การผลิตมันเทศปลอดไวรัส SPFMV และ SPCSV โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ชฎาพร ไชยลังกา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาโรคพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

มกราคม 2562

การผลิตมันเทศปลอดไวรัส SPFMV และ SPCSV โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ชฎาพร ไชยลังกา

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อมหาวิทยาลัยเชียงใหม่เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาโรคพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
มกราคม 2562

การผลิตมันเทศปลอดไวรัส SPFMV และ SPCSV โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ชฎาพร ไชยลังกา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาโรคพืช

คณะกรรมการสอบ

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมบัติ ศรีชูวงศ์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เกวลิน คุณาศักดากุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรอุมา เรืองวงษ์

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. เกวลิน คุณาศักดากุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรอุมา เรืองวงษ์)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

18 มกราคม 2562

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เกวลิน คุณาศักดากุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คอยชี้แนะแนวทาง และให้ความช่วยเหลือแก่ข้าพเจ้าในทุกๆด้าน ตลอดจนการทำวิทยานิพนธ์ ที่ได้รับการตรวจแก้ไขจนวิทยานิพนธ์ถูกต้องสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สมบัติ ศรีชูวงศ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรอุมา เรืองวงษ์ ประธานกรรมการสอบ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาตรวจแก้ไข และให้ข้อชี้แนะแก่ข้าพเจ้าจนวิทยานิพนธ์ถูกต้องสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ Taiwan ICDF project in Royal Project Foundation (Thailand) โครงการ Gloriosa, Sweet potato Virus-free Seedling and Grape Root Stock Production Project ที่ให้การสนับสนุนทุนในการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลางสาขาวิชาโรคพืช ห้องปฏิบัติการกลางและศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืช มูลนิธิโครงการหลวง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านสถานที่ และวัสดุ อุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณ คุณศิริมาศ ชัยชม เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืช มูลนิธิโครงการหลวง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้ช่วยเหลือตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ และครอบครัว ไชยลังกา ที่ได้เลี้ยงดูอบรมสั่งสอนทั้งด้านทัศนคติ และการดำเนินชีวิต คอยให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจเสมอมา ซึ่งเป็นแรงผลักดันให้แก่ข้าพเจ้าผ่านพ้นอุปสรรคและปัญหาต่างๆมาจนถึงทุกวันนี้

ชฎาพร ไชยลังกา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตมันเทศปลอดไวรัส SPFMV และ SPCSV โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
ผู้เขียน	นางสาวชฎาพร ไชยลังกา
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)
คณะกรรมการที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. เกวลิน คุณาศักดากุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรอุมา เรืองวงษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

เก็บรวมรวมพันธุ์มันเทศจากสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ SP02 (เนื้อม่วง) และ SP08 (เนื้อเหลือง) มาปลูกภายในโรงเรือน หลังปลูก 90 วัน พบพืชแสดงอาการจุดสีเหลืองและจุดสีม่วง โรคไวรัส *Sweet patato chlorotic stunt virus* (SPCSV) และ *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) อาการใบจุดสีเหลืองและม่วงกระจายชัดเจนทั่วใบ เมื่อประเมินความรุนแรงของโรค 5 ระดับ (0-4) พบว่า ต้นมันเทศทั้งสองสายพันธุ์มีร้อยละความรุนแรงมากที่สุดที่ระดับ 2 เท่ากับร้อยละ 48 และ 45 ตามลำดับ จากการวินิจฉัยชนิดของไวรัสด้วยเทคนิคต่างๆพบว่าในการศึกษาลักษณะผิดปกติภายในเซลล์พืช สามารถพบผลึกโปรตีนแบบ cylindrical inclusions อีกทั้งเมื่อนำยอดมันเทศที่เป็นโรคเสียบยอดลงพืชทดสอบ พบว่าไวรัสสามารถถ่ายทอดโรคได้ด้วยวิธีการเสียบยอดในต้นยาสูบ (*Nicotiana glutinosa*) หลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน และเมื่อนำมาตรวจสอบชนิดของไวรัสด้วยเทคนิค PCR พบว่าตัวอย่างให้ผลบวกกับ SPFMV และ SPCSV ทั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าอาการใบจุดสีเหลืองและม่วงของมันเทศ เกิดจากการเข้าทำลายร่วมกันของไวรัสทั้งสองชนิด สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.5 มม. และ1 มม. ร่วมกับการใช้ความร้อน และไม่ใช้ความร้อน (37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน) แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS และตรวจสอบการปลอดไวรัสด้วยเทคนิค PCR พบว่าการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดมันเทศทั้งสองสายพันธุ์มีการปลอดไวรัสร้อยละ 90.9-100 อย่างไรก็ตามการใช้ความร้อนและการตัดเนื้อเยื่อเจริญขนาดเล็กที่ 0.3 มิลลิเมตรส่งผลต่ออัตราการมีชีวิตต่ำลง และจากการศึกษาการเพิ่มปริมาณมันเทศ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปลอดไวรัสในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถเพิ่มปริมาณมันเทศได้ดีที่สุดทั้งสองสายพันธุ์ โดยมีจำนวนข้อเฉลี่ย 11.1 และ 13.8 ข้อต่อต้น ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Production of SPFMV-free and SPCSV-free Sweet Potato Using Tissue Culture Techniques
Author	Miss Chadaporn Chailangka
Degree	Master of Science (Plant Pathology)
Advisory Committee	Associate Professor Dr. Kaewalin Kunasakdakul Advisor Assistant Professor Dr. On-Uma Ruangwong Co-advisor

ABSTRACT

Two varieties of sweet potato from Inthanon Royal Project Station, Chiang Mai Province were collected and named as such as SP02 (purple flesh) and SP08 (yellow flesh), were then planted under greenhouse condition. All of the sample showed viral leaf symptoms, yellow spots and purple spots symptoms were clear observed after planting for 90 days. The samples were proved by PCR method to be infected by both *Sweet patato chlorotic stunt virus* (SPCSV) and *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV). (Five severity levels of the symptoms).were recorded as a number of 0 – 4 (no symptom-servere symptoms). The disease evaluated results showed no healthy normal, the most levels found, level 2 and level 2 at 48 and 45% for SP02 and SP08, respectively. The identification of virus was diagnosed with various techniques. Firstly, the infected sweet potato cell was determined and cylindrical inclusion was found which typically formed in cytoplasm of *Potyvirus*-infected cell. Secondly, the grafting shoot transmission using infectious shoot was detected and the results revealed on leaves of *Nicotiana glutinosa* after inoculation for 30 days. Finally, molecular technology was used to diagnose SPFMV and SPCSV. Positive results for SPFMV and SPCSV in all tested sample. Thus, virus-free plantlets were produced using meristem tip cultured with and without thermotherapy. Excision of the meristem tip (0.5 and 1 mm) from the shoot and culturing on MS medium and then PCR technique were used to evaluate the virus-free plantlets. Result showed 90.9-100% of SP02 and SP08 samples proceeded through thermotherapy trials

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(plantlets were kept under 37±1 °C for 30 days) were thrived. However, smaller site excisting of the meristem with thermotherapy trials effected the decessing of plant survivals. Mass-production of virus-free plantlets were tested using various concentration of growth regulators supplemented on MS medium. After culturing for 30 days, SP02 and SP08 were produced 11.1 and 13.8 node per explant on the medium supplemented with Indole-3-Acetic Acid (IAA) at the concentration of 0.5 ppm and gibberellin (GA_3) at the concentration of 1 ppm respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		ค
บทคัดย่อภาษาไทย		ง
ABSTRACT		ฉ
สารบัญ		ซ
สารบัญตาราง		ฌ
สารบัญภาพ		ญ
บทที่ 1	บทนำ	1
บทที่ 2	ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3	อุปกรณ์และวิธีการ	17
บทที่ 4	ผลการทดลองและวิจารณ์	27
บทที่ 5	สรุปผลการทดลอง	43
เอกสารอ้างอิง		44
ภาคผนวก		48
ภาคผนวก ก	สูตรอาหารสังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	48
ภาคผนวก ข	ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	49
ประวัติผู้เขียน		62

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3.1	ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ในแต่ละกรรมวิธี	21
ตารางที่ 3.2	ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองสำหรับตรวจไวรัส SPFMV และ SPCSV	26
ตารางที่ 4.1	ระดับความรุนแรงของอาการไวรัส (0-4) ที่พบในหัวพันธุ์มันเทศสายพันธุ์ SP02 และ SP08 หลังปลูกเป็นเวลา 90 วัน	29
ตารางที่ 4.2	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศสายพันธุ์ SP02 ในอาหารในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญที่แตกต่างกันต่อการพัฒนาของ จำนวนข้อ จำนวนใบ ความยาวราก และความสูงต้นหลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน	36
ตารางที่ 4.3	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศสายพันธุ์ SP08 ในอาหารในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญที่แตกต่างกันต่อการพัฒนาของ จำนวนข้อ จำนวนใบ ความยาวราก และความสูงต้นหลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน	37
ตารางที่ 4.4	ร้อยละการมีชีวิตรอด การเจริญ และการกำจัดไวรัสของมันเทศ 2 สายพันธุ์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	43

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 2.1	ลักษณะการเจริญของมันเทศ	4
ภาพที่ 2.2	ส่วนต่างๆของต้นมันเทศ	5
ภาพที่ 2.3	รูปทรงของใบมันเทศ	6
ภาพที่ 2.4	ลักษณะการหยักของใบมันเทศ	6
ภาพที่ 2.5	จำนวนการหยักของใบมันเทศ	7
ภาพที่ 2.6	ลักษณะสีเปลือก และสีเนื้อของหัวพันธุ์มันเทศสายพันธุ์ขาวใบโพธิ์	7
ภาพที่ 2.7	ลักษณะสีเปลือก และสีเนื้อของหัวพันธุ์มันเทศสายพันธุ์มันไข่นคร	8
ภาพที่ 2.8	ลักษณะสีเปลือก และสีเนื้อของหัวพันธุ์มันเทศสายพันธุ์โอกุดหรือมันเกษตร	8
ภาพที่ 2.9	ลักษณะสีเปลือก และสีเนื้อของหัวพันธุ์มันเทศสายพันธุ์ พจ. 113-7	9
ภาพที่ 2.10	ลักษณะใบ สีเปลือก และสีเนื้อของหัวพันธุ์มันเทศสายพันธุ์ สท. 03	9
ภาพที่ 2.11	ลักษณะใบ สีเปลือก และสีเนื้อของหัวพันธุ์มันเทศสายพันธุ์ สท. 18	10
ภาพที่ 3.1	ใบมันเทศที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากไวรัสในแต่ละระดับความรุนแรง ทั้ง 5 ระดับ (ระดับ 0-4)	18
ภาพที่ 3.2	ขั้นตอนการสกัด RNA	24
ภาพที่ 4.1	ลักษณะใบ สีเปลือก และสีเนื้อของหัวพันธุ์มันเทศที่รวบรวมจากสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ สถานีวิจัยขุนห้วยแห้ง	27
ภาพที่ 4.2	ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากไวรัสบนใบมันเทศ	28
ภาพที่ 4.3	ลักษณะความผิดปกติภายในเซลล์ใบมันเทศที่แสดงอาการใบจุดสีเหลืองปนม่วง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า	30
ภาพที่ 4.4	การปลูกเชื้อมันเทศบนพืชทดสอบยาสูบใบเล็กที่แสดงอาการจุดสีเหลือง	31
ภาพที่ 4.5	การตรวจไวรัสด้วยเทคนิค PCR ด้วยในตัวอย่างมันเทศที่แสดงอาการโรคที่เกิดจากไวรัส	32

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 4.6	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนของมันเทศสายพันธุ์ SP02 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร	33
ภาพที่ 4.7	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนของมันเทศสายพันธุ์ SP08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร	33
ภาพที่ 4.8	การเจริญของต้นอ่อนมันเทศสายพันธุ์มันเทศ SP02 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญที่แตกต่างกัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	35
ภาพที่ 4.9	การเจริญของต้นอ่อนมันเทศสายพันธุ์มันเทศ SP08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญที่แตกต่างกัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	35
ภาพที่ 4.10	ลักษณะมันเทศสายพันธุ์ SP02 ที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด	39
ภาพที่ 4.11	ลักษณะต้นมันเทศสายพันธุ์ SP02 ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 25 วัน	39
ภาพที่ 4.12	ลักษณะต้นกล้ามันเทศปลอดไวรัสที่ออกปลูกในสภาพโรงเรือน เป็นเวลา 45 วัน	39
ภาพที่ 4.13	การตรวจสอบการปลอดไวรัสด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพร์เมอร์จำนวน 2 คู่ ในตัวอย่างมันเทศที่ผ่านการกำจัดไวรัสด้วยกรรมวิธีต่างๆ	42

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 1

บทนำ

มันเทศ (Sweet potato) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ipomoea batatas* (L.) Lam. จัดอยู่ในวงศ์ Convolvulaceae เป็นพืชอาหารที่สำคัญอันดับ 7 ของโลก รองจากข้าวสาลี ข้าว ข้าวโพด มันฝรั่ง ข้าวบาร์เลย์ มันสำปะหลัง มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนแถบอเมริกากลาง และอเมริกาใต้ ใช้เป็นอาหารสำหรับมนุษย์และเป็นอาหารสัตว์ได้ทั้งส่วน หัว เถา ใบ และยอดอ่อน (ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร, 2552) คุณค่าทางโภชนาการสูง ทั้งนี้ ปริมาณสารอาหารสำคัญขึ้นกับสีของเนื้อมันเทศ โดยมีเนื้อสีหลายสีตามสายพันธุ์ ได้แก่ สีขาว ครีม เหลือง ส้ม และม่วง นอกจากนี้ทางด้านอุตสาหกรรมมีการนำมาทำเป็นแป้ง จากข้อมูลการปลูกมันเทศของกรมการส่งเสริมการเกษตร ปี พ.ศ. 2558-2559 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมันเทศรวม 23,717 ไร่ ผลผลิตรวม 27,654 ตัน และผลผลิตเฉลี่ย 1,165 กิโลกรัมต่อไร่ (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2559) และจากข้อมูลทางกรมส่งเสริมการเกษตรมีเป้าหมายในการส่งเสริมการผลิตมันเทศให้มีคุณภาพดีสอดคล้องกับความต้องการในประเทศ และส่งออกไปยังต่างประเทศ แต่ปัจจุบันการผลิตมันเทศในประเทศไทยนั้นยังมีการปลูกที่ยังไม่เป็นระบบ ซึ่งมักมีการขยายพันธุ์โดยการใช้ลำต้นและเถาจากต้นเดิมซ้ำๆ โดยไม่คำนึงถึงการเข้าทำลายของแมลง และเชื้อสาเหตุโรคต่างๆที่ติดมาจากต้นเดิม เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส เป็นต้น โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสนับว่าเป็นโรคที่สำคัญต่อมันเทศเป็นอย่างมาก เนื่องจากยากต่อการจัดการเมื่อเกิดการแพร่ระบาด ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบการรายงานเกี่ยวกับโรคของมันเทศ ซึ่งเกิดจากไวรัสหลายชนิด (Adikin *et.al*., 2016) เนื่องจากการใช้ส่วนขยายพันธุ์ลำต้นและเถา จึงทำให้ไวรัสระบาดได้ง่าย มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และทวีความรุนแรงขึ้น ส่งผลให้ผลผลิตลดลงทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ โดยแนวทางการแก้ไขปัญหาดังกล่าว คือ การใช้ส่วนขยายพันธุ์ของมันเทศที่แข็งแรงปลอดไวรัสในการเพาะปลูก ซึ่งการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการผลิตมันเทศปลอดไวรัสจึงนับว่าเป็นวิธีการที่สำคัญในการผลิตท่อนพันธุ์มันเทศปลอดโรค อีกทั้งยังสามารถเพิ่มปริมาณต้นกล้ามันเทศได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น (Dugassa and Feyissa, 2011; Namanda *et al.,* 2015)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการผลิตมันเทศปลอดไวรัสและการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้ต้นกล้ามันเทศปลอดไวรัส ในระยะเวลาอันรวดเร็ว อีกทั้งงานวิจัยนี้สามารถเป็นแนวทางในการส่งเสริมกระบวนผลิตมันเทศให้มีคุณภาพและยั่งยืนของเกษตรกรผู้ผลิตมันเทศในประเทศไทยต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาอาการและวินิจฉัยโรคไวรัสของมันเทศ
2. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณของมันเทศในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
3. เพื่อศึกษาวิธีการผลิตต้นแม่พันธุ์มันเทศปลอดไวรัสด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

มันเทศ (Sweet potato) เป็นพืชในตระกูล Convolvulaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ipomoea batatas* (L.) Lam. มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนแถบอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ซึ่งเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญเป็นอันดับ 7 ของโลก รองจาก ข้าวโพด ข้าว ข้าวสาลี มันฝรั่ง มันสำปะหลังและถั่วเหลือง จากการรายงานพื้นที่ปลูกและผลผลิตของมันเทศทั่วโลกของ FAO (2014) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547-2557 พบว่า พื้นที่ที่มีการปลูกมันเทศมากที่สุดอยู่ในทวีปเอเชีย รองลงมาเป็นแอฟริกาอเมริกา โอเชียเนีย และยุโรป ตามลำดับ โดยในปี พ.ศ. 2557 มีพื้นที่ปลูกมันเทศทั่วโลก 13 ล้านไร่และผลผลิต 104 ล้านตัน โดยประเทศที่มีการผลิตมากที่สุดในโลก ได้แก่ ประเทศจีน ไนจีเรีย และยูกันดา โดยประเทศจีนมีการผลิตมากที่สุดในโลก 96 ล้านตันคิดเป็นร้อยละ 92.8 ของการผลิตมันเทศทั่วโลก มันเทศเป็นพืชหัวที่ปลูกง่าย ปลูกได้ในดินแทบทุกชนิด ไม่ว่าจะเป็นดินเหนียว ดินร่วนดินร่วนปนทราย และดินทรายริมแม่น้ำ ดินที่เหมาะสมที่สุดเป็นดินร่วมปนทรายระบายน้ำดี โดยประโยชน์ของมันเทศนั้นสามารถนำมาประกอบอาหารได้หลายชนิด ทั้งอาหารคาวและหวาน นอกจากนี้มีประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรม คือนำมาทำเป็นแป้ง และอาหารเลี้ยงสัตว์ เช่น สุกร วัวเนื้อ และวัวนม เป็นต้น (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2559) ซึ่งมันเทศนั้นเป็นแหล่งอาหารที่อุดมไปด้วยสารอาหารหลายชนิด ได้แก่ แคลเซียม วิตามินซี (ascorbic acid) เบต้าแคโรทีน (provitamin A) คาร์โบไฮเดรต และสารต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้ปริมาณสารอาหารที่สำคัญขึ้นอยู่กับสีเนื้อมันเทศด้วย ซึ่งมีหลากหลายสี ได้แก่ สีขาว ครีม เหลือง ส้ม และม่วง มันเทศที่มีเนื้อสีเหลืองและสีส้มนั้นจะมีสาร carotenoid ในระดับที่สูงเทียบเท่ากับในแครอท ซึ่งเป็นแหล่งของ provitamin A (Woolfe, 1992)

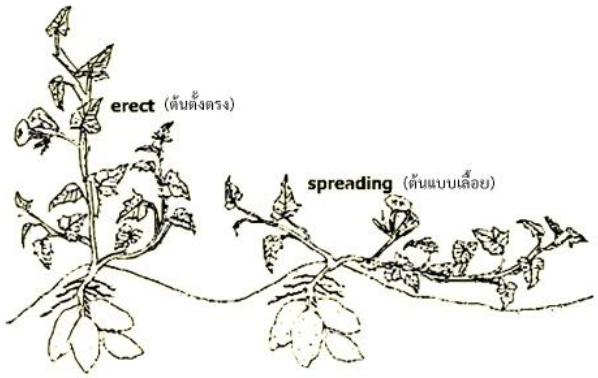
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความสำคัญของมันเทศในประเทศไทย

ในประเทศไทยสามารถปลูกมันเทศได้ทั่วทุกภาค แหล่งปลูกที่สำคัญประกอบด้วยภาคเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ พิษณุโลก เพชรบูรณ์ และสุโขทัย ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ เลย สุรินทร์ และบุรีรัมย์ ภาคกลาง ได้แก่ อยุธยา สุพรรณบุรี และปทุมธานี และภาคใต้ ได้แก่ นครศรีธรรมราช ชุมพร และปัตตานี (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2559) จากข้อมูลการปลูกมันเทศของกรมการส่งเสริมการเกษตร โดยในปี พ.ศ. 2558 – 2559 ระบุว่าประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมันเทศ 23,717 ไร่ ได้ผลผลิตรวม 27,654 ตัน และผลผลิตเฉลี่ย 1,165 กิโลกรัมต่อไร่ และมีการนำเข้ามันเทศในรูปแบบต่างๆมากขึ้นทุกปี โดยมีมูลค่าเพิ่มจาก 251.67 ล้านบาท เป็น 396.35 ล้านบาท โดยมีการนำเข้ามาจากหลายประเทศ ได้แก่ จีน อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น เกาหลี ลาว และเวียดนาม สำหรับการส่งออกมันเทศมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นกัน จากมูลค่า 1,594,030 บาท ในปี 2555 เป็น 6,365,777 บาท ในปี 2558 ประเทศไทยมีการส่งออกไปยังประเทศเกาหลีถึง 98.90 และ 99.22 เปอร์เซ็นต์ ในปี 2557 และ 2558 ตามลำดับ (กรมศุลกากร, 2559)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันเทศ

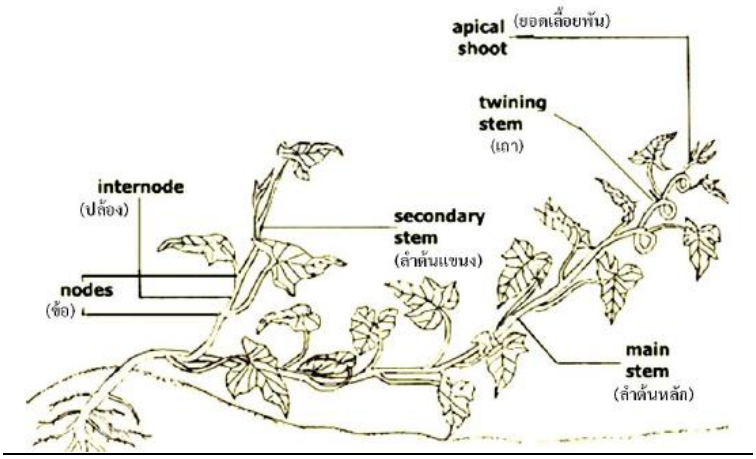
มันเทศเป็นพืชล้มลุก สามารถปลูกได้ตลอดปี โดยส่วนที่ใช้ในการปลูกคือ หัวพันธุ์ เถา หรือยอด การเจริญของต้นมันเทศนั้นสามารถเจริญได้หลายแบบ เช่น อาจยืดตั้งสูงแบบตั้งตรง หรือกึ่งตั้งตรง หรือทอดยอดในแนวนอน หรือกึ่งทอดยอด (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2559)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะการเจริญของมันเทศ

ที่มา: Huaman, 1991

ต้น (เถา) ของมันเทศ มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกยาว มีปล้อง (internode) ติดต่อกันโดยมีจำนวนปล้องขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตของลำต้นและความชื้นในดิน ลำต้นมันเทศที่ตั้งตรงนั้นจะมีความยาวประมาณ 1 เมตร ส่วนลำต้นที่เลื้อยไปตามดิน จะมีความยาวประมาณ 2-5 เมตร มันเทศบางสายพันธุ์ จะมีลำต้น 2 ลักษณะ คือ มีทั้งตั้งตรงและเลื้อยไปตามดิน ภายในต้นเดียวกัน ความยาวของปล้องระหว่าง 1.5-12 เซนติเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3-0.9 เซนติเมตร มันเทศที่มีข้อถี่จำนวนมากมีโอกาสลงหัวได้ดีกว่ามันเทศที่มีข้อห่าง (ภาพที่2.2) ลำต้นของมันเทศนั้นมีหลายสีแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ เช่น เขียว น้ำตาล เขียวจุดม่วง และม่วง มันเทศบางพันธุ์มีขนสั้นตามลำต้นหรือยอดอ่อนด้วย



ภาพที่ 2.2 ส่วนต่างๆของต้นมันเทศ

ที่มา: Huaman, 1991

ใบ ใบเรียงซ้อนกันอยู่บนลำตัน ในรูปแบบที่เรียกว่า 2/5 phyllotaxis (มี 5 ใบต่อ 2 วงรอบลำต้น)

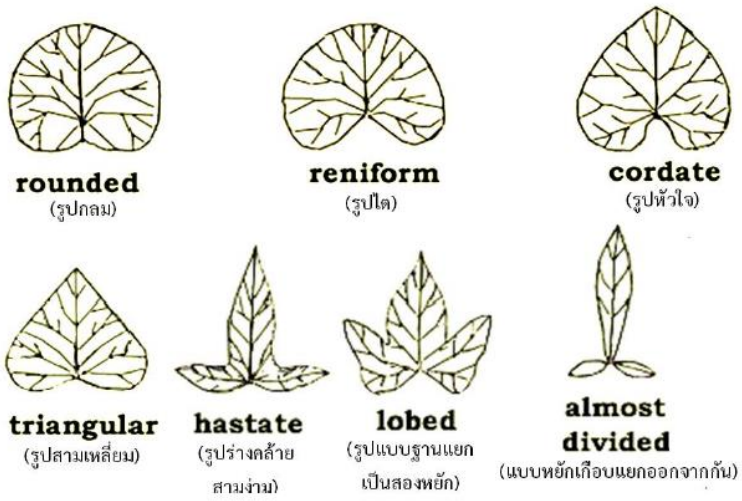
ขอบใบหรือริมใบ อาจจะมีลักษณะหยักเป็นซี่หรือเป็นลอนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ที่ฐานใบจะเว้ามี 2 หยัก (lobe) อาจเปลี่ยนเป็นเหยียดตรงหรือม้วนเป็นวงกลมก็ได้ รูปทรงของใบมันเทศมีหลายแบบ เช่น กลม (round) รูปไต (reniform) รูปหัวใจ (cordate) รูปสามเหลี่ยม (triangular) รูปร่างแหลมคล้ายสามง่าม (hastate) รูปแบบที่ฐานแยกเป็น 2 หยัก และแบบหยักเกือบแยกออกจากกัน (almost divided lobe)

การโค้งหรือการหยักของใบมันเทศ จะมีลักษณะที่แตกต่างกันไปจากเล็กน้อยจนโค้งมาก การหยักเว้าของขอบใบมันเทศแต่ละแบบ จะนับจากเส้นแขนง (vein) ทแยงของเส้นกลางใบที่แยกมาจากก้านใบจนถึงขอบใบ

รูปแบบการหยักของใบมันเทศมีหลายแบบ เช่น ไม่มีหยัก (no lateral lobes) หยักน้อยมาก (very slight) หยักน้อย (slight) หยักปานกลาง (moderate) หยักลึก (deep) และหยักลึกมาก (very deep) อย่างไรก็ตาม ใบมันเทศที่มีลักษณะเป็นแฉกหรือเป็นหยัก ๆ อาจมีหยักเล็กที่เรียกว่า teeth ด้วย

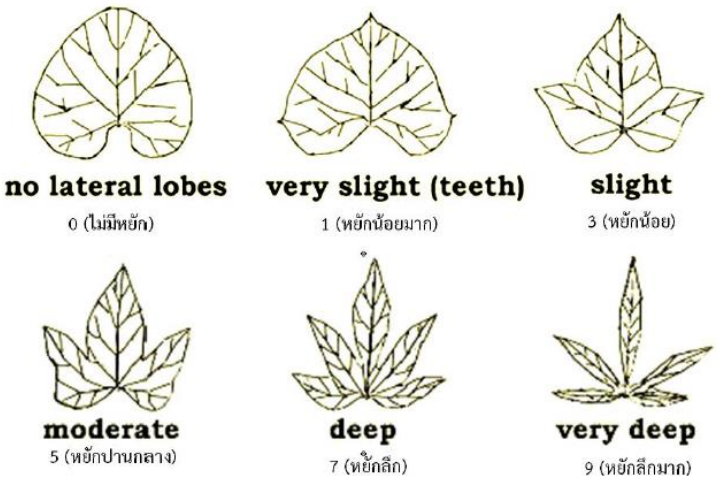
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งสามารถนับได้โดยมีจานวนหยักตั้งแต่ 1-9 หรือมากกว่า มันเทศบางพันธุ์ แม้จะอยู่บนต้นเดียวกัน จะมีรูปร่างของใบที่แตกต่างกันไปได้บ้าง (ภาพที่ 2.3-2.5)



ภาพที่ 2.3 รูปทรงของใบมันเทศ

ที่มา: Huaman, 1991



ภาพที่ 2.4 ลักษณะการหยักของใบมันเทศ

ที่มา: Huaman, 1991

ภาพที่ 2.5 จำนวนการหยักของใบมันเทศ

ที่มา: Huaman, 1991

<u>พันธุ์ของมันเทศ</u>

มันเทศที่ปลูกในประเทศไทยระยะแรก ส่วนใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศโดยหน่วยงานราชการ และ ปลูกทดสอบจนได้พันธุ์ที่เหมาะสม ปรับตัวและให้ผลผลิตดี ก่อนเผยแพร่ไปสู่เกษตรกรและมีการปลูกต่อเนื่องเป็นเวลานาน จนเป็นพันธุ์พื้นเมืองของแต่ละท้องถิ่น (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2559) สายพันธุ์มันเทศที่มีความสำคัญปลูกมากในประเทศไทย เมื่อแบ่งกลุ่มตามสีเนื้อ มีพันธุ์ต่าง ๆ ดังนี้

1. กลุ่มเนื้อสีขาว

1.1 พันธุ์แม่โจ้ หรือพันธุ์เชียงใหม่ หรือพันธุ์ปากช่อง หรือมันแดง เป็นพันธุ์ท้องถิ่นของจังหวัดเชียงใหม่ หัวมีผิวสีแดง รูปทรงยาวรี

1.2 พันธุ์อีดก เป็นพันธุ์ท้องถิ่นของจังหวัดสุโขทัย หัวมีผิวสีน้ำตาล รูปทรงยาวรี เนื้อสีขาว

1.3 พันธุ์ พจ.129-6 เป็นมันเทศที่ปรับปรุงพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร กรมวิชาการเกษตร ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 เป็นต้นมา จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์อีดกกับพันธุ์ UPL SP-4 หัวมีผิวสีขาว รูปทรงไข่ ตอนปลายกว้าง

2. กลุ่มเนื้อสีเหลือง

2.1 พันธุ์ขาวใบโพธิ์ เป็นพันธุ์ท้องถิ่นของจังหวัดพัทลุง หัวมีผิวสีขาว รูปทรงแบบไข่ เนื้อสีเหลือง

ภาพที่ 2.6 ลักษณะสีเปลือก และสีเนื้อของหัวพันธุ์มันเทศสายพันธุ์ขาวใบโพธิ์

ที่มา: สถาบันวิจัยพืชสวน, 2559

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 พันธุ์มันไข่นคร เป็นพันธุ์ท้องถิ่นของจังหวัดนครศรีธรรมราช หัวมีผิวสีแดง รูปทรงยาวรี เนื้อสีเหลือง

ภาพที่ 2.7 ลักษณะสีเปลือก และสีเนื้อของหัวพันธุ์มันเทศสายพันธุ์มันไข่นคร
ที่มา: สถาบันวิจัยพืชสวน, 2559

2.3 พันธุ์มันไข่ หรือพันธุ์มันไข่สุโขทัย เป็นพันธุ์ท้องถิ่นของจังหวัดสุโขทัย หัวมีผิวสีน้ำตาล รูปทรงยาวรี เนื้อสีเหลืองส้ม

2.4 พันธุ์โอกุดหรือมันเกษตร เป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักแห่งเอเชีย (Asian Vegetable Research and Development Center: AVRDC) หัวมีผิวสีแดง รูปไข่ เนื้อสีเหลือง

ภาพที่ 2.8 ลักษณะสีเปลือก และสีเนื้อของหัวพันธุ์มันเทศสายพันธุ์โอกุดหรือมันเกษตร
ที่มา: สถาบันวิจัยพืชสวน, 2559

2.5 พันธุ์ไทนุงหรือพันธุ์อีกา เป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักแห่งเอเชีย (Asian Vegetable Research and Development Center: AVRDC) หัวมีผิวสีน้ำตาล หัวยาวรี เนื้อสีเหลืองส้ม

2.6 พันธุ์ พจ.091 เป็นพันธุ์ที่ปรับปรุงพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร กรมวิชาการเกษตร ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2528 เป็นต้นมา หัวมีผิวสีแดง หัวยาวรี เนื้อสีเหลือง

2.7 พันธุ์ พจ.113-7 ปรับปรุงพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร กรมวิชาการเกษตร ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2530 เป็นต้นมา จากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพันธุ์แม่โจ้กับพันธุ์มันไข่สุโขทัย หัวมีผิวสีแดง หัวยาวรี เนื้อเหลือง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 2.9 ลักษณะสีเปลือก และสีเนื้อของหัวพันธุ์มันเทศสายพันธุ์ พจ. 113-7

ที่มา: สถาบันวิจัยพืชสวน, 2559

2.8 พันธุ์ พจ.115-1 ปรับปรุงพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร กรมวิชาการเกษตร ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2530 เป็นต้นมา จากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพันธุ์มันไข่สุโขทัยกับพันธุ์ พจ.091 หัวมีผิวสีแดง หัวยาวรี เนื้อสีเหลืองส้ม

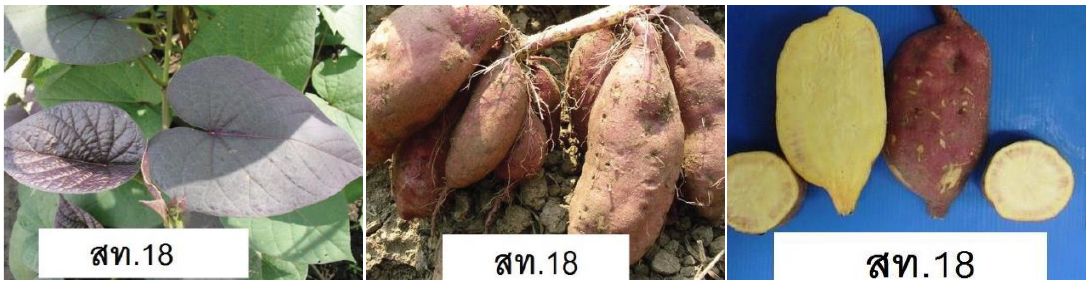
2.9 พันธุ์ สท. 03 ปรับปรุงพันธุ์โดยศูนย์วิจัยพืชสวนสุโขทัยและศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตรจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพันธุ์ พจ. 226-31 (พันธุ์เนื้อสีเหลือง) กับพันธุ์T101 (พันธุ์เนื้อสีส้ม) หัวมีผิวสีขาว หัวรูปทรงกระบอกยาว มีสีชมพูเป็นวงรอบด้านขั้วของหัว เนื้อสีเหลืองอ่อน ยาวรี

ภาพที่ 2.10 ลักษณะใบ สีเปลือก และสีเนื้อของหัวพันธุ์มันเทศสายพันธุ์ สท. 03

ที่มา: สถาบันวิจัยพืชสวน, 2559

2.10 พันธุ์ สท. 18 ปรับปรุงพันธุ์โดยศูนย์วิจัยพืชสวนสุโขทัยและศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตรจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพันธุ์ พจ.189-257 (พันธุ์เนื้อม่วง) กับพันธุ์ FM37-LINIDOK-3 (พันธุ์เนื้อเหลือง) หัวมีสีแดง ยาวรี เนื้อสีเหลืองเข้ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2.11 ลักษณะใบ สีเปลือก และสีเนื้อของหัวพันธุ์มันเทศสายพันธุ์ สท. 18

ที่มา: สถาบันวิจัยพืชสวน, 2559

3. กลุ่มเนื้อสีม่วง

3.1 พันธุ์ พจ.091 กับพันธุ์นิโกร ผ่านการพิจารณาจากกรมวิชาการเกษตรให้เป็นมันเทศพันธุ์แนะนำ เมื่อวันที่ 24 กรกฎาคม 2540 หัวสีแดง ยาวรี เนื้อสีม่วง

3.2 พันธุ์ พจ.65-3 ปรับปรุงพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร ตั้งแต่ปี พ.ศ.2530 จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์นิโกรกับพันธุ์ พจ.091 หัวสีแดง ยาวรี เนื้อสีม่วง

4. กลุ่มเนื้อสีขาวม่วง

4.1 พันธุ์ปีนัง หรือพันธุ์นิโกร เป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากประเทศมาเลเซีย หัวสีแดง ยาวรี ขนาดของหัวเฉลี่ยกว้าง 4.5 เซนติเมตร ยาว 16 เซนติเมตร เนื้อสีขาวม่วง

4.2 พันธุ์มาลายู หรือพันธุ์ต่อเผือก หรือพันธุ์หัวแดงใจม่วง เป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากประเทศมาเลเซีย หัวมีผิวสีแดง ยาวรี เนื้อสีขาวม่วง

<u>ปัญหาการผลิตมันเทศ</u>

ในปัจจุบันการผลิตมันเทศประสบปัญหาสำคัญจากการเข้าทำลายและการสะสมของไวรัสและมีปริมาณของไวรัสที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลกระทบเชิงปริมาณและคุณภาพต่อผลผลิต โดยต้นมันเทศที่มีการเข้าทำลายของไวรัสเพียงชนิดเดียวหรือไวรัสหลายชนิดร่วมกันจะแสดงอาการ ใบด่างสีเหลืองและสีม่วง ใบหงิก (leaf strapping) เส้นใบใส (vein clearing) ใบเบี้ยวเสียรูป (leaf distortion) ใบย่น (puckering) และถ้ามีการสะสมของไวรัสในปริมาณที่มาก จะทำให้ต้นแคระแกร็น (stunting) ไม่ออกรากได้ และไม่สร้างหัว ทำให้การผลิตหัวลดลง ส่งผลทำให้เกิดความเสียหายในทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (Kokkinos *et al*., 2006) ซึ่งในการผลิตมันเทศส่วนใหญ่แล้วนั้นมีการใช้ส่วนขยายพันธุ์ คือ ลำต้นหรือเถา การใช้ส่วนขยายจากต้นพันธุ์เดิมซ้ำๆ โดยที่ต้นแม่พันธุ์เดิมนั้นอาจเป็นแหล่งสะสมของไวรัสแต่ไม่แสดงอาการจึงทำให้เกิดการสะสมของไวรัสและมีการเพิ่มปริมาณและการแพร่ระบาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของไวรัสในปริมาณที่มากขึ้นในพื้นที่ปลูกด้วย อีกทั้งไวรัสสามารถแพร่ระบาดหรือถ่ายทอดไปยังต้นใหม่ได้ในหลายรูปแบบทั้งวิธีกล เช่น น้ำคั้นของไวรัสติดไปกับเครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ตัดแต่งกิ่ง และแมลงพาหะที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อพืชและไวรัส เช่น แมลงหวี่ขาว เพลี้ยอ่อน เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันไวรัสนั้นยังไม่มีสารเคมีที่จะมาใช้ในทางป้องกันและกำจัดได้จึงถือว่าเป็นปัญหาสำคัญต่อการผลิตพืช

<u>แมลงที่สำคัญของมันเทศ</u>

แมลงศัตรูพืชนับว่าเป็นปัญหาสำคัญในการผลิตมันเทศ โดยสร้างความเสียหายต่อผลผลิตทางด้านปริมาณและคุณภาพ อีกทั้งยังก่อให้เกิดปัญหาในระบบการจัดการการผลิต ซึ่งต้องมีค่าใช้จ่ายหรือต้นทุนที่สูงขึ้น โดยแมลงศัตรูพืชที่สำคัญของมันเทศได้แก่ ด้วงงวงมันเทศ (*Cylas formicarius*) หนอนเจาะเถามันเทศ (*Omphisa anastomosalis*) หนอนชอนใบมันเทศ (*Bedellia somnulentella*) หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) หนอนผีเสื้อเหยี่ยว (*Agrius convolvuli*) หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) และด้วงเต่า (*Metriona circuemdata*) (ฐานข้อมูลพันธุกรรมพืช, 2559; เกษตรก้าวหน้า, 2559)

<u>โรคที่สำคัญของมันเทศ</u>

ในส่วนของโรคที่สำคัญส่วนใหญ่นั้นเกิดจากเชื้อรา คือ โรคหัวเน่า เกิดจากเชื้อรา เช่น *Fusarium* sp. โรคใบจุด เกิดจากเชื้อรา *Cercospora* sp. และโรคที่เกิดจากไส้เดือนฝอย ได้แก่ โรครากปม เกิดจากไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* นอกจากนี้ ยังมีโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย และไวรัสที่เข้าทำลายและสร้างความเสียหายให้กับการผลิตมันเทศอีกด้วย

<u>ไวรัสที่เข้าทำลายมันเทศ</u>

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไวรัสนับว่าเป็นเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญสาเหตุหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตมันเทศเนื่องจากมีการขยายพันธุ์โดยใช้ลำต้น และเถา จึงทำให้ไวรัสสามารถติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ทำให้มีการแพร่ระบาด ทวีความรุนแรงมากขึ้น สังเกตได้จากลักษณะอาการของต้นมันเทศที่ปลูกในแปลงเกษตรในพื้นที่ต่างๆ ในปัจจุบันมักจะพบอาการใบด่าง ใบขนาดเล็กลง และชะงักการเจริญเติบโต ซึ่งส่งผลกระทบต่อการผลิตมันเทศของเกษตรกร Wang and Valkonen (2008) กล่าวว่าโรคที่เกิดจากไวรัสที่พบมากที่สุดในมันเทศเกิดจากไวรัส 2 ชนิดเข้าทำลายร่วมกัน ได้แก่ S*weet potato chlorotic stunt* (SPCSV) และ *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) และเมื่อพืชเป็นโรคไวรัสพืชจะแสดง

อาการใบสีเขียว และเหลืองด่างลายประปรายทั่วใบ เนื้อใบหยักเป็นคลื่น ขนาดใบเล็กลง ยอดตั้งชัน และชะงักการเจริญเติบโต มีผลให้มันเทศลงหัวน้อย ผลผลิตต่ำ

จากการรายงานของ Kokkinos (2006) กล่าวว่า ไวรัส SPFMV จัดอยู่ในตระกูล *Potyviridae* เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิด RNA เส้นเดี่ยว สายบวก (+ss RNA) อนุภาคมีลักษณะเป็นเส้นยาวคด ขนาดความกว้าง 12-15 นาโนเมตร และความยาว 650 900 นาโนเมตร มีแมลงพาหะคือ *Aphis gossypii* และ *Myzus persicae* ถ้ามีการเข้าทำลายของไวรัส SPFMV เพียงชนิดเดียวพืชอาจไม่แสดงอาการหรือแสดงอาการเล็กน้อย แต่จะแสดงอาการชัดเจนขึ้นเมื่อมีการเข้าทำลายร่วมกันกับเชื้อ SPCSV ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากไวรัส SPFMV โดยทั่วไปแล้วจะปรากฏจุดสีซีด (chlorotic spots) บางครั้งอาจล้อมรอบด้วยสีม่วงในมันเทศบางสายพันธุ์ ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของไวรัส (strain) ของ SPFMV และสายพันธุ์ของมันเทศด้วย มันเทศบางสายพันธุ์ไม่แสดงลักษณะอาการที่กล่าวมาข้างต้น แต่อาจเกิดแผลตายบนใบและยังส่งผลให้หัวแตกลายได้ด้วย และมีพืชอาศัยส่วนใหญ่ของไวรัส SPFMV นั้นจะมีจำกัดขึ้นอยู่กับสปีชีส์ของพืชในหลายตระกูล ได้แก่ พืชในตระกูล Convolvulaceae เช่น *Ipomoea batatas*, *Lepistemon owariensis, Convolvulus arvensis, Ipomoea hederacea, Ipomoea incarnata* และ *Merremia sibirica* และพืชในตระกูล Chenopodiaceae เช่น *Chenopodium polyspermum*, *Chenopodium quinoa, Chenopodium amaranticolor* และ *Spinacia oleracea* แต่อย่างไรก็ตามไวรัสบางสายพันธุ์อาจเข้าทำลายได้ในพืชตระกูล Solanaceae เช่น *Cappicum annuum, Nicatiana benthamiana, Nicotiana clevelandii, Nicotia occidentalis, Nicotiana tabacum* และ *Nicotiana glutinosa* (Clark *et al.* 1986)

สำหรับไวรัส SPCSV จัดอยู่ในตระกูล *Closteroviridae* เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิด RNA เส้นเดี่ยว สายบวก (+ss RNA) อนุภาคมีลักษณะเป็นเส้นยาวคด มีความยาวเป็นพิเศษ ขนาดความกว้าง 10-13 นาโนเมตร และความยาว 950-2200 นาโนเมตร มีแมลงพาหะคือ *Bemisia tabaci, Trialeurodes abutionea* ถ้ามีการเข้าทำลายของไวรัส SPCSV เพียงชนิดเดียวพืชจะแสดงอาการเล็กน้อยถึงปานกลาง แต่จะทำให้สูญเสียผลผลิตถึง 43 เปอร์เซ็นต์ และ Ames *et al.* (1997) กล่าวว่า ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากไวรัส SPCSV โดยทั่วไปนั้นจะทำให้ใบมีจุดสีเหลือง (chlorotic yellowing) หรือเกิดอาการสีซีดเหลืองบริเวณกลางใบและบริเวณใบล่าง หรือเกิดอาการด่าง (mosaic) อย่างไรก็ตามการแสดงอาการจะขึ้นอยู่กับสภาพอากาศหรือสภาพแวดล้อมที่ปลูกมันเทศนั้นด้วย หากมีการสะสมของไวรัสเพิ่มขึ้นเรื่อย จะทำให้เกิดผลกระทบต่อผลผลิตและทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจมากขึ้น เช่น ทำให้การลงหัวและการเกิดหัวช้าลง หัวมีขนาดเล็กลง และทำให้เนื้อมันเทศมีรสผิดปกติไปจากเดิม การผลิตต้นแม่พันธุ์ปลอดไวรัสจึงจะเป็นแนวทางหนึ่งในการส่งเสริมการผลิตมันเทศ และมีพืชอาศัย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนใหญ่ของไวรัส SPCSV นั้นส่วนใหญ่จะเป็นพืชในหลายตระกูล ได้แก่ พืชในตระกูล Convolvulaceae เช่น *Ipomoea setosa, Ipomoea acuminate, Ipomoea hederacea, Ipomoea hederifolia, Ipomoea trichocarpa* และ *Ipomoea mexicana* และพืชในตระกูล Solanaceae เช่น *Nicatiana benthamiana, Nicotiana clevelandii, Nicotia glutinosa* และ *Amaranthus palmeri* (Cohen *et al.,* 1992)

<u>แนวทางการวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากไวรัส</u>

1. ลักษณะอาการของโรค

1.1 การตรวจดูลักษณะอาการภายนอกของพืช (external symptoms) ซึ่งเป็นขั้นตอนหลักในการวินิจฉัยโรค โดยส่วนใหญ่พืชที่ถูกไวรัสเข้าทำลาย มักเกิดลักษณะที่ผิดปกติ โดยสามารถสังเกตเห็นอาการได้ อย่างชัดเจน เช่น การเจริญของส่วนต่างๆ ที่ผิดปกติ สีของใบที่ผิดปกติ ไม่ว่าจะเป็นใบที่อยู่บริเวณยอดหรือบริเวณใบล่างเช่น อาการด่าง (mosaic) อาการสีซีด (chlorosis) อาการเส้นใบใส (vein clearing) รูปร่างของใบที่ผิดปกติ เช่น ใบม้วน (rolling) ใบหงิก (curling) ใบบิดเบี้ยว (distortion) ลักษณะการเจริญของต้น เช่น ต้นแคระแกร็น (stunting) และผลที่มีรูปร่างเปลี่ยนไป เช่น รูปทรงบิดเบี้ยว ขนาดเล็กลง ซึ่งอาการข้างต้นอาจเกิดในลักษณะกระจายทั่วต้น (systemic symptoms) หรือเกิดเฉพาะบางส่วนของพืชเท่านั้น หรือเรียกว่าอาการเฉพาะแห่ง (local symptoms) (สุพัฒน์, 2551)

1.2 การตรวจดูอาการผิดปกติในระดับเซลล์ (internal symptoms) ซึ่งเมื่อเนื้อเยื่อพืชหรือเซลล์พืชถูกไวรัสเข้าทำลาย จะพบว่าทั้งเซลล์และเนื้อเยื่อพืชจะได้รับผลกระทบในรูปแบบต่างๆ โดยส่งผลกระทบต่อพัฒนาการของเนื้อเยื่อและเซลล์พืช (cytological effects) เช่น เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้นภายในเซลล์จะทำให้องค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์และรูปร่างของเซลล์นั้นผิดปกติไป เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การถ่ายทอดไวรัส

2.1 การถ่ายทอดโดยวิธีกล

การถ่ายทอดไวรัสพืชหลายชนิดสามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีกลหรือเรียกอีกอย่างได้ว่าการถ่ายทอดโดยการสัมผัสทางบาดแผล ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมมาใช้ในการวินิจฉัยโรค เนื่องจากเป็นวิธีที่ประหยัด และเชื่อถือได้ ซึ่งวิธีนี้มีข้อจำกัดคือ สภาพแวดล้อม และเป็นลักษณะการถ่ายทอดเฉพาะของไวรัสบางชนิดเท่านั้น ซึ่งไวรัสอีกหลายชนิดไม่สามารถถ่ายทอดด้วยวิธีนี้ได้ (สุพัฒน์, 2551)

2.2 การถ่ายทอดโดยอาศัยแมลงพาหะ

นอกจากการถ่ายทอดไวรัสภายในต้นพืชเองแล้ว ยังสามารถถ่ายทอดจากต้นที่เป็นโรคไปสู่ต้นที่ปกติและพืชอาศัยอื่นๆได้โดยอาศัยแมลงพาหะ (vectors) หลายชนิด ซึ่งถือว่าเป็นส่วนสำคัญในการดำรงอยู่และแพร่กระจายของไวรัสในธรรมชาติ แมลงพาหะของไวรัสมีทั้งปริมาณและชนิดที่หลากหลายมาก โดยส่วนใหญ่พบอยู่ใน Order Hemiptera (Sub-Order Homoptera) ได้แก่ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เป็นต้น โดยมีข้อจำกัด คือ ไวรัสและแมลงพาหะนั้นมีความเฉพาะเจาะจงซึ่งกันและกัน (specificity)

Sim *et al.* (2000) ศึกษาการถ่ายทอดไวรัส SPCSV โดยใช้แมลงหวี่ขาวชนิด *Bemisia tabaci* และ *Trialeurodes abutilonea* โดยปล่อยแมลงหวี่ขาวให้ดูดกินบริเวณต้นมันเทศ *I. batatas* cv. White Bunch ที่ถูกไวรัส SPCSV และ SPFMV เข้าทำลายร่วมกัน หลังจากนั้นปล่อยแมลงหวี่ขาวที่ไปดูดกินต้นที่มีไวรัสแล้ว เพียง 1 ตัวไว้ที่ต้นกล้ามันเทศที่ไม่มีโรค และแข็งแรง *I. nil* cv. Scarlet O'Hara เพื่อทำการปลูกไวรัสในช่วงระยะเวลา 2 วัน พบว่าต้นกล้ามันเทศแสดงอาการซีดเหลืองบริเวณกลางใบ และบริเวณใบล่าง

Schaefers and Terry (1976) ศึกษาการถ่ายทอดไวรัส SPCSV โดยใช้แมลงหวี่ขาวชนิด *Bemisia tabaci* พบอัตราการถ่ายทอดไวรัสคิดเป็น 78% โดยปล่อยให้แมลงดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพืชเป็นระยะเวลา 1 และ 2 วันแล้วปล่อยให้ตัวแมลงปลูกเชื้อไวรัสเข้าต้นพืชที่แข็งแรงเป็นระยะเวลา 2 วัน และต้นพืชมีการแสดงอาการของโรค แต่ถ้าให้แมลงดูดกินเพียง 1 ชั่วโมงนั้นไม่สามารถแสดงการถ่ายทอดไวรัสได้ มีการศึกษาที่คล้ายกันของ Cohen *et al.* (1992) กล่าวว่า การถ่ายทอดไวรัสโดย *B. tabaci* ในประเทศอิสราเอล มีอัตราการถ่ายทอดสูงถึง คิดเป็น 86 เปอร์เซ็นต์ ที่พืชถูกไวรัสเข้าทำลายและแสดงอาการชัดเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Shang *et al.* (1996) ศึกษาการถ่ายทอดไวรัส SPFMV โดยเตรียมต้น *Indicator plants* คือ *Ipomoea setosa* หรือใช้บางครั้งมีการใช้ *Chenopodium quinoa* อายุประมาณ 45-60 วัน หลังจากนั้นนำส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ เช่น ยอด ตาข้าง ของต้นมันเทศที่เป็นโรคมาต่อยอด (scion) หรือทาบกิ่ง (graft) ในต้น *I. setosa* หลังจากการปลูกเชื้อ 15 วัน ต้นพืชแสดงอาการใบด่าง ใบม้วนงอ และใบย่น แสดงให้เห็นว่ามีการถ่ายทอดของไวรัสเกิดขึ้นอย่างแน่นอน

3. เทคนิคทางอณูชีววิทยา

Sivparsad and Gubba (2012) รายงานการตรวจไวรัสว่า ไวรัสที่เข้าทำลายมันเทศร่วมกันมีมากกว่า 1 ชนิด ได้แก่ SPFMV SPVG และ SPCSV ซึ่งใช้วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ซึ่งสามารถจัดจำแนกชนิดของไวรัสเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งได้ ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความสำคัญในการตรวจหาไวรัสในพืช อีกทั้งสามารถนำมาตรวจสอบพืชปลอดไวรัสอีกด้วย

Tugume *et al.* (2008) รายงานว่าสามารถตรวจไวรัส SPFMV ที่เข้าทำลายมันเทศได้โดยใช้วิธีการ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ได้

<u>การผลิตพืชปลอดไวรัส (Production of virus-free plant)</u>

ไวรัสเมื่อเข้าทำลายพืชมักทำให้ผลผลิตลดลงในเชิงปริมาณและคุณภาพ โดยเฉพาะพืชที่นิยมขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เช่น ใช้กิ่งพันธุ์ หน่อ หรือหัว หากส่วนขยายพันธุ์นั้นมีการติดไวรัสอยู่ภายในเนื้อเยื่อ จะทำให้เป็นปัญหาต่อการนำมาขยายพันธุ์หรือเพิ่มปริมาณ เนื่องจากไวรัสสามารถติดไปกับส่วนของพืชได้ทุกส่วน เกวลิน (2556) กล่าวถึงเทคนิคการผลิตพืชเพื่อให้ปลอดจากไวรัสโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่าสามารถทำได้ดังนี้

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (meristem culture)
2. การใช้ความร้อนเพื่อกำจัดไวรัส (thermotherapy or heat treatment)
3.การใช้ความร้อนเพื่อกำจัดไวรัสร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (heat treatment followed by meristem culture)

ซึ่งการผลิตพืชปลอดไวรัสโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (meristem culture) เป็นวิธีที่นิยมปฏิบัติกันมานาน ซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างมีประสิทธิภาพ ทำให้ต้นพืชปลอดไวรัสได้ในพืชหลายชนิด และมักนำวิธีการนี้ไปใช้ร่วมกับวิธีอื่นๆ เนื่องจากบริเวณปลายยอดมักมีการสะสมของอนุภาคของไวรัสค่อนข้างต่ำกว่าบริเวณอื่นๆ เซลล์บริเวณปลายยอดนั้นมีอัตราการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว และทำให้ไวรัสไม่สามารถแพร่กระจายได้รวดเร็ว อีกทั้งเซลล์บริเวณนี้ยังไม่มี plasmodesmata ซึ่งเป็นช่องลำเลียงระหว่างเซลล์ต่อเซลล์ ทำให้ไวรัสไม่สามารถเคลื่อนย้ายจากเซลล์หนึ่งไปยังเซลล์หนึ่งได้ นอกจากนั้นอาจเกิดจากบทบาทของ Auxin และ Cytokinin ภายในเซลล์ของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ซึ่งช่วยให้เกิดการแบ่งเซลล์ของพืชและไปมีผลต่อการยับยั้งการทวีจำนวนของไวรัส ดังนั้นเมื่อนำกลุ่มเซลล์เหล่านี้ไปเพาะเลี้ยงจึงมีโอกาสได้ต้นพืชที่ปลอดไวรัสได้

Wondimu *et al.* (2012) ศึกษาวิธีการผลิตมันเทศปลอดไวรัส SPFMV และ SPCSV โดยการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ขนาด 0.5 - 0.7 มิลลิเมตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5-10 วัน มีการเปลี่ยนสีของ Meristem ในบางจำนวนเป็นสีเหลืองอ่อนจนถึงสีเขียว ซึ่งมีการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยมีการย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่ทุกๆ 4 สัปดาห์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงส่วนของเนื้อเยื่อเจริญดังกล่าวสามารถทำให้ต้นกล้ามันเทศปลอดไวรัสได้ถึง 98 เปอร์เซ็นต์

Dugassa *et al.* (2011) ศึกษาวิธีการใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญในการผลิตมันเทศปลอดจากไวรัส SPFMV และ SPCSV ในมันเทศ 2 สายพันธุ์ได้แก่ Awassa-83, Awassa local พบว่า ต้นมันเทศที่ผ่านการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดร่วมกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 31 วัน ทำให้ต้นมันเทศปลอดไวรัส 88.89 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 สายพันธุ์มันเทศ และโรคที่เกิดจากไวรัสในมันเทศ

3.1.1 ศึกษาลักษณะพืช อาการของโรคที่เกิดจากไวรัส

นำหัวพันธุ์มันเทศทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ SP02 และ SP08 ที่ได้รับจากสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ หน่วยวิจัยขุนห้วยแห้ง ตำบลบ้านหลวง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 20 หัว โดยแบ่งเป็นสายพันธุ์ละ 10 หัว โดยเลือกจากลักษณะหัวมีความยาวประมาณ 15-20 เซนติเมตร และมีความกว้างประมาณ 5-7 เซนติเมตร นำมาปลูกในกระถาง ขนาด 12 นิ้ว ที่บรรจุดินที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ดูแลให้ปุ๋ยและน้ำตามวิธีการของมูลนิธิโครงการหลวง ภายใต้สภาพโรงเรือนกันแมลง ณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

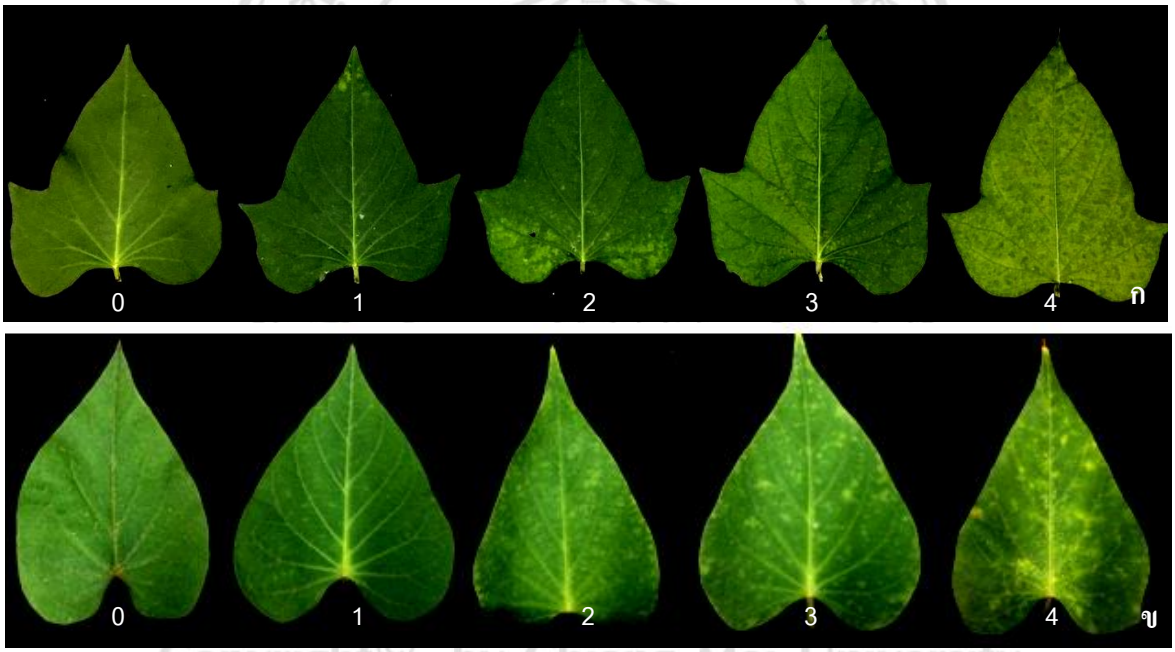
ศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาของมันเทศสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยบันทึกลักษณะรูปร่างของใบ รูปร่างหัว สีเปลือกภายนอก และสีของเนื้อภายในโดยผ่าครึ่งตามแนวยาว และแนวขวางของหัวพันธุ์ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์หลังจากการปลูกมันเทศเป็นเวลา 120 วัน ซึ่งอยู่ในช่วงที่มันเทศลงหัวและพร้อมจะเก็บเกี่ยว ณ แปลงปลูกของสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ หน่วยวิจัยขุนห้วยแห้ง ตำบลบ้านหลวง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บันทึกลักษณะอาการที่ผิดปกติที่สามารถเห็นบนใบมันเทศได้หลังจากการปลูกเป็นเวลา 90 วัน โดยสังเกตลักษณะอาการบนใบที่แสดงอาการผิดปกติต่างๆ เช่น อาการจุดเหลือง (chlorotic spot) และอาการจุดเหลืองที่ล้อมรอบด้วยสีม่วง (Purpling around chlorotic spot) เป็นต้น

3.1.2 การประเมินความรุนแรงของโรคที่เกิดจากไวรัส และผลกระทบต่อปริมาณผลผลิตของมันเทศ

นำหัวพันธุ์มันเทศที่สุ่มเก็บมาจากสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ หน่วยวิจัยขุนห้วยแห้ง ตำบลบ้านหลวง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 10 หัว โดยเลือกจากลักษณะหัวมีความยาวประมาณ 15-20 เซนติเมตร และมีความกว้างประมาณ 5-7 เซนติเมตร มาปลูกในดินผ่านการอบฆ่าเชื้อภายใต้สภาพโรงเรือน ณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เป็นเวลา 90 วัน หลังจากนั้นบันทึกลักษณะอาการที่ผิดปกติที่เกิดขึ้น เช่น อาการจุดสีเหลืองและสีม่วง และประเมินระดับความรุนแรงของโรคที่เกิดจากไวรัสในมันเทศ โดยประเมินทั้งหมดจำนวน 100 ใบ แบ่งเป็น 10 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ใบต่อต้น (ใบที่อยู่ในระหว่าง 1-5 นับจากยอด) โดยกำหนดเกณฑ์การประเมินความรุนแรงของโรคแบ่งเป็น 5 ระดับ ซึ่งดัดแปลงจาก Ndunguru *et al.* (2009) (ภาพที่ 3.1) คือ



ภาพที่ 3.1 ใบมันเทศที่แสดงอาการโรคที่เกิดจากไวรัสในแต่ละระดับความรุนแรง ทั้ง 5 (0-4) ของสายพันธุ์ (ก) SP02 และ (ข) SP08

ระดับ 0 ไม่แสดงอาการ

ระดับ 1 แสดงอาการจุดเหลืองหรือม่วง 1-25% บนพื้นที่ใบ

ระดับ 2 แสดงอาการจุดเหลืองหรือม่วง 26-50% บนพื้นที่ใบ

ระดับ 3 แสดงอาการจุดเหลืองหรือม่วง 51-75% บนพื้นที่ใบ

ระดับ 4 แสดงอาการจุดเหลืองหรือม่วง 76-100% บนพื้นที่ใบ

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การวินิจฉัยโรคที่เกิดจากไวรัส

3.2.1 การศึกษาลักษณะอาการผิดปกติระดับเซลล์ของใบมันเทศ

ศึกษาลักษณะความผิดปกติระดับเซลล์ของมันเทศสายพันธุ์ SP02 ที่แสดงอาการใบจุดสีเหลืองปนม่วง โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Christic and Edwardson (1994) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ โดยเริ่มจากการลอกเนื้อเยื่อชั้นผิวหรือส่วนเส้นกลางใบของมันเทศที่แสดงอาการจุดสีเหลืองหรือสีม่วงด้วยคีมปลายแหลม ภายใต้กล้องสเตอริโอ หลังจากนั้นล้างคลอโรฟิลล์และโครงสร้างบางส่วนออกจากเซลล์พืชด้วยสารละลาย Lactic acid 25% ปิดทับด้วยแผ่น cover slip นำไปผ่านความร้อนเป็นเวลา 5-10 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ตามด้วยการย้อมสี Basic Fushhin (BF) ผสมกับ Toluidine Blue O (TBO) หรือ Brilliant Green (BG) ในอัตรา 1 ต่อ 1 เป็นเวลา 1 นาที ทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง และล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นที่ผสมกับเอทานอล หลังจากนั้นย้ายเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการนำมาทำสไลด์โดย mount ด้วยน้ำกลั่น และปิดทับด้วย cover slip จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลัง 400-1000 เท่า พร้อมทั้งบันทึกลักษณะนิวเคลียสและ Inclusion body ที่พบ

3.2.2 การถ่ายทอดโรคที่เกิดจากไวรัสโดยวิธีการเสียบยอด

เตรียมพืชทดสอบ ยาสูบใบเล็ก (*Nicotiana glutinosa*) ด้วยการเพาะเมล็ดในกระบะเพาะและย้ายปลูกในกระถาง ภายใต้สภาพโรงเรือน ณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อายุ 30 วัน หลังย้ายปลูกทำการปลูกเชื้อ โดยนำส่วนยอดของมันเทศที่แสดงอาการ ความยาวประมาณ 3-6 เซนติเมตร นำมาเสียบลงบนยอดของต้นยาสูบ หลังจากนั้นพันยอดด้วยพลาสติกหรือหลอดพลาสติกเพื่อช่วยให้เนื้อเยื่อของพืชทั้งสองชนิดได้เชื่อมต่อกัน สังเกตและบันทึกลักษณะอาการที่เกิดขึ้นบนใบของพืชทดสอบหลังจากการปลูกเชื้อ เป็นเวลา 30-45 วัน

3.2.3 การตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

นำใบมันเทศที่แสดงอาการใบจุดสีเหลืองปนจุดสีม่วงมาตรวจสอบหาชนิดของเชื้อไวรัสโดยใช้การตรวจสอบด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ในการตรวจสอบ สำหรับการตรวจหาเชื้อ SPFMV และ SPCSV ซึ่งดัดแปลงตามวิธีการในการทำปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการ Kwak *et al.* (2014) (ตารางที่ 3.2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศ

3.3.1 การเพาะเลี้ยงส่วนขยายพันธุ์เริ่มต้น

นำส่วนขยายพันธุ์ของต้นมันเทศสายพันธุ์ SP02 และ SP08 ที่เพาะปลูก ณ สถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ หน่วยวิจัยขุนห้วยแห้ง ตำบลบ้านหลวง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ มาเพาะเลี้ยงในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยทำการตัดส่วน ยอด และตาข้าง ขนาดประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร มาล้างด้วยน้ำไหล 10 นาที จากนั้นจุ่มชิ้นพืชใน Ethanol เข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 30 วินาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อล้างด้วย Electrolyzed Oxidizing water (EO) เข้มข้นร้อยละ 1 หรือ Sodium hypochlorite (Clorox) เข้มข้นร้อยละ 10 ที่ผสม Tween 20 จำนวน 2-3 หยด เขย่าเบาเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำชิ้นส่วนปลายยอด และตาข้าง เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) pH 5.6 ที่เติม BAP เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่บรรจุในขวดแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาด 8 ออนซ์ และนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 1200 lux 16 ชั่วโมงต่อวัน สังเกตและบันทึกการเจริญหลังการเพาะเลี้ยงระยะเวลา 30 วัน

3.3.2 ศึกษาการพัฒนาสูตรอาหารสังเคราะห์สูตร MS

พัฒนาอาหารสังเคราะห์สูตร MS จากข้อ 3.3.1 โดยการนำชิ้นส่วนของยอดมันเทศขนาดประมาณ 1 เซนติเมตรจากต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากข้อ 3.3.1 มาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร ที่บรรจุอาหารสังเคราะห์สูตร MS ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่เติมชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญแตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญ 3 ชนิด ได้แก่ 6-Benzylaminopurine (BAP), Indole-3-acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ความเข้มข้น 0-2 มิลลิกรัมต่อลิตรที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS จำนวน 14 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ตามตารางที่ 3.1 ซึ่งมีการปรับระดับความเข้มข้นของ IAA ที่ 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับระดับความเข้มข้นของ BAP ที่ 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และปรับระดับความเข้มข้นของ GA_3 ที่ 0 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นบันทึกลักษณะการเจริญ ความสูง จำนวนข้อ จำนวนใบ หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน พร้อมทั้งศึกษาการมีชีวิตรอดหลังการออกปลูกในแต่ละกรรมวิธีเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (อาหารสังเคราะห์สูตร MS) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD)

ตารางที่ 3.1 ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ในแต่ละกรรมวิธี

กรรมวิธีที่	ความเข้มข้นของสารควบคุมเจริญการเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	IAA	BAP	GA_3
1 (ชุดควบคุม)	0	0	0
2	0.5	0	0
3	1	0	0
4	0	1	0
5	0	2	0
6	0	0	1
7	0.5	0	1
8	1	0	1
9	0	1	1
10	0.5	1	1
11	1	1	1
12	0	2	1
13	0.5	2	1
14	1	2	1

3.4 การกำจัดไวรัส SPFMV และ SPCSV สาเหตุโรคในมันเทศ

3.4.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (Meristem tip culture)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำต้นมันเทศแต่ละสายพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในข้อที่ 3.4.1 ซึ่งเป็นต้นที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย มาตัดเฉพาะส่วนของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ภายใต้กำลังขยาย 20-40 เท่า โดยดัดแปลงวิธีการของ Wondimu *et al.* (2012) โดยทดลอง 3 ขนาด ได้แก่ 0.3, 0.5 และ 1 มิลลิเมตร ขนาดละ 40 ซ้ำ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เก็บในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แสง 1200 lux 16 ชั่วโมงต่อวัน จากนั้นสังเกตการมีชีวิตรอดของเนื้อเยื่อเจริญ และนำต้นที่เจริญสมบูรณ์ไปตรวจสอบการปลอดไวรัสต่อไป

3.4.2 การใช้ความร้อนร่วมกับการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (Thermotherapy and meristem tip culture)

นำต้นมันเทศแต่ละสายพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในข้อที่ 3.4.1 ซึ่งเป็นต้นที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย ที่มีการเจริญเติบโตดีและมีราก อายุ 31 วัน ไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิโดยให้ความร้อนที่ระดับอุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดไวรัสเป็นเวลา 30 วัน เมื่อครบกำหนดนำต้นมันเทศมาตัดเฉพาะส่วนของยอด จากนั้นนำมาตัดส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (meristem tip) ภายใต้กำลังขยาย 20-40 เท่า ซึ่งดัดแปลงวิธีการของ Dugassa *et al.* (2011) โดยทดลองตัด 3 ขนาด ได้แก่ 0.3, 0.5 และ 1 มิลลิเมตร ขนาดละ 40 ซ้ำ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญ ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส โดยอยู่ในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน และหลังจากนั้นย้ายเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แสง 1200 lux 16 ชั่วโมงต่อวัน จากนั้นสังเกตการมีชีวิตรอดของเนื้อเยื่อเจริญ และนำต้นที่เจริญไปตรวจการปลอดไวรัสต่อไป

3.5 การตรวจสอบการปลอดไวรัส

นำต้นกล้ามันเทศที่ผ่านการทำให้ปลอดไวรัสในแต่ละกรรมวิธีโดยการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดร่วมกับความร้อนในขั้นต้น (ข้อ 3.4.1-3.4.2) มาตรวจสอบการปลอดไวรัสโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ได้แก่ Polymerase chain reaction (PCR)

3.5.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA)

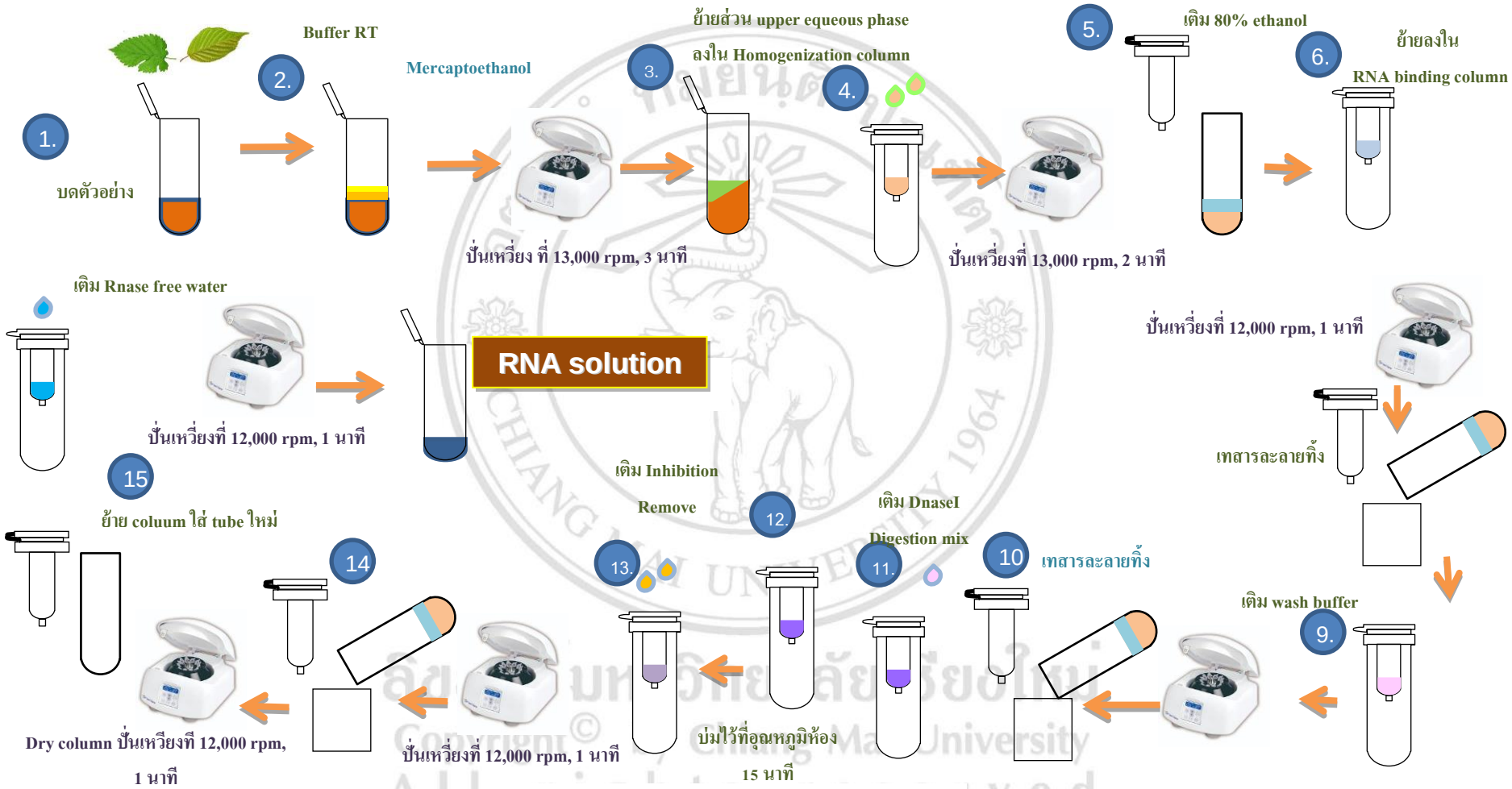
การสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส ด้วยชุด Kit ที่ชื่อว่า vivantis (GF-1 Total RNA Extraction Kit) เนื่องจากมีความรวดเร็ว และมีความเหมาะสมต่อการสกัด viral RNA ของมันเทศ โดยมีขั้นตอนการสกัดทั้งหมด 17 ขั้นตอน ซึ่งหลังจากการสกัดอาร์เอ็นเอตามขั้นตอนดังกล่าวแล้ว จะวัดปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอเพื่อใช้สำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป (ภาพที่ 3.2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการสกัด RNA

1. บดตัวอย่างใบพืช 0.1 กรัม กับไนโตรเจนเหลวจนละเอียดแล้วบรรจุลงใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. เติม Buffer RT 0.4 มิลลิลิตร และ Mercaptoethanol 0.01 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
3. ดูดของเหลวส่วนบนใส่ใน Homogenization column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
4. ถอดส่วน Homogenization column ข้างบนออก แล้วเติมเอทานอล 80% 0.35 มิลลิลิตร ลงไปใน eppendorf tube ผสมให้เข้ากันทันทีโดยใช้ Micropipette
5. ดูดสารละลายทั้งหมดประมาณ 0.65 มิลลิลิตร ใส่ลงไปใน RNA binding culuum แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
6. ถอดส่วน RNA binding culumn ข้างบนออก แล้วเทของเหลวที่อยู่ใน eppendorf tube ทิ้ง
7. เติม Washing Buffer 0.5 มิลลิลิตร โดยเติมผ่าน RNA binding culumn แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
8. ถอดส่วน RNA binding culuum ข้างบนออก แล้วเทของเหลวที่อยู่ใน eppendorf tube ทิ้ง
9. เติม DNase I Digestion mix 0.07 มิลลิลิตร โดยเติมผ่าน RNA binding culumn แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที 10. เติม Inhibitor Remove Buffer 0.5 มิลลิลิตร โดยเติมผ่าน RNA binding culumn แล้วนำไป ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวที่อยู่ใน eppendorf tube ด้านล่างทิ้ง
11. เติม Washing Buffer 0.5 มิลลิลิตร โดยเติมผ่าน RNA binding culumn แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวที่อยู่ใน eppendorf tube ด้านล่างทิ้ง
12. เติม Washing Buffer 0.5 มิลลิลิตร โดยเติมผ่าน RNA binding culumn แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวที่อยู่ใน eppendorf tube ด้านล่างทิ้ง
13. Dry culumn โดยถอดส่วน RNA binding culumn ข้างบน ออกจาก culumn แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
14. เติม Washing Buffer 0.5 มิลลิลิตร โดยเติมผ่าน RNA binding culumn แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวที่อยู่ในหลอดด้านล่างทิ้ง
15. ย้าย RNA binding culumn ไปใส่กับ eppendorf tube ใหม่
16. เติม RNase–free 0.05 มิลลิลิตร โดยเติมผ่าน RNA binding culumn แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
17. ย้ายส่วนที่เป็นของเหลวใสใส่ eppendorf tube ใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัด RNA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.2 การสังเคราะห์ สายดีเอ็นเอต้นแบบ (complementary DNA; cDNA)

การสร้างสาย cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอ โดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง RNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, รีเวิร์สไพรเมอร์ และชุดน้ำยาสังเคราะห์ cDNA สำเร็จรูป (Thermo Scientific, USA) ตามวิธีการของผู้ผลิต จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะได้ cDNA สำหรับใช้ในกระบวนการ PCR ในขั้นตอนต่อไป

3.5.3 การตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค PCR

โดยนำ DNA ต้นแบบ ที่สังเคราะห์ในขั้นตอนข้างต้น นำมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้น้ำยาสังเคราะห์สำเร็จรูป GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, USA) ร่วมกับคู่ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสชนิดที่ต้องการตรวจหา ได้แก่ SPFMV และ SPCSV รวมทั้งระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งดัดแปลงจากการรายงานที่เกี่ยวข้องของ Kwak *et al.* (2014) (ตารางที่ 3.2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.2 ไพร์เมอร์สำหรับตรวจไวรัส SPFMV และ SPCSV ในมันเทศ

การตรวจสอบ	คู่ไพร์เมอร์	ลำดับเบส (5'→3')	gene เป้าหมาย	ปฏิกิริยา PCR	อ้างอิง
SPFMV	SPFMV 1-F	TACACACTGCTAAAACTAGG	Polyprotein gene	94°C 5 นาที (94°C 30 วินาที. 55°C 30 วินาที, 72°C 60 วินาที) 35 รอบ และ 72°C 10 นาที	Kwak *et al.* (2014)
	SPFMV 1-R	AGTTCATCATAACCCCATGA			
SPCSV	SPCSV-uni-f1	GGGAAGAMGAGAYATGGAGTTAA	Coat protein gene	94°C 5 นาที (94°C 30 วินาที. 55°C 30 วินาที,72°C 60 วินาที) 35 รอบ และ 72°C 10 นาที	
	SPCSV-uni-r1	CCTTGTTACAAAGAGCGTTCCT			

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 สายพันธุ์ของมันเทศ

จากการศึกษาลักษณะของมันเทศทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทางมูลนิธิโครงการหลวงได้ส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูก ได้แก่ สายพันธุ์ SP02 และ SP08 พบว่า มันเทศสายพันธุ์ SP02 มีเนื้อสีม่วง สีเปลือกสีม่วงแดง และใบเป็นรูปฐานแยกหรือสองหยัก (lobed) ส่วนสายพันธุ์ SP08 มีเนื้อสีเหลือง สีเปลือกสีม่วงแดง และลักษณะใบเป็นรูปหัวใจ (cordate) (ภาพที่ 4.1)

ภาพที่ 4.1 ลักษณะใบ สีเปลือก และสีเนื้อของหัวพันธุ์มันเทศที่รวบรวมจากสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์

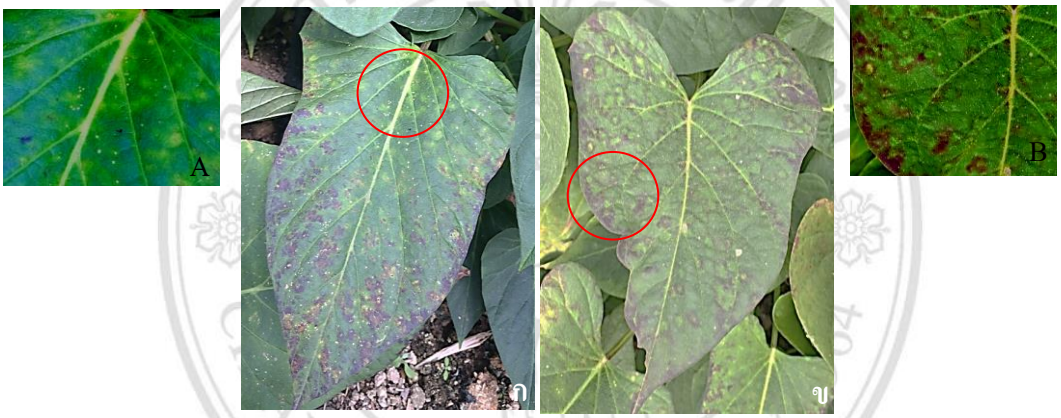
(ก) สายพันธุ์ SP02

(ข) สายพันธุ์ SP08

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากไวรัสในมันเทศ

จากการศึกษาลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากไวรัสบนใบมันเทศ หลังการเพาะปลูก 90 วัน ในสภาพโรงเรือน พบว่าใบมันเทศแสดงอาการจุดสีเหลืองสลับม่วง หรือเป็นลักษณะจุดสีเหลืองล้อมรอบด้วยสีม่วง (ภาพที่ 4.2B) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Kokkinos and Clark (1992) ที่อธิบายถึงลักษณะอาการของมันเทศที่มีการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) และ *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) มักจะพบอาการใบจุดสีเหลือง หรือจุดสีเหลืองปนม่วง ใบอาจจะผิดรูป ใบหงิกงอ และจะทำให้การเจริญของต้นหยุดชะงัก หรือทำให้ต้นแคระแกร็นได้



ภาพที่ 4.2 ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากไวรัสไวรัสบนใบมันเทศ

A= Chlorotic yellowing B= Purpling spot

(ก) สายพันธุ์ SP02

(ข) สายพันธุ์ SP08

4.3 ความรุนแรงของโรคที่เกิดจากไวรัสของมันเทศ

จากการประเมินระดับความรุนแรงของอาการโรคที่เกิดจากไวรัสจากหัวพันธุ์มันเทศทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ได้รับจากมูลนิธิโครงการหลวงอินทนนท์ หน่วยวิจัยขุนห้วยแห้ง จังหวัดเชียงใหม่ และนำมาปลูกในสภาพโรงเรือน ณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่า ตัวอย่างหัวพันธุ์มันเทศที่สุ่มมาปลูก โดยเริ่มแสดงอาการหลังปลูก 90 วัน พบอาการบนใบเป็นจุดสีเหลืองปนม่วง ซึ่งระดับความรุนแรงที่พบของไวรัสในมันเทศแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันเป็นดังนี้ สายพันธุ์ SP02 ระดับความรุนแรงที่พบมากที่สุดคือระดับ 2 คิดเป็นร้อยละ 48 รองลงมาคือระดับที่ 3 คิดเป็นร้อยละ 23 ส่วนระดับที่ 0, 1 และ 4 คิดเป็นร้อยละ 11, 15 และ 3 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) และสายพันธุ์ SP08 ระดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความรุนแรงที่พบมากที่สุดคือระดับ 2 คิดเป็นร้อยละ 45 รองลงมาคือระดับที่ 1 คิดเป็นร้อยละ 28 ส่วนระดับที่ 0, 3 และ 4 คิดเป็นร้อยละ 10, 14 และ 3 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ระดับความรุนแรงของอาการไวรัส (0-4) ที่พบในหัวพันธุ์มันเทศสายพันธุ์ SP02 และ SP08 หลังปลูกเป็นเวลา 90 วัน

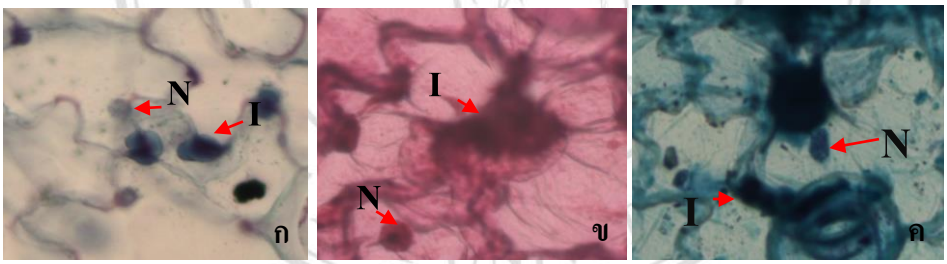
ระดับความรุนแรงของโรคไวรัส	ปริมาณที่พบ (ร้อยละ)	
	มันเทศสายพันธุ์ SP02	มันเทศสายพันธุ์ SP08
0	11.0	10.0
1	15.0	28.0
2	48.0	45.0
3	23.0	14.0
4	3.0	3.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 การวินิจฉัยโรคที่เกิดจากไวรัส

4.3.1 การศึกษาลักษณะอาการผิดปกติระดับเซลล์ของใบมันเทศ

จากการศึกษาลักษณะอาการผิดปกติในระดับเซลล์ของมันเทศสายพันธุ์ SP02 ที่แสดงอาการใบจุดสีเหลืองที่ล้อมรอบด้วยสีม่วง โดยนำเนื้อเยื่อบริเวณผิวใบของมันเทศมาตรวจสอบด้วยการย้อมสี พบว่าอวัยวะภายในเซลล์มีลักษณะผิดปกติเกิดขึ้น ได้แก่ เยื่อหุ้มนิวเคลียสมีบางส่วนมีลักษณะฉีกขาด บางส่วนมีลักษณะขรุขระ (ภาพที่ 4.3) ซึ่งตามการรายงานของ Christie และ Edwardson (2015) นอกจากนั้นยังพบกลุ่มของ Inclusion body บริเวณที่ใกล้กับนิวเคลียส ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Souto *et.al.* (2003) ซึ่งกล่าวว่า Inclusion body ของเชื้อ SPFMV มีลักษณะไม่แน่นอน บาง Inclusion body จะมีลักษณะ Cylindical อยู่รวมกัน บางส่วนก็จะเป็นก้อนกลม ซึ่งลักษณะข้างต้นสันนิษฐานได้ว่าเกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลาย และมีแนวโน้มว่าเกิดจากเชื้อไวรัสในสกุล *Potyvirus* เนื่องจากเกิดลักษณะอาการที่ผิดปกติของเซลล์ ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับลักษณะ Inclusion body ที่ถูกไวรัสสกุลนี้เข้าทำลายในพืชหลายชนิด

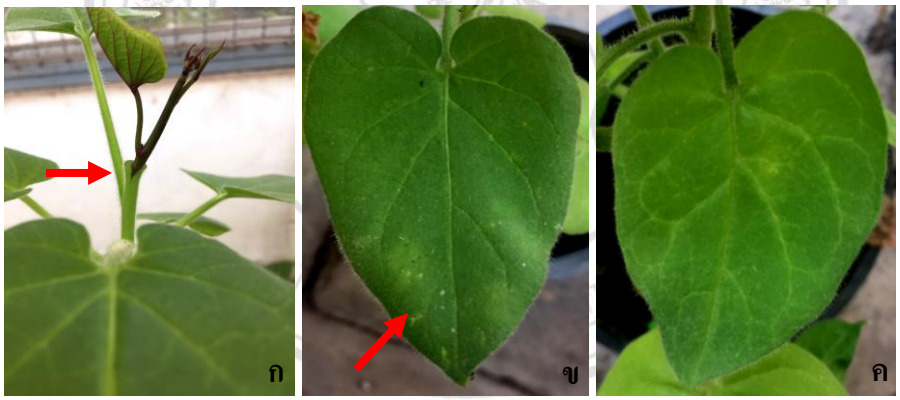


ภาพที่ 4.3 ลักษณะความผิดปกติภายในเซลล์ของใบมันเทศที่แสดงอาการใบจุดสีเหลืองปนม่วง ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า N = Nucleus I = Cylindical Inclusion body (ก) การย้อมสีด้วย Basic Fusion และ Brilliant Green (ข) การย้อมสีด้วย Basic Fusion, Toluidine Blue O และ Brilliant Green (ค) การย้อมสีด้วย Basic Fusion และ Toluidine Blue O

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.2 การถ่ายทอดโรคที่เกิดจากไวรัสโดยวิธีการเสียบยอด

จากทดสอบการถ่ายทอดโรคโดยวิธีการเสียบยอดมันเทศ บนยาสูบใบเล็ก พบว่าหลังปลูกเชื้อ 30 วัน ยาสูบใบเล็กแสดงอาการจุดสีเหลือง กระจายบนใบหลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน (ภาพที่ 4.4) สอดคล้องกับการรายงานของ (Shang *et al*., 1996) ซึ่งได้ศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ SPFMV ในต้น *Chenopodium quinoa* หลังจากการปลูกเชื้อเป็นเวลา 15 วัน ต้นพืชแสดงอาการใบด่าง ใบม้วนงอ และใบหยิก แสดงให้เห็นถึงการถ่ายทอดเชื้อว่าเกิดขึ้นอย่างแน่นอน อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยโรคไวรัสจากพืชทดสอบเป็นเพียงแนวโน้มการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสเบื้องต้น อาการที่พบอาจจะเป็นการเข้าทำลายของเชื้อหลายชนิดแต่แสดงอาการไม่ชัดเจน จึงไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายได้จากการสังเกตลักษณะอาการบนยาสูบใบเล็กได้ แต่จากผลการทดลองนั้นแสดงให้เห็นว่าอาการใบจุดสีเหลืองปนม่วงของมันเทศสามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีการติดตายอด และทำให้พืชทดสอบแสดงอาการจุดสีเหลือง บางใบมีอาการหงิกงอผิดรูป จึงสันนิษฐานได้ว่าอาจเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในสกุล *Potyvirus* หรือ *Closterovirus*

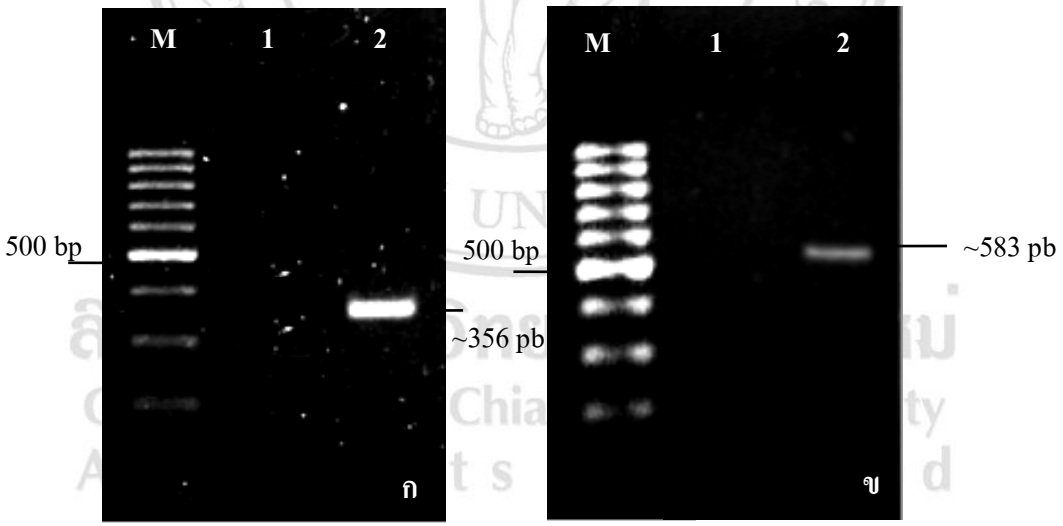


ภาพที่ 4.4 การปลูกเชื้อมันเทศบนพืชทดสอบยาสูบใบเล็กที่แสดงอาการจุดสีเหลือง
(ก) การเสียบยอด (ข) อาการจุดสีเหลืองบนใบ (ค) ลักษณะใบหงิกงอผิดรูป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.3 การตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค PCR

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างใบมันเทศที่แสดงอาการใบจุดสีเหลืองปนม่วงที่ปลูกไว้ในโรงเรือนของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มาตรวจสอบเชื้อไวรัส 2 ชนิด ได้แก่ SPFMV และ SPCSV ด้วยเทคนิค PCR จากการตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาวประมาณ 356 คู่เบส (ภาพที่ 4.5ก) ซึ่งมีขนาดตรงกันกับขนาดของนิวคลีโอไทด์ผลผลิตจากคู่ไพร์เมอร์ SPFMV 1-F และ SPFMV 1-R ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส SPFMV (Kwak *et al.*, 2014) และในขณะเดียวกันพบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาวประมาณ 583 คู่เบส (ภาพที่ 4.5ข) ซึ่งมีขนาดตรงกันกับขนาดของนิวคลีโอไทด์ผลผลิตจากคู่ไพร์เมอร์ SPCSV uni-f1 และ SPCSV r1 ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส SPCSV (Kwak *et al.*, 2014) จากผลการตรวจสอบดังกล่าวสามารถชี้ให้เห็นว่าสาเหตุของลักษณะอาการใบจุดสีเหลืองของมันเทศนั้นเกิดจากการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อไวรัส SPFMV และ SPCSV ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Potyvirus* และ *Closterovirus* ตามลำดับ ดังนั้นจึงควรศึกษาลักษณะอาการที่แน่นอนของเชื้อไวรัสแต่ละชนิดต่อไปเนื่องจากบางใบพืชไม่ได้ปรากฏลักษณะจุดสีเหลืองล้อมรอบด้วยสีม่วงแต่ปรากฏเพียงลักษณะใบจุดสีเหลืองเพียงอย่างเดียวแต่ยังมีเชื้อไวรัสทั้ง2ชนิดเข้าทำลายร่วมกัน

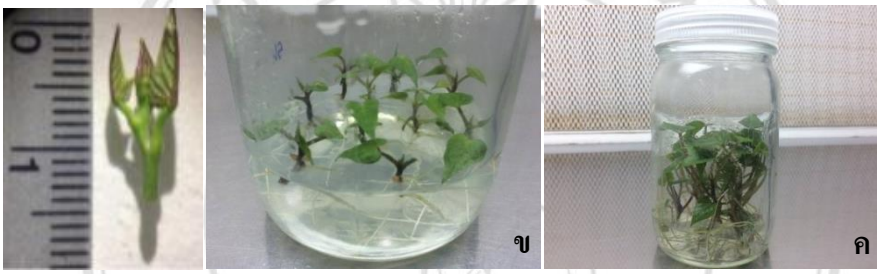


ภาพที่ 4.5 การตรวจเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค PCR ในตัวอย่างมันเทศที่แสดงอาการโรคที่เกิดจากไวรัส
สำหรับ (ก) *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV)
(ข) *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV)
ช่องที่ 1 คือ DNA marker 100 bp ladder
ช่องที่ 2 คือ Nuclease-free water (control) และช่องที่ 3 คือ ตัวอย่างมันเทศที่นำมาทดสอบ

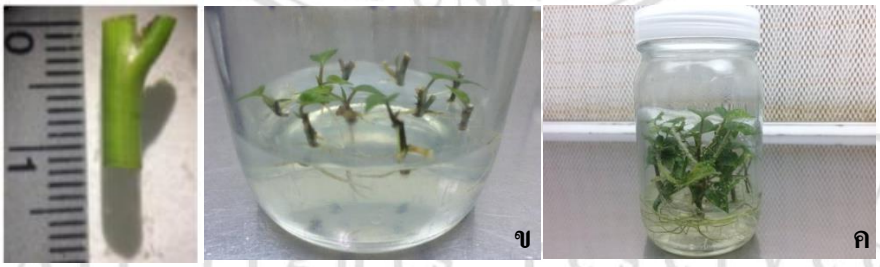
4.4 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของต้นมันเทศในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.4.1 การเพาะเลี้ยงส่วนขยายพันธุ์เริ่มต้น

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยอาศัยส่วนขยายพันธุ์ 2 ส่วน ได้แก่ ยอด และตาข้าง ซึ่งการเจริญของต้นมันเทศสายพันธุ์ SP02 และ SP08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน พบว่า ต้นมันเทศเจริญสมบูรณ์ดี โดยดูจากลักษณะใบมีสีเขียว ลำต้นตั้งตรงแข็งแรง และมีความสูงเฉลี่ย ของสายพันธุ์ SP02 และ SP08 เท่ากับ 6.20 และ 5.15 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งการเพาะเลี้ยงส่วนยอดสามารถเจริญได้ดีและออกรากได้รวดเร็วกว่าต้นที่เพาะเลี้ยงจากส่วนของตาข้าง (ภาพที่ 4.6-4.7)



ภาพที่ 4.6 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนยอดของมันเทศสายพันธุ์ SP08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ก= ส่วนขยายพันธุ์ส่วนยอดขนาด 1 เซนติเมตร ข= ต้นกล้าอายุ 10 วัน ค= ต้นกล้าอายุ 30 วัน



ภาพที่ 4.7 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนตาข้างของมันเทศสายพันธุ์ SP08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ก= ส่วนขยายพันธุ์ส่วนตาข้างขนาด 1 เซนติเมตร ข= ต้นกล้าอายุ 10 วัน ค= ต้นกล้าอายุ 30 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
All rights reserved

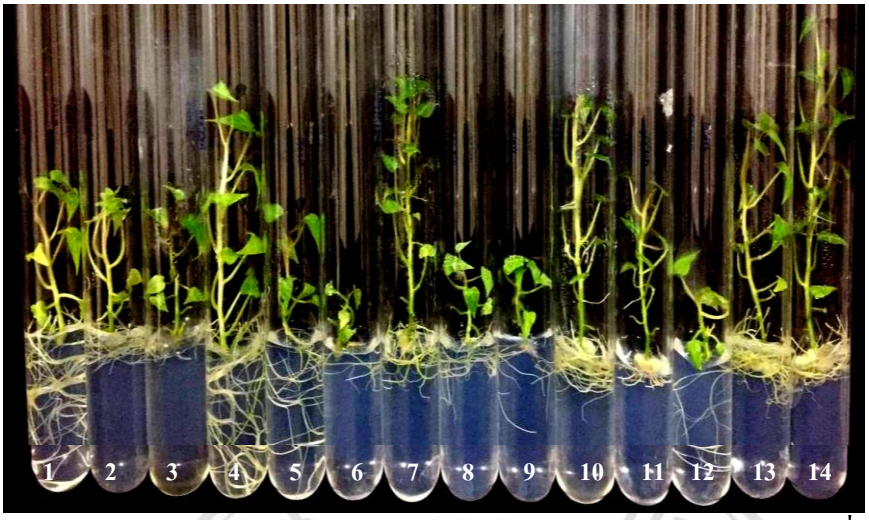
4.4.2 ศึกษาการพัฒนาสูตรอาหาร MS

จากการทดสอบอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เพาะเลี้ยงมันเทศทั้งสองสายพันธุ์ ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ชนิดได้แก่ IAA, BAP และ GA_3 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ทั้งหมด 14 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ซึ่งภายหลังการย้ายต้นมันเทศลงบนอาหารแต่ละกรรมวิธี ตามวิธีการข้อที่ 3.4.2 เป็นเวลา 30 วัน (ภาพที่ 4.8-4.9)

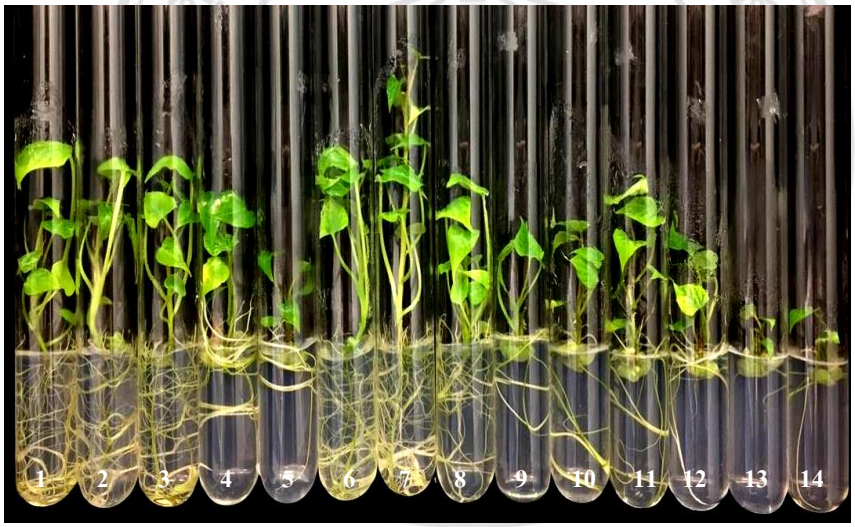
การพัฒนาการเจริญของมันเทศสายพันธุ์ SP02 (ภาพที่ 4.8) และ (ตารางที่ 4.3) จากการสังเกตการเจริญการพัฒนาจำนวนข้อ พบว่า กรรมวิธีที่ 7 ที่เติม IAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนข้อได้มากที่สุด เท่ากับ 11.1 ข้อต่อต้น ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญ และมีอัตราการรอดหลังการออกปลูกมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 60 และจากการสังเกตความยาวราก พบว่าความยาวรากยาวที่สุดในกรรมวิธีที่ 4 ที่เติม BAP เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีความยาวรากเท่ากับ 9.59 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Dolinski and Olek (2013) ที่รายงานว่า การเพาะเลี้ยงส่วนข้อของมันเทศ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ Carmen Rubin และ สายพันธุ์ White Triumph บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม IAA ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถส่งเสริมการเจริญมันเทศดีที่สุด ดังนี้ คือ เพิ่มปริมาณข้อได้มากที่สุด เท่ากับ 4.35 และ 3.70 ข้อต่อต้น ตามลำดับ การมีชีวิตรอดหลังการออกปลูกร้อยละ 72 และ 72 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เติม GA_3 ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Kinetin ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การพัฒนาการเจริญของมันเทศสายพันธุ์ SP02 (ภาพที่ 4.9) และ (ตารางที่ 4.4) จากการสังเกตการเจริญการพัฒนาจำนวนข้อ พบว่า กรรมวิธีที่ 7 ที่เติม IAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3 ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนข้อได้มากที่สุด เท่ากับ 13.8 ข้อต่อต้น ความยาวรากยาวที่สุด เท่ากับ 7.40 เซนติเมตร และความสูงต้นสูงที่สุดเท่ากับ 9.94 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญ และมีอัตราการรอดหลังการออกปลูกมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 50

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.8 การเจริญของต้นอ่อนมันเทศสายพันธุ์ SP02 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญที่แตกต่างกัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ 4.9 การเจริญของต้นอ่อนมันเทศสายพันธุ์ SP08 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญที่แตกต่างกัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

กรรมวิธีที่ 1 MS free hormone

กรรมวิธีที่ 2 MS + 0.5 mg/l IAA

กรรมวิธีที่ 3 MS + 1 mg/l IAA

กรรมวิธีที่ 4 MS + 1 mg/l BAP

กรรมวิธีที่ 5 MS + 2 mg/l BAP

กรรมวิธีที่ 6 MS + 1 mg/l GA_3

กรรมวิธีที่ 7 MS + 1 mg/l GA_3 + 0.5 mg/l IAA

กรรมวิธีที่ 8 MS + 1 mg/l GA_3 + 1 mg/l IAA

กรรมวิธีที่ 9 MS + 1 mg/l GA_3 + 1 mg/l BAP

กรรมวิธีที่ 10 MS + 1 mg/l GA_3 + 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA

กรรมวิธีที่ 11 MS + 1 mg/l GA_3 + 1 mg/l BAP + 1 mg/l IAA

กรรมวิธีที่ 12 MS + 1 mg/l GA_3 + 2 mg/l BAP

กรรมวิธีที่ 13 MS + 1 mg/l GA_3 + 2 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA

กรรมวิธีที่ 14 MS + 1 mg/l GA_3 + 2 mg/l BAP + 1 mg/l IAA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศสายพันธุ์ SP02 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญที่แตกต่างกันต่อการพัฒนาของ จำนวนข้อ จำนวนใบ ความยาวราก และความสูงต้น หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน

กรรมวิธี	ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญ (mg/l)			จำนวนข้อ[1]	จำนวนใบ[1]	ความยาวราก (cm)[1]	ความสูงต้น (cm)[1]
	IAA	BAP	GA_3				
1	0	0	0	6.80^{bc} [2]	6.80^{bcde}	6.85^{b}	5.15^{bc}
2	0.5	0	0	5.50^{bcd}	4.50^{efg}	3.94^{defg}	2.60^{de}
3	1	0	0	6.30^{bc}	4.80^{defg}	3.73^{efgh}	2.74^{de}
4	0	1	0	8.00^{b}	7.90^{abcd}	9.59^{a}	7.04^{ab}
5	0	2	0	6.40^{bc}	5.60^{cdef}	6.72^{b}	2.84^{de}
6	0	0	1	3.00^{d}	2.00^{g}	4.70^{de}	1.13^{e}
7	0.5	0	1	11.10^{a}	10.4^{a}	4.60^{def}	6.51^{bc}
8	1	0	1	5.00^{bcd}	3.90^{efg}	5.06^{cd}	2.32^{e}
9	0	1	1	4.20^{cd}	4.10^{efg}	3.53^{fghi}	2.07^{e}
10	0.5	1	1	8.00^{b}	9.20^{ab}	2.65^{hij}	6.20^{bc}
11	1	1	1	7.20^{bc}	8.00^{abcd}	2.23^{j}	4.57^{cd}
12	0	2	1	2.50^{d}	2.50^{fg}	6.03^{bc}	4.57^{cd}
13	0.5	2	1	8.00^{b}	8.80^{abc}	3.00^{ghij}	1.17^{e}
14	1	2	1	7.30^{b}	6.60^{bcde}	2.56^{ij}	8.70^{a}
	$LSD_{0.05}$			3.05	3.22	1.15	2.05
	CV%			54.12	59.95	27.94	55.39

[1] ค่าเฉลี่ย 10 ซ้ำ

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันใน columm เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Least-significant difference ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศสายพันธุ์ SP08 ในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญที่แตกต่างกันต่อการพัฒนาของ จำนวนข้อ จำนวนใบ ความยาวราก และความสูงต้น หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน

กรรมวิธี	ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญ (mg/l)			จำนวนข้อ[1]	จำนวนใบ[1]	ความยาวราก (cm)[1]	ความสูงต้น (cm)[1]
	IAA	BAP	GA_3				
1	0	0	0	6.80^{c} [2]	9.30^{c}	7.55^{a}	4.36^{e}
2	0.5	0	0	6.30^{c}	9.50^{bc}	6.49^{b}	5.55^{cd}
3	1	0	0	6.00^{c}	8.30^{c}	6.20^{b}	5.03^{de}
4	0	1	0	6.10^{c}	5.70^{d}	4.73^{cde}	4.28^{e}
5	0	2	0	2.90^{d}	3.80^{e}	3.79^{fg}	2.80^{f}
6	0	0	1	8.50^{b}	9.50^{bc}	5.36^{c}	6.55^{bc}
7	0.5	0	1	13.8^{a}	11.70^{a}	7.40^{a}	9.94^{a}
8	1	0	1	8.50^{b}	10.70^{ab}	5.09^{cd}	6.84^{b}
9	0	1	1	2.40^{df}	3.90^{e}	4.47^{def}	2.49^{fg}
10	0.5	1	1	1.70^{ef}	2.70^{ef}	4.00^{efg}	2.74^{fg}
11	1	1	1	1.60^{ef}	2.20^{f}	4.01^{efg}	2.26^{fgh}
12	0	2	1	1.40^{ef}	2.70^{ef}	3.55^{g}	1.68^{gh}
13	0.5	2	1	1.00^{f}	2.20^{f}	2.71^{h}	1.19^{h}
14	1	2	1	1.00^{f}	2.10^{f}	2.46^{h}	1.33^{h}
	$LSD_{0.05}$			1.11	1.37	0.80	1.09
	CV%			26.03	25.81	18.87	30.31

[1] ค่าเฉลี่ย 10 ซ้ำ

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันใน columm เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Least-significant difference ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การกำจัดไวรัส SPFMV และ SPCSV สาเหตุโรคในมันเทศ

4.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (Meristem tip culture)

จากการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของมันเทศทั้ง 2 สายพันธุ์ให้มีขนาด 0.3, 0.5 และ 1 มิลลิเมตร ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญ เลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน และย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่เติม BAP เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 วัน พบร้อยละการมีชีวิตรอดคิดเป็น 50-87.5 และ 95 ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงต่อไปบนอาหารสูตรข้างต้น เป็นระยะเวลา 60 วัน เนื้อเยื่อเจริญของบางตัวอย่างสามารถพัฒนาเป็นใบอ่อนคู่แรกได้ (ภาพที่ 4.10) และบางตัวอย่างมีการเจริญเป็นแคลลัส อย่างไรก็ตาม พบว่าการตัดเนื้อเยื่อขนาด 0.3 มิลลิเมตร มีร้อยละการมีชีวิตรอดเพียง 6.67 โดยพบว่าเนื้อเยื่อส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย จากนั้นนำต้นมันเทศที่เจริญจากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดทั้ง 3 ขนาดมาสังเกตอาการโรคไวรัสบนใบทั้งการสังเกตในต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 4.11) และต้นกล้าที่ย้ายปลูกในสภาพโรงเรือน (ภาพที่ 4.12) พบว่า ไม่แสดงอาการใบจุดสีเหลืองหรือสีม่วงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นมันเทศที่ไม่ได้ผ่านการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด เช่นเดียวกับการรายงานของ Wang *et al.* (2008) ที่พบว่าขนาดของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของมันเทศขนาด 0.5 และ 1 มิลลิเมตร มีอัตราการมีชีวิตรอดร้อยละ 100 หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน ซึ่งการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาดใหญ่มีร้อยละการรอดมากกว่าขนาดเล็ก แต่อย่างไรก็ตามเนื้อเยื่อเจริญขนาดเล็กมีร้อยละการปลอดมากกว่าเนื้อเยื่อเจริญขนาดใหญ่

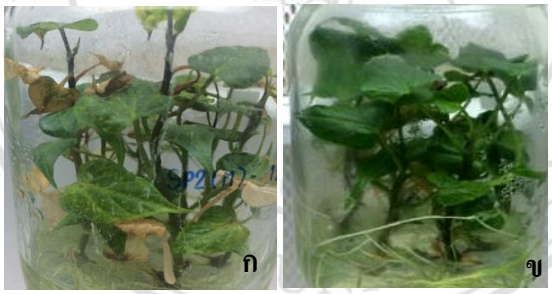
4.2 การใช้ความร้อนร่วมกับการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (Thermotherapy and meristem tip culture)

จากการนำต้นมันเทศที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ อายุ 30วัน ที่เก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิโดยให้ความร้อน 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน พบว่า ต้นมันเทศมีลักษณะใบเหลืองเล็กน้อยแต่เนื้อเยื่อของต้นยังคงมีความแข็งแรง ไม่แตกหักง่ายเช่นเดียวกันกับต้นที่ไม่ได้เข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิ แต่ใบเริ่มจะมีลักษณะเหลืองเพิ่มขึ้นถ้าเพิ่มระยะเวลาในการเก็บภายในตู้นานขึ้น หลังจากนั้นนำมาตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดให้มีขนาด 0.3, 0.5 และ 1 มิลลิเมตร พบว่าหลังการเพาะเลี้ยงระยะเวลา 30 วัน การตัดเนื้อเยื่อเจริญ 0.3, 0.5 และ 1 มิลลิเมตรมีชีวิตรอดคิดเป็น ร้อยละ 37.5, 75 และ 87.5 ตามลำดับ ซึ่งภายหลังจากการตัดมาเลี้ยงบนอาหาร ระยะเวลา 60 วัน เนื้อเยื่อเจริญสามารถพัฒนาเป็นใบอ่อนคู่แรกได้ในบางชิ้น และมีการเกิดแคลลัสด้วย จากนั้นจะเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ขนาดเล็กและเกิดรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BAP ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในเวลา 120 วัน ส่วนขนาด 0.3 มิลลิเมตรไม่มีชีวิตรอด ซึ่งเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแห้งตายไป จากนั้นนำต้นมันเทศที่เจริญจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดทั้ง 2 ขนาด ได้แก่ 0.5 และ 1 มิลลิเมตร มาสังเกตอาการโรคที่เกิดจากไวรัสบนใบ พบว่า ไม่แสดงอาการใบจุดสีเหลืองหรือม่วงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นมันเทศที่ไม่ได้ผ่านการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด เช่นเดียวกับการรายงานของ Dugassa and Feyissa (2011) ที่กล่าวว่าการใช้ความร้อนร่วมกับการตัดเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.5 และ 1 มิลลิเมตร มีอัตราชีวิตรอดสูง และสามารถลดปริมาณของไวรัสได้

ภาพที่ 4.10 ลักษณะมันเทศสายพันธุ์ SP02 ที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด
(ก) เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.5 มิลลิเมตร
(ข) การเจริญของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดหลังการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 65 วัน
(ค) ต้นที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด เป็นเวลา 75 วัน



ภาพที่ 4.11 ลักษณะต้นมันเทศสายพันธุ์ SP02 ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 25 วัน
(ก) ต้นมันเทศที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย
(ข) ตันมันเทศที่ปลอดไวรัส

ภาพที่ 4.12 ลักษณะต้นกล้ามันเทศปลอดไวรัสที่ออกปลูกในสภาพโรงเรือน เป็นเวลา 45 วัน
(ก) สายพันธุ์ SP02
(ข) สายพันธุ์ SP08

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การตรวจสอบการปลอดไวรัส

จากการตรวจสอบการปลอดไวรัส SPFMV และ SPCSV ด้วยเทคนิค PCR ในมันเทศทั้งสองสายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ SP02 และ SP08 ที่ผ่านการตัดเนื้อเยื่อเจริญพบว่า ต้นมันเทศสายพันธุ์ SP02 ที่เจริญจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.3, 0.5 และ 1 มิลลิเมตร มีร้อยละการปลอดไวรัส เท่ากับ 100, 90.9 และ 94.2 ตามลำดับ และสายพันธุ์ SP08 ที่เจริญจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.5 และ 1 มิลลิเมตร มีร้อยละการปลอดไวรัส เท่ากับ 100 (ตารางที่ 4.5) และ (ภาพที่ 4.13) เช่นเดียวกับการรายงานของ Wang and Volkonen (2008) ที่พบว่าการตัดเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.5-1.5 มิลลิเมตร ทำให้ต้นมันเทศปลอดไวรัสได้ร้อยละ 87-100

จากการตรวจสอบการปลอดไวรัสในมันเทศทั้งสองสายพันธุ์ที่ผ่านการใช้ความร้อนร่วมกับการตัดเนื้อเยื่อเจริญพบว่า ต้นมันเทศทั้งสองสายพันธุ์ที่เจริญจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.5 และ 1 มิลลิเมตรมีร้อยละการปลอดไวรัส เท่ากับ 100 (ตารางที่ 4.5) และ (ภาพที่ 4.13) เช่นเดียวกับการรายงานของ Dugassa and Feyissa (2011) ที่กล่าวว่าการใช้ความร้อนร่วมกับการตัดเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.5 และ 1 มิลลิเมตร สามารถกำจัดเชื้อไวรัสได้ร้อยละ 88.99-100 แต่การใช้ความร้อนร่วมกับการตัดเนื้อเยื่อเจริญที่มีขนาดเล็กนั้นมักจะมีอัตราการรอดที่ต่ำมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.4 ร้อยละการมีชีวิตรอด การเจริญ และการกำจัดไวรัส (SPCSV และ SPFMV) ของมันเทศ 2 สายพันธุ์ (SP02 และ SP08) โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดและใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาดต่างๆ

กรรมวิธี[a]	การมีชีวิตรอด (%)[b]		การเจริญเป็นต้น (%)[c]		การกำจัดเชื้อไวรัส (%)[d]			
					SPCSV		SPFMV	
	SP02	SP08	SP02	SP08	SP02	SP08	SP02	SP08
1. เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด								
0.3 mm	50.0	45.0	5.0	11.1	100	100	100	100
0.5 mm	87.5	85.0	94.3	97.0	90.9	100	87.9	90.0
1 mm	95.0	95.0	92.1	92.1	94.3	100	88.6	97.1
2. อุณหภูมิ 37±2 °C เป็นเวลา 30 วัน								
0.3 mm	37.5	37.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5 mm	75.0	70.0	83.3	89.3	100	100	100	100
1 mm	87.5	87.5	94.3	94.3	100	100	100	100

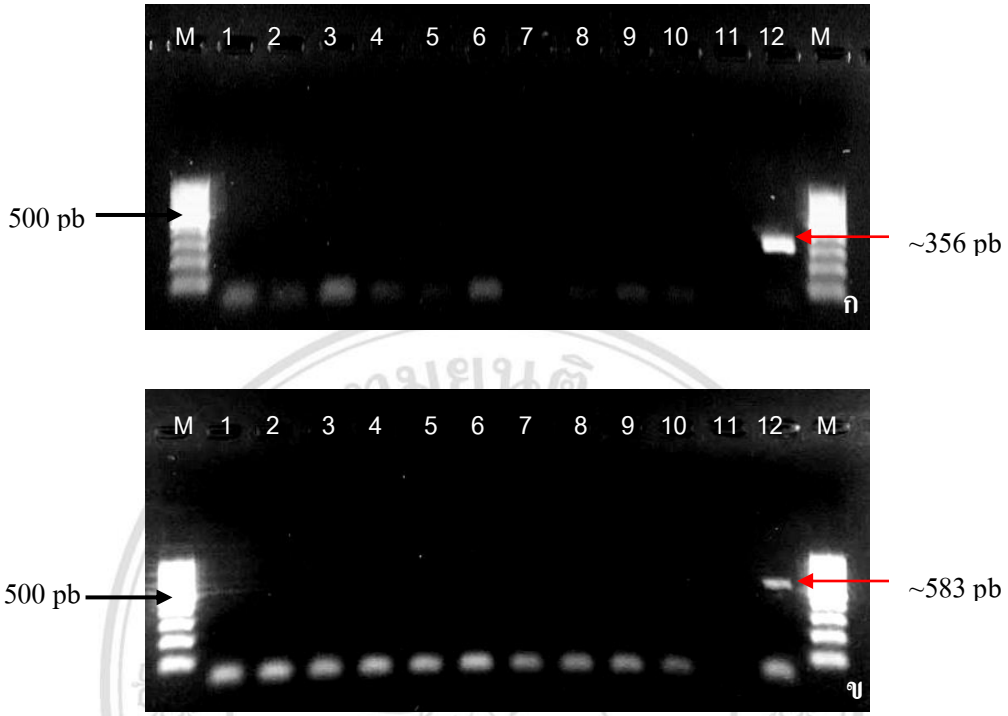
[a] จำนวน meristem tips ทั้งหมด 40 ซ้ำ โดยแต่ละขนาดมีอย่างละ 40 ซ้ำ

[b] ความมีชีวิตรอดหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เป็นเวลา 120 วัน

[c] การเจริญกลายเป็นต้นหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS + BAP 1 mg/l เป็นเวลา 150 วัน

[d] เปอร์เซ็นต์ของมันเทศที่ปลอดไวรัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.13 การตรวจสอบการปลอดไวรัสด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพร์เมอร์จำนวน 2 คู่ ในตัวอย่างมันเทศที่ผ่านการกำจัดไวรัสด้วยกรรมวิธีต่างๆ

(ก) *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) (ข) *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV)

M คือ DNA marker 100 bp ladder

ช่องที่ 1 คือ ต้นมันเทศสายพันธุ์ SP02 ที่ผ่านการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตร

ช่องที่ 2 คือ ต้นมันเทศสายพันธุ์ SP02 ที่ผ่านการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.5 มิลลิเมตร

ช่องที่ 3 คือ ต้นมันเทศสายพันธุ์ SP02 ที่ผ่านการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 1 มิลลิเมตร

ช่องที่ 4 คือ ต้นมันเทศสายพันธุ์ SP02 ที่ผ่านความร้อนร่วมการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.5 มิลลิเมตร

ช่องที่ 5 คือ ต้นมันเทศสายพันธุ์ SP02 ที่ผ่านความร้อนร่วมการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 1 มิลลิเมตร

ช่องที่ 6 คือ ต้นมันเทศสายพันธุ์ SP08 ที่ผ่านการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตร

ช่องที่ 7 คือ ต้นมันเทศสายพันธุ์ SP08 ที่ผ่านการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.5 มิลลิเมตร

ช่องที่ 8 คือ ต้นมันเทศสายพันธุ์ SP08 ที่ผ่านการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 1 มิลลิเมตร

ช่องที่ 9 คือ ต้นมันเทศสายพันธุ์ SP08 ที่ผ่านความร้อนร่วมการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.5 มิลลิเมตร

ช่องที่ 10 คือ ต้นมันเทศสายพันธุ์ SP08 ที่ผ่านความร้อนร่วมการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 1 มิลลิเมตร

ช่องที่ 11 คือ Nuclease-free water (Negative control)

ช่องที่ 12 คือ Positive Control

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. จากตัวอย่างหัวพันธุ์มันเทศที่เป็นพืชสำคัญที่ทางมูลนิธิโครงการหลวงมีการส่งเสริมการปลูกจากแปลงเพาะปลูกสถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ หน่วยวิจัยย่อยขุนห้วยแห้ง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ พบว่ามันเทศ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ SP02 มีลักษณะสีผิวเป็นสีแดงม่วง และมีเนื้อเป็นสีม่วง ใบเป็นรูปฐานแยกหรือสองหยัก (lobed) ส่วนสายพันธุ์ SP08 มีลักษณะสีผิวเป็นสีแดงม่วง และมีเนื้อเป็นสีเหลือง ใบเป็นรูปหัวใจ (cordate)

2. จากการศึกษาอาการและตรวจสอบเชื้อไวรัสในตัวอย่างมันเทศ 2 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค PCR พบเชื้อไวรัส SPFMV ซึ่งอยู่ในสกุล *Potyvirus* และ เชื้อ SPCSV ซึ่งอยู่ในสกุล *Closterovirus* เป็นสาเหตุโรคที่เข้าทำลายร่วมกัน

3. เมื่อนำต้นมันเทศดังกล่าวมาทำให้ปลอดไวรัสด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ขนาด 0.3, 0.5 และ 1 มิลลิเมตร ทั้งแบบใช้และไม่ใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ขนาด 0.3, 0.5 และ 1 มิลลิเมตร พบว่า วิธีการดังกล่าวสามารถกำจัดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ออกจากชิ้นพืชได้ในช่วงร้อยละ 87.9-100

4. การใช้เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาดใหญ่ที่ 0.5-1 มิลลิเมตร ส่งผลดีต่ออัตราการมีชีวิตรอดและการเจริญของพืช โดยเฉพาะเมื่อใช้ความร้อนร่วมกับการตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่ทำให้สามารถกำจัดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ได้ถึงร้อยละ 100 และมีร้อยละการมีชีวิตรอดหลังตัดเนื้อเยื่อเจริญสูงร้อยละ 70 ขึ้นไป อย่างไรก็ตามการใช้เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตร และไม่ใช้ความร้อนร่วมก็มีโอกาสในการกำจัดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดได้ร้อยละ 100 เหมือนกัน หากแต่จะมีอัตราการมีชีวิตและการเจริญค่อนข้างต่ำ

5. จากการเพาะเลี้ยงมันเทศปลอดเชื้อไวรัสในอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม IAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ GA_3ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนส่วนขยายพันธุ์ที่สมบูรณ์ได้ในอัตรา 1:11- 1:13 ในระยะเวลา 1 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกสารอ้างอิง

กรมศุลกากร. 2559. สถิติการนำเข้า-ส่งออกมันเทศ.(ระบบออนไลน์) แหล่งข้อมูล : http://www.customs.go.th/list_strc_link.php?ini_content=statistics_report&lang=th&left_menu=nmenu_esevice_007. (25 ธันวาคม 2561).

เกวลิน คุณาศักดากุล. 2556. การประยุกต์ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทางโรคพืช (Application of Plant Tissue Culture in Plant Pathology). คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 94 หน้า.

เกษตรก้าวหน้า. 2559. หนอนเจาะเถามันเทศ (ระบบออนไลน์) แหล่งข้อมูล : http://www.kasetcenter.com/article/topic-62504.html (25 ธันวาคม 2561).

ฐานข้อมูลพันธุกรรมพืช. 2559. ด้วงงวงมันเทศ (ระบบออนไลน์) แหล่งข้อมูล : http://hort.ezathai.org/?p=3484 (25 ธันวาคม 2561).

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร. 2552. เทคโนโลยีการผลิตมันเทศหลังนา. สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขต 2. 224 หน้า.

สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2551. โรคพืชที่เกิดจากไวรัส (Virus Disease of Plants). ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 206 หน้า.

สถาบันวิจัยพืชสวน. 2559. เทคโนโลยีการผลิตมันเทศ. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 63 หน้า.

Adikini, S., S.B. Mukasa, R.O.M. Mwanga and R.W. Gibson. 2016. Effects of *Sweet potato feathery mottle virus* and *Sweet potato chlorotic stunt virus* on the yield of sweet potato in Uganda. Journal of Phytopathology 164: 242–254.

.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Ames, T., N.E.J.M. Smit, A.R. Braun, J.N. O'Sullivan, and L.G. Skoglund. 1997. Sweetpotato: Sweetpotato: Major P Major Pests, Diseases, and Diseases and Nutritional Nutritional Nutritional Disorders . International Potato Center (CIP). 153 p.

Clark, C.A., K.S. Derrick, C.S. Pace and B. Watson. 1986. Survey of wild *Ipomoea* spp. as potential reservoirs of *Sweet potato feathery mottle virus* in Louisiana. Plant Disease 70(10): 931-932.

Christie, R.G. and J. R. Edwardson. 1994. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Monograph 9 (rev.) University of Florida-IFAS, Gainesville. 165 p.

Cohen, J., A. Franck, H.J. Vetten, D.E. Lesemann and G. Loebenstein. 1992. Purification and properties of closterovirus-like particles associated with a whitefly-transmitted disease of sweet potato. Annals of Applied Biology 121: 257-268.

Dolinski, R. and A. Olek. 2013. Micropropagation of sweet potato (*Ipomoea batatas*(L.) Lam) from node explants. Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus 12(4): 117-127.

Dugassa, G. and T. Feyissa. 2011. *In vitro* production of virus- free sweet potato (*Ipomoea batatas*(L.) Lam) by meristem culture and thermotherapy. SINET: Ethiop Journal Science 34(1): 17–28.

FAO. 2014. Production and Area Harvested. (online) available: http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E (25 November 2018).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Huaman, Z. 1991. Discriptors for Sweet Potato. Internation Board for Plant Genetic Resources. 130 p.

Kwak, H.R., M.K. Kim, J.C. Shin., Y.J. Lee., J.K. Seo., H.U. Lee., M.N. Jung., S.H. Kim and H.S. Choi. 2014. The current incidence of viral in Korean sweet potato and development of multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of eight sweet potato viruses. Plant Pathology Journal 30(4): 416-424.

Kokkinos, C.D. and C.A. Clark. 2006. Interactions among *Sweet potato chlorotic stunt virus* and different potyviruses and potyvirus strains infecting sweet potato in the United States. The American Phytopathological Society 90(10): 1347-1352.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15(3): 473-497.

Namanda, S., R. Gatimu, S. Agili, S. Khisa, I. Ndyetabula, C.Bagambisa. 2015. Micropropagation and Hardening Sweetpotato Tissue Culture Plantlets. A Manual Developed from the SASHA Project's Experience in Tanzania. International Potato Center (CIP), Lima, Peru. 39 p.

Ndunguru J., R. Kapinga, P. Sseruwagi, B. Sayi, R. Mwanga, S. Tumwegamire and C. Rugutu. 2009. Assessing the sweetpotato virus disease and its associated vectors in northwestern Tanzania and central Uganda. African Journal of Agricultural Research 4 (4): 334-343.

Schaefers, G.A. and E.R. Terry. 1976. Insect transmission of sweet potato disease agents in Nigeria. Phytopathology 66: 642–645.

Shang, Y.F., C.L.Yang and J.H. Zhao. 1996 Sweetpatato viruses and the research and application of virus-free sweetpotato. Plant Doctor 9 (4): 35-39.

Sim, J., R.A. Valverde and C.A.Clark. 2000. Whitefly transmission of Sweet potato chlorotic stunt virus. Plant Disease 84(11) : 1250-1250.

Sivparsad, B. J. and A. Gubba. 2012. Development of an efficient plant regeneration protocol for sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cv. Blesbok. African Journal of Biotechnology 11(84) : 14982-14987.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Souto, E.R., J. Sim, J. Chen, R.A. Valverde and C.A. Clark. 2003. Properties of strains of *Sweet potato feathery mottle virus* and two newly recognized potyvirues infecting sweet potato in United States. The American Phytopathological Society 87(10): 1226-1232.

Tugume, A.K., S.B. Mukasa, and J.P.T. Valkonen. 2008. Natural wild hosts of *Sweet potato featheraay mottle virus* show spatial differences in virus incidence and virus-like diseases in Uganda. The American Phytopathological Society 98(6): 640-652.

Wang, Q.C. and J.P.T. Valkonen. 2008. Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato by shoot tip culture and cryotherapy. Journal of Virological Methods 154: 135–145.

Wondimu, T., T. Feyissa and G. Bedadav. 2012. Meristem culture of selected sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) cultivars to produce virus-free planting material. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 87 (3) : 255–260.

Woolfe, J.A. 1992. Sweet Potato; An Untapped Food Resource. Cambridge University Press, Cambridge. 643 p.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

อาหารสังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ตาราง 1 สูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS) ที่ดัดแปลงสารควบคุมการเจริญเติบโต

ชื่อสารเคมี	สูตรสารเคมี	ปริมาณที่ใช้ในอาหาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Ammonium nitrate	NH4NO3	1,650.0
Calcium chloride dihydrate	$CaCl_2.2H_2O$	440.0
Magnesium sulfate heptahydrate	$MgSO_4.7H_2O$	370.0
Potassium dihydrogen phosphate	KH_2PO_4	170.0
Potassium nitrate	KNO_3	1,900.0
Boric acid	H_3BO_3	6.2
Cobalt (II) chloride hexahydrate	$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Copper (II) sulfate pentahydrate	$CuSO_4.5H_2O$	0.025
Iron (II) sulfate heptahydrate	$FeSO_4.7H_2O$	27.8
Manganese (II) sulfate tetrahydrate	$MnSO_4.4H_2O$	22.3
Potassium iodide	KI	0.83
Sodium molybdate dihydrate	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
Zinc sulfate heptahydrate	$ZnSO_4.7H_2O$	8.6
Ethylenediaminetetraacetic acid ferric sodium	NaFe-EDTA	37.3
Myo-inositol		100.0
Nicotinic acid		0.5
Pyridoxine hydrochloride		0.5
Thiamine hydrochloride		0.5
Glycine		2.0
Sucrose		30,000.0
gel		3,000.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1.ข้อมูลทางสถิติการทดสอบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศสายพันธุ์ SP02 ในอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญต่อการพัฒนาจำนวนข้อ หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน

Completely Randomized AOV for rep

Source	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**P**
tr	13	657.64	50.5874	4.25	0.0000
Error	126	1501.30	11.9151		
Total	139	2158.94			

Grand Mean 6.3786 CV 54.12

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	23.0	13	0.0416

Cochran's Q 0.1533

Largest Var / Smallest Var 11.505

Component of variance for between groups 3.86723

Effective cell size 10.0

tr	**Mean**	**tr**	**Mean**
1	6.800	8	5.000
2	5.500	9	4.200
3	6.300	10	8.000
4	8.000	11	7.200
5	6.400	12	2.500
6	3.000	13	8.000
7	11.100	14	7.300

Observations per Mean 10

Standard Error of a Mean 1.0916

Std Error (Diff of 2 Means) 1.5437

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

LSD All-Pairwise Comparisons Test of rep by tr

tr	Mean	Homogeneous Groups
7	11.100	A
4	8.0000	B
10	8.0000	B
13	8.0000	B
14	7.3000	B
11	7.2000	BC
1	6.8000	BC
5	6.4000	BC
3	6.3000	BC
2	5.5000	BCD
8	5.0000	BCD
9	4.2000	CD
6	3.0000	D
12	2.5000	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.5437
Critical T Value 1.979 Critical Value for Comparison 3.0549
There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.ข้อมูลทางสถิติการทดสอบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศสายพันธุ์ SP02 ในอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญต่อการพัฒนาจำนวนใบ หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน

Completely Randomized AOV for rep

Source	DF	SS	MS	F	P
t	13	860.84	66.2181	4.99	0.0000
Error	126	1673.30	13.2802		
Total	139	2534.14			

Grand Mean 6.0786 CV 59.95

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	29.1	13	0.0063
Cochran's Q	0.1528		
Largest Var / Smallest Var	15.975		

Component of variance for between groups 5.29380
Effective cell size 10.0

t	Mean	t	Mean
1	6.800	8	3.900
2	4.500	9	4.100
3	4.800	10	9.200
4	7.900	11	8.000
5	5.600	12	2.500
6	2.000	13	8.800
7	10.400	14	6.600

Observations per Mean 10
Standard Error of a Mean 1.1524
Std Error (Diff of 2 Means) 1.6297

LSD All-Pairwise Comparisons Test of rep by t

t	Mean	Homogeneous Groups
7	10.400	A
10	9.2000	AB
13	8.8000	ABC
11	8.0000	ABCD
4	7.9000	ABCD
1	6.8000	BCDE
14	6.6000	BCDE
5	5.6000	CDEF
3	4.8000	DEFG
2	4.5000	EFG
9	4.1000	EFG
8	3.9000	EFG
12	2.5000	FG
6	2.0000	G

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.6297
Critical T Value 1.979 Critical Value for Comparison 3.2252
There are 7 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ข้อมูลทางสถิติการทดสอบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศสายพันธุ์ SP02 ในอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญต่อการพัฒนาความยาวราก หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน

Completely Randomized AOV for rep

Source	DF	SS	MS	F	P
t	13	551.573	42.4287	25.1	0.0000
Error	126	213.211	1.6922		
Total	139	764.784			

Grand Mean 4.6564 CV 27.94

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	71.1	13	0.0000

Cochran's Q 0.2792
Largest Var / Smallest Var 64.701

Component of variance for between groups 4.07366
Effective cell size 10.0

t	Mean	t	Mean
1	6.8500	8	5.0600
2	3.9400	9	3.5300
3	3.7300	10	2.6500
4	9.5900	11	2.2300
5	6.7200	12	6.0300
6	4.7000	13	3.0000
7	4.6000	14	2.5600

Observations per Mean 10
Standard Error of a Mean 0.4114
Std Error (Diff of 2 Means) 0.5817

LSD All-Pairwise Comparisons Test of rep by t

t	Mean	Homogeneous Groups
4	9.5900	A
1	6.8500	B
5	6.7200	B
12	6.0300	BC
8	5.0600	CD
6	4.7000	DE
7	4.6000	DEF
2	3.9400	DEFG
3	3.7300	EFGH
9	3.5300	FGHI
13	3.0000	GHIJ
10	2.6500	HIJ
14	2.5600	IJ
11	2.2300	J

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.5817
Critical T Value 1.979 Critical Value for Comparison 1.1513
There are 10 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.ข้อมูลทางสถิติการทดสอบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศสายพันธุ์ SP02 ในอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญต่อการพัฒนาความสูงต้น หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน

Completely Randomized AOV for rep

Source	DF	SS	MS	F	P
t	13	741.29	57.0224	10.6	0.0000
Error	126	680.28	5.3990		
Total	139	1421.57			

Grand Mean 4.1950 CV 55.39

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	46.6	13	0.0000
Cochran's Q	0.1659		
Largest Var / Smallest Var	44.760		

Component of variance for between groups 5.16234
Effective cell size 10.0

t	Mean	t	Mean
1	5.1500	8	2.3200
2	2.6000	9	2.0700
3	2.7400	10	6.2000
4	7.0400	11	4.5700
5	2.8400	12	1.1700
6	1.1300	13	5.6900
7	6.5100	14	8.7000

Observations per Mean 10
Standard Error of a Mean 0.7348
Std Error (Diff of 2 Means) 1.0391

LSD All-Pairwise Comparisons Test of rep by t

t	Mean	Homogeneous Groups
14	8.7000	A
4	7.0400	AB
7	6.5100	BC
10	6.2000	BC
13	5.6900	BC
1	5.1500	BC
11	4.5700	CD
5	2.8400	DE
3	2.7400	DE
2	2.6000	DE
8	2.3200	E
9	2.0700	E
12	1.1700	E
6	1.1300	E

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.0391
Critical T Value 1.979 Critical Value for Comparison 2.0564
There are 5 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.ข้อมูลทางสถิติการทดสอบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศสายพันธุ์ SP08 ในอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญต่อการพัฒนาจำนวนข้อ หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน

Completely Randomized AOV for rep

Source	DF	SS	MS	F	P
tr	13	1873.74	144.134	90.2	0.0000
Error	126	201.40	1.598		
Total	139	2075.14			

Grand Mean 4.8571 CV 26.03

At least one group variance is near zero,
variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups 14.2536
Effective cell size 10.0

tr	Mean	tr	Mean
1	6.800	8	8.500
2	6.300	9	2.400
3	6.000	10	1.700
4	6.100	11	1.600
5	2.900	12	1.400
6	8.500	13	1.000
7	13.800	14	1.000

Observations per Mean 10
Standard Error of a Mean 0.3998
Std Error (Diff of 2 Means) 0.5654

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

LSD All-Pairwise Comparisons Test of rep by tr

tr	Mean	Homogeneous Groups
7	13.800	A
6	8.5000	B
8	8.5000	B
1	6.8000	C
2	6.3000	C
4	6.1000	C
3	6.0000	C
5	2.9000	D
9	2.4000	DE
10	1.7000	EF
11	1.6000	EF
12	1.4000	EF
13	1.0000	F
14	1.0000	F

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.5654
Critical T Value 1.979 Critical Value for Comparison 1.1189
There are 6 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.ข้อมูลทางสถิติการทดสอบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศสายพันธุ์ SP08 ในอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญต่อการพัฒนาจำนวนใบ หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน

Completely Randomized AOV for rep

Source	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**P**
tr	13	1704.64	131.126	54.3	0.0000
Error	126	304.30	2.415		
Total	139	2008.94			

Grand Mean 6.0214 CV 25.81

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	87.4	13	0.0000
Cochran's Q	0.3434		
Largest Var / Smallest Var	116.11		

Component of variance for between groups 12.8711
Effective cell size 10.0

tr	**Mean**	**tr**	**Mean**
1	9.300	8	10.700
2	9.500	9	3.900
3	8.300	10	2.700
4	5.700	11	2.200
5	3.800	12	2.700
6	9.500	13	2.200
7	11.700	14	2.100

Observations per Mean 10
Standard Error of a Mean 0.4914
Std Error (Diff of 2 Means) 0.6950

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

LSD All-Pairwise Comparisons Test of rep by tr

tr	Mean	Homogeneous Groups
7	11.700	A
8	10.700	AB
2	9.5000	BC
6	9.5000	BC
1	9.3000	C
3	8.3000	C
4	5.7000	D
9	3.9000	E
5	3.8000	E
10	2.7000	EF
12	2.7000	EF
11	2.2000	F
13	2.2000	F
14	2.1000	F

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.6950
Critical T Value 1.979 Critical Value for Comparison 1.3754
There are 6 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. ข้อมูลทางสถิติการทดสอบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศสายพันธุ์ SP08 ในอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญต่อการพัฒนาความยาวราก หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน

Completely Randomized AOV for rep

Source	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**P**
tr	13	333.139	25.6261	30.7	0.0000
Error	126	105.265	0.8354		
Total	139	438.404			

Grand Mean 4.8436 CV 18.87

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	24.7	13	0.0249
Cochran's Q	0.1465		
Largest Var / Smallest Var	14.492		

Component of variance for between groups 2.47907
Effective cell size 10.0

tr	**Mean**	**tr**	**Mean**
1	7.5500	8	5.0900
2	6.4900	9	4.4700
3	6.2000	10	4.0000
4	4.7300	11	4.0100
5	3.7900	12	3.5500
6	5.3600	13	2.7100
7	7.4000	14	2.4600

Observations per Mean 10
Standard Error of a Mean 0.2890
Std Error (Diff of 2 Means) 0.4088

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

LSD All-Pairwise Comparisons Test of rep by tr

tr	Mean	Homogeneous Groups
1	7.5500	A
7	7.4000	A
2	6.4900	B
3	6.2000	B
6	5.3600	C
8	5.0900	CD
4	4.7300	CDE
9	4.4700	DEF
11	4.0100	EFG
10	4.0000	EFG
5	3.7900	FG
12	3.5500	G
13	2.7100	H
14	2.4600	H

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.4088
Critical T Value 1.979 Critical Value for Comparison 0.8089
There are 8 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8.ข้อมูลทางสถิติการทดสอบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศสายพันธุ์ SP08 ในอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติมชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญต่อการพัฒนาความสูงต้น หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน

Completely Randomized AOV for rep

Source	DF	SS	MS	F	P
tr	13	821.89	63.2220	41.5	0.0000
Error	126	192.18	1.5253		
Total	139	1014.07			

Grand Mean 4.0743 CV 30.31

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	114	13	0.0000
Cochran's Q	0.3297		
Largest Var / Smallest Var	235.55		

Component of variance for between groups 6.16967
Effective cell size 10.0

tr	Mean	tr	Mean
1	4.3600	8	6.8400
2	5.5500	9	2.4900
3	5.0300	10	2.7400
4	4.2800	11	2.2600
5	2.8000	12	1.6800
6	6.5500	13	1.1900
7	9.9400	14	1.3300

Observations per Mean 10
Standard Error of a Mean 0.3905
Std Error (Diff of 2 Means) 0.5523

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

LSD All-Pairwise Comparisons Test of rep by tr

tr	Mean	Homogeneous Groups
7	9.9400	A
8	6.8400	B
6	6.5500	BC
2	5.5500	CD
3	5.0300	DE
1	4.3600	E
4	4.2800	E
5	2.8000	F
10	2.7400	FG
9	2.4900	FG
11	2.2600	FGH
12	1.6800	GH
14	1.3300	H
13	1.1900	H

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.5523
Critical T Value 1.979 Critical Value for Comparison 1.0930
There are 8 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นางสาวชฎาพร ไชยลังกา

วัน เดือน ปี เกิด 21 กันยายน พ.ศ. 2536

ประวัติการศึกษา ปีการศึกษา 2560 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาเอกโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปีการศึกษา 2554 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย (วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์) โรงเรียนหางดงรัฐราษฎร์อุปถัมภ์ อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

ทุนการศึกษา ปีการศึกษา 2560 ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย Taiwan ICDF project in Royal Project Foundation (Thailand) โครงการ Gloriosa Sweet potato Virus-free Seedling and Grape Root Stock Production Project

ประสบการณ์ ผู้ช่วยนักวิจัยโครงการวิจัยและพัฒนาชีวภัณฑ์ป้องกันกำจัดโรคราสีเทา (Botrytis) ของกุหลาบ (มกราคม 2560 ถึง ธันวาคม 2561

สำเร็จหลักสูตรการฝึกงาน ฝ่ายพันธุศาสตร์โมเลกุล ณ บริษัท ฮอทิเจเนติคส์ รีเสิร์ช (เอส.อี.เอเชีย) จำกัด (พฤษภาคม 2560 ถึง สิงหาคม 2560)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
rights reserved