บทความวิจัย (Research Article)

การเจริญเติบโตของมันจาวพร้าวในสภาพทำเทียมความเข้มข้นของแมนนิทอลแตกต่างกัน

นุชจรี สิงห์พันธ์*, สุรีภรณ์ ยอดดี

In vitro growth of *Dioscorea alata* L. by different concentrations of mannitol

Nootjaree Singphan*, Sureepon Yoddee

Department of Agricultural Science, Faculty of Agricultural Technology and Industrial Technology, Phetchabun Rajabhat University, Phetchabun Province 67000

*Correspondence to: nootjareetudses@gmail.com

Naresuan Phayao J. 2020;13(1):21-25.

Received; 15 October 2019; Revised: 21 April 2020; Accepted: 24 April 2019

บทคัดย่อ

การศึกษามุ่งหมายกำหนดหาการเจริญเติบโตของมันจาวพร้าวในสภาพทำเทียม ร่วมกับการเติมสารแมนนิทอลระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เพื่อศึกษาสูตรอาหารเหมาะสมในการชะลอการเจริญเติบโตสำหรับการเก็บรักษาพันธุ์มันจาวพร้าวในสภาพทำเทียม นำเนื้อเยื่อบริเวณข้อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS [3] ร่วมกับการเติมสารแมนนิทอลระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ ร้อยละ 0 1 2 และ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพาะเลี้ยง ณ อุณหภูมิ 25 ±2 องศาเซลเซียส ให้แสงนาน 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ เพาะเลี้ยงนาน 90 วัน โดยไม่มีการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ บันทึกผลการทดลอง จำนวนยอด จำนวนข้อ จำนวนใบ เปอร์เซ็นต์การเกิดราก และความสูงของต้น จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมันจาวพร้าวบนอาหารแข็งสูตร MS เติมสารแมนนิทอลระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 ส่งผลให้ จำนวนยอด เปอร์เซ็นต์การเกิดราก และความสูงของต้นน้อยสุด ในขณะที่การเติมแมนนิทอลระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 ส่งผลให้จำนวนข้อ และจำนวนใบน้อยสุด ตามลำดับ

คำสำคัญ: การเจริญเติบโต, แมนนิทอล, มันจาวพร้าว

Abstract

The study was aimed to determine *in vitro* growth of *Dioscorea alata* L. by different concentrations of mannitol for the optimum medium on slowing growth for conservation of *D. alata* L. *in vitro*. Nodal segments were cultured on solid MS (Murashige and skoog, 1962) with the addition of mannitol at different concentrations of 4 levels: 0, 1, 2 and 3 % (w/v) of culture at a temperature of 25 ± 2 °C light for 16 hours a day, the light intensity of 2,500 lux cultured for 90 days without any subculture. Number of shoots, nodes and leaves per plant, percentage of root formation, and shoot length were recorded. The results investigated that 2% (w/v) mannitol was obtained the lowest of number of shoots per plant, percentage of root formation, and shoot length. While, 3% (w/v) of mannitol gave the lowest of number of nodes and leaves, respectively.

Keywords: Slowing growth, mannitol, *Dioscorea alata* L.

สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ จังหวัดเพชรบูรณ์ 67000

บทนำ

มันจาวพร้าวเป็นพืชมีหัววงศ์กลอย (Dioscoreaceae) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dioscorea alata* L. เป็นไม้เลื้อย รากสีชมพู เถาเป็นสันเหลี่ยม มีครีบ ลำต้นเลื้อยพันไปทางขวา ไม่มีหนามแต่บางครั้งเป็นปุ่มปม หรือโคนเป็นรอยหยาบ ปรากฏหัวขนาดเล็กตามซอกใบ และหัวใต้ดินขนาดใหญ่ สีน้ำตาล เนื้อสีขาวครีม รูปทรงหลายแบบ ยาวตรงหรือกลม ส่วนใบเป็นใบเดี่ยว รูปหัวใจ มันจาวพร้าวใช้ประโยชน์หลายรูปแบบ อย่างเช่น ประกอบอาหารคาวและของหวาน มีสารอาหารสูงประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ฟอสฟอรัส แคลเซียม เบต้าแคโรทีน โปรแทสเซียม วิตามิน และกรดโฟลิก [1]

ปัจจุบันระบบนิเวศน์ถูกทำลายไปอย่างรวดเร็ว พืชหลายชนิดสูญหายไป การเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพทำเทียมมีระยะเวลาในการเก็บรักษาระยะเวลาสั้น ระยะเวลาปานกลาง และระยะเวลายาว ซึ่งการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมอีกวิธีหนึ่งซึ่งจัดเป็นการเก็บรักษาในระยะยาว เนื้อเยื่อจะถูกเก็บรักษา ณ อุณหภูมิต่ำมากถึง -196 องศาเซลเซียส โดยเก็บรักษาในไนโตรเจน เหลว (liquid nitrogen) เนื่องจากการเก็บรักษาวิธีนี้เป็นการเก็บตัว ณ อุณหภูมิต่ำมาก อันตรายเกิดกับเนื้อเยื่อคือ การเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์และทำให้เซลล์แตก จำเป็นต้องมีการศึกษากระบวนการและวิธีการละลายน้ำแข็ง โดยไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ และต้องสามารถชักนำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อซึ่งเก็บรักษา พัฒนาขึ้นมาเป็นต้นสมบูรณ์ได้อีกด้วย [2]

สำหรับเทคนิค minimal growth เป็นการเก็บรักษาในระยะสั้นหรือระยะปานกลาง ประมาณ 2 เดือน ถึง 2 ปี ซึ่งสามารถช่วยให้เนื้อเยื่อมีอัตราการเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ แม้จะได้รับสภาพหรือปัจจัยต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงอย่างเต็มที่ วิธีการเลือกนำมาใช้ในการลดการเจริญเติบโตของพืช การเติมสารลดการเจริญเติบโต (slowing growth) เป็นสารชะลอการแบ่งเซลล์ และการยืดตัวของเซลล์บริเวณใต้ปลายยอดเป็นผลทำให้พืชสูงน้อยกว่าปกติ และเติบโตน้อยสุด (minimal growth) ข้อดี คือ การประหยัดพื้นที่ และแรงงาน สะดวกในการควบคุมสภาพแวดล้อม สามารถชะลอหรือหยุดการเจริญของเนื้อเยื่อพืชชั่วคราว เพื่อการเก็บรักษาจนกว่าจะนำไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชในสภาพทำเทียม (*in vitro*) จะช่วยลดความเสี่ยงต่อการสูญเสียสายพันธุ์ โดยมีการศึกษาสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS) [3] ร่วมกับการเพิ่มความดันออสโมติกโดยเติมสารแมนนิทอล ซึ่งเป็นการชะลอการเจริญเติบโตพืชสามารถสงวนรักษาพันธุกรรมพืชวิธีหนึ่ง พบในพืชสมุนไพร เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายชนิด ได้แก่ สะระแหน่ สมุนไพร อีหรุด และหญ้าหวาน เป็นต้น [4-7]

การชะลอการเติบโตด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขึ้นกับหลายปัจจัย กล่าวคือ การเพาะเลี้ยง ณ อุณหภูมิต่ำ การลดปริมาณสารอาหารเพาะเลี้ยง [8] สำหรับแมนนิทอล (mannitol) เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ คุณสมบัติช่วยรักษาสภาพสมดุลภายในและภายนอกเซลล์ เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนของตัวทำละลาย (osmosis) อันเป็นกลไกการลำเลียงสารเข้าสู่เซลล์ ผลเกิดแรงดันเคลื่อนตัวทำลายเพิ่มขึ้น เป็นผลให้สารอาหารเข้าสู่เซลล์ยากขึ้น และการเติบโตของพืชลดลง [9,10] สำหรับวัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อหาสูตรอาหารเหมาะสมในการชะลอการเจริญเติบโตของมันจาวพร้าวเพื่อเป็นข้อมูลในการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชวงศ์นี้ในสภาพทำเทียม

วัสดุและวิธีการ

คัดเลือกต้นอ่อนมันจาวพร้าวในสภาพทำเทียมอายุ 4 เดือน เลือกต้นแข็งแรง ตัดแต่งข้อยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับแมนนิทอลความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับคือ ร้อยละ 0, 1, 2 และ 3 (w/v) ตามลำดับ ทุกสูตรเติมร้อยละ 0.1 ผงถ่านปลุกฤทธิ์ (activated charcoal) และร้อยละ 1 ผงวุ้น ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 5.7

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design - CRD) รวมทั้งสิ้น 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น เพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงนาน 90 วัน บันทึกข้อมูลประกอบด้วย จำนวนยอด (นับยอดเฉพาะยอดยาว 1 ซม.) จำนวนข้อ (นับข้อเฉพาะข้อยาว 0.5 ซม.) จำนวนใบ (นับเฉพาะใบคลี่

เต็มที่) ร้อยละการเกิดราก และความสูงต้น (ความสูงต้นวัดจากเหนือรากถึงปลายยอด)

จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ Analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบ ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยโปรแกรมสำเร็จรูป

ผลการศึกษา

เมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณข้อของต้นอ่อนของมันจาวพร้าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลแตกต่างกัน 4 ระดับคือ ร้อยละ 0, 1, 2 และ 3 (w/v) ในสภาพทำเทียม เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 90 วัน โดยไม่มีการเปลี่ยนถ่ายอาหาร พบว่า เนื้อเยื่อบริเวณข้อของต้นอ่อนของมันจาวพร้าวมีการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยง ดังนี้

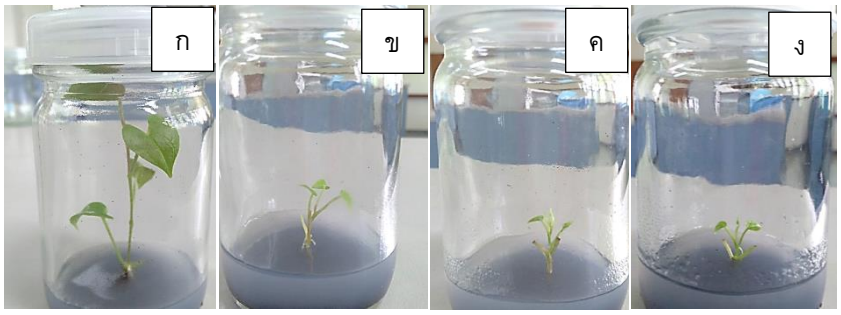
อาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS เติมแมนนิทอลความเข้มข้นร้อยละ 1 2 และ 3 (w/v) ส่งผลให้จำนวนข้อ จำนวนใบ และความสูงต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS ไม่เติมแมนนิทอล การเติมแมนนิทอลระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 (w/v) ส่งผลให้จำนวนข้อ และจำนวนใบต่ำสุด เท่ากับ 1.31 ± 0.17 ข้อ และ 1.50 ± 0.50 ใบ ตามลำดับ สำหรับการเติมแมนนิทอลระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 (w/v) นั้นส่งผลให้ความสูงต้นต่ำสุดเท่ากับ (10.68 ± 0.56 มม.) (**ตาราง 1**)

ขณะที่ทุกระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลส่งผลให้จำนวนยอดและร้อยละการเกิดรากไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) โดยรวมอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS เติมแมนนิทอลความเข้มข้นต่างๆ สามารถชะลอการเติบโตเกี่ยวกับจำนวนยอด ข้อ ใบ ร้อยละการเกิดราก และความสูงต้น (**ตาราง 1**) **(รูป 1)**

ตาราง 1 ค่าเฉลี่ยจำนวนยอด ข้อ และใบ ร้อยละการเกิดราก และความสูงต้น เพาะเลี้ยงด้วยสารอาหารแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงนาน 90 วัน

ความเข้มข้นของแมนนิทอล (%, w/v)	จำนวนยอด (ยอด)	จำนวนข้อ (ข้อ) *	จำนวนใบ (ใบ) *	ร้อยละการเกิดราก	ความสูงต้น (มม.) *
0	2.75 ± 1.09	2.42 ± 0.38^{a}	2.83 ± 0.29^{a}	56.19 ± 38.37	36.75 ± 3.68^{a}
1	2.83 ± 0.76	1.33 ± 0.33^{b}	2.06 ± 0.59^{ab}	36.50 ± 5.50	14.56 ± 2.30^{b}
2	2.08 ± 0.37	1.47 ± 0.50^{b}	1.87 ± 0.23^{b}	36.50 ± 5.50	10.68 ± 0.56^{b}
3	2.57 ± 0.28	1.31 ± 0.17^{b}	1.50 ± 0.50^{b}	38.69 ± 10.76	10.72 ± 1.31^{b}

* นัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)



รูป 1 การเจริญเติบโตของมันจาวพร้าวเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS เติมสารแมนนิทอลระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงนาน 90 วัน

ก) แมนนิทอลความเข้มข้นร้อยละ 0 ข) แมนนิทอลความเข้มข้นร้อยละ 1 (w/v)

ค) แมนนิทอลความเข้มข้นร้อยละ 2 (w/v) และ ง) แมนนิทอลความเข้มข้นร้อยละ 3 (w/v)

วิจารณ์

หลังจากย้ายเนื้อเยื่อบริเวณข้อมันจาวพร้าวลงเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร MS เติมสารแมนนิทอลระหว่างร้อยละ 2 ถึง 3 (w/v) สามารถช่วยชะลอการเติบโตของมันจาวพร้าว ทั้งจำนวนยอด ข้อและใบ ร้อยละการเกิดราก และความสูงต้น เนื่องด้วยแมนนิทอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ คุณสมบัติช่วยรักษาสภาพสมดุลภายในและภายนอกเซลล์ เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนของตัวทำละลาย (osmosis) อันเป็นกลไกการลำเลียงสารเข้าสู่เซลล์ ผลเกิดแรงดันเคลื่อนตัวทำลายเพิ่มขึ้น เป็นผลให้สารอาหารเข้าสู่เซลล์ยากขึ้น และการเติบโตของพืชลดลง [9,10]

การศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาการชะลอการเจริญเติบโตของอ้อยปลูกและอ้อยป่าในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าความสูงต้นของทุกสายพันธุ์จะลดลง เมื่อความเข้มข้นของแมนนิทอลเพิ่มขึ้น แมนนิทอลเป็นสาร osmoticum เมื่อผสมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่งผลทำให้ความดันออสโมติกของอาหารสูงขึ้นซึ่งเป็นผลให้การดูดซับไอออนของรากผิดปกติ ดังนั้นการเจริญเติบโตของพืชจึงลดลง [11] เช่นเดียวกับการศึกษาการเก็บรักษาพันธุ์กรรมเอื้องแซะหลวงในสภาพปลอดเชื้อ สำหรับการใช้น้ำตาลแมนนิทอล พบว่าระดับความเข้มข้น 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ความสูงไม่แตกต่างกัน แต่เตี้ยกว่าระดับความเข้มข้น 0 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ [12] รวมถึงการศึกษาผลการใช้แมนนิทอล ในการเก็บรักษาพันธุ์เจตมูลเพลิงแดง พบว่า แมนนิทอลสามารถชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนที่เจริญจากตาข้างข้อได้ โดยเฉพาะความสูงของต้นจะลดลงในอาหารมีสารควบคุมการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวนยอดของต้นอ่อนมีแนวโน้มลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารมีแมนนิทอลความเข้มข้น 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ต้นอ่อนยังคงมีชีวิตในอาหารทุกสูตรสามารถเจริญเติบโตให้ยอดใหม่ได้เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ [13]

ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมันจาวพร้าวบนอาหารแข็งสูตร MS เติมสารแมนนิทอลระดับความเข้มข้น ร้อยละ 2 ส่งผลให้จำนวนยอด เปอร์เซ็นต์การเกิดราก และความสูงของต้นต่ำสุด ในขณะที่แมนนิทอลระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 ส่งผลให้จำนวนข้อ และจำนวนใบต่ำสุด เมื่อระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลเพิ่มขึ้นเป็นผลให้การเจริญเติบโตของการเกิดยอด ข้อ ใบ ราก ความสูงต้นลดลง ดังนั้น สารละลายแมนนิทอลจึงเหมาะสมสำหรับการนำมาเพาะเลี้ยงมันจาวพร้าวเพื่อการเก็บรักษาพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ อายุการเก็บรักษาในระยะเวลา 90 วัน โดยไม่มีการย้ายหรือเปลี่ยนอาหารใหม่

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ผู้ให้การสนับสนุนทางการเงิน ผ่านทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2560 ประเภทสร้างสะสมองค์ความรู้ที่มีศักยภาพ (PCRU_2560_NO01)

เอกสารอ้างอิง

1. Makiyah S N N, Djati M S. Potency of purple yam (*Dioscorea alata* L.) as an immune-modulatory agent. Berkala Kedokteran. 2018; 14(1):89-98.
2. Bahadur B, Rajam MV, Sahijram L, Krishnamurthy KV. *In vitro* conservation of plant germplasm. Plant Biology and Biotechnology Volume II: Plant Genomics and Biotechnology, Edition: 1st, Chapter, Publisher: Springer Veralag, New York. 2015; p. 417-443.
3. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plantarum. 1962;15 (3):473-497.
4. Khalid AK, Weiming C. The effects of mannitol and salinity stresses on growth and biochemical accumulations in lemon balm. Acta Ecol Sinica. 2011; 31(2):112-120.
5. Mahmoud AHM, Taghreed AI. Enhanced *in vitro* production of *Ruta graveolens* L. coumarins and rutin by mannitol and ventilation. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2012;111(3): 335-343.

6. Sabah MH, Kadhim MI, Shatha IY. Effect of shock and elevated levels of mannitol on callus growth, regeneration and proline accumulation in *Ruta graveolens* cultures. Int J Curr Microbiol App Sci. 2014;3(11):479-488.
7. Matin G, Danial K, Gholamreza B. Effect of mannitol on some morphological characteristics of *in vitro stevia rebaudiana* Bertoni. Biharean Biol. 2017;11(2):94-97.
8. Lersrutaiyotin R, Roongruengchanchai N, Chindonnirat J, Burikam S, Wongmanirot M. Growth of sugarcane plantlets on media limiting concentration of inorganic nutrient and growth promoter supplement. Kasetsart J Nat Sci. 1993;27:4-8.
9. Golmirzaie A, Toledo J. Noncryogenic, long-term germplasm storage. In: Hall RD. editor. Methods in Molecular Biology, Vol. 111: Plant cell culture protocols. Totowa: Humana Press Inc. 1999; p. 95-101.
10. Helena L, Dick V. Uptake of mannitol from the media by in vitro grown plants. Plant Cell Tissue Organ Cult. 1996;45(2):103-107.
11. Chanprame S. Growth suppression of sugarcane and wild cane *in vitro* culture. Proceedings of 29th Kasetsart University Annual Conference: Plants; 1991 Feb 4-7; Bangkok, Thailand; 1991:575-581.
12. Pornpan S. *In vitro* Conservation of *Dendrobium scabrilingue* Lindl. Master of Science in Horticulture. Maejo University; 2006. 121 p.
13. Charoensub R, Phansiri S. *In vitro* conservation of rose coloured leadwort: Effect of mannitol on growth of plantlets. Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference: Plants. Agricultural Extension and Communication; 2004 Feb 3-6; Bangkok, Thailand; 2004:553-559.