

# การพัฒนาเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้ออะเคเซียลูกผสม

## Development of *Acacia* hybrid sterilization techniques

ปัทมา ทองกอด\*, วีรศิลป์ สอนจรรยาเอกพงษ์ ธนสวัสดิ์, สุชาติ สุขพิบูลย์, เทพา ผุดผ่อง, ปวีณา บาดาล, เกษม หลุ่ยสนั่น  
\*สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900  
\*วิทยาลัยบูรณาการศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

### บทคัดย่อ

อะเคเซียลูกผสมเป็นไม้โตเร็วที่มีการปลูกในสวนป่าเพื่อพลังงานในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย วิธีการขยายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสำหรับปลูกสวนป่า คือ ใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว การฟอกฆ่าเชื้อเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบชนิดความเข้มข้น และระยะเวลาของสารฟอกฆ่าเชื้อที่ต่างกัน 6 ชุดการทดลอง ต่ออัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโต โดยใช้ตาข้างของอะเคเซียลูกผสมมาฟอกฆ่าเชื้อ และเลี้ยงบนอาหาร 1/2MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อที่ฟอกฆ่าเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การรอด การปนเปื้อน การตาย และการเจริญเติบโตที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กระบวนการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมคือ การล้างน้ำไหล 5 นาที+แอลกอฮอล์ 70% 30 วินาที+ $HgCl_2$  0.1% 10 นาที และล้างด้วยน้ำปลอดเชื้ออีก 4 ครั้ง วิธีนี้เนื้อเยื่อมีอัตราการรอดชีวิต 87% ความยาวยอด  $3.40 \pm 0.20$  ซม. ความยาวใบ  $5.04 \pm 0.70$  ซม. และมีใบ  $3.3 \pm 0.48$  ใบต่อชิ้นเนื้อเยื่อ

**คำสำคัญ:** การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, ฟอกฆ่าเชื้อ, ไม้โตเร็ว, อะเคเซีย

*Acacia* hybrid is a fast-growing tree species which plants in the forest plantation for energy in Southeast Asia, including Thailand. The efficient method for rapid propagation for forest plantation is tissue culture technology. A sterilization is one of the most important steps in tissue culture. This experiment aimed to examine the effects of type, concentration, and duration of disinfectants. Lateral buds were used as explants. The procedures for sterilization were conducted 6 treatments and cultured in 1/2MS for 4 weeks. There was significantly different all treatments in the percentage of survived, contaminated, dead explants, and growth performance ( $P < 0.05$ ). The optimal sterilization procedure was rinsing for 5 min+70%(v/v) Ethanol for 30 sec+0.1% $HgCl_2$  for 10 min and rinsing with sterile water for 4 times. The results showed 87% survival rate. The shoot length, leaf length and leaf number were  $3.40 \pm 0.20$  cm.,  $5.04 \pm 0.70$  cm. and  $3.3 \pm 0.48$  no./explant, respectively.

**Keywords:** *Acacia*, Fast-growing tree, Sterilization, Tissue culture

### คำนำ

อะเคเซียลูกผสมเป็นพันธุ์ไม้โตเร็วที่ได้รับการยอมรับว่าให้ผลผลิตดีและมีศักยภาพในการแตกหน่อได้ดี (มะลิวัลย์, 2560) สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร จึงนำอะเคเซียลูกผสมมาขยายพันธุ์เพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกสำหรับเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมพลังงานทดแทน

อย่างไรก็ตามที่ผ่านมาระบบขยายพันธุ์ไม้ อะเคเซียหรือไม้โตเร็วชนิดต่างๆ ในอดีตใช้เมล็ดเป็นหลักซึ่งมีโอกาสทำให้ต้นพืชที่ได้มีลักษณะผันแปรไปจากต้นแม่และให้ผลผลิตต่ำ (กรมป่าไม้, 2557; มะลิวัลย์ และคณะ, 2559)



ในปัจจุบันมีเทคโนโลยีและวิทยาการใหม่ๆ จึงได้เปลี่ยนมาใช้วิธีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแทน เช่นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (รังสฤษดิ์, 2540) เพื่อผลิตกล้าไม้โตเร็วที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ให้ผลผลิตดีและมีความสม่ำเสมอ และสามารถผลิตกล้าไม้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้นเพียงพอต่อความต้องการในอนาคต

การฟอกฆ่าเชื้อเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญและเป็นขั้นตอนแรกในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคและสูตรฟอกฆ่าเชื้ออะเคเซียลูกผสมจึงมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออะเคเซียลูกผสมให้ประสบความสำเร็จ โดยการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตต้นพันธุ์ปลอดเชื้อที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ที่ต้องการ เพื่อใช้ในการขยายพันธุ์และผลิตต้นกล้าขยายผลให้เกษตรกรไปปลูกเพื่อเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมพลังงานชีวภาพและเคมีชีวภาพต่อไป

### อุปกรณ์และวิธีการ



### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการฟอกฆ่าเชื้ออะเคเซียลูกผสมพบว่าเนื้อเยื่อมีเปอร์เซ็นต์การรอด การปนเปื้อน การตาย และการเจริญเติบโตที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) การฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมที่สุดคือวิธีที่ 6 ใช้สารฟอกฆ่าเชื้อ  $HgCl_2$  ความเข้มข้น 0.1% 10 นาที โดยมีกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อดังแสดงใน Fig. 1

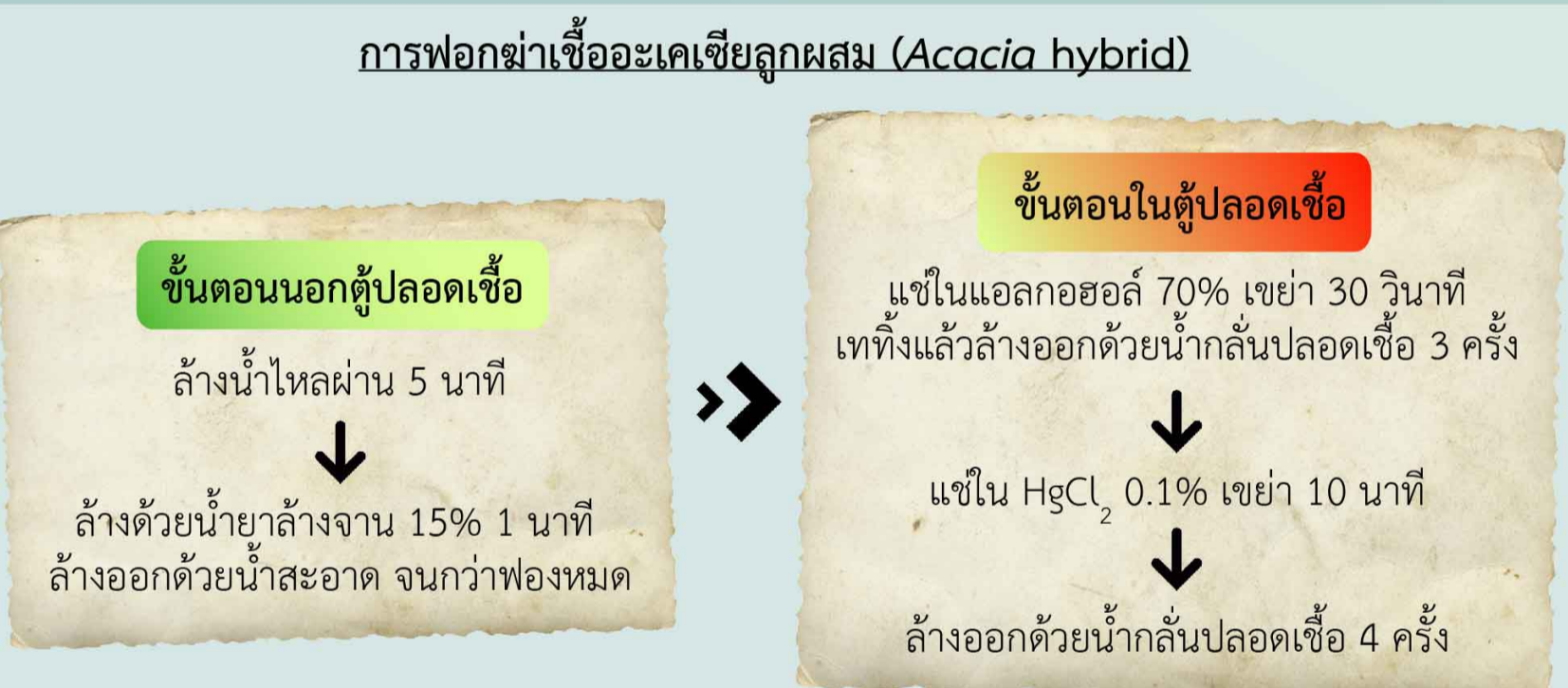


Fig. 1 Procedure of the optimum method for explant surface sterilization of *Acacia* hybrid

Table 1 Percent of survived explants, contaminated explants and dead explants after sterilization using various concentrations of sterilizing agents for 4 weeks on 1/2 MS medium.

Treatments	First sterilization (min.)	Second sterilization (min.)	%Survived explants	%Contamination explants	%Dead explants
T1	10% Clorox for 10 min.	5% Clorox for 10 min.	13	87	0
T2	15% Clorox for 10 min.	10% Clorox for 10 min.	30	70	0
T3	0.05% $HgCl_2$ for 5 min.	-	73	27	0
T4	0.05% $HgCl_2$ for 10 min.	-	80	20	0
T5	0.1% $HgCl_2$ for 5 min.	-	77	23	0
T6	0.1% $HgCl_2$ for 10 min.	-	87	13	0

Table 2 Shoot and leaf developments of *Acacia* hybrid for 4 weeks on 1/2 MS medium.

Treatments	Sterilizing agents	Shoot length (mm)	Leaf length (mm)	Leaves (no./plant)
T1	10% Clorox + 5% Clorox	$3.31 \pm 0.16^b$	$4.68 \pm 0.48^b$	$3.0 \pm 0.47^a$
T2	15% Clorox + 10% Clorox	$3.20 \pm 0.09^c$	$3.74 \pm 0.38^c$	$2.6 \pm 0.69^b$
T3	0.05% $HgCl_2$	$3.41 \pm 0.17^a$	$5.04 \pm 0.67^a$	$3.2 \pm 0.42^a$
T4	0.05% $HgCl_2$	$3.40 \pm 0.2^a$	$5.03 \pm 0.69^a$	$3.1 \pm 0.31^a$
T5	0.1% $HgCl_2$	$3.44 \pm 0.23^a$	$5.10 \pm 0.71^a$	$3.1 \pm 0.56^a$
T6	0.1% $HgCl_2$	$3.40 \pm 0.20^a$	$5.04 \pm 0.70^a$	$3.3 \pm 0.48^a$

\*Means±SD values within a column followed by the different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ )

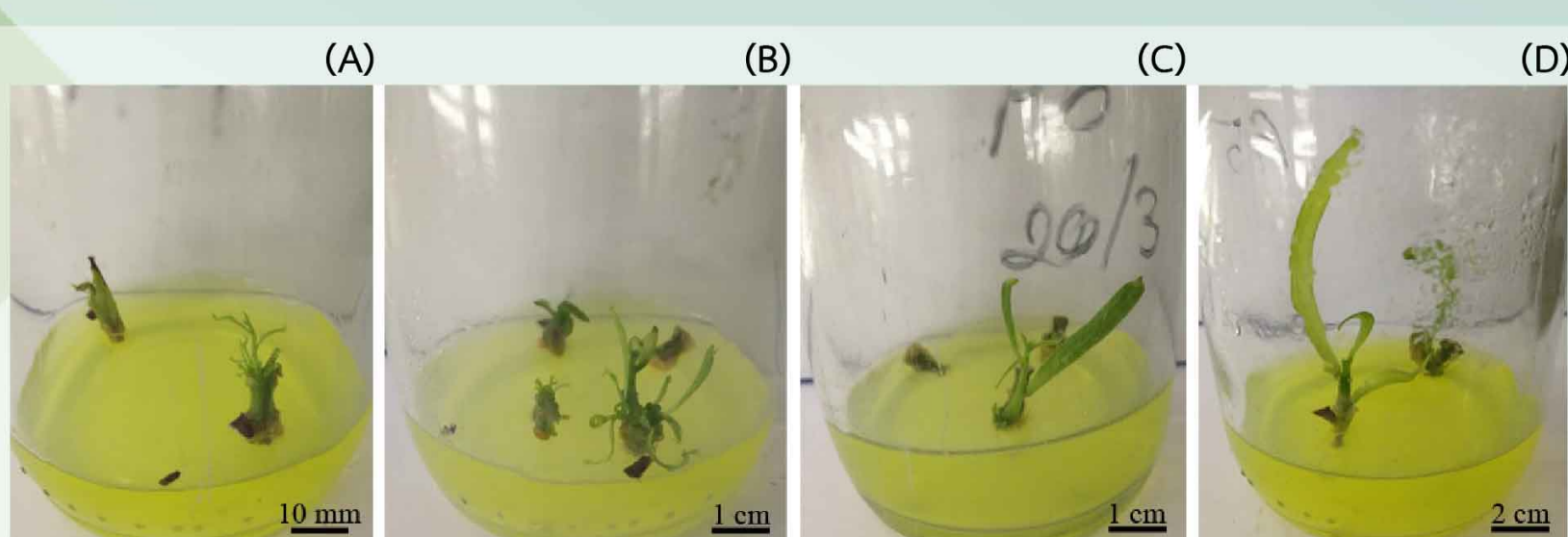


Fig. 2 *Acacia* hybrid on 1/2 MS medium after surface sterilization using 0.1%  $HgCl_2$  for 10 minutes (T6), after 1 week (A), after 2 weeks (B), after 3 weeks (C), after 4 weeks (D)

กระบวนการฟอกฆ่าเชื้อดังกล่าว สามารถลดเวลาการฟอกฆ่าเชื้อได้ถึง 2 เท่า เมื่อเทียบกับวิธีการฟอกฆ่าเชื้อ *Acacia chundra* (Rout et al., 2008) การฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่ 6 เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุด เนื้อเยื่อมีอัตราการรอดชีวิต 87% มีการปนเปื้อน จุลินทรีย์ต่ำที่สุด เพียง 13% เนื้อเยื่อมีความยาวยอด ความยาวใบ และจำนวนใบสูงสุดคือ  $3.40 \pm 0.20$  ซม.,  $5.04 \pm 0.70$  ซม. และ  $3.3 \pm 0.48$  ใบต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ รองลงมาคือสูตรที่ 4 --> 5 --> 3 --> 2 และ 1 ตามลำดับ (Table 1 และ Table 2)

อัตราการเจริญของเนื้อเยื่อมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยง (Fig. 2 และ Fig. 3) เมื่อติดตามการเจริญเติบโตพบว่าต้นอ่อนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วย  $HgCl_2$  ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน (สูตรที่ 3-6) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่เนื้อเยื่อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสูตรที่ 1 และ 2 ซึ่งใช้คลอรีนออกซ์เป็นสารฟอกฆ่าเชื้อ พบว่าความยาวยอด ความยาวใบ และจำนวนใบ มีการพัฒนาต่ำกว่าการใช้  $HgCl_2$  แม้ว่าการใช้คลอรีนออกซ์จะไม่ส่งผลให้เนื้อเยื่อถูกทำลายแต่ด้วยความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อครั้งนี้ส่งผลให้เนื้อเยื่อมีอัตราการเจริญที่น้อยลง การฟอกฆ่าเชื้อจึงควรใช้ความเข้มข้นของสารชนิดสาร และระยะเวลาที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด (ประศาสน์, 2538) เพื่อให้ได้เทคนิคและกระบวนการที่มีประสิทธิภาพสูงสุดเพื่อลดต้นทุนและระยะเวลาในการปฏิบัติงาน

### สรุป

เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้ออะเคเซียลูกผสมที่มีประสิทธิภาพสูงสุดประกอบด้วย ขั้นตอนนอกตู้ปลอดเชื้อคือล้างน้ำไหลผ่าน 5 นาที ล้างด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ 15% 1 นาที และล้างน้ำสะอาดจนกว่าฟองหมด ขั้นตอนในตู้ปลอดเชื้อคือแช่ในแอลกอฮอล์ 70% 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง แช่ใน  $HgCl_2$  ความเข้มข้น 0.1% 10 นาที เพียง 1 ครั้ง และล้างด้วยน้ำปลอดเชื้ออีก 4 ครั้ง พบอัตราการรอดชีวิต 87% มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ 13% และเนื้อเยื่อมีความยาวยอด  $3.40 \pm 0.20$  ซม. ความยาวใบ  $5.04 \pm 0.70$  ซม. และจำนวนใบ  $3.3 \pm 0.48$  ใบต่อชิ้นเนื้อเยื่อ หลังเพาะเลี้ยงในอาหาร 1/2MS 4 สัปดาห์

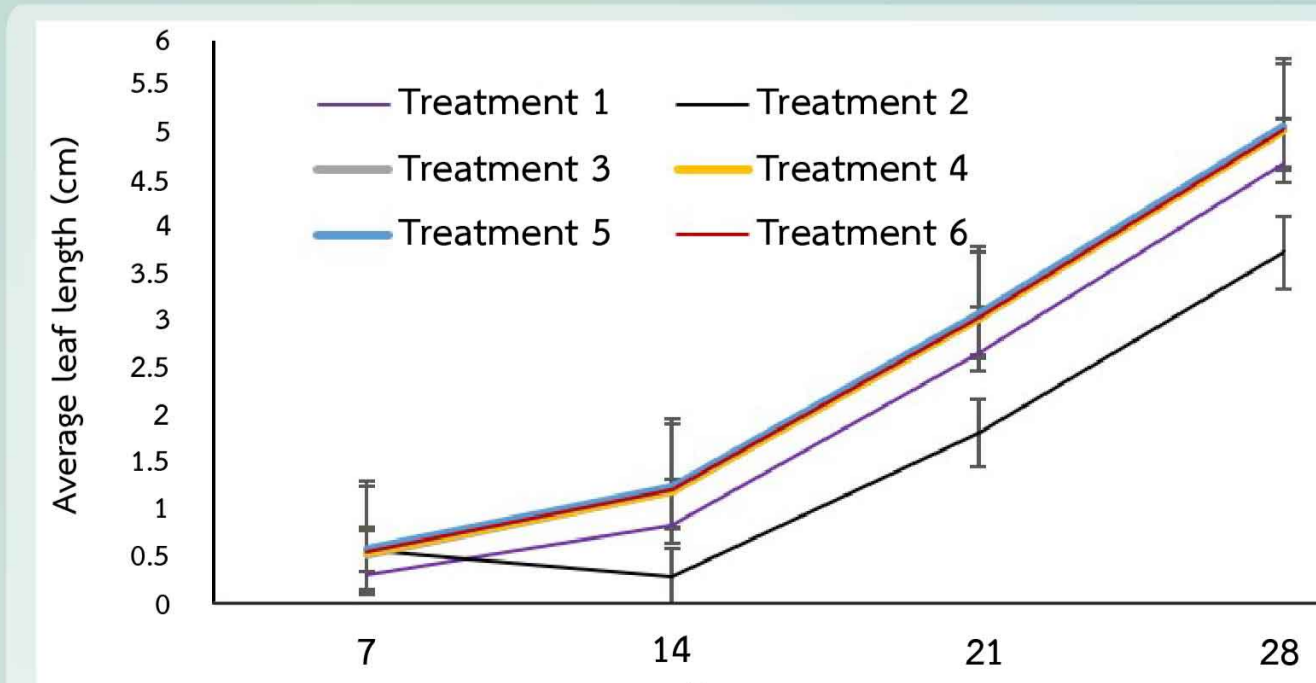


Fig. 3 Leaf development of *Acacia* hybrid after surface sterilization.