การสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมร่วมกับสารเคมีก่อกลายพันธุ์อ้อยคั้นน้ำผ่านเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กาญจนา กิระศักดิ์[1*] ภาคภูมิ ถิ่นคำ[1] แสงเดือน ชนะชัย[1] และธีระรัตน์ ชิณแสน[1]

[1]ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร
*kanjana.kiki@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้ เพื่อสร้างฐานทางพันธุกรรมของอ้อยคั้นน้ำให้กว้างขึ้นและได้สายพันธุ์ใหม่ที่เหมาะสมเฉพาะพื้นที่ โดยการทดลองแบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ได้แก่ 1) การชักนำแคลลัส โดยใช้ใบอ่อนอ้อยคั้นน้ำพันธุ์สุพรรณบุรี 50 เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมกับ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 5 มิลลิกรัม/ลิตร (มก./ล.) และน้ำมะพร้าว 10 % เพาะเลี้ยงในที่มืดภายใต้สภาพห้องที่ความคุมอุณหภูมิ 2) การชักนำการกลายพันธุ์ โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ร่วมกับสารก่อกลายพันธุ์โซเดียมเอไซด์ (NaN_3)/ ไทเดียซูรอน (SA) ที่ 5 ระดับ ได้แก่ 0, 5, 10, 15 และ 20 มก./ล. 3) การชักนำหน่ออ่อนจากแคลลัสกลายพันธุ์ และ 4) การชักนำราก ผลการทดลองพบว่า แคลลัสเกิดจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนอ้อยในที่มืดต่อเนื่องเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สามารถเพิ่มแคลลัสปริมาณมากในอาหารสูตรเดิมได้จากการเปลี่ยนอาหาร (subculture) มากกว่า 6 ครั้ง เมื่อย้ายแคลลัสลงสูตรอาหารก่อกลายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 5 มก./ล. แคลลัสสามารถมีชีวิตรอด มีปริมาณเพิ่มขึ้น สามารถพัฒนาเกิดยอดอ่อนหลังเพาะเลี้ยงได้ 5 สัปดาห์ และเพิ่มปริมาณยอดที่พร้อมพัฒนาเป็นหน่ออ่อนเมื่อเพาะเลี้ยงไปถึงสัปดาห์ที่ 8 จากนั้น ทำการ subculture เพิ่มปริมาณหน่ออ่อนจำนวนมากในอาหารสังเคราะห์สูตรเดิมเป็นเวลา 4-5 สัปดาห์ และ subculture ลงอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS สามารถชักนำรากของหน่ออ่อนที่แข็งแรงพร้อมออกอนุบาลต้นกล้าได้ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

คำสำคัญ: สารก่อกลายพันธุ์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ความแปรปรวนทางพันธุกรรม

Genetic variation with by chemical mutagens of Juice cane through tissue culture technique

Kanjana Kirasak[1*], Pakpoom Thinkham[1], Sangdaun Chanachai[1] and Theerarat Chinnasaen[1]

[1]Khon Kaen Field Crops Research Center, Field and Renewable Energy Crops Research Institute, Department of Agriculture
*kanjana.kiki@gmail.com

Abstract

This study aims to broaden the genetic base of sugarcane and develop new varieties suitable for specific regions. The experiment is divided into four stages: 1) Callus induction: Young leaves of Suphanburi 50 sugarcane are cultured on a modified MS (Murashige and Skoog, 1962) medium combined with 5 mg/L 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and 10% coconut water, cultured in the dark under controlled temperature conditions. 2) Mutation induction: Callus is cultured on a modified MS medium combined with the mutagenic agent sodium azide (NaN3)/Thidiazuron (SA) at five concentation: 0, 5, 10, 15, and 20 mg/L. 3) Induction of shoots from mutated callus. 4) Root induction. The results showed that callus formed from the continuous dark culture of young sugarcane leaves for 8 weeks could significantly increase in quantity through subculturing on the same medium more than six times. The callus was transferred to a mutagenic medium at a concentration of 5 mg/L, it survived, increased in quantity, and developed shoots after 5 weeks of culture. The amount of shoots ready to grow into young plants increased by the 8th week. Subsequently, subculturing on the same synthetic medium for 4-5 weeks increased the number of shoots, and subculturing on modified MS medium induced strong root formation, ready for seedling nursery after 2 weeks of culture.

Keywords: Chemical mutagen, Tissue culture, Genetic variation

1. บทนำ

น้ำอ้อยสดเป็นเครื่องดื่มที่มีความอร่อย ดื่มแล้วสดชื่น เป็นสารธรรมชาติ เป็นเครื่องดื่มแก้กระหายน้ำ นิยมดื่มกันได้ทั้งสังคมเมืองและชนบท เข้าถึงง่าย ราคาถูก รสชาติหอมหวาน และมีประโยชน์ต่อสุขภาพ เป็นที่ชื่นชอบในหลายประเทศ นิยมมากที่สุดในบางประเทศแถบเอเชีย ได้แก่ อินเดีย บังคลาเทศ มาเลเซีย จีน ไทย และบราซิล ในทวีปอเมริกาใต้ [1-3] พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นที่ซึ่งมีการปลูกอ้อยเป็นการค้า โดยเฉพาะอินเดียและบังคลาเทศ จัดน้ำอ้อยเป็นเครื่องดื่มที่มีราคาแพง ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน มีการหีบขายสด จนกระทั่งบรรจุกล่องและกระป๋อง สร้างเป็นแบรนด์ขึ้นในการขายระดับอุตสาหกรรม แต่ที่ประเทศจีนสมัยก่อนจัดกลุ่มน้ำอ้อยสดให้เป็นเครื่องดื่มที่มีความหวาน ราคาถูก เป็นที่นิยมกันมากในช่วงฤดูเก็บเกี่ยวอ้อยโรงงาน จนกระทั่งกลายเป็นแฟชั่นที่ขายกันข้างทางเดิน โรงอาหาร และร้านอาหาร เมื่อมีความเจริญและมีความนิยมสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ราคาในปัจจุบันจึงแพงมากขึ้น สำหรับในประเทศไทยตั้งแต่อดีตมีการผลิตขายรูปแบบหีบน้ำอ้อยสด บรรจุขวดพลาสติกแช่เย็นในลังน้ำแข็งและขายตามข้างทางสัญจร เมื่อมีความนิยมดื่มกันมากขึ้นในปัจจุบันจึงพัฒนาการขายผ่านทางเวปไซด์ แต่บรรจุภัณฑ์ยังคงลักษณะแบบดั้งเดิม ซึ่งในน้ำอ้อยทั่วไปประกอบด้วยน้ำ 75%-85% น้ำตาลรีดิวซ์ 0.3-3.0% น้ำตาลที่ไม่ถูกรีดิวซ์ 10-21% มีค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5-5.7 ปริมาณน้ำอ้อยคั้น 8 ออนซ์ ประกอบด้วย 250 แคลลอรี่ และ 30 กรัมของน้ำตาลธรรมชาติ โดยปราศจากสารเติมแต่ง ไม่มีไขมัน ไม่มีคลอเลสเตอรอล ไม่มีเยื่อไย ไม่มีโปรตีน แต่มีธาตุอาหารสำคัญ เช่น โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซี่ยม แมกนีเซียม และเหล็ก เป็นต้น ที่สำคัญน้ำอ้อยคั้นดีต่อสุขภาพผู้บริโภคช่วยป้องกันการเกิดมะเร็ง มีฤทธิ์ต้านภูมิแพ้ ป้องกันตับอักเสบ และป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ ช่วยส่งเสริมการพัฒนาระบบ

โครงสร้างกระดูกและฟัน เสริมสร้างระบบการทำงานของไต ดวงตา และสมอง [4-5] นอกจากนี้ยังมีปริมาณเอนไซม์ที่เป็นประโยชน์และมีสรรพคุณทางยา สามารถรักษาและแก้โรคเจ็บคอ การป่วยจากความเย็น ไข้หวัดใหญ่ และรักษาโรคดีซ่าน มี glycemic ต่ำ ซึ่งดีต่อสุขภาพ จัดเป็นน้ำหวานชนิดหนึ่งที่คนเป็นโรคเบาหวานสามารถดื่มทดแทนน้ำอัดลมได้ และมีธาตุอาหารโปแทสเซียมที่ช่วยควบคุมระดับค่าความเป็นกรดด่างในกระเพาะอาหาร ช่วยในการย่อยอาหาร ปลดปล่อยน้ำย่อยและช่วยให้ระบบการย่อยดำเนินต่อเนื่องได้ดี หลังจากดื่มแล้วสามารถคืนความสดชื่นและให้พลังงานแก่ร่างกายได้ทันทีที่ร่างกายอ่อนเพลียและใช้ประโยชน์ได้ดีมากกับผู้ปัญหาเกี่ยวกับการขับปัสสาวะและระบบการทำงานของไตบกพร่อง มีฟลาโวนอยด์ซึ่งช่วยปกป้องเซลล์จากกระบวนการเสื่อมและลดการเกิดมะเร็งและหลอดเลือดหัวใจ ซึ่งในอินเดียเป็นน้ำผลไม้ชนิดเดียวที่อยู่บนโต๊ะอาหารที่เป็นอาหารจากธรรมชาติ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และปลอดภัยที่มีราคาถูก บำรุงร่างกายและหาได้ง่ายสำหรับตลาดผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพ [6-8] เนื่องจากน้ำอ้อยดื่มสดมีประโยชน์และมีสรรพคุณทางยาที่ดีต่อร่างกาย จึงมีความสำคัญทางการค้า และกลายเป็นธุรกิจที่มีมูลค่าสูงทางการตลาด การจำหน่ายน้ำอ้อยสดพร้อมดื่มสามารถพบเห็นได้ทั่วในประเทศไทย เป็นธุรกิจที่ทำได้ง่ายไม่ซับซ้อนเพียงมีอ้อยและเครื่องหีบอ้อยก็สามารถประกอบกิจการได้ เพราะมีอ้อยคั้นน้ำพันธุ์ดีที่มีคุณภาพ “กวก. สุพรรณบุรี 50” ที่สามารถปลูกได้ทั่วไปดูแลรักษาง่าย อ้อยคั้นน้ำพันธุ์นี้มีรสชาติดี กลิ่นหอม สีเหลืองอมเขียวและสีไม่คล้ำเมื่อเวลาผ่านไป เป็นพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตรตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2539 ซึ่งใช้มานานมากกว่า 20 ปี ในประเทศอินเดียซึ่งเป็นผู้ผลิตอ้อยโรงงานรายใหญ่อันดับ 2 รองจากบราซิล แต่ให้ความสำคัญกับอ้อยคั้นน้ำเป็นอันดับหนึ่งในการผลิตและมีความหลากหลายในงานวิจัยด้านพันธุ์ ความสมบูรณ์ในการเก็บเกี่ยว ภูมิอากาศ และสภาพดินปลูก รวมถึงส่วนของลำอ้อยที่นำมาใช้หีบน้ำอ้อยสด และพันธุ์ที่นิยมปลูกในอดีตคือพันธุ์ CoP 92226 เพราะว่าให้ปริมาณน้ำอ้อยสูงมากและคุณภาพโดยรวมดี และมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งได้พันธุ์ Cos 767 ที่นิยมปลูกในปัจจุบัน เป็นพันธุ์ที่ผลิตน้ำอ้อยที่ต้องประกอบด้วย ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ในน้ำ 20% มีส่วนของน้ำตาลเป็นหลัก มีธาตุอาหาร และมีสารสำคัญที่ส่งเสริมสุขภาพ เมื่ออายุ 12 เดือน [9-10] ส่วนพันธุ์ที่นิยมในประเทศบังคลาเทศ ได้แก่ Isd 34, Isd 35, Isd 36, Isd 37 และ Isd 38 เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่เหมาะกับการเก็บเกี่ยวในช่วงเดือนธันวาคมถึงมกราคม จะมีคุณสมบัติความสดใหม่ของน้ำอ้อยดีที่สุด เพราะมีค่าน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่าช่วงอื่น และมีเปอร์เซ็นต์น้ำตาลสูงที่สุด [4] จากข้อมูลประเทศอินเดียและบังคลาเทศแสดงให้เห็นว่าการพัฒนาพันธุ์อ้อยคั้นน้ำยังคงมีความสำคัญ เพื่อให้ได้คุณลักษณะที่ดียิ่งขึ้นกว่าพันธุ์ที่นิยมใช้อยู่เดิม และเป็นทางเลือกไว้ทดแทนหรือชดเชยพันธุ์เดิมที่อาจเปลี่ยนไปหรือเสียหายจากการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศโลก พันธุ์ใหม่จำเป็นต้องถูกพัฒนาให้ได้พันธุ์ที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม ณ ปัจจุบัน พันธุ์พืชจึงจะสามารถปรับตัวได้ดีกว่าพันธุ์ที่มีอยู่เดิม ซึ่งในประเทศไทยมีอยู่เพียง 3 พันธุ์ ได้แก่ กวก. สุพรรณบุรี 50 กวก. ศรีสำโรง 1 และ กวก. สุพรรณบุรี 1 ซึ่งจัดว่ามีจำนวนพันธุ์อ้อยคั้นน้ำน้อยต่อการนำมาใช้ประโยชน์ภายในประเทศ การพัฒนาและวิจัยเพื่อให้ได้อ้อยคั้นน้ำที่มีคุณสมบัติดีขึ้นกว่าเดิมและรองรับสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนอย่างต่อเนื่องจึงมีความจำเป็นและต้องทำอย่างต่อเนื่อง ถึงแม้ว่าการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมเกสรสามารถพัฒนาพันธุ์อ้อยใหม่ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีได้ แต่ยังคงมีข้อจำกัดในหลายด้าน เช่น แหล่งรวมพันธุกรรมแคบ จีโนมซับซ้อน มีความสมบูรณ์เพศน้อย และมีรอบของการปรับปรุงพันธุ์หรือคัดเลือกค่อนข้างนาน จึงทำให้ยากต่อการดำเนินงานปรับปรุงพันธุ์ให้ตรงตามวัตถุประสงค์ในระยะเวลาที่สั้นได้ การก่อกลายพันธุ์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งช่วยเพิ่มศักยภาพการปรับปรุงพันธุ์ และเพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงมากขึ้นด้วยการใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ร่วมกับการเพาะเลี้ยงแคลลัส เนื่องการแคลลัสที่มีการแบ่งตัวบ่อย ๆ จะทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชสูงมาก จึงสร้างความเชื่อมั่นได้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมและพันธุ์ใหม่ที่เกิดขึ้นมีการเปลี่ยนแปลงไปจากพันธุ์เดิมอย่างแท้จริง ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้ มีจุดประสงค์ในการปรับปรุงพันธุ์อ้อยคั้นน้ำด้วยการก่อกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีผ่านการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อสร้างโอกาสการคัดเลือกพันธุ์ที่ดีไว้ทดแทนพันธุ์ที่มีอยู่เดิมในสภาพภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง

2. วิธีวิจัย

2.1 สิ่งทดลอง ได้แก่ พืชทดลอง สารเคมี

2.1.1 พืชทดลอง ได้แก่ ใบหลอด (ใบอ่อนที่ยังไม่คลี่) อ้อยคั้นน้ำพันธุ์ กวก. สุพรรณบุรี 50

2.2.2 สารเคมี ได้แก่ สารเคมีสูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962) สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D (2,4 dichlorophenoxyacetic acid), BA (N6-Benzyladenine) สารอาหารเสริม น้ำมะพร้าว สารฟอกฆ่าเชื้อโซเดียมไฮโป-คลอไรด์ สารเคมีก่อกลายพันธุ์ TDZ (Thidiazuron) และ SA (Sodium azide)

2.2 วิธีการทดลอง การดำเนินงานทดลองเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้ คือ

2.2.1 ขั้นตอนที่ 1 การชักนำแคลลัสจากใบหลอด

เตรียมอาหารแข็งสังเคราะห์สูตรดัดแปลง (MS) ที่เติมกรดซิตริก 150มิลลิกรัมต่อลิตร (มก./ล.) น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร (ก./ล.) ร่วมกับ 2,4-D 5 มก./ล. น้ำมะพร้าว 10 % และ วุ้น 6.5 ก./ล. [11] ปรับ pH 5.6-5.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (°C) เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ในให้เย็น นำใบหลอดของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 มาทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด และฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (%) ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ตัดชิ้นส่วนใบขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร (ซม.) วางลงในขวดอาหารที่เตรียมไว้ขวดละ 2-4 ชิ้น นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปวางไว้บนชั้นเพาะเลี้ยงในห้องที่ไม่มีแสงสว่างและควบคุมอุณหภูมิที่ 25±3 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 8 สัปดาห์ หรือจนกระทั่งได้แคลลัส

2.2.2 ขั้นตอนที่ 2 การชักนำกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีก่อกลายพันธุ์และการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (subculture)

เตรียมอาหารแข็งสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่เติมกรดซิตริก 150 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 20 ก./ล. เติม TDZ/SA ความเข้มข้น 5 ระดับคือ 0, 5, 10, 15 และ 20 มก./ล. และ วุ้น 6.5 ก./ล. ปรับ pH 5.6-5.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่ปรับความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งแคลลัสจากข้อ 1 0.5 กรัมต่อขวด วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 ขวด วางลงในขวดอาหารสังเคราะห์ นำไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงในห้องที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมง (ช.ม.) สลับมืด 8 ช.ม. และควบคุมอุณหภูมิที่ 25±3 °C เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ อย่างน้อย 6 ครั้ง บันทึกสีของแคลลัส และขนาดของแคลลัสให้ค่าคะแนนน้อยสุด-มากที่สุด ได้แก่ 1-5 คะแนน

2.2.3 ขั้นตอนที่ 3 การชักนำหน่ออ่อน

เตรียมอาหารแข็งสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่เติมกรดซิตริก 150 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 20 ก./ล. และวุ้น 6.5 ก./ล.ปรับ pH 5.6-5.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่ปรับความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งแคลลัสจากข้อ 2 ปริมาณ 0.5 กรัมต่อขวด วางลงในขวดอาหารสังเคราะห์ นำไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงในห้องที่มีแสงสว่าง 16 ช.ม. สลับมืด 8 ช.ม. และควบคุมอุณหภูมิที่ 25+3 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแคลลัสพัฒนาเกิดหน่ออ่อน

2.2.4 ขั้นตอนที่ 4 การเพิ่มปริมาณหน่ออ่อนและชักนำราก

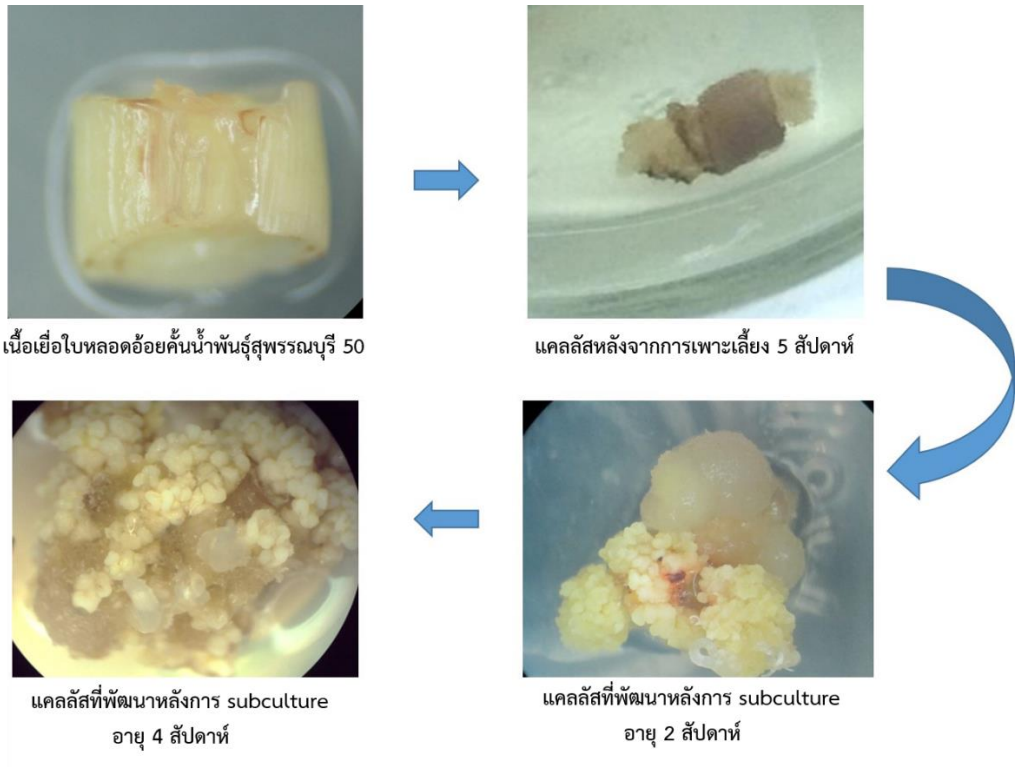
เตรียมอาหารเหลวสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่เติมกรดซิตริก 150 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 20 ก./ล. ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ปรับ pH 5.6-5.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่ปรับความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ย้ายหน่ออ่อนจากข้อ 3 ใส่ลงในขวดละ 1 หน่ออ่อน นำไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงในห้องที่มีแสงสว่าง 16 ช.ม. สลับมืด 8 ช.ม. และควบคุมอุณหภูมิที่ 25+3 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้หน่ออ่อนเพิ่มขึ้น ทำการ subculture ทุก 3-4 สัปดาห์ 3 ครั้ง แล้วจึงแยกหน่ออ่อนย้ายลงอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติมกรดซิตริก 150 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 20 ก./ล. เพาะเลี้ยงจนกระทั่งหน่ออ่อนพัฒนาเกิดราก

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

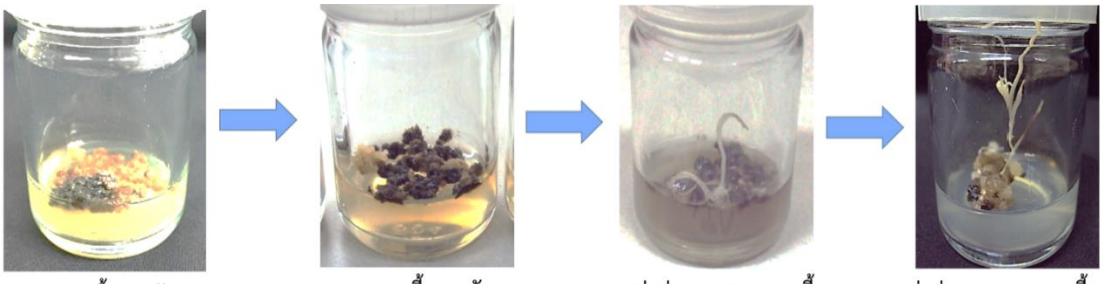
การชักนำแคลลัสจากใบหลอด พบว่า สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถชักนำแคลลัสหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4-5 สัปดาห์ แสดงดังภาพที่ 1 ใช้วิธีการทดลองตามเอกสารอ้างอิง [11] โดยพัฒนาการเกิดแคลลัสมีสีขาวนวลและขาวออกเหลือง ซึ่ง 2,4-D ที่ความเข้มข้นน้อยสามารถชักนำแคลลัสได้มีประสิทธิภาพดีแต่ที่ความเข้มข้นสูงกลับจะเป็นการยับยั้งการพัฒนาแคลลัส [12] และสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสจำนวนมากได้จากการ subculture จำนวน 6 ครั้ง ซึ่งการ subculture อย่างน้อย 6 ครั้ง เป็นการช่วยเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Somaclonal variation) ของเซลล์พืชแบบธรรมชาติได้แนวทางหนึ่ง ดังเช่นงานวิจัย [13] ที่สร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุ์กรรมโดยใช้ isozyme maker ที่ได้จากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ NCO310 ชักนำให้เกิดแคลลัสโดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิดร่วมกัน และสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยการเปลี่ยนอาหารและเพิ่มปริมาณแคลลัสให้บ่อยครั้ง โดยที่ความแปรปรวนที่เกิดขึ้นจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งในช่วงระหว่างชักนำให้แคลลัสพัฒนา พบว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงของคาร์โอไทป์ รวมไปถึงการจัดเรียงตัวของโครโมโซม การจัดเรียงลำดับของยีนร่างกายจนกระทั่งถึงระดับของการแลกเปลี่ยน sister-chromatiod [14]

ผลการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสังเคราะห์ที่มีสารก่อกลายพันธุ์ Thidiazuron (TDZ) และ Sodium azide (SA) พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เติมสาร TDZ ความเข้มข้น 20 มก./ล. ในสัปดาห์ที่ 5 มีแคลลัสพัฒนาเป็น

หน่ออ่อนมีใบยอด ได้เพียง 4 % เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปถึงสัปดาห์ที่ 7 ใบเริ่มมีสีเขียวอ่อนและกลับมาเป็นสีซีดขาวในสัปดาห์ที่ 8 จากนั้นหน่ออ่อนค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายไป แสดงดังภาพที่ 2 และ ตารางที่ 1 ดังเช่นที่มีรายงานว่า TDZ แม้จะก่อกลายพันธุ์และสามารถชักนำต้นอ่อนจากแคลลัสได้ดี แต่มีผลกระทบในด้านการลดการขยายตัวของเซลล์พืชได้ด้วยเช่นกัน [15] และแคลลัสที่เพาะ เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เติมสาร SA ความเข้มข้น 5 มก./ล. สามารถชักนำยอดอ่อนได้หลังการเพาะเลี้ยง 5 สัปดาห์ และพัฒนาเป็นหน่ออ่อนได้ 80 % เมื่อเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และสามารถขยายเพิ่มปริมาณหน่ออ่อนจำนวนมากได้ โดยไม่ต้องย้ายแคลลัสลงสูตรอาหารสังเคราะห์ใหม่ที่ใช้สำหรับชักนำยอดอ่อน แสดงดังภาพที่ 3 และตารางที่ 2 ซึ่งสาร SA เป็นสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม เช่น อาจเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครมโซม แลกเปลี่ยนลำดับเบสโดยการแทนที่ ซึ่ง SA ที่เป็นสารละลายเมื่อเจอสภาพความเป็นกรดจะเกิดสารประกอบไฮโดรเจนเอไซด์ (HN_3) เมื่อเข้าไปในเซลล์พืชแล้วจะชักนำให้เกิดสารประกอบที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ คือ azidoalanine [16-17] ดังเช่นการวิจัย ที่ใช้สาร SA กระตุ้นการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมลักษณะสำคัญที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางฟีโนไทป์ผ่านทางการเพาะเลี้ยงคัพภะข้าวสาลี [18] และทำการเพิ่มปริมาณหน่ออ่อนจำนวนมากโดยการแยกยอดอ่อนลงอาหารสังเคราะห์ใหม่จาก 1 หน่อ ได้จำนวนหน่อใหม่ 7-10 หน่อ ในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ที่มีผลกระทบต่อการแบ่งเซลล์ การเจริญเติบโตลำต้นและเนื้อเยื่อเจริญตาข้าง สามารถชักนำการแตกยอดอ่อนจำนวนมากในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ดี ขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นและชนิดพืชที่ใช้เพาะเลี้ยง ดังเช่นงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Cryptolepis sanguinolenta* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับสาร BA และ IBA, NAA สามารถชักนำต้นอ่อนจำนวนมากได้ [19-20] และหน่ออ่อนสามารถเกิดรากได้ในอาหารสังเคราะห์ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารก่อกลายพันธุ์ ซึ่งการเกิดรากของหน่ออ่อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยไม่ต้องใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน อาจเป็นเพราะว่าภายในเนื้อเยื่อพืชมีฮอร์โมนออกซินมากพอเพียงที่จะใช้ในการชักนำรากได้ แสดงดังภาพที่ 4 และในส่วนของกรรมวิธีอื่น ๆ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารเคมีก่อกลายพันธุ์ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำส่งผลให้แคลลัสไม่พัฒนา และ SA ที่ระดับความเข้มข้นสูงมีผลกระทบให้แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 4 สัปดาห์ และตายไปหลังเพาะเลี้ยง 5 สัปดาห์ (ภาพที่ 5 และ ภาพที่ 6 ตามลำดับ)



ภาพที่ 1 การพัฒนาแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบหลอดอ้อยคั้นน้ำพันธุ์สุพรรณบุรี 50

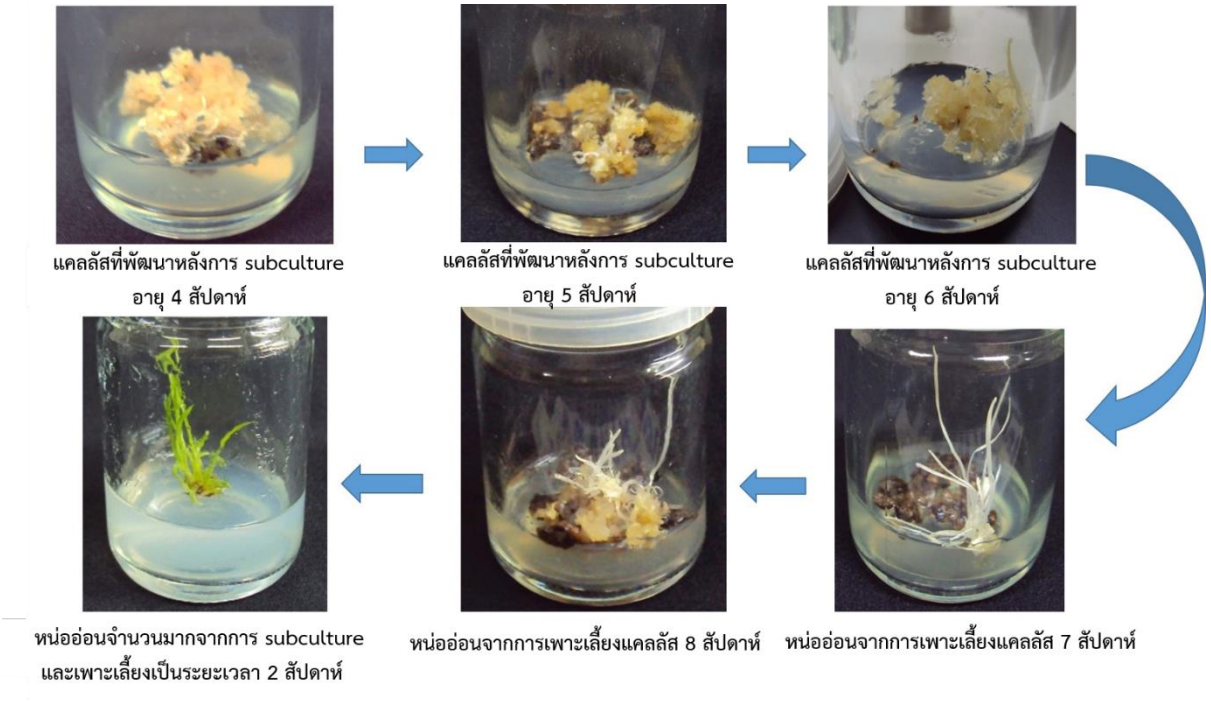


ภาพที่ 2 การพัฒนาแคลลัสและหน่ออ่อนอ้อยคั้นน้ำพันธุ์กลายจากการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารสังเคราะห์ดัดแปลง MS ร่วมกับสารก่อกลายพันธุ์ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 20 มก./ล.

ตารางที่ 1 การพัฒนาแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยง 4, 6 และ 8 สัปดาห์ บนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่เติมสารก่อกลายพันธุ์ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 มก./ล.

ความเข้มข้น TDZ (มก./ล.)	การพัฒนาแคลลัส								
	สัปดาห์ที่								
	4			6			8		
	ปริมาณ	สี	จำนวนหน่อ	ปริมาณ	สี	จำนวนหน่อ	ปริมาณ	สี	จำนวนหน่อ
0	1.1b	ขาวนวล	0	1.3b	ขาวนวล	0	1.3b	ขาวเหลือง	0
5	3.05a	ขาวนวล	0	2.15a	ขาวเหลือง	0	2.45a	น้ำตาล	0
10	3.05a	น้ำตาล	0	1.3b	น้ำตาล	0	2.15a	น้ำตาล	0
15	3.05a	น้ำตาล	0	1.3b	น้ำตาล	0	2.15b	น้ำตาล	0
20	3.05a	น้ำตาล	0	1.1b	น้ำตาล	0	1.3b	น้ำตาล	0
CV (%)	2.66			1.43			1.87		

Mean in the same column followed by different lowercase was significantly different at the 5% level of probability by DMRT.
*=Significant at p < 0.05, **=Significant at p < 0.01 ns=not significant

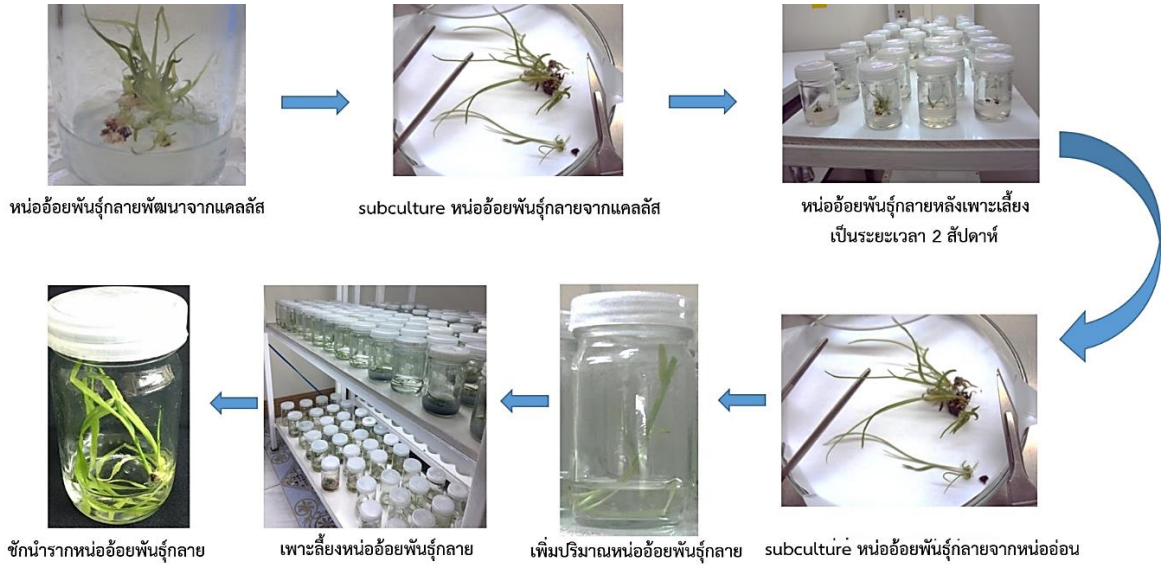


ภาพที่ 3 การพัฒนาแคลลัสและหน่ออ่อนอ้อยคั้นน้ำพันธุ์กลายจากการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารสังเคราะห์ดัดแปลง MS ร่วมกับสารก่อกลายพันธุ์ SA ที่ระดับความเข้มข้น 5 มก./ล.

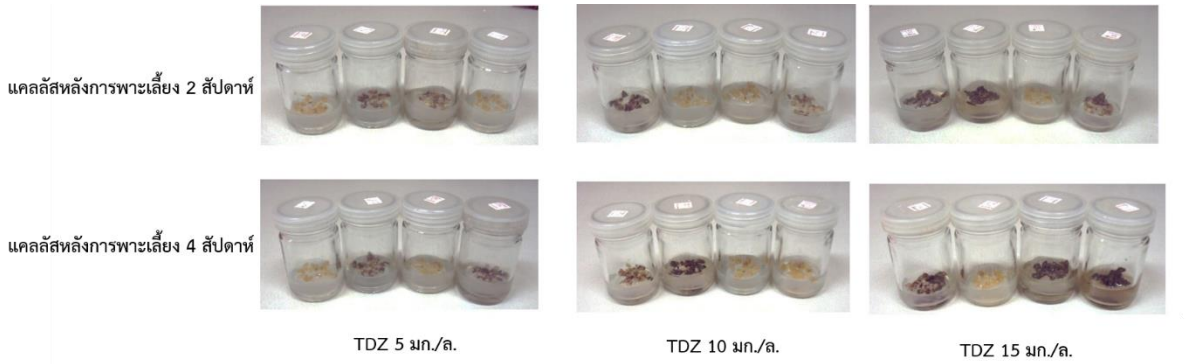
ตารางที่ 2 การพัฒนาแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยง 4, 6 และ 8 สัปดาห์ บนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่เติมสารก่อกลายพันธุ์ SA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 มก./ล.

ความเข้มข้น TDZ (มก./ล.)	การพัฒนาแคลลัส								
	สัปดาห์ที่								
	4			6			8		
	ปริมาณ	สี	จำนวนหน่อ	ปริมาณ	สี	จำนวนหน่อ	ปริมาณ	สี	จำนวนหน่อ
0	1.1c	ขาวนวล	0	1.3c	ขาวเหลือง	0	1.3c	ขาวเหลือง	0
5	3.2a	ขาวนวล	0	3.45a	น้ำตาล	0	2.45a	ขาวเหลือง	10
10	2b	น้ำตาล	0	2b	น้ำตาล	0	2b	น้ำตาล	0
15	3.05a	น้ำตาล	0	3.05a	น้ำตาล	0	2.15ab	น้ำตาล	0
20	2.15b	น้ำตาล	0	2.15b	น้ำตาล	0	1.3c	น้ำตาล	0
CV (%)	1.87			2.3			1.84		

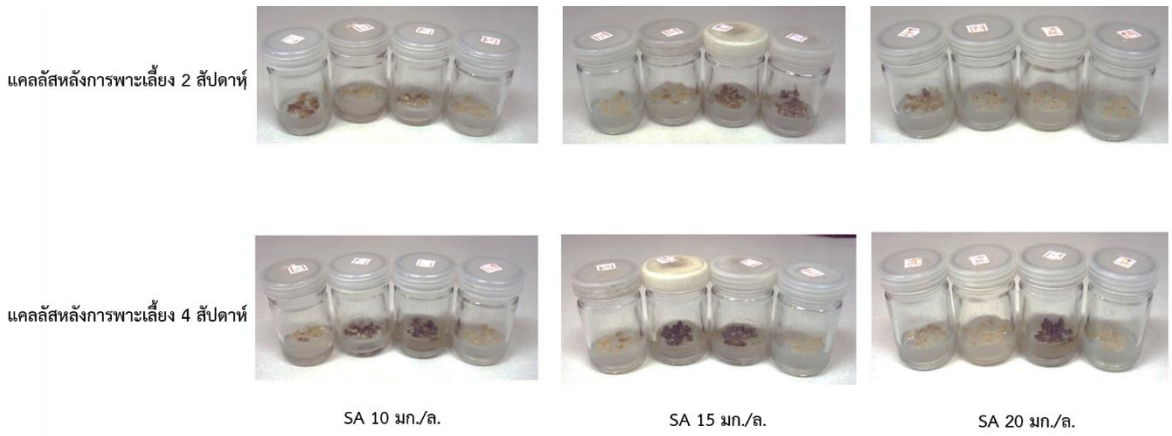
Mean in the same column followed by different lowercase was significantly different at the 5% level of probability by DMRT.
*=Significant at p < 0.05, **=Significant at p < 0.01 ns=not significant



ภาพที่ 4 การเพิ่มปริมาณหน่ออ่อนและชักนำรากอ้อยคั้นน้ำพันธุ์กลายจากการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารสังเคราะห์ดัดแปลง MS ร่วมกับ BA 2 มก./ล.



ภาพที่ 5 การเพาะเลี้ยงแคลลัสบนสูตรอาหารสังเคราะห์ดัดแปลง MS ร่วมกับสารก่อกลายพันธุ์ Thidiazuron (TDZ) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15 มก./ล. เป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์



ภาพที่ 6 การเพาะเลี้ยงแคลลัสบนสูตรอาหารสังเคราะห์ดัดแปลง MS ร่วมกับสารก่อกลายพันธุ์ Sodium azide (SA) ที่ระดับความเข้มข้น 10,15 และ 20 มก./ล. เป็นระยะเวลา 2 และ 4 สัปดาห์

4. สรุปผลการทดลอง

1. การชักนำแคลลัสจากใบอ่อนอ้อยคั้นน้ำพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ได้จากสูตรอาหารแข็งสังเคราะห์ดัดแปลง MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 5 มก./ล. และ น้ำมะพร้าว 10 % ในสภาพการเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิและในที่มืดเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 4 สัปดาห์

2. สารเคมีก่อกลายพันธุ์ SA ที่ระดับความเข้มข้น 5 มก./ล. ในอาหารสังเคราะห์ดัดแปลง MS สามารถชักนำการก่อกลายพันธุ์ของแคลลัสอ้อยคั้นน้ำพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ที่ผ่านการ subculture อย่างน้อย 6 ครั้ง ซึ่งเป็นการสร้างการกลายพันธุ์ของเซลล์พืชเบื้องต้นก่อนการใช้สารเคมีชักนำ และสามารถชักนำหน่ออ่อนอ้อยได้ หลังการเพาะเลี้ยง 5 สัปดาห์ และได้หน่ออ่อนอ้อยจำนวนมากหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

5. เอกสารอ้างอิง

[1] Abhilasha, P., and Pal, U. (2018). Comparison of different preservation techniques on quality storability of sugarcane juice. Int. *International journal of pure and applied bioscience*, 6, 339–352.

[2] Arshad, R. N., Abdul-Malek, Z., Roobab, U., Qureshi, M. I., Ahmad, M. H., Malik, N., Bekhit, A. E. D., Liu, Z. W., and Aadil, R. M. (2021). Pulsed electric field: A potential alternative towards a sustainable food processing. *Trends in Food Science Technology*, 111, 43–54.

[3] Kaavya, R., Pandiselvam, R., Kothakota, A., Priya, E.B., and Prasath, V.A. (2019). Sugarcane juice preservation: A critical review of the state of the art and way forward, *Sugar Technology*, 21, 9–19.

[4] Begum, M. K., Arefin, M. S., Islam, M. S. and Islam, M. J. (2015). Preservation of Sugarcane Juice Using Herbal Clarificant. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 4(5), 530-534.

[5] Dhansu, P., Ram, B., Singh, A. K., Tomar, S. K., Karuppaiyan, R., Kumar, R., Chhabra, M. L., Singh, A., Raja, A. K., Kaushik, P., and Pandey, S. K. (2023). Different Treatments for Sugarcane Juice Preservation. *Foods*, 12, 311.

[6] Ivana, M. G. A., Ana, C. R., Fabio, A. G., and Rodrigo, P. (2020). The shelf life of standardized sugarcane juice stored under refrigeration. *The Journal of Food Science and Technology*, Campinas, 40(1), 95-101,

[7] Arif, S., Batool, A., Nazir, W., Khan, R. S., and Khalid, N. (2019). Physiochemical characteristics nutritional properties and health benefits of sugarcane juice, Non-Alcoholic Beverages. *Science Beverages*, 6, 227–257.

[8] Kinza, M., Brera, G. N., Rai, N. A., Ume, R., Bilal, Y., Muhammad M. A. N. R., Rana, M. A., and Salam A. I. (2022). Potential impact of ultrasound, pulsed electric field, high-pressure processing and microfludization against thermal treatments preservation regarding sugarcane juice (*Saccharum officinarum*), *Ultrasonics Sonochemistry,* 90, 1-14.

[9] Chauhan, O. P., Singh, D., Tyagi, S. M., and Balyan, D. K. (2002). Studied on preservation of sugarcane juice. *International Journal of food properties*, 5(1), 217–229.

10] Khare, A., Lal, A. B., Singh, A. and Singh, A. P. (2012). Shelf life enhancement of sugarcane juice. *Croatian. Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 7(3–4), 179–183.

[11] Kanjana Kirasak[1], Pakpoom Thinkham[2], Sangdaun Chanachai[2] and Theerarat Chinnasaen[2]. (2022). *Annual report*. Khon Kaen Field Crop Research Center.

[12] Mayerni, R., Satria, B., Wardhani, D. K. and SROS, C. (2020). Effect of auxin (2,4-D) and cytokinin (BAP) in callus induction of local patchouli plants (*Pogostemon cablin* Benth.). *Earth and Environmental Science*, 583, 1-6.

[13] Sadat, S., Soltani, H. M., Mojadam, M. and Marashi, S. K.. (2013). Somaclonal variation and the study of its isozyme electrophoretic pattern in sugarcane variety NCO310. *Academic Journals*, 8(46), 5814-5820.

[14] Sengar, R. S., Sengar, K. and Garg, S. K. (2011). Biotechnological approaches for high sugarcane yield. *Plant Sciences Feed*, 1(2), 101-111.

[15] Lauren, A. E. E., Ryland, T. G., Jerrin, M. R. V., Susan, J. M., and Praveen, K. S. (2020). The Morphoregulatory Role of Thidiazuron: Metabolomics-Guided Hypothesis Generation for Mechanisms of Activity. *Biomolecules*, 10(9), 1-28.

[16] Al-Qurainy, F., and Khan, S. (2009). Mutagenic effects of sodium azide and its application in crop improvement. *World Applied Sciences Journal*, 6(12), 1589-1601.

[17] Khan, S., Al-Qurainy, F., and Anwar, F. (2009). Sodium azide: a chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants. *Environment We International Journal Science Technology*, 4, 1-21.

[18] Aras, T., Metin, T., and Kamil, H. (2022). Mutagenic effects of sodium azide on in vitro mutagenesis, polymorphism and genomic instability in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Biology Reports*, 49(11), 10165-10174.

[19] Thomas, G., Claire, K., Claude, P., Hubert, G., David M. R., and Trevor, A. T. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 32(4), 272-289.

[20] Maame, A. D. M., Naalamle, A., E. B. (2016). Influence of BA and IBA or NAA Combinations on Micropropagation of *Cryptolepis sanguinolenta*. *American Journal of Plant Sciences*, 7(3), 572-580.