่ได้รับสารนาน 2.5, 5.0 และ 7.5 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย 44.45, 29.63 และ 25.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

จะเห็นได้ว่าเมื่อต้นอ่อนกล้วยไข่ได้รับสาร colchicine และ oryzalin ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นมีผลให้อัตราการรอดชีวิตลดลงตามลำดับ และเมื่อพิจารณาจากระยะเวลาที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ทั้งสองชนิด พบว่าเมื่อได้รับสารนานขึ้นทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลงเช่นเดียวกัน สอดคล้องกับการทดลองของเยาวพา (2536) ซึ่งรายงานว่าอัตราการรอดชีวิตของหม่อนในสภาพปลอดเชื้อจะลดลงเมื่อได้รับสาร colchicine ที่มีความเข้มข้นและระยะเวลาเพิ่มมากขึ้น ในทำนองเดียวกันกับการทดลองของปาริชาติ (2526) ซึ่งรายงานว่าระดับความเข้มข้นของ colchicine และระยะเวลาที่ใช้เพิ่มมากขึ้นมีผลทำให้อัตราการรอดชีวิตของกล้วยหอมทองในสภาพปลอดเชื้อลดลงตามลำดับ

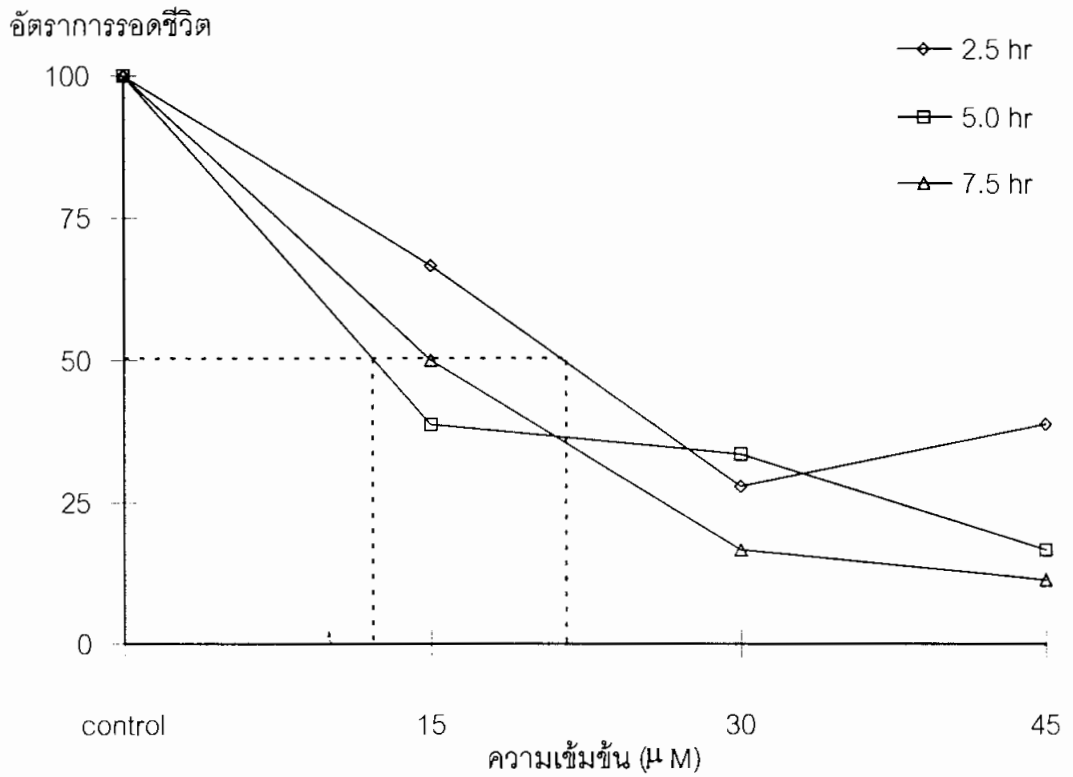
จากภาพที่ 1 และ 2 ซึ่งแสดงแผนภูมิเส้นของอัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนกล้วยไข่อายุ 1 เดือน พบว่า ความเข้มข้นที่ชักนำให้เกิดการตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ คือ ใช้สาร colchicine 0.4-0.75 เปอร์เซ็นต์ หรือ oryzalin 13-22 μM ตามลำดับ ปริมาณหรือความเข้มข้นของสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่

ตารางที่ 1 อัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนกล้วยไข่ (VM_1)ในสภาพปลอดเชื้อ ที่อายุ 1 เดือน หลังได้รับสารก่อกลายพันธุ์

สาร	ความเข้มข้น	ระยะเวลา (ช.ม.)			เฉลี่ย
		2.5	5.0	7.5	
control					100.00
colchicine	0.50 %	61.11	50.00	39.89	50.33
	0.75 %	50.00	44.44	33.33	42.59
	1.00 %	38.89	27.78	16.67	27.78
	เฉลี่ย	50.00	40.74	29.96	
oryzalin	15 μM	66.67	38.89	50.00	51.85
	30 μM	27.78	33.33	16.67	25.93
	45 μM	38.89	16.67	11.11	22.22
	เฉลี่ย	44.45	29.63	25.93	



<u>ภาพที่ 1</u> อัตราการรอดชีวิต ที่อายุ 1 เดือน หลังได้รับสาร colchicine



<u>ภาพที่ 2</u> อัตราการรอดชีวิต ที่อายุ 1 เดือน หลังได้รับสาร oryzalin

มีผลทำให้พืชในการทดลองมีการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) หรือมากกว่า เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ หากความเข้มข้นที่ใช้ต่ำกว่านี้แม้ว่าจะมีจำนวนพืชรอดชีวิตมากขึ้นก็ตามแต่พืชอาจเกิดการกลายพันธุ์ได้น้อยหรือไม่เปลี่ยนแปลงเลย เนื่องจากปริมาณของสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่พืชได้รับน้อยเกินไป (สิรินุช, 2536) เช่นการทดลองของสุภาพร (2536) รายงานว่าการใช้ colchicine กับกล้วยไข่ในสภาพปลอดเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 500-1500 ppm (0.05-0.15 เปอร์เซ็นต์) นาน 24-72 ชั่วโมง มีผลทำให้เกิดการตาย 20 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้

อัตราการรอดชีวิตของกล้วยที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์นอกจากจะเป็นผลจากระดับความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์และระยะเวลาที่ได้รับสารโดยตรงแล้วยังอาจเกิดจากผลของสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวพา (carrier agent) คือ DMSO 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Omar และคณะ (1989) พบว่า DMSO 4 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้อัตราการรอดชีวิตของพืชลดลงและทำให้ชิ้นส่วนพืชเปลี่ยนเป็นสีดำและหยุดการพัฒนาในที่สุด แต่อย่างไรก็ตามการใช้ DMSO มีผลช่วยทำให้พืชสามารถดูดซึมสารก่อกลายพันธุ์ EMS ได้มากขึ้นกว่าเดิม

2) <u>การเกิดหน่อใหม่</u>

ต้นอ่อนกล้วยไข่(VM_1)ในสภาพปลอดเชื้อหลังได้รับสารก่อกลายพันธุ์ที่ระดับต่างๆ แล้วเมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการแตกหน่อ VM_2 ที่ต่างกัน คือ จำนวนหน่อเฉลี่ยของกล้วยไข่ที่ไม่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ (control) เท่ากับ 2.1 หน่อ สิ่งทดลองที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์นาน 2.5 5.0 และ 7.5 ชั่วโมง โดยใช้ colchicine 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีการแตกหน่อ 0.8 0.9 1.0 หน่อ ใช้ colchicine 0.75 เปอร์เซ็นต์ มีการแตกหน่อ 1.1 0.9 1.1 หน่อ และ ใช้ colchicine 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีการแตกหน่อ 1.2 1.0 0.8 หน่อ ตามลำดับ กล้วยไข่ที่ได้รับ oryzalin 15 μM มีการแตกหน่อ 0.8 0.7 0.7 หน่อ ใช้ oryzalin 30 μM มีการแตกหน่อ 0.5 0.4 0.4 หน่อ และใช้ oryzalin 45 μM มีการแตกหน่อ 0.5 0.5 0.2 หน่อ ตามลำดับ ต้นควบคุมมีการเกิดหน่อแตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ (ตารางที่ 2)

จะเห็นได้ว่ากล้วยไข่ที่ได้รับสาร colchicine และ oryzalin มีอัตราการเกิดหน่อใหม่ต่ำกว่าต้นที่ไม่ได้รับสาร (control) และอัตราการเกิดหน่อใหม่มีแนวโน้มลดลงตามความเข้มข้นของสารที่

เพิ่มขึ้นและระยะเวลาที่ได้รับสารนานขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าสาร oryzalin มีผลทำให้กล้วยไข่มีการเกิดหน่อใหม่ต่ำกว่าการใช้ colchicine

การพัฒนาของกล้วยไข่ภายหลังย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ต้นควบคุม (control) มีการเจริญเติบโตได้ดีสามารถเกิดหน่อใหม่ได้เร็วกว่าต้นที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ทั้งสองชนิด ต้นควบคุมจะเกิดหน่อใหม่สีเขียวสดซึ่งเจริญขึ้นมาจากตาข้างบริเวณซอกใบ ลักษณะใบเรียวยาว ส่วนกล้วยไข่ที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ทั้ง colchicine และ oryzalin บริเวณด้านนอกของชิ้นส่วนที่สัมผัสสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือดำ การเกิดหน่อและการพัฒนาของหน่อใหม่ช้ากว่าต้นควบคุม บางชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมีการขยายขนาดเพิ่มมากขึ้นแต่ไม่มีการเจริญเป็นหน่อใหม่ หรืออาจมีการเจริญขึ้นเป็นหน่อใหม่แต่ไม่มีการพัฒนาเป็นยอดต่อไป หน่อใหม่ที่เกิดขึ้นมาบางหน่อมีลักษณะใบขนาดเล็ก หนาและค่อนข้างกลม (ภาพที่ 3 และ 4)

จากนั้นแยกหน่อ VM_2 ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ หลังจากนั้นมีการเกิดหน่อใหม่จาก VM_2 คือ VM_3 พบว่าจำนวนหน่อ VM_3 ที่เกิดขึ้นของกล้วยไข่ที่ไม่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ (control) เฉลี่ย 1.4 หน่อ สิ่งทดลองที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์นาน 2.5 5.0 และ 7.5 ชั่วโมง โดยใช้ colchicine 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีการแตกหน่อ 1.4 1.1 1.3 หน่อ ใช้ colchicine 0.75 เปอร์เซ็นต์ มีการแตกหน่อ 0.9 0.9 1.1 หน่อ และ ใช้ colchicine 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีการแตกหน่อ 1.3 0.4 1.4 หน่อ ตามลำดับ กล้วยไข่ที่ได้รับ oryzalin 15 μM มีการแตกหน่อ 1.6 0.7 0.9 หน่อ ใช้ oryzalin 30 μM มีการแตกหน่อ 1.0 1.3 1.0 หน่อ และใช้ oryzalin 45 μM มีการแตกหน่อ 1.4 1.1 0.0 หน่อ ตามลำดับ ในการเกิดหน่อ VM_3 นี้ ต้นควบคุมและต้นที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ colchicine และ oryzalin มีจำนวนระหว่าง 0-1.6 หน่อ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ต้นควบคุมมีแนวโน้มเกิดหน่อได้มากกว่าต้นที่ได้รับสาร colcincine และ oryzalin (ตารางที่ 2)

ต้นกล้วยไข่ควบคุมในชั่ว VM_2 มีการเกิดหน่อ VM_3 ได้ภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์ ส่วนต้นที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ทั้งสองชนิดจะเกิดหน่อใหม่ช้ากว่าและต้นที่ได้รับสารความเข้มข้นสูงหรือระยะเวลานานบางต้น เช่น ต้นที่ได้รับ oryzalin 45 μM นาน 7.5 ชั่วโมง จะหยุดการพัฒนาชิ้นส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำและตายในที่สุด อาจเนื่องจากความเข้มข้นของสาร oryzalin และระยะเวลาที่ได้รับสารนั้นนานเกินไป

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยการเกิดหน่อใหม่ของกล้วยไข่จากชั่ว VM_1-VM_3

สาร	ความเข้มข้น	เวลา (ช.ม.)	VM_1 1/	VM_2	VM_3
control			2.1^{e}	1.4	1.9
colchicine	0.5 %	2.5	0.8^{a-d}	1.4	1.3
		5.0	0.9^{bcd}	1.1	1.1
		7.5	1.0^{bcd}	1.3	1.3
	0.75 %	2.5	1.1^{cd}	0.9	1.0
		5.0	0.9^{bcd}	0.9	1.3
		7.5	1.1^{cd}	1.1	1.6
	1.0 %	2.5	1.2^{d}	1.3	1.3
		5.0	1.0^{bcd}	0.4	1.0
		7.5	0.8^{a-d}	1.4	1.0
oryzalin	15 μM	2.5	0.8^{a-d}	1.6	1.1
		5.0	0.7^{a-d}	0.7	0.9
		7.5	0.7^{a-d}	0.9	1.1
	30 μM	2.5	0.5^{abc}	1.0	1.1
		5.0	0.4^{ab}	1.3	1.1
		7.5	0.4^{ab}	1.0	1.0
	45 μM	2.5	0.5^{abc}	1.4	1.1
		5.0	0.5^{abc}	1.1	0.7
		7.5	0.2^{a}	0.0	-
F-test			**	ns	ns
CV (%)			74.9	91.4	64.8

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** = แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

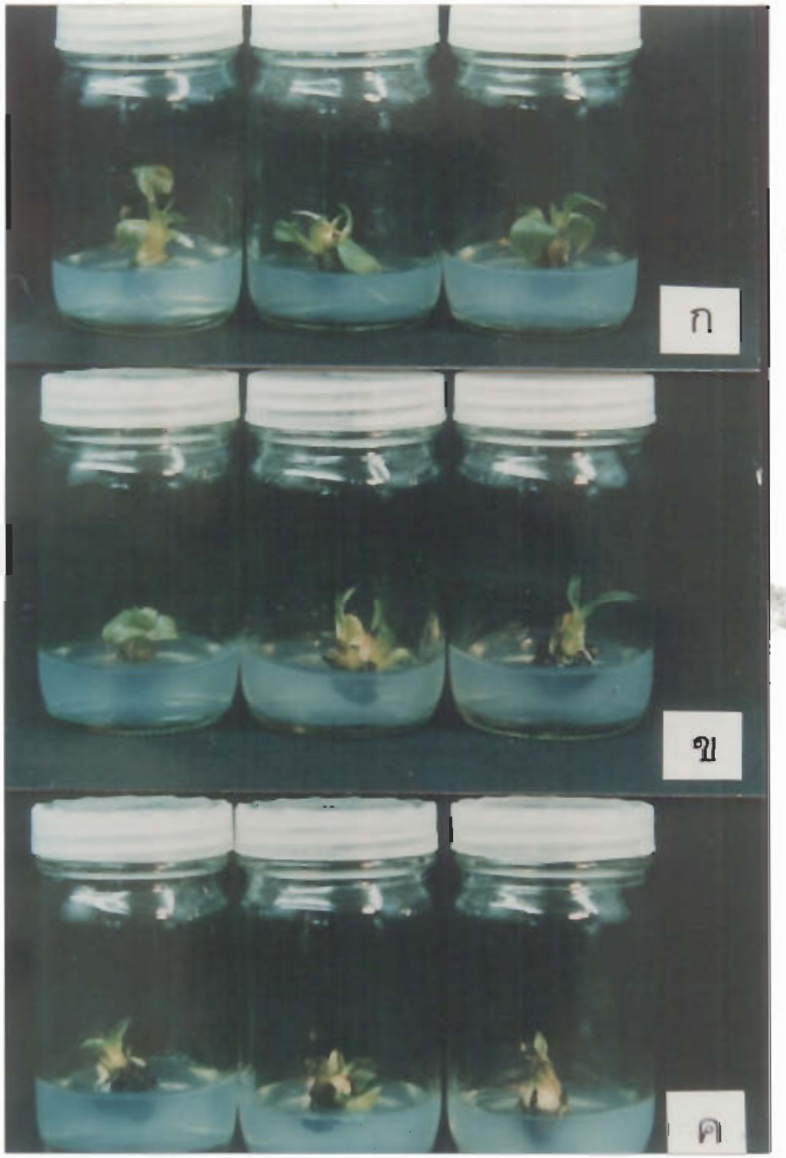
1/ = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ภาพที่ 3 การเกิดหน่อใหม่หลังได้รับสาร colchicine นาน 2.5 5.0 7.5 เมื่ออายุ 1 เดือน

(ก) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

(ข) ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

(ค) ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4 การเกิดหน่อใหม่หลังได้รับสาร oryzalin นาน 2.5 5.0 7.5 ชั่วโมง เมื่ออายุ 1 เดือน

(ก) ความเข้มข้น 15 μM

(ข) ความเข้มข้น 30 μM

(ค) ความเข้มข้น 45 μM

จากนั้นนำต้น VM_3 ที่รอดชีวิตมาตัดแยกและย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่เป็นเวลาหนึ่งเดือน พบว่าจำนวนหน่อที่เกิดใหม่หรือ VM_4 ของกล้วยไข่ที่ไม่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ (control) เฉลี่ย 1.9 หน่อ สิ่งทดลองที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์นาน 2.5 5.0 และ 7.5 ชั่วโมง โดยใช้ colchicine 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีการแตกหน่อ 1.3 1.1 1.3 หน่อ ใช้ colchicine 0.75 เปอร์เซ็นต์ มีการแตกหน่อ 1.0 1.3 1.6 หน่อ และ ใช้ colchicine 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีการแตกหน่อ 1.3 1.0 1.0 หน่อ ตามลำดับ กล้วยไข่ที่ได้รับ oryzalin 15 μM มีการแตกหน่อ 1.1 0.9 1.1 หน่อ ใช้ oryzalin 30 μM มีการแตกหน่อ 1.1 1.1 1.0 หน่อ และใช้ oryzalin 45 μM ที่ระยะเวลา 2.5 5.0 ชั่วโมง มีการแตกหน่อ 1.1 0.7 หน่อ ตามลำดับ ส่วนต้นที่ได้รับสาร oryzalin นาน 7.5 ชั่วโมง นั้นต้นตายทั้งหมดในชั่ว VM_2 ในการเกิดหน่อVM_4 นี้ต้นควบคุมและต้นที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ colchicine และ oryzalin มีจำนวนระหว่าง 0.7-1.9 หน่อ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ต้นควบคุมมีแนวโน้มเกิดหน่อได้มากที่สุด (ตารางที่ 2)

โดยส่วนใหญ่แล้วต้นกล้วยไข่ที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์เมื่อถึงชั่ว VM_2-VM_3 จะมีการเจริญเติบโตและจำนวนหน่อเฉลี่ยแตกต่างกันน้อยลงและใกล้เคียงกับต้นควบคุม ลักษณะของต้นควบคุมคือใบบางเรียวยาว สีเขียวอ่อน สังเกตเห็นส่วนของก้านใบชัดเจน การเรียงตัวของใบค่อนข้างห่าง มุมใบแคบ (ภาพที่ 5) ในขณะที่ต้นที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์บางต้นแสดงลักษณะผิดปกติ เช่น ต้นเตี้ย, ใบป้อมอวบและหนา, มีสีเขียวเข้ม, มุมใบกว้าง, ใบด่าง หรือมีการเจริญของรากเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 6) ซึ่งต่างไปจากต้นควบคุมและพบได้ในรุ่น VM_2 ลักษณะผิดปกติเหล่านี้เมื่อทำการตัดแยกและเปลี่ยนอาหารแล้วมีการแสดงออกกลับไปเหมือนต้นปกติได้ รวมถึงขนาดของเซลล์ปากใบ (stomta) พบว่าต้น VM_2 ที่มีขนาดความยาวของเซลล์ปากใบเพิ่มขึ้น เมื่อทำการตัดแยกและเปลี่ยนอาหารจนถึง VM_3 แล้วขนาดเซลล์ปากใบกลับไปเท่าเดิมได้อีก ในขณะที่บางต้นยังคงมีลักษณะผิดปกตินั้นอยู่ แสดงว่าเกิดลักษณะ chimera ขึ้นในชิ้นส่วนของพืช เมื่อได้ย้ายและเปลี่ยนอาหารแล้วหน่อใหม่ที่เกิดขึ้นมาบางหน่อจึงมีลักษณะกลับไปเหมือนต้นปกติตามเดิม

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นเหตุการณ์ที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์เพียงบางเซลล์เท่านั้น ในขณะที่การเกิดอวัยวะ (organogenesis) เกิดจากการพัฒนาของกลุ่มเซลล์ ซึ่งถ้ากลุ่มเซลล์นั้นๆ เจริญมาจากเซลล์ส่วนที่กลายพันธุ์ (mutant sector) จะทำให้เป็นการกลายพันธุ์ทั้งส่วนของอวัยวะ (solid mutant หรือ homohistont) ในขณะเดียวกันถ้าอวัยวะนั้นๆเจริญมาจากกลุ่มเซลล์ที่ประกอบ

ภาพที่ 5 ลักษณะต้นอ่อนกล้วยไข่ที่ไม่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

<u>ภาพที่ 6</u> ลักษณะผิดปกติของต้นอ่อนกล้วยไข่ที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

ด้วยเซลล์ปกติและเซลล์กลายพันธุ์จะทำให้ปรากฏลักษณะ chimera การตัดแยกและเปลี่ยนอาหารเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยลดลักษณะ chimera และคัดเลือก solid mutant ได้ง่ายขึ้น (สิรนุช, 2536)

3) <u>ความยาวของเซลล์ปากใบ</u>

หลังจากนำหน่อกล้วยไข่ที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์(VM_1)ย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 1 เดือน จึงตัดแยกและย้ายเลี้ยง VM_2 บนอาหารใหม่ กำหนดรหัสต้นในแต่ละสิ่งทดลอง เช่น A1-1, A1-2, A1-3,... แล้วนำใบจากต้น VM_2 ทุกต้นในสภาพปลอดเชื้อมาวัดขนาดความยาวของเซลล์ปากใบ พบว่ากล้วยไข่ต้นควบคุมมีความยาวของเซลล์ปากใบโดยเฉลี่ย 19 ไมโครเมตร (ภาพที่ 7) ส่วนต้นที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ทั้งสองชนิดจะมีขนาดความยาวของเซลล์ปากใบผันแปรตั้งแต่ 17 ถึง 36 ไมโครเมตร

คัดเลือกต้นที่มีขนาดความยาวของเซลล์ปากใบประมาณ 1.5 เท่าของต้นปกติ คือขนาดตั้งแต่ 28 ไมโครเมตร ซึ่งได้จาก สิ่งทดลอง A1 จำนวน 5 ต้น, A2 จำนวน 4 ต้น, A3 จำนวน 1 ต้น, B1 จำนวน 1 ต้น, B2 จำนวน 2 ต้น, B3 จำนวน 1 ต้น, C1 จำนวน 5 ต้น, C2 จำนวน 2 ต้น, C3 จำนวน 2 ต้น, X1 จำนวน 1 ต้น, X2 จำนวน 1 ต้น, X3 จำนวน 5 ต้น, Y1 จำนวน 1 ต้น, Y2 จำนวน 3 ต้น, Z1 จำนวน 6 ต้น และ Z2 จำนวน 2 ต้น (ตารางที่ 3) แล้วนำมาตัดแยกเพิ่มปริมาณต้นต่อไป จากนั้นทำการคัดเลือกอีกครั้งหนึ่งในชั่ว VM_3 พบว่าในบางต้นมีขนาดความยาวของเซลล์ปากใบเท่ากับต้นปกติ

จากการทดลองจะเห็นได้ว่ากล้วยไข่ที่ไม่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์มีขนาดเซลล์ปากใบใกล้เคียงกับที่สุภาพร (2536) ได้รายงานว่ากล้วยไข่ปกติเซลล์ปากใบมีความยาวประมาณ 18-19 ไมโครเมตร ส่วนต้นที่ได้คัดเลือกไว้มีความยาวประมาณ 28 ไมโครเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับกล้วยเทพรสที่มีขนาดความยาวเท่ากับ 29 ไมโครเมตร และมีจำนวนชุดโาครโมโซมเป็น 4X ลักษณะเซลล์ปากใบของกล้วยที่มีจำนวนโครโมโซมหลายๆชุดจะมีขนาดใหญ่และยาวกว่ากล้วยที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ จึงอาจใช้ความยาวเซลล์ปากใบเป็นเกณฑ์เบื้องต้นในการศึกษาและคัดเลือกสำหรับต้นที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น (เบญจมาศ, 2538)

<u>ภาพที่ 7</u> **เซลล์ปา**กใบจากหน่อที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (400 X)

(ก) ต้นปกติ

(ข) ต้นกลายพันธุ์

ตารางที่ 3 จำนวนต้นที่คัดเลือกไว้ซึ่งมีความยาวของเซลล์ปากใบมากกว่า 28 ไมโครเมตร

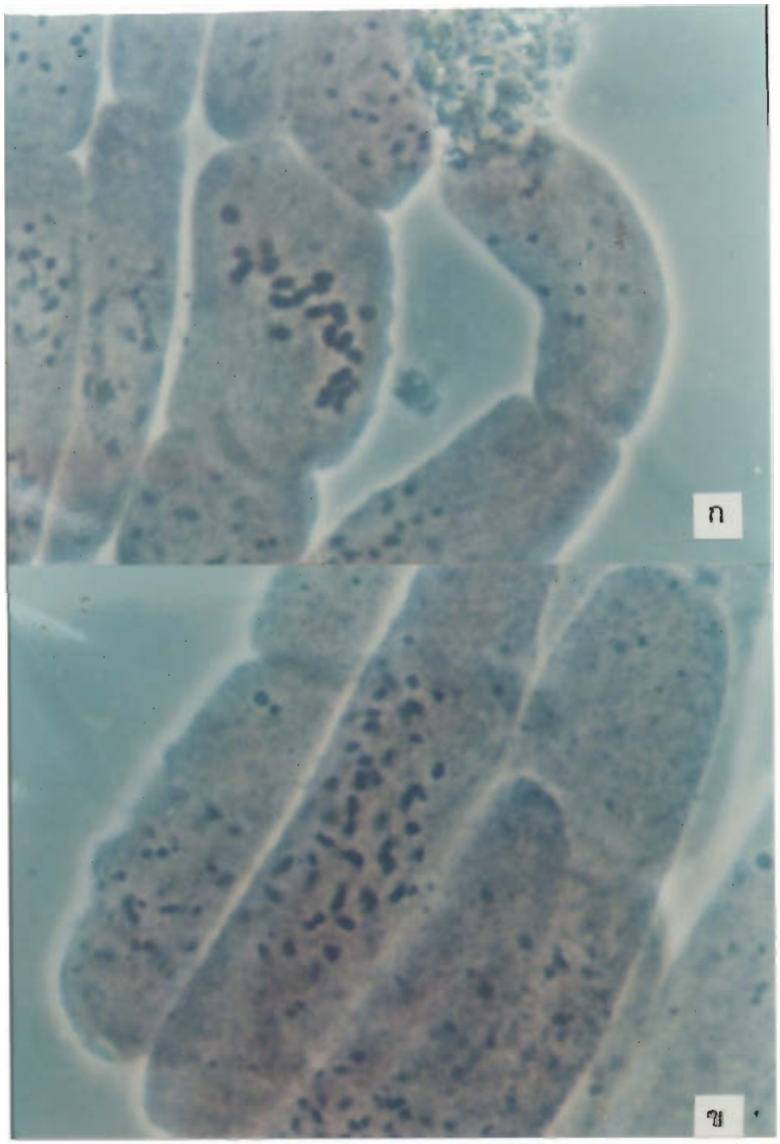
สิ่งทดลอง	ความเข้มข้น	ระยะเวลา(ชั่วโมง)	จำนวนต้นทั้งหมด	จำนวนต้นที่คัดเลือกได้
control			25	
colchicine	0.5 %	2.5	22	5
		5.0	14	4
		7.5	13	1
	0.75 %	2.5	13	1
		5.0	21	2
		7.5	15	1
	1.0 %	2.5	30	5
		5.0	8	2
		7.5	9	2
oryzalin	15 μM	2.5	18	1
		5.0	5	1
		7.5	17	5
	30 μM	2.5	7	1
		5.0	16	3
		7.5	7	0
	45 μM	2.5	27	6
		5.0	14	2
		7.5	-	-

4) <u>การเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม</u>

หลังจากคัดเลือกต้น VM_3 ที่มีขนาดความยาวของเซลล์ปากใบเพิ่มขึ้นแล้ว นำต้นที่ได้จากการคัดเลือกและต้นควบคุม (control) มาตัดแบ่งและเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณต้น จากนั้นย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมNAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 3 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดราก ตัดปลายรากต้น VM_4 มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม พบว่า ต้นกล้วยไข่ปกติ มีจำนวนโครโมโซม 2n=22 กล้วยไข่ที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์นั้นมีจำนวนโครโมโซมทั้ง 2n=22 และ 2n=44 คัดเลือกต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2n=44 สามารถคัดได้ 3 หมายเลข ได้แก่ C3-5 และ C3-6 ซึ่งได้จากการใช้สาร colchicine 1.0 เปอร์เซ็นต์ นาน 7.5 ชั่วโมง ต้นที่ได้มีลักษณะคล้ายกัน และ Z1-6 ซึ่งได้จากการใช้ oryzalin 45 μM นาน 2.5 ชั่วโมง ต้นมีลักษณะแตกต่างจาก C3-5 และ C3-6 (ภาพที่ 8)

แสดงให้เห็นว่าทั้ง colchicine และ oryzalin มีผลต่อการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในทำนองเดียวกัน แต่จะมีผลต่อ genotype แตกต่างกัน ซึ่ง Hassawi และ Liang (1991) ได้รายงานการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของ haploid callus ของ anther ข้าวสาลีโดยใช้ colchicine, oryzalin และ trifluralin พบว่าสารทั้งสามชนิดสามารถชักนำให้เกิด doubled haploid ได้ในอัตราที่ต่างกัน และ colchicine ยังคงเป็นสารที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม นอกจากนี้ Ramulu และคณะ (1991) ได้รายงานว่า oryzalin และ APM ที่ความเข้มข้น 15-32 μM สามารถหยุดกระบวนการไมโตซิส ในเซลล์แขวนลอยของมันฝรั่งและทำให้โครโมโซมเพิ่มขึ้นได้

colchicine และ oryzalin จัดเป็นสารก่อกลายพันธุ์ประเภท antimitotic agent ซึ่งจะมีผลขัดขวางการแบ่งเซลล์ในกระบวนการไมโตซีส โดยการเข้าทำปฏิกิริยารวมตัวกับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ microtubule ทำให้ไม่สามารถต่อกันเป็น spindle fiber ที่จะเข้าจับกับโครโมโซมจึงทำให้โครโมโซมไม่เคลื่อนเข้าสู่ขั้วเซลล์ในระยะอะนาเฟส (anaphase) จำนวนโครโมโซมภายในเซลล์จึงมีเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า (Elliott, 1958) แต่การใช้ oryzalin นั้นจะใช้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า colchicine มาก (Morejohn และคณะ, 1987)



<u>ภาพที่ 8</u> โครโมโซมจากปลายรากของต้นกล้วยไข่ (1850 X)

(ก) ต้นปกติ 2n=22

(ข) ต้นพันธุ์กลาย 2n=44

5) <u>การเจริญเติบโตของต้นพันธุ์กลาย</u>

นำต้นที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น tetraploid มาตัดแบ่งเพื่อเพิ่มปริมาณและศึกษาการเจริญเติบโตบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ในสัปดาห์ที่ 1 ต้นควบคุม, Z1-6, C3-6 และ C3-5 มีการเกิดหน่อใหม่เป็น 1.0 0.8 0.9 และ 0.8 หน่อ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 4) ในสัปดาห์ที่ 2-5 ต้นควบคุมมีการเกิดหน่อใหม่ 2.1 3.0 4.1 และ 4.9 หน่อ แตกต่างจากพันธุ์กลาย Z1-6 ซึ่งมีการเกิดหน่อใหม่เป็น 1.3 2.2 2.5 และ 3.3 หน่อ C3-6 มีการเกิดหน่อใหม่เป็น 1.1 1.5 2.2 และ 2.5 หน่อ C3-5 มีการเกิดหน่อใหม่เป็น 1.1 1.5 2.1 และ 2.2 หน่อ ตามลำดับ (ภาพที่ 9 และ 10)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่ากล้วยไข่ต้นควบคุมมีการเกิดหน่อใหม่ได้ดีและมากกว่าพันธุ์กลาย เนื่องจากจำนวนชุดโครโมโซมหรือ ชนิดของ genome ที่แตกต่างกันมีผลต่อลักษณะการเจริญเติบโต ส่วนใหญ่แล้วกล้วยที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นมากกว่า 2 ชุด (diploid) มีแนวโน้มที่จะเกิดหน่อใหม่ได้ช้ากว่าและน้อยกว่ากล้วย diploid กล้วยที่มี genome A มีการเกิดหน่อได้ดีกว่ากล้วยที่มี genome B ประกอบอยู่ด้วย (สุภาพร, 2534)

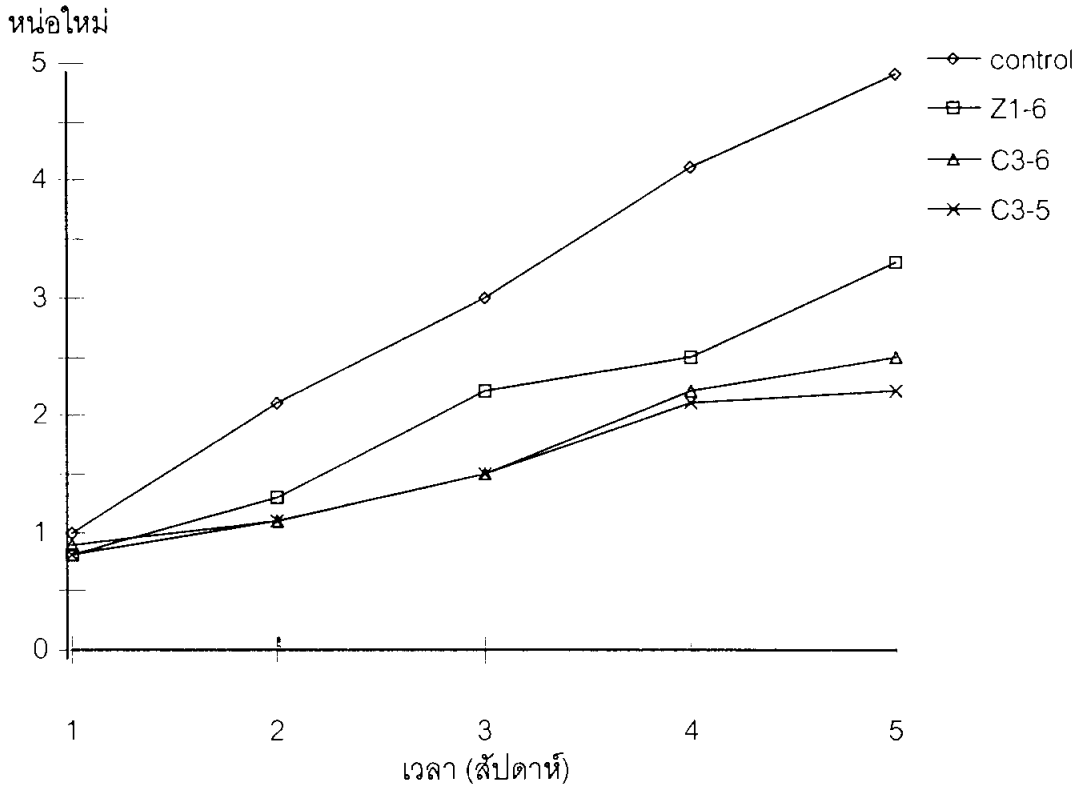
ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยการเกิดหน่อใหม่ของพันธุ์กลายในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

	จำนวนหน่อที่เกิดใหม่				
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2[1/]	สัปดาห์ที่ 3[1/]	สัปดาห์ที่ 4[1/]	สัปดาห์ที่ 5[1/]
control	1.0	2.1[b]	3.0[b]	4.1[b]	4.9[c]
Z1-6	0.8	1.3[a]	2.2[a]	2.5[a]	3.3[b]
C3-6	0.9	1.1[a]	1.5[a]	2.2[a]	2.5[ab]
C3-5	0.8	1.1[a]	1.5[a]	2.1[a]	2.2[a]
F-test	ns	**	**	**	**
CV(%)	70.7	54.8	43.6	44.0	37.7

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** = แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

1/ = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



<u>ภาพที่ 9</u> การเกิดหน่อใหม่ของพันธุ์กลายและต้นควบคุม

ภาพที่ 10 ลักษณะกล้วยไข่ต้นควบคุมและพันธุ์กล้วย

<u>การทดลองที่ 2 การชักนำต้นพันธุ์กลายให้เกิดรากและย้ายปลูกในเรือนเพาะชำ</u>

<u>การชักนำให้เกิดราก</u>

นำต้นอ่อนกล้วยไข่ที่คัดเลือกไว้แล้วจากการทดลองที่ 1 มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดราก จากนั้นศึกษาการเกิดรากด้วยการให้คะแนนความสมบูรณ์ของราก โดยให้คะแนน 1 เมื่อเกิดราก 0-1 ราก และให้คะแนนเพิ่มขึ้นตามระดับความสมบูรณ์ของรากจนถึง 5 ซึ่งจะมีรากมากกว่า 6 ราก และมีการแตกแขนงมากที่สุด พบว่ากล้วยไข่พันธุ์กลายหมายเลข Z1-6 มีคะแนนเฉลี่ยความสมบูรณ์ของราก 4.6 (ตารางที่ 5) ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับต้นควบคุมและพันธุ์กลายหมายเลข C3-5 และ C3-6 ซึ่งมีคะแนนเฉลี่ย 3.8, 3.8 และ 3.7 ตามลำดับ รากของพันธุ์กลาย Z1-6 (ภาพที่ 11) มีขนาดใหญ่และยาว รากมีจำนวนมากและแผ่ขยายไปทั่วในวุ้นอาหาร และระบบรากแข็งแรงดี ส่วน C3-6 และ C3-5 มีจำนวนรากที่เกิดขึ้นน้อยกว่า รากสั้น และมีการแตกแขนงน้อย ต้นควบคุมมีการเกิดรากใกล้เคียงกับ C3-6 และ C3-5 แต่มีรากแขนงขนาดเล็กค่อนข้างมาก สูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นสูตรอาหารที่สามารถชักนำการเกิดรากของกล้วยหลายๆพันธุ์ได้อย่างดี (เบญจมาศ, 2538) รวมทั้งการเกิดรากของกล้วยไข่ที่ฉายรังสีแกมมาด้วย (ภาสันต์, 2536) ความสามารถในการเกิดรากที่แตกต่างกันในการศึกษาครั้งนี้คาดว่าอาจเป็นผลจากชนิดของสารก่อกลายพันธุ์ที่ใช้ต่างชนิดกัน

<u>การเจริญเติบโตหลังจากย้ายปลูกในเรือนเพาะชำ</u>

เมื่อนำต้นอ่อนกล้วยไข่ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วล้างวุ้นที่รากให้สะอาด จากนั้นปลูกในวัสดุปลูกที่อบฆ่าเชื้อ คลุมด้วยถุงพลาสติกใสเพื่อรักษาความชื้น นำไปไว้ในเรือนเพาะชำที่มีการพรางแสงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าต้นอ่อนกล้วยไข่มีการรอดชีวิตเฉลี่ย 98 เปอร์เซ็นต์ การใช้วัสดุที่อบฆ่าเชื้อและรักษาความชื้นให้สูงช่วยให้พืชเป็นโรคน้อยลงและสามารถปรับตัวได้ดี สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการชำต้นอ่อนกล้วยจะช่วยให้มีอัตราการรอดตายถึง 90-100 เปอร์เซ็นต์ (เบญจมาศ, 2538) จากนั้นนำออกจากถุงพลาสติกเพื่อลดความชื้น พบว่าในบางต้นมีการเข้าทำลายของโรคทำให้ใบเหี่ยวและตายทั้งนี้อาจเนื่องจากเป็นช่วงฤดูฝนมีความชื้นในอากาศสูงเหมาะกับการเข้าทำลายของโรคพืช และพบว่ากล้วยไข่พันธุ์กลาย 3-4 ต้น มีลักษณะใบด่างเป็นริ้วสีขาวซีดตามเส้นใบ แต่เมื่อเกิดใบใหม่ไม่พบลักษณะดังกล่าว (ภาพที่ 12) แสดงว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบ chimera เมื่อวัดความสูง

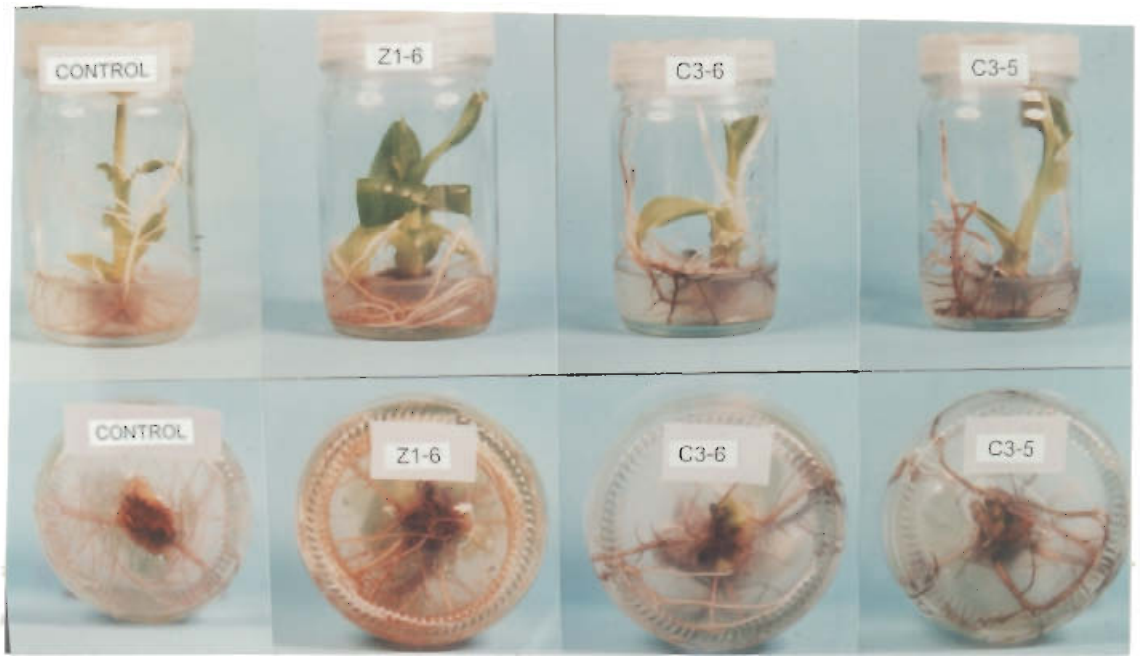
ต้นที่อายุ 1 เดือน พบว่าต้นควบคุม , C3-6 และ C3-5 มีความสูงใกล้เคียงกันเฉลี่ย 6.12 , 6.47 และ 6.98 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่แตกต่างทางสถิติกับ Z1-6 ที่มีความสูง 3.63 เซนติเมตร (ตารางที่ 6) จากนั้นเมื่ออายุครบ 2 เดือน พบว่ากล้วยไข่ต้นควบคุม, C3-6 และ C3-5 มีความสูงเพิ่มขึ้นเป็น 8.11, 8.10 และ 7.53 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติจาก Z1-6 ที่มีความสูงเพียง 4.13 เซนติเมตร (ภาพที่ 13)

ตารางที่ 5 คะแนนความสมบูรณ์ของรากกล้วยไข่พันธุ์กลายที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS

	คะแนนเฉลี่ยความสมบูรณ์ของราก[1/]
control	3.8[a]
Z1-6	4.6[b]
C3-6	3.8[a]
C3-5	3.7[a]
F-test	**
CV (%)	25.6

** = แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

1/ = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 11 การเกิดรากของต้นอ่อนกล้วยไข่บนอาหารสูตร MS

ภาพที่ 12 ลักษณะใบด่างหลังย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำ

ภาพที่ 13 ต้นอ่อนกล้วยไข่อายุ 2 เดือน หลังย้ายออกปลูก

ตารางที่ 6 ความสูงของต้นกล้วยไข่หลังจากนำออกปลูก 1 และ 2 เดือน

	ความสูง (เซนติเมตร)	
	เดือนที่ 1 1/	เดือนที่ 2 1/
control	6.12[b]	8.11[b]
Z1-6	3.63[a]	4.13[a]
C3-6	6.47[bc]	8.10[b]
C3-5	6.98[c]	7.53[b]
F-test	**	**
CV (%)	19.4	19.9

** = แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

1/ = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

<u>การทดลองที่ 3 การศึกษาลักษณะในแปลงปลูก</u>

หลังจากนำต้นกล้วยไข่อายุ 3 เดือน ลงปลูกในแปลงทดลองของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม พบว่ากล้วยไข่ต้นควบคุม Z1-6 C3-6 และ C3-5 ที่อายุ 1 เดือน หลังจากปลูกมีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย 100.0 43.8 87.5 และ 87.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าต้นควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตในแปลงปลูกมากที่สุดรองลงมาได้แก่ C3-6 C3-5 และ Z1-6 ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของสุภาพร (2536) ที่ใช้สาร colchicine ที่ความเข้มข้น 0-1500 ppm กับกล้วยไข่ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าต้นกล้วยไข่ที่ได้รับสาร colchicine 1500 ppm เมื่อนำไปปลูกในแปลงทดลองแล้วมีอัตราการรอดตาย 70 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ต้นปกติมีอัตราการรอดตาย 90 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นเพราะกล้วยไข่ที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์มีการเจริญเติบโตในช่วงแรกที่ช้ากว่าต้นควบคุม ต้นจึงอ่อนแอทำให้มีการเข้าทำลายของโรคและแมลงได้ง่าย (สุภาพร, 2536) โดยเฉพาะ Z1-6 ต้นมีขนาดค่อนข้างเล็กและเจริญเติบโตได้ช้ามาก ทำให้มีต้นตายเนื่องจากโรคเข้าทำลายได้ง่าย ส่วนต้นควบคุมนั้นสามารถตั้งตัวได้ดีกว่าถึงแม้ว่าบางต้นก็มีการเข้าทำลายของโรคได้บ้างเล็กน้อยแต่ไม่ทำให้ต้นตาย และพบอาการใบเหี่ยวบ้างเล็กน้อยในช่วงเวลาบ่ายเนื่องจากแสงแดดจัดและอากาศร้อนทำให้ใบมีการคายน้ำมากขึ้น

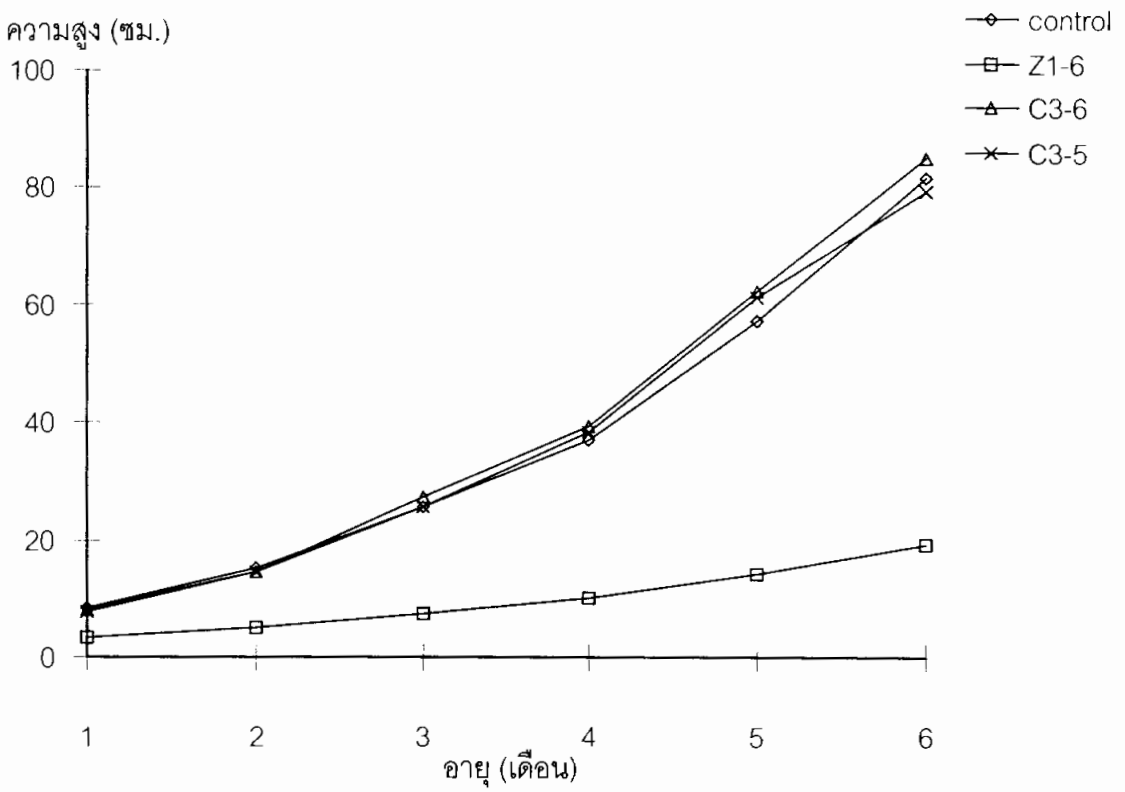
จากการบันทึกความสูงของต้นกล้วยไข่ทุกๆ 1 เดือน ตั้งแต่อายุ 1-6 เดือนหลังปลูก พบว่าต้นควบคุมมีความสูง 8.43 15.23 25.58 36.88 57.20 และ 81.90 เซนติเมตร ตามลำดับ ต้น Z1-6 มีความสูง 3.40 4.95 7.57 10.05 14.30 และ 19.20 เซนติเมตร ตามลำดับ ต้น C3-6 มีความสูง 8.15 14.55 27.35 39.45 62.33 และ 85.05 เซนติเมตร ตามลำดับ ต้น C3-5 มีความสูง 7.78 14.48 25.58 38.50 61.13 และ 79.53 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 7) จะเห็นได้ว่าในแต่ละช่วงอายุหลังจากปลูก ต้นควบคุม C3-6 และ C3-5 มีขนาดความสูงใกล้เคียงกัน แต่สูงกว่า Z1-6 อย่างชัดเจนและมีความแตกต่างทางสถิติ (ภาพที่ 14) สาเหตุที่ทำให้ต้น Z1-6 มีความสูงน้อยที่สุดอาจมีสาเหตุมาจากลักษณะของลำต้นที่มีช่วงระยะห่างระหว่างใบบนกับใบล่างน้อยมาก กาบหุ้มลำต้นและก้านใบสั้นจึงทำให้มีความสูงน้อยที่สุด (ภาพที่ 15) ต้นควบคุมมีความสูงใกล้เคียงกับต้น C3-6 และ C3-5 ซึ่งได้จากการใช้สาร colchicine คล้ายคลึงกับต้นกล้วยตานีที่เป็น tetraploid และ diploid ซึ่งมีความสูงไม่แตกต่างกัน (Vakili, 1967)

ตารางที่ 7 ความสูงของต้นกล้วยไข่หลังจากปลูกในแปลง ที่อายุ 1-6 เดือน

	ความสูง[1/] (เซนติเมตร)					
	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4	เดือนที่ 5	เดือนที่ 6
control	8.43[b]	15.23[b]	25.58[b]	36.88[b]	57.20[b]	81.90[b]
Z1-6	3.40[a]	4.95[a]	7.57[a]	10.05[a]	14.30[a]	19.20[a]
C3-6	8.15[b]	14.55[b]	27.35[b]	39.45[b]	62.33[b]	85.05[b]
C3-5	7.78[b]	14.48[b]	25.58[b]	38.50[b]	61.13[b]	79.53[b]
F-test	**	**	**	**	**	**
CV (%)	14.3	16.3	15.9	14.1	14.7	13.8

** = แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

1/ = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



<u>ภาพที่ 14</u> ความสูงต้นกล้วยไข่ ที่อายุ 1-6 เดือน

ความยาวเส้นรอบวงโคนต้นที่ความสูง 10 เซนติเมตร จากพื้นดินของต้นควบคุม Z1-6 C3-6 และ C3-5 เฉลี่ย 23.95 15.33 24.45 และ 23.88 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 8) ต้นควบคุม C3-6 และ C3-5 มีการเจริญเติบโตได้ดี ลำต้นสูง จึงมีขนาดของลำต้นที่ใหญ่ใกล้เคียงกัน และใหญ่กว่า Z1-6 ซึ่งต้นเตี้ย โตช้า กาบหุ้มลำต้นอัดตัวกันแน่น ทำให้มีขนาดเส้นรอบวงโคนต้นน้อยกว่าและมีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากการเกิดหน่อใหม่ พบว่ากล้วยไข่ต้นควบคุม Z1-6 C3-6 และ C3-5 มีจำนวนหน่อใหม่เฉลี่ย 2.12 1.25 1.21 และ 1.17 หน่อ ตามลำดับ (ตารางที่ 8) ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ต้นควบคุมมีแนวโน้มที่จะเกิดหน่อใหม่ได้มากและเร็วกว่าต้นพันธุ์กลาย ต้น Z1-6 มีการเกิดหน่อใหม่ได้น้อยและช้าที่สุด

จากการนับจำนวนใบ พบว่าต้นควบคุม Z1-6 C3-6 และ C3-5 ที่อายุ 6 เดือน มีจำนวนใบเฉลี่ย 17.58 14.08 15.20 และ 14.95 ใบต่อต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 8) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ต้นควบคุมมีแนวโน้มมีใบมากกว่าต้นอื่น

จากการศึกษาลักษณะความสูง ความยาวของเส้นรอบวงโคนต้น จำนวนใบ และจำนวนหน่อใหม่ของกล้วยต้นควบคุม Z1-6 C3-6 และ C3-5 พบว่า การเจริญเติบโตทางด้านความสูงและขนาดเส้นรอบวงโคนต้นของต้นควบคุม C3-6 และ C3-5 มีค่าใกล้เคียงกัน ต้น Z1-6 มีขนาดความสูงและเส้นรอบวงโคนต้นน้อยที่สุด และมีความแตกต่างกันทางสถิติ จำนวนใบและจำนวนหน่อเกิดใหม่ของต้นควบคุม Z1-6 C3-6 และ C3-5 มีค่าใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ต้นควบคุมมีแนวโน้มที่จะให้จำนวนใบและหน่อใหม่สูงที่สุด ในขณะที่ Z1-6 มีแนวโน้มต่ำที่สุด ต้น C3-6 และ C3-5 มีลักษณะการเจริญเติบโตที่คล้ายกันอาจเป็นเพราะได้จากการใช้สาร colchicine 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 7.5 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน และแสดงอาการอ่อนแอต่อการทำลายของโรคและแมลงมากกว่าต้นควบคุม

โดยทั่วไปแล้วต้นกล้วยไข่จะเริ่มแทงช่อดอกเมื่ออายุประมาณ 6-9 เดือน ซึ่งมีความสูงประมาณ 194-206 เซนติเมตร มีขนาดของเส้นรอบวงประมาณ 45-51 เซนติเมตร จำนวนใบประมาณ 33-40 ใบ จำนวนหน่อ 5 หน่อ (กฤษดา, 2536 ; สุภาพร, 2536 ; มุจลินท์, 2538) ในขณะที่เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับต้นควบคุมในการทดลองครั้งนี้ ซึ่งมีความสูง 82 เซนติเมตร ขนาดเส้นรอบวง

ตารางที่ 8 เส้นรอบโคนต้นที่ความสูง 10 เซนติเมตร , จำนวนใบ และจำนวนหน่อ ของต้นกล้วยไข่ที่อายุ 6 เดือน

	เส้นรอบโคนต้น[1/] (เซนติเมตร)	จำนวนใบ (ใบ)	จำนวนหน่อ (หน่อ)
control	23.95[b]	17.58	2.12
Z1-6	15.33[a]	14.08	1.25
C3-6	24.45[b]	15.20	1.21
C3-5	23.88[b]	14.95	1.17
F-test	**	ns	ns
CV (%)	11.4	15.6	56.1

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** = แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

1/ = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

โคนต้น 24 เซนติเมตร และมีใบ 18 ใบ จะเห็นได้ว่าต้นกล้วยไข่มีการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ อาจเนื่องจากในระยะแรกของการปลูกตรงกับเดือนกันยายน-ตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงที่ฝนตกมากถึง 330.7 มิลลิเมตร ทำให้มีน้ำขังในแปลง ดินจับตัวแน่น ต้นกล้วยจึงชะงักการเจริญเติบโตไประยะหนึ่ง และผ่านช่วงฤดูหนาวในเดือนธันวาคม-มกราคม ซึ่งบางวันอุณหภูมิต่ำสุดลดลงถึง 11-13 องศาเซลเซียส จึงอาจทำให้ต้นกล้วยมีการเจริญเติบโตช้ากว่าที่ควร

จากการศึกษาการกางของใบโดยวัดมุมองศาระหว่างแนวก้านกลางใบที่ 4-5 ทำกับแนวแกนของลำต้นเทียมเมื่ออายุ 5 เดือน พบว่าค่ามุมองศาเฉลี่ยของต้นควบคุม Z1-6 C3-6 และ C3-5 มีขนาด 61 85 82 และ 80 องศา ตามลำดับ ใบของต้นควบคุมมีลักษณะค่อนข้างตั้งตรง ส่วน C3-6 และ C3-5 ใบโค้งลง กาบใบที่หุ้มลำต้นเทียมนั้นกางแยกออกจากโคนของลำต้นมากกว่าต้นควบคุม ซึ่งถ้ากาบใบด้านนอกนี้กางแยกออกจากลำต้นเทียมหลายกาบใบมากขึ้นอาจทำให้ลำต้นไม่แข็งแรง หักล้มได้ง่าย ต้น Z1-6 ลำต้นเทียมและใบมีขนาดเล็กกว่าหมายเลขอื่นมาก ใบค่อนข้างกลม หนา สีเขียวเข้ม กางออกมากและแผ่นใบห้อยลงจากเส้นกลางใบ ก้านใบสั้นมากหรือไม่มี การเรียงตัวของใบถี่ชิดกัน

ลักษณะใบที่กางออกมากนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Vakili (1967) ซึ่งรายงานว่าต้น tetraploid ของกล้วยตานีมีลักษณะใบที่โค้งลงมากกว่าปกติเช่นกัน ลักษณะของใบที่โค้งมากนี้เป็นลักษณะอย่างหนึ่งของกล้วยที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้น เนื่องจากแผ่นใบมีน้ำหนักเพิ่มมากขึ้นทำให้ใบกางออกและห้อยโค้งลงมากกว่าต้น diploid ทำให้มีการหักของก้านใบได้ง่าย และแห้งเหี่ยวได้เร็วกว่าต้นกล้วยที่เป็น diploid ด้วย (เบญจมาศ, 2538)

จากการวัดขนาดความยาวของเซลล์ปากใบพบว่าต้นควบคุม Z1-6 C3-6 และC3-5 มีขนาดความยาวของเซลล์ปากใบ 16.08 20.88 26.16 และ 25.20 ไมโครเมตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าต้นควบคุมมีขนาดเซลล์ปากใบใกล้เคียงกับกล้วยไข่ปกติซึ่งยาว 18-19 ไมโครเมตร (สุภาพร, 2536) ส่วนต้น Z1-6 C3-6 และ C3-5 มีขนาดความยาวของเซลล์ปากใบมากกว่าต้นควบคุมคิดเป็น 1.3 1.63 และ 1.57 เท่า ตามลำดับ จำนวนของเซลล์ปากใบต่อพื้นที่ของต้นควบคุม Z1-6 3-6 และ C3-5 เป็น 165.9 117.2 78.1 และ 72.1 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งสุภาพร (2536) ได้รายงานว่าต้นกล้วยไข่ปกติมีจำนวนเซลล์ปากใบ 127.7-135.2 เซลล์ต่อตารางมิลลิเมตร ส่วนความหนาของแผ่นใบของต้นควบคุม Z1-6 C3-6 และ C3-5 เป็น 0.32 0.46 0.47 และ 0.45 มิลลิเมตร ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบต้นพันธุ์กลายกับต้นควบคุมจะเห็นได้ว่าต้นพันธุ์กลายทั้ง Z1-6 C3-6 และ C3-5 มีขนาดความยาวของเซลล์ปากใบมากกว่าต้นควบคุม มีจำนวนของเซลล์ปากใบต่อพื้นที่น้อยกว่าต้นควบคุม และใบหนากว่าต้นควบคุม สอดคล้องกับลักษณะของกล้วยที่มีจำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเซลล์ปากใบจะมีขนาดใหญ่กว่าหรือยาวกว่า มีจำนวนปากใบต่อพื้นที่น้อยกว่า และใบหนากว่ากล้วยที่มีจำนวนโครโมโซมปกติ (เบญจมาศ, 2538)

ภาพที่ 15 ลักษณะของต้นกล้วยไข่ในแปลงทดลอง

สรุป

สารก่อกลายพันธุ์ colchicine 0.5 0.75 1.0 เปอร์เซ็นต์ และ oryzalin 15 30 45 μM และระยะเวลาที่ได้รับสารนาน 2.5 5.0 7.5 ชั่วโมง ตามลำดับ มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของหน่ออ่อนกล้วยไข่ในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มมากขึ้นและระยะเวลานานขึ้นทำให้หน่อมีอัตราการรอดชีวิตลดลง หน่อที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์ทั้งสองชนิดมีการเกิดหน่อใหม่ในชั่ว VM_1 ได้น้อยกว่าต้นควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในชั่ว VM_2 และ VM_3 ทุกสิ่งทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สารก่อกลายพันธุ์ทำให้เกิดลักษณะผิดปกติ เช่น ต้นเตี้ย ใบหนา ใบด่าง ซึ่งเป็นการเกิดในลักษณะchimera ตลอดจนการเพิ่มขึ้นของความยาวเซลล์ปากใบ สามารถคัดเลือกต้นที่เซลล์ปากใบมีขนาดเพิ่มขึ้น นำไปศึกษาจำนวนโครโมโซมพบว่ากล้วยไข่ที่ได้รับสารก่อกลายพันธุ์บางต้นมีโครโมโซม 2n=44 ในขณะที่ต้นกล้วยไข่ปกติมีจำนวนโครโมโซม 2n=22 ซึ่งสามารถคัดเลือกต้นที่เป็น tetraploid ไว้ได้ 3 หมายเลข ได้แก่ C3-6 , C3-5 ซึ่งได้จากการใช้สาร colchicine 1.0 เปอร์เซ็นต์ นาน 7.5 ชั่วโมง และ Z1-6 ได้จากการใช้สาร oryzalin 45 μM นาน 2.5 ชั่วโมง หลังจากทำการตัดแบ่งและเปลี่ยนอาหารพบว่าพันธุ์กลายมีการเจริญเติบโตและการเกิดหน่อใหม่ได้น้อยและช้ากว่าต้นควบคุม

หลังการชักนำต้นอ่อนกล้วยไข่ให้เกิดรากบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่าต้นพันธุ์กลาย Z1-6 สามารถเกิดรากได้ดีและสมบูรณ์มากที่สุด แตกต่างจากต้นควบคุม C3-6 และ C3-5 ที่มีการเกิดรากในระดับใกล้เคียงกัน จากนั้นย้ายต้นอ่อนออกชำในวัสดุปลูก การเจริญเติบโตทางด้านความสูงของต้นควบคุม C3-6 และ C3-5 มีความสูงใกล้เคียงกัน ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับ Z1-6 ที่มีความสูงน้อยที่สุด เมื่อปลูกในแปลงทดลองต้นควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด ต้น Z1-6 มีอัตราการรอดชีวิตน้อยที่สุด การเจริญเติบโตทางด้านความสูงและความยาวของเส้นรอบวงโคนต้นที่ความสูง 10 เซนติเมตร ของต้นควบคุม C3-6 และ C3-5 มีค่าใกล้เคียงกัน แต่แตกต่างทางสถิติกับ Z1-6 ซึ่งให้ค่าต่ำที่สุด จำนวนใบและจำนวนหน่อใหม่ของต้นควบคุม Z1-6 C3-6 และ C3-5 มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ต้นควบคุมมีแนวโน้มให้จำนวนใบและหน่อใหม่มากที่สุด พันธุ์กลายทั้งสามหมายเลขมีมุมระหว่างใบกับลำต้นกว้าง ใบโค้งลง ในขณะที่ต้นควบคุมมีมุมแคบและใบตั้งขึ้นมากกว่า พันธุ์กลายมีความยาวของเซลล์ปากใบมากกว่า มีจำนวนเซลล์ปากใบต่อพื้นที่น้อยกว่า และใบหนากว่าต้นควบคุม

เอกสารอ้างอิง

กฤษดา สังข์สิงห์. 2536. การเจริญเติบโต ลักษณะที่แสดงออก และการให้ผลผลิตของกล้วยการค้าบางพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

กวิศร์ วานิชกุล, เบญจมาศ ศิลาย้อย, ฉลองชัย แบบประเสริฐ, จุลภาค คุ้นวงศ์ และ ธำรง ช่วยเจริญ. 2536. การทดสอบและเปรียบเทียบศักยภาพของกล้วยพันธุ์การค้าที่ขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในแหล่งปลูกต่างๆของประเทศไทย. รายงานวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 147 น.

กวี สุจิปุลิ. 2533. ผลของ NAA, ผงถ่าน และความเข้มข้นวุ้น ต่อการเกิดรากและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยพันธุ์ Grand Nain บนอาหารสังเคราะห์. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

กัลยาณี อรรถฉัตร. 2533. การเพิ่มปริมาณต้นและการเจริญเติบโตของกล้วยหอมพันธุ์ Grand Nain โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ฉลองชัย แบบประเสริฐ. 2532. การปลูกกล้วยไข่. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม. 27 น.

เดช วัฒนชัยยิ่งเจริญ และ ชำนาญ ทองกลัด. 2536. สถานการณ์กล้วยในตลาดโลกที่มีผลต่อการผลิตและส่งออกกล้วยของประเทศไทย. ข่าวสารสถาบันวิจัยพืชสวน 7(1) : 1-11.

ทิวา รักนิ่ม. 2533. ผลของcolchicineที่มีต่อการกลายพันธุ์ของแกลดิโอลัสที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เบญจมาศ ศิลาย้อย. 2538. กล้วย. บริษัท ประชาชน จำกัด, กรุงเทพฯ. 290 น.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2537. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, น.222-239. *ใน* พันธุศาสตร์พื้นฐาน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประภาสินี รัตโนภาส. 2529. เทคนิคการขยายพันธุ์กล้วยโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปาริชาติ นุกูลการ. 2526. ผลของสิ่งก่อกลายพันธุ์ต่อกล้วยหอมทองที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ภาสันต์ ศารทูลทัต. 2536. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาสมในการชักนำการเกิดรากของต้นอ่อนกล้วยไข่ที่ฉายรังสี. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มุจลินท์ ติณสิริสุข. 2537. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยบางพันธุ์. ปัญหาพิเศษปริญญาโท . ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2538. การเจริญเติบโต ลักษณะที่แสดงออก การให้ผลผลิต และการตอบสนองต่อระดับปุ๋ยไนโตรเจน ของกล้วยในกลุ่มยีโนม AA บางพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เยาวภา จิระเกียรติกุล. 2536. การชักนำให้หม่อนเกิดการกลายและคัดพันธุ์ทนเค็มโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

รงรอง วิเศษสุวรรณ. 2528. การชักนำให้เยอบีรากลายพันธุ์ในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิจิตร วังใน. 2530. กล้วย. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 310 น.

วิชชุตา รุ่งเรือง. 2537. ผลของ colchicine และรังสีแกมมาที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัวพันธุ์ 'Double Spathe' ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศรีสังวาลย์ ลายวิเศษกุล. 2533. ผลของ pH ต่อการเกิดหน่อของกล้วยไข่บนอาหารสังเคราะห์. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศิริพร เจนศิริสกุล. 2533. ผลตอบแทนจากการลงทุนปลูกกล้วยไข่ในจังหวัดกำแพงเพชร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต. 2533. ผลของระดับความเข้มข้นของวุ้นและ supporting agent ต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไข่ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2536. การกลายพันธุ์ของพืช. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี่พับบลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ. 197 น.

สุภัทรา ศุภเมธี. 2533. การชักนำให้กล้วยเกิดการกลายและคัดพันธุ์เพื่อทนเค็มโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุภาพร แก้วสมพงษ์. 2532., ผลของ 6-Benzylaminopurine ต่อการเกิดหน่อของกล้วยไข่บนอาหารสูตรสังเคราะห์. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2534. ผลของยีโนมในกล้วยที่มีต่อการขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2536. ผลของโคลชิซีนต่อกล้วยไข่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุภาภรณ์ รุ่งเรืองขจรเลิศ. 2536. ศึกษาการเกิดหน่อของกล้วยหอม 8 พันธุ์ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ปัญหาพิเศษปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2526. ผลของรังสีและสารเคมีต่อกุหลาบหินพันธุ์ลาร์โกที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เสริมศิริ เอี่ยมแฟง. 2532. การปรับปรุงพันธุ์เก็กฮวยโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อมรา คัมภิรานนท์. 2536. พันธุศาสตร์ของเซลล์. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 322 น.

Aaouine, M. 1989. *In vitro* propagation of bananas. Actes de l' Inst. Agron. et Veterinaire Hassan II. 9(2):5-9.

Alvard, D., F. Cote and C. Teisson. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation, Effects of temporary immersion of explants. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 32(1):55-60.

Balakrishnamurthy, G. and S.R. Sree Rangasamy. 1988. Regeneration of banana plantlets from *in vitro* culture of floral apices. Hort. Abstr. 60(5) : 445.

Berg, L.A. and M. Bustamante. 1974. Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free banana. *Cited by* เบญจมาศ ศิลาย้อย. กล้วย. Phytopathology 64:320-322.

Chen, C.H. and V.C. Coeden-Kallemeyn. 1979. *In vitro* induction of tetraploid plants from colchicine-treated diploid daylily callus. Euphytica 28 : 705-709.

Cote, F., D. Alvard, R. Domergue, L. Navarro-Mastache and C. Teisson. 1990. *In vitro* micropropagation of banana plants. Fruits, Spec. Issue. 230 p.

Cronauer-Mitra, S.S. and A.D. Krikorian. 1984. Rapid multiplication of bananas and plantains by *In vitro* shoot tip culture. HortScience 19(2) : 234-243.

_____. 1987. Adventitious shoot production from calloid cultures of banana. Plant Cell Rep. 6(6) : 443-445.

_____. 1988. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana *Musa ornata* Roxb. Plant Cell Rep. 7(1) : 23-25.

Elliotte, F.C. 1958. Plant breeding and cytogenetics. *Cited by* เยาวพา จิระเกียรติกุล. การชักนำให้หม่อนเกิดการกลายและคัดพันธุ์ทนเค็มโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. Mc Graw-Hill, Inc, New York. 395 p.

Epp, M.D. 1987. Somaclonal variation in bananas : a case study with *Fusarium* wilt. ACIAR Proceeding Series, Australian Centre for International Agricultural Research. 21 : 140-150.

Escalant, J.V. and C. Teisson. 1989. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. Plant Cell Rep. 7(8) : 665-668.

Fitchet, M. and W.De Winnaar. 1987. Rapid multiplication of bananas. Information Bull, Citrus and Subtropical Fruit Res. Inst, South Africa. 179 p.

Garcia, R.A., J.R. Lorenzo Martin and M.J. Rodriguez Enriquez. 1987. *In vitro* propagation of Canary Island banana (*Musa acuminata* Colla AAA var.Dwarf Cavendish), Studies of factors affecting culture obtention, preservation and conformity of the plants. Acta Hort. 212(2) : 577-583.

Griesbach, R.J. 1987. Selected topics on induced chromosome changes in tissue culture cells. HortScience 22(6) : 1204-1206.

Hassawi, D.S. and G.H. Liang. 1991. Antimitotic agents : effects of double haploid production in wheat. Crop Sci. 31(3) : 723-726.

Hwang, S.C. and W.H. Ko. 1988. *In vitro* somaclonal variation in banana and its application for screening for resistance to fusarial wilt. Technical Bulletin, Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region, Taiwan. 107 p.

Jarret, R.L., W. Rodriguez and R. Fernandez. 1985. Evaluation tissue culture propagation and dissemination of 'Saba' and 'Pelipita' in Costa Rica. Sci. Hort. 25 : 137-147.

Kwa, M and J. Ganry. 1990. Agronomic use of banana vitroplants. Fruits, Spec issue. 155 p.

Ling, D.H., W.Y. Chen and M.F. Chen. 1990. Plant regeneration from reinitiation of vegetative growth and adventitious buds of terminal floral culture in fruit banana. Acta Bot. Austro Sinica. 6 : 159-163.

Mateille, T. and B. Foncelle. 1988. Micropropagation of *Musa* AAA cv. Poyo in The Ivory Coast. Trop. Agri. 65(4) : 325-328.

Matsumoto, K. and H. Yamaguchi. 1990. Selection of aluminium-tolerant variants from irradiated protocorm-like bodies in banana. Trop. Agri. 67(3) : 229-232.

Morejohn, L..C., T.E. Bureau, J. Mole-Bajer, A.S. Bajer and D.E. Fosket. 1987. Oryzaline, a dinitroaniline herbicide, binds plant tubulin and inhibits microtubule polymerization *in vitro* (*Haemanthus katherinae*, Rosa sp.). Planta. 172(2) : 252-264.

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

Novak, F.J. 1991. *In vitro* mutation system for crop improvement, pp 327-342 *In* Plant mutation breeding for crop improvement proceedings of an international symposium

on the contribution of plant mutation breeding to crop improvement jointly organized by IAEA and FAO, 18-22 June 1990, vol 2. Vienna, Austria.

_____. 1992. *Musa* (bananas and plantains), pp.449-488. *In* F.A. Hammerschlag and R.E. Litz. Biotechnology of perennial fruit crops. Plant Breeding Unit. IAEA Laboratories, Vienna, Austria.

Novak, F.J., H. Brunner, R. Afza and M. van Duren. 1993. Mutation breeding of *Musa* sp.(banana, plantain). Mutation Breeding Newsletter 40 : 2-4.

Novak, F.J., R. Afza, M. van Duren and M.S. Omar. 1990. Mutation induction by gamma irradiation of *in vitro* cultured shoot-tips of banana and plantain (*Musa* cvs). Trop. Agri. 67(1) : 21-28.

Olivia, P.D. and R.C. Barba. 1984. *In vitro* culture of Saba banana (*Musa* sp. cv. Saba BBB). Phil. Agr. 63 : 351-358.

Omar, M.S., F.J. Novak and H. Brunner. 1989. *In vitro* action of ethylmethansulphonate on banana shoot tips. Sci. Hort. 40 : 283-295.

Ramulu, K., H.A. Verhoeven and P. Dijkhuis. 1991. Mitotic blocking, micronucleation and chromosome doubling by oryzalin, amiprofosmethyl and colchicine in potato. Protoplasma. 160 : 2-3, 65-71.

Rodriguez, N., A. Vanterpool and A.A. Rodriguez Nodals. 1987. Comparative study of banana clones in Guantanamo basin. Ciencia y Tecnica en la Agri.,Viandas Tropicales. 10 : 1,7-17.

Smith, M.K., S.D. Hamill, P.W. Langdon and K.G. Pegg. 1993. Mutation breeding programme produces a plant with potential Fusarium wilt (race 4) resistant Cavendish variety. Mutation Breeding Newsletter, FAO/IAEA 4 : 5.

Stover, R.H. 1987. Somaclonal variation in Grand Nain and Saba bananas in the nursery and field. ACIAR Proceeding Series, Australian Centre for International Agricultural Research 21 : 136-139.

Stover, R.H. and I.W. Buddenhagen. 1986. Banana breeding : polyploid, disease resistance and productivity. Fruits 41(3) : 175-191.

Tulman Neto, A., E.T. Domingues, A.L.F. Alvarez, B.M.J. Mendez and A. Ando. 1990. *In vivo* methodology for mutation induction in banana, cultivar 'Maca'. Mutation Breeding Newsletter 36 : 12.

Vakili, N.G. 1967. The experimental formation of polyploidy and its effect in the genus Musa. Amer. J. Bot. 54(1) : 24-36.

Valsalakumuri, P.K. and P.C.S. Nair. 1988. Pollen studies in banana. South Indian Hort. 36 : 3,96-102.

Verhoeven, H.A., K. Ramulu and P. Dijkhuis. 1990. A comparison of the effects of various spindle toxins on metaphase arrest and formation of micronuclei in cell suspension cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. Planta 182 : 3, 408-414.

Wan, Y., D.R. Duncan, A.L. Rayburn, J.F. Petolino and J.M. Widholm. 1991. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther derived maize callus. Theoretical and Applied Genetics 81 : 2, 205-211.

Worthing, C.R. and S.B. Walker. 1987. The Pesticide Manual, A World Compendium. British Crop Protection Council, UK. 1078 p.

Zeng, X.B., F.N. Li, L.B. Xu, H. Yang, Z.X. Lin and B.Z. Huan. 1989. A preliminary investigation on wild bananas in Guandong province. Acta Hort. Sinica. 16 : 2,95-100.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 รายงานผลการวิเคราะห์ดินพื้นฐานแปลงปลูกกล้วย

ข้อมูล	ปริมาณ	ระดับ
อินทรีย์วัตถุ (%)	1.57	ค่อนข้างต่ำ
ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (ppm)	152.51	สูงมาก
โพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ (ppm)	353.32	สูงมาก
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	7.45	ด่างอ่อน
ความเค็มของดิน (dS/m)	3.14	เค็มน้อย

<u>ตารางผนวกที่ 2</u> ข้อมูลอุตุนิยมวิทยา ตั้งแต่ สิงหาคม 2539 - มีนาคม 2540

เดือน	อุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ย (C)	อุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ย (C)	ปริมาณฝน (มม.)
สิงหาคม	33.2	24.3	62.3
กันยายน	31.8	24.3	330.7
ตุลาคม	31.4	24.0	182.8
พฤศจิกายน	30.6	22.5	73.5
ธันวาคม	28.7	17.9	<0.1
มกราคม	31.0	16.5	0.0
กุมภาพันธ์	33.3	20.8	<0.1
มีนาคม	34.9	22.7	138.1

ที่มา : สถานีตรวจอากาศเกษตร อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม