เทคนิคการขยายและอนุรักษ์พันธุกรรมมันสาคู (*Maranta arundinacea* L.) ในสภาพปลอดเชื้อ

In Vitro Propagation and Conservation Technique of Arrowroot (*Maranta arundinacea* L.)

พัชร ปิริยะวินิตร[1*], พัฒน์นรี รักษ์คิด[1] และปาริฉัตร สังข์สะอาด[1]

Phatchara Piriyavinit[1], Padnaree Rukkid[1] and Parichart Sangkasa-ad[1]

Received: October 19, 2023
Revised: January 17, 2024
Accepted: January 26, 2024

Abstract: Starch produced from arrowroot rhizomes is a low glycemic index starch which is possible to promote as a healthy food. Micropropagation and *in vitro* conservation by tissue culture techniques was investigated in this research. The result showed that the appropriate sterilization method for rhizome buds was the sterilization with 70% ethanol for 10 secs and 20% Clorox for 15 mins followed by 25% Clorox for 5 mins. The survival rate of this sterilization method was 16.7%. For shoot induction, the regenerated shoots from rhizome buds (~2 cm) were cultured on MS medium supplemented with 0, 0.5 and 1.0 mg/L NAA and 0, 3.0, 6.0 mg/L BA. The results showed that 6.0 mg/L BA alone could induce the average number of shoots of 5.5. The average root number of 4.6 and root length of 4.49 cm were observed on MS medium without NAA and BA. In vitro slow growth was attempted by culturing shoots on MS, ½ MS, and ¼ MS medium supplemented with 30, 45 and 60 g/L sucrose. It was revealed that the in vitro shoots cultured on ½ MS medium supplemented with 60 g/L sucrose for 5 months had survival rate and growth at 96.7%.

Keywords: marantaceae, tissue Culture technology, micropropagation, slow growth

บทคัดย่อ: มันสาคูเป็นพืชให้แป้งที่มีค่าดัชนีน้ำตาลต่ำซึ่งมีศักยภาพพัฒนาเป็นอาหารสุขภาพ จึงได้ศึกษาการขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุกรรมมันสาคูด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาจากหน่อด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 วินาที ตามด้วยคลอรอกซ์ ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ และ 25 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 และ 5 นาที ตามลำดับ พบเนื้อเยื่อปลอดการปนเปื้อนของเชื้อ 16.7 เปอร์เซ็นต์ การขยายพันธุ์โดยนำยอดอ่อนในสภาพปลอดเชื้ออายุประมาณ 6 สัปดาห์ ขนาด 2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม Naphthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0, 3.0 และ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด 5.5 ยอด และเมื่อเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำการเกิดรากเฉลี่ยสูงสุด 4.6 ราก และรากยาว 4.49 เซนติเมตร สำหรับการชะลอการเจริญเติบโตโดยเพาะเลี้ยงยอดมันสาคูบนอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้น ได้แก่ MS, ½ MS และ ¼ MS ร่วมกับการปรับความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 30, 45 และ 60 กรัมต่อลิตร พบว่าอาหาร ½ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ 96.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงได้นาน 5 เดือน โดยไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหาร

คำสำคัญ: วงศ์คล้า, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, การขยายพันธุ์, การชะลอการเจริญเติบโต

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร, ปทุมธานี, 12110

[1] Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Pathum Thani 12110

*Corresponding author: phat87_ka@yahoo.com

คำนำ

มันสาคู *(Maranta arundinacea* L.; Arrowroot) เป็นพืชหัวให้แป้งที่มีประโยชน์เชิงสุขภาพ คุณสมบัติที่เด่นคือมีค่าดัชนีน้ำตาล (glycemic index, IG) ต่ำ และมีคุณสมบัติเป็นแป้งทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (resistant starch) (Aprianita *et al*., 2014) แต่ในประเทศไทยมีการเพาะปลูกมันสาคูเป็นพืชรองซึ่งความสำคัญทางเศรษฐกิจค่อนข้างน้อย (minor crops) นอกจากนี้การเพาะปลูกใช้ระยะเวลาค่อนข้างนานประมาณ 8-10 เดือน (พีรศักดิ์ และคณะ, 2544) และมีอายุเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมคือช่วง 11 -12 เดือนหลังปลูกเลี้ยง ทำให้ผลผลิตสูงสุดซึ่งหัวจะมีแป้งและกากใยเหนียวเหมาะที่จะนำมาผลิตแป้ง (อรนุช, 2549) ทำให้พืชชนิดนี้ถูกลดบทบาทความสำคัญลงและพบเห็นได้ยากขึ้นในพื้นที่เพาะปลูกต่างๆ ด้วยเหตุนี้จึงนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาศึกษาการขยายพันธุ์มันสาคูและการอนุรักษ์พันธุกรรม เนื่องจากเทคโนโลยีนี้จะใช้พื้นที่และแรงงานในการดำเนินการน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับการขยายพันธุ์ในสภาพแปลงปลูก และเหมาะกับพืชที่มีคุณลักษณะที่เฉพาะที่ผ่านมามีการศึกษาขยายพันธุ์มันสาคูในสภาพปลอดเชื้อแล้ว พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการเกิดยอดได้ แต่การแตกยอดบางครั้งยังไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (พัชร และคณะ, 2564) และมีงานวิจัยในต่างประเทศที่การเพาะเลี้ยงหน่ออ่อนมันสาคูพันธุ์ ‘Criollo’ ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมืด นาน 1 สัปดาห์แล้วย้ายมาเลี้ยงในสภาพแสงปกติ พบว่าสามารถชักนำการเกิดยอดได้ดีกว่าการเลี้ยงในสภาพแสงปกติ (Daquinta *et al*., 2009) และมีรายงานเพิ่มเติมว่ามีการใช้ชิ้นส่วนตาข้างของ *Calathea crotalifera* ซึ่งเป็นพืชอยู่ในวงศ์ Marantaceae ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการเกิดยอด และชักนำการเกิดรากเมื่อเติมสาร NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว (Rozali *et al*., 2014)

สำหรับเทคนิคการชะลอการเจริญเติบโต (slow growth) ซึ่งเป็นการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชในระยะเวลาสั้นหรือปานกลาง โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพที่ทำให้มีอัตราในการเจริญเติบโตต่ำ เพื่อลดการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ซึ่งจะช่วยลดค่าใช้จ่ายได้ เนื้อเยื่อปลอดภัยจากสภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติ และเชื้อพันธุ์สามารถพร้อมใช้ได้ทันที เทคนิคนี้ทำโดยการปรับลดปริมาณธาตุอาหารหรือการเพิ่มปริมาณ sucrose หรือการเพิ่มสารที่มีผลเพิ่ม osmotic ของอาหาร เช่น sorbitol หรือ mannitol ตัวอย่างเช่น เก็บรักษาสตรอเบอรี่ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการเก็บรักษาระยะปานกลาง (Hassan and Bekheet, 2008) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อขยายพันธุ์และอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมมันสาคูในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร สำหรับการการพัฒนาการใช้ประโยชน์จากเชื้อพันธุกรรมพืชต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อเพื่อกำจัดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ โดยใช้ชิ้นส่วนเหง้ามันสาคู (*Maranta arundinacea* var. *indica*) เป็นมันสาคูใบเขียว ที่มีตาหน่อที่เจริญเล็กน้อยฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ จำนวน 4 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล (ethanol, EtOH) ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 วินาที หลังจากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลานาน 15 นาที และคลอรอกซ์ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที

กรรมวิธีที่ 2 ฟอกฆ่าเชื้อด้วย EtOH ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 วินาที หลังจากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลานาน 15 นาที และคลอรอกซ์ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที

กรรมวิธีที่ 3 ฟอกฆ่าเชื้อด้วย EtOH ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 วินาที หลังจากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลานาน 20 นาที และคลอรอกซ์ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที

กรรมวิธีที่ 4 ฟอกฆ่าเชื้อด้วย EtOH ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 วินาที หลังจากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลานาน 20 นาที และคลอรอกซ์ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที

ตัดชิ้นส่วนตาเหง้ามาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ใส่ผงถ่านกัมมันต์ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ช่วยดูดซับสารที่พืชปล่อยออกมา แล้วเพาะเลี้ยงภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ให้แสงสว่างนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การปลอดการปนเปื้อนของเชื้อหลังฟอกฆ่าเชื้อนาน 7-10 วัน และจำนวนตาที่สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

2. ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดและราก โดยเพาะเลี้ยงยอดอ่อนอายุประมาณ 6 สัปดาห์ ขนาด 2 เซนติเมตร บนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารกลุ่มออกซิน คือ NAA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมกับการใช้สารกลุ่มไซโทไคนิน คือ BA ความเข้มข้น 0, 3.0 และ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ จำนวน 9 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สูตรอาหาร MS

กรรมวิธีที่ 2 สูตรอาหาร MS + NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 3 สูตรอาหาร MS + NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 4 สูตรอาหาร MS + BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 5 สูตรอาหาร MS + BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 6 สูตรอาหาร MS + BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 7 สูตรอาหาร MS + BA ความเข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 8 สูตรอาหาร MS + BA ความเข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 9 สูตรอาหาร MS + BA ความเข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

บันทึกผลการทดลองหลังเพาะเลี้ยงนาน 3 เดือน โดยบันทึกข้อมูลลักษณะการเจริญเติบโต จำนวนยอดจำนวนรากที่สมบูรณ์ ความยาวราก นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan,s Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$)

3. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชะลอการเจริญเติบโตของยอดมันสาคู โดยนำต้นมันสาคูที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อยาวประมาณ 3 เซนติเมตร อายุประมาณ 2 เดือน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของอาหาร ได้แก่ ½ MS และ ¼ MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครสที่ ความเข้มข้น 30, 45 และ 60 กรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 คือ ปริมาณสารอาหาร MS จำนวน 3 ระดับ ได้แก่ ¼ MS, ½ MS, และ MS

ปัจจัยที่ 2 คือ ปริมาณน้ำตาลซูโครส จำนวน 3 ระดับ ได้แก่ ความเข้มข้น 30, 45 และ 60 กรัมต่อลิตร

ทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น บันทึกผลการทดลองหลังเพาะเลี้ยงนาน 5 เดือน โดยบันทึกข้อมูลลักษณะการเจริญเติบโต จำนวนยอด ความยาวยอด (เซนติเมตร) และการรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์) นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan,s Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การฟอกฆ่าเชื้อเพื่อกำจัดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์

จากการทดลองการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของเหง้า

มันสาคู ด้วยวิธีการ 4 กรรมวิธี พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียที่ชิ้นส่วนตาของเหง้าจำนวนมาก โดยการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที และคลอรอกซ์ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที มียอดที่ปลอดเชื้อสูงสุดคิดเป็น 16.7 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) ซึ่งค่อนข้างต่ำอาจเนื่องจากชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อเป็นเหง้าที่อยู่ใต้ดินเป็นการเพิ่มโอกาสในการเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ แม้จะมีการเตรียมตัวอย่างก่อนการฟอกฆ่าเชื้อโดยล้างทำความสะอาดและเพาะเลี้ยงในทรายที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อก่อนทำการศึกษาเป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ (Figure 1)

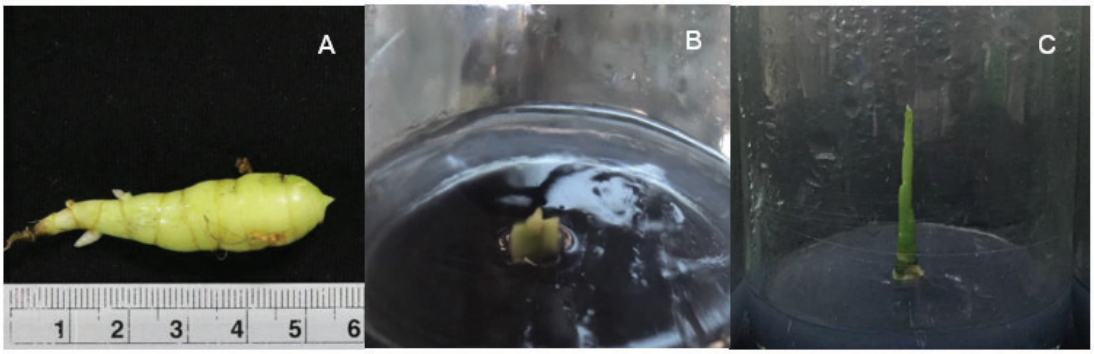

Figure 1 Arrowroot rhizome explant preparation by choosing rhizome with growing buds (A) a bud explant cultured on MS medium (B) Non-contaminated shoot after being cultured for 1 month (C).

เนื่องจากการเตรียมเนื้อเยื่อก่อนการฟอกฆ่าเชื้อเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เพื่อให้เนื้อเยื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อ ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การฟอกฆ่าเชื้อ ซึ่งการฟอกฆ่าเชื้อมันสาคูและในพืชสกุล Maranta ชนิดอื่น มีรายงานบ้างแล้ว โดยส่วนใหญ่ใช้สารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) เช่นการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาด้วย EtOH 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 วินาที และ $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที พบเนื้อเยื่อที่ปลอดการปนเปื้อนของเชื้อ 35.29 เปอร์เซ็นต์ (พัชร และคณะ, 2564) และการฟอกเหง้ามันสาคูพันธุ์ Criollo โดยใช้ $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) นาน 15 นาที เพื่อศึกษาการขยายพันธุ์มันสาคูในสภาพปลอดเชื้อ (Daquinta *et al*., 2009) นอกจากนี้การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนปลายยอดของ *M. leuconeura* cv. Kerchoviana โดยใช้ EtOH ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 วินาที หลังจากนั้นแช่โซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ (Sodium hypochlorite, NaOCl) ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที แล้วแช่ $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที (Ebrahim and Ibrahim, 2000)

แม้ว่าการใช้สาร $HgCl_2$ มีแนวโน้มที่จะฟอกฆ่าเชื้อให้ปลอดการปนเปื้อนของเชื้อได้ดี แต่ต้องใช้ความระมัดระวังในขณะปฏิบัติการเนื่องจากเป็นสารที่มีปรอทเป็นองค์ประกอบ ส่งผลต่อการทำงานของต่อมไร้ท่อ ทำลายเนื้อเยื่อบริเวณทางเดินหายใจส่วนบน และผิวหนังอย่างรุนแรง ก่อให้เกิดอาการไอ ภาวะหายใจสั้นเร็วแบบรุนแรง ปวดศีรษะและ คลื่นไส้ (Supelco, 2566) งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารคลอรอกซ์ซึ่งมีสารละลาย NaOCl เป็นองค์ประกอบ ดังที่มีรายงานในการฟอกฆ่าเชื้อลำต้น *M. leucolneura* Morren var. Tricolor ด้วย NaOCl ความเข้มข้น 1.2% นาน 15 นาที (Scaramuzzi and Apollonio, 1997) ซึ่งชนิดของสารการฟอกฆ่าเชื้อ ความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อจะแตกต่างกันอาจขึ้นกับชนิดและพันธุ์ รวมถึงชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อที่นำมาใช้ในการศึกษา

Table 1 Effect of rhizome bud sterilization methods on the rate of survival.

Sterilization method	Survival rate from contamination (%)
20% Clorox, 15 min + 25% Clorox, 3 min	0
20% Clorox, 15 min + 25% Clorox, 5 min	16.7
20% Clorox, 20 min + 25% Clorox, 3 min	5.26
20% Clorox, 20 min + 25% Clorox, 5 min	0

2. การชักนำการเกิดยอดและราก

จากการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนอายุประมาณ 6 สัปดาห์ ขนาด 2 เซนติเมตร บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0, 3.0 และ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 3 เดือน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยอดมันสาคูบนอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำให้ยอดมีความยาว 9.0 เซนติเมตร แต่ไม่พบการเกิดการแตกยอดมีจำนวนราก 4.6 ราก และความยาวราก 4.49 เซนติเมตร ซึ่งเป็นค่าความยาวยอดและจำนวนรากมากที่สุด (Table 2) เมื่อเพาะเลี้ยงยอดอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว ยอดอ่อนมีลักษณะน้ำตาลเหลืองและไม่พบการเจริญเติบโต (Figure 2) และเมื่อเพาะเลี้ยงยอดอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA เพียงอย่างเดียวมีแนวโน้มกระตุ้นการเกิดยอดได้ดีกว่าการเติม BA ร่วมกับ NAA โดยการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 5.5 ยอด ยอดมีความยาวเฉลี่ย 4.43 เซนติเมตร มีจำนวนรากเฉลี่ย 3.3 ราก และรากยาวเฉลี่ย 3.33 เซนติเมตร (Table 2) สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงปลายยอด *M. leuconeura* cv. Kerchoviana บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยชักนำการเกิดยอด (Ebrahim and Ibrahim, 2000) อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเหง้า *M. arundinacea* บนอาหารสูตร MS ที่เติม กรด 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีแอซีติก (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำการเกิดยอด และกระตุ้นการยืดของยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Wahyurini, 2020) และ Calathea crotalifera ซึ่งเป็นพืชอยู่ในวงศ์ Marantaceae ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำการแตกยอด (Rozali *et al*., 2014) จากผลการทดลองจะเห็นว่าความแตกต่างของชิ้นส่วน ชนิดของเชื้อพันธุ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถูกควบคุมด้วยความสมดุลระหว่างความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนินในการชักนำการเกิดยอดและรากซึ่งมีความซับซ้อน โดยมีรายงานว่าออกซินสามารถยับยั้งการสะสมของไซโตไคนิน ขณะที่ไซโตไคนินสามารถยับยั้งออกซินบางส่วน ซึ่งโดยปกติมักจะเลือกใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งก่อนแล้วค่อยเปลี่ยนถ่ายอาหารที่เติมสารอีกกลุ่มหนึ่ง (Van Staden *et al*., 2008) ด้วยเหตุนี้การศึกษาความสมดุลระหว่างความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนินจึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมที่เฉพาะในแต่ละชิ้นส่วน ชนิดของเชื้อพันธุ์ต่อไป

Table 2 Effect of NAA and BA combination on shoot and root multiplication from arrowroot plantlets cultured on MS medium for 3 months.

Tissue Culture Medium	Number of shoots	Shoot length (cm)	Number of roots	Root length (cm)
MS	1.0 a	9.00 b	4.6	4.49 c
MS + 0.5 mg/L NAA	1.1 a	5.17 a	2.3	4.15 c
MS + 1.0 mg/L NAA	n/a	n/a	n/a	n/a
MS + 3.0 mg/L BA	2.3 b	4.27 a	2.4	3.34 b
MS + 3.0 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	1.0 a	4.83 a	2.9	4.06 c
MS + 3.0 mg/L BA + 1.0 mg/L NAA	1.0 a	3.33 a	2.3	1.27 a
MS + 6.0 mg/L BA	5.5 c	4.43 a	3.3	3.33 b
MS + 6.0 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA	1.5 b	2.67 a	2.6	1.27 a
MS + 6.0 mg/L BA + 1.0 mg/L NAA	1.6 b	3.48 a	2.3	1.30 a
mean	1.63	4.44	2.52	2.65
F-test	**	**	ns	**
CV (%)	23.56	28.9	17.44	28.1

Means within columns and rows followed by the same letters are not significantly different at 5% level probability using DMRT n/a = not applicable (Browning and ungrowing of explant) CV = coefficient of variation
ns = not significant ** = significant at 1% level
Transformation efficiency: Number of shoots and roots are log (X+1) transformed value

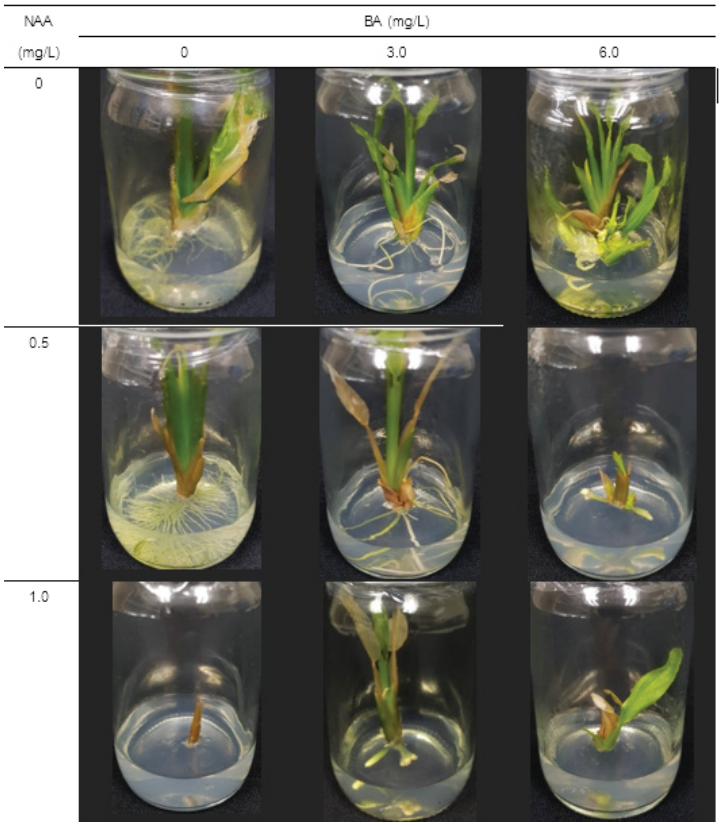

Figure 2 The growth of arrowroot shoots after culturing rhizome buds on MS medium supplemented with various concentrations of BA and NAA for 3 months.

3. การชะลอการเจริญเติบโตของยอดมันสาคู

จากการศึกษาผลของอาหารสูตร MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชะลอการเจริญเติบโต พบว่ายอดมันสาคูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ความเข้มข้นลดลง ได้แก่ ¼ MS และ ½ MS สามารถเจริญเติบโตได้ดี แต่ยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ความเข้มข้น 1 เท่าไม่สามารถเจริญได้ และการลดความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมีแนวโน้มทำให้เกิดจำนวนยอดลดลง ส่วนความยาวของยอดพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอาหารสูตร MS และน้ำตาลซูโครส โดยเมื่อเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร ¼ MS และ ½ MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ลักษณะต้นมีความยาวมากกว่ามากกว่าน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง และยอดอ่อนมันสาคูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ความเข้มข้น 1 เท่าไม่พบการแตกยอดและความยาวของยอดที่สูงขึ้น ลักษณะของยอดสีน้ำตาลเหลืองซีด โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงร่วมกันน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ต้นไม่สามารถเจริญเติบโตแตกหน่ออ่อนได้เมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ¼ MS หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 3 เดือน เริ่มมีอาการน้ำตาลเหลืองซีด (Figure 3) เมื่อเพาะเลี้ยงยอดมันสาคูนาน 5 เดือน พบว่าต้นมันสาคูที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร ½ MS ยังคงมีลักษณะต้นที่แข็งแรง และมีการเจริญเติบโตแตกยอดใหม่ได้เมื่อเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ โดยอาหาร ½ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดชีวิตและเจริญเติบโตแตกยอดใหม่ได้ 96.7 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหาร

ผลดังกล่าวสอดคล้องกับพืชหลายชนิดที่มีการศึกษาการชะลอการเจริญเติบโต เช่น พืชในวงศ์ขิง Zingiberaceae ได้แก่ ขิง ไพล และขมิ้นอ้อย พบว่าการใช้อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 40 - 60 กรัมต่อลิตร หรือ อาหารสูตร ½ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 40-50 กรัมต่อลิตร สามารถชะลอการเจริญเติบโตได้นานอย่างน้อย 8 เดือน (สนธิชัย, 2548) ในหงส์เหินขาว (Globba adhaerens Gagnep) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ¼ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร สามารถเพาะเลี้ยงได้นาน 3 เดือน (Iida *et al*., 2020) ซึ่งการลดปริมาณอาหาร MS จะช่วยในการชะลอการเจริญได้ เนื่องจากเป็นการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพที่ทำให้มีอัตราในการเจริญเติบโตต่ำจากการควบคุมปริมาณอาหารและแร่ธาตุ แต่ความเข้มข้นที่เหมาะสมอาจแตกต่างไปตามชนิดและชิ้นส่วนของพืช

Table 2 Effect of MS medium and sucrose concentration on shoot and regeneration rate from arrowroot plantlets cultured for 5 months.

Sucrose (g/L)	Number of shoots				Shoot length (cm)				Regeneration rate (%)		
	MS			mean	MS			mean	MS		
	MS	½ MS	¼ MS		MS	½ MS	¼ MS		MS	½ MS	¼ MS
30	1.00	1.88	1.00	1.30 ab	3.00 a z	6.83 a x	5.50 a y	5.11	n/a	93.3	66.7
45	1.00	1.29	1.00	1.10 b	3.00 a y	5.67 b x	3.50 b y	4.06	13.3	63.3	46.7
60	1.62	2.30	1.00	1.64 a	3.33 a y	2.33 c z	5.00 a x	3.56	16.7	96.7	63.3
mean	1.21 y	1.83 x	1.00 y		3.11	4.95	4.67	4.24			
F-test (MS)		*				**					
F-test (SU)		**				**					
F-test (MS×SU)		ns				**					
CV (%)		20.30				13.2					

Means within columns and rows followed by the same letters are not significantly different at 5% level probability using DMRT
n/a = not applicable (Browning and ungrowing of explant) CV = coefficient of variation
ns = not significant * = significant at 5% level ** = significant at 1% level
- The a, b, c combinations compare differences in concentrations of sucrose (SU)
- The x, y, z combinations compare the difference in concentration of MS medium (MS)
Transformation efficiency: Number of shoots is log (X+1) transformed value

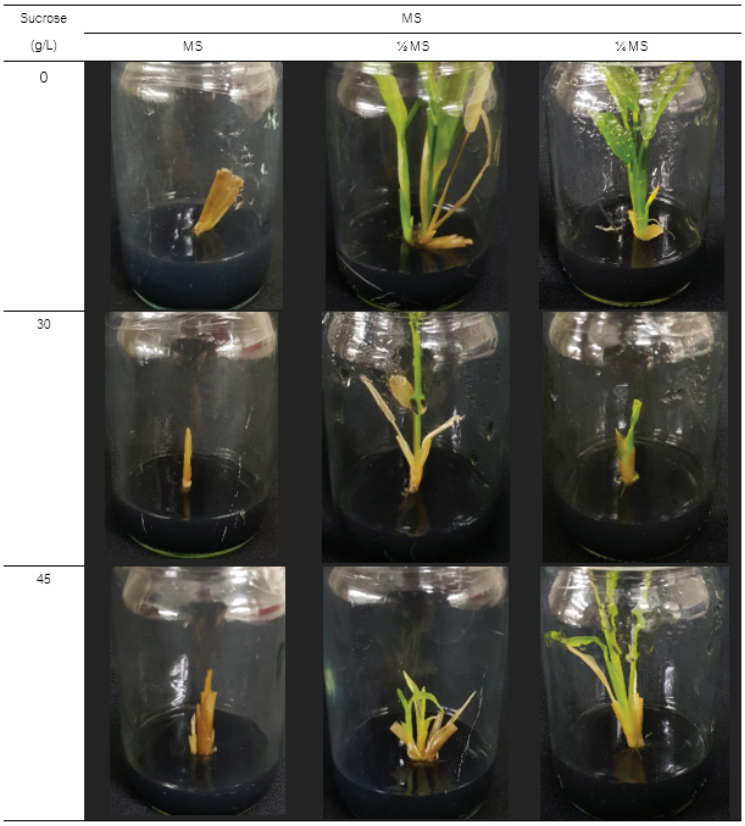

Figure 3 The growth of arrowroot shoots after culturing on different strength of MS medium supplemented with various concentrations of sucrose for 3 months.

สรุป

จากการทดลองฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาจากเหง้ามันสาคูด้วยคลอรอกซ์ได้เทคนิคที่เหมาะสมคือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 วินาที ตามด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ และ 25 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 และ 5 นาที ตามลำดับ พบเนื้อเยื่อปลอดการปนเปื้อนของเชื้อ 16.7 เปอร์เซ็นต์ และการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนมันสาคูเพื่อเพิ่มปริมาณ โดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 5.5 ยอด และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มปริมาณราก มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 4.6 ราก ซึ่งมีการแตกรากฝอยได้ดีกว่ายอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ส่วนการชะลอการเจริญเติบโตโดยการเพาะเลี้ยงต้นมันสาคูบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดชีวิตและเจริญเติบโตแตกยอดใหม่ได้คิดเป็น 96.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงได้นาน 5 เดือน โดยไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหาร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำวิจัยในครั้งนี้ งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงานจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.), สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) และสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

พัชร ปิริยะวินิตร พัฒน์นรี รักษ์คิด และปาริฉัตร สังข์สะอาด. 2564. อิทธิพลของ BA และสภาพแสงต่อการขยายพันธุ์มันสาคู (*Maranta arundinacea* L.) ในสภาพ

ปลอดเชื้อ. หน้า 50-58. *ใน*: ประมวลบทความ *ใน*: การประชุมวิชาการระดับชาติ มอบ. วิจัย ครั้งที่ 15, 22-23 กรกฎาคม 2564. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อุบลราชธานี. วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

พีรศักดิ์ วรสุนทโรสถ, สุนทร ดุริยะประพันธ์, ทักษิณ อาชวาคม, สายันต์ ตันพานิช, ชลธิชา นิวาสประกฤติ และปรียานันท์ ศรสูงเนิน. 2544. PROSEA ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 9 พืชที่ให้คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช้เมล็ด. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 299 หน้า.

สนธิชัย จันทร์เปรม. 2548 การเก็บรักษาพืชวงศ์ขิงบางชนิดโดยการลดการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ. หน้า 384-389. *ใน*: การประชุมวิชาการทรัพยากรไทย : สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว (ภาคโปสเตอร์). โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, กรุงเทพฯ.

อรนุช เกษประเสริฐ. 2549. ผลปุ๋ยและอายุเก็บเกี่ยวที่มีต่อผลผลิตและคุณภาพที่เหมาะสมกับการใช้บริโภคสดและการผลิตแป้งจากหัวสาคู 2 ชนิด. หน้า 33-55. *ใน*: ผลงานฉบับเต็ม 2549 กรมวิชาการเกษตร. กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

Aprianita, A., T. Vasiljevic, A. Bannikova and S. Kasapis. 2014. Physicochemical properties of flours and starches derived from traditional Indonesian tubers and roots. Journal of Food Science and Technology 51(12): 3669-3679.

Ebrahim, M.K.H. and I.A. Ibrahim. 2000. Influence of medium solidification and pH value on *in vitro* propagation Maranta l*euconeura* cv. *Kerchoviana*. Scientia Horticulturae 86: 211-221.

Daquinta M., K. Brown, J.A. Teixeira da Silva and F. Sagarra. 2009. *In: vitro* propagation of arrowroot (*Maranta arundinacea* L.). International Journal of Plant Developmental Biology 3(1): 15-17.

Hassan, N. A. and S.A. Bekheet. 2008. Mid-term storage and genetic stability of strawberry tissue cultures. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 4(5): 505-511

Iida K., P. Kaewsorn and S. Wongchaochant. 2020. Slow growth culture media for *in vitro* short-term storage of *Globba adhaerens* Gagnep. pp. 223-230. *In:* The Proceedings of The 58th Kasetsart University Annual Conference, 5 – 7 Feb 2020. Bangkok, Thailand.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Rozali S.E., Rashid, K.A., and R.M. Taha. 2014. Micropropagation of an exotic ornamental plant, *Calathea crotalifera,* for production of high quality plantlets. The Scientific World Journal 2014: 1-12.

Scaramuzzi, F. and G. Apollonio. 1997. Micropropagation of *Ctenanthe lubbersiana* Eichl. and Maranta leuconeura Morren var. *Tricolor*. pp. 85-95. *In* Bajaj. Y.P.S. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 40 Hight-Tech and Micropropagation VI. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Bari, Italy.

Supelco. 2566. เอกสารข้อมูลความปลอดภัย. เมอร์คิวรี(II) คลอไรด์บริสุทธิพิเศษ ผลึกละเอียด. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://www.sigmaaldrich.com (9 มกราคม 2567).

Van Staden, J., E. Zazimalova and E.F. George. 2008. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. pp. 205-226. *In:* George, E.F., M. A. Hall and G.J. De Klerk., eds. Plant Propagation by Tissue Culture Volume 1. The Background. 3rd Edition. Springer, Dordrecht, Netherlands.

Wahyurini, E. 2020. In vitro shoot induction of Garut (*Maranta arundinace*) with the addition of 2,4-D and benzyl adenine. AGRIVET 26: 43-49.