



วารสาร

ISSN 0125-0507

วิทยาศาสตร์เกษตร

AGRICULTURAL SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 51 ฉบับที่ 1 (พิเศษ) สิงหาคม-พฤศจิกายน 2563

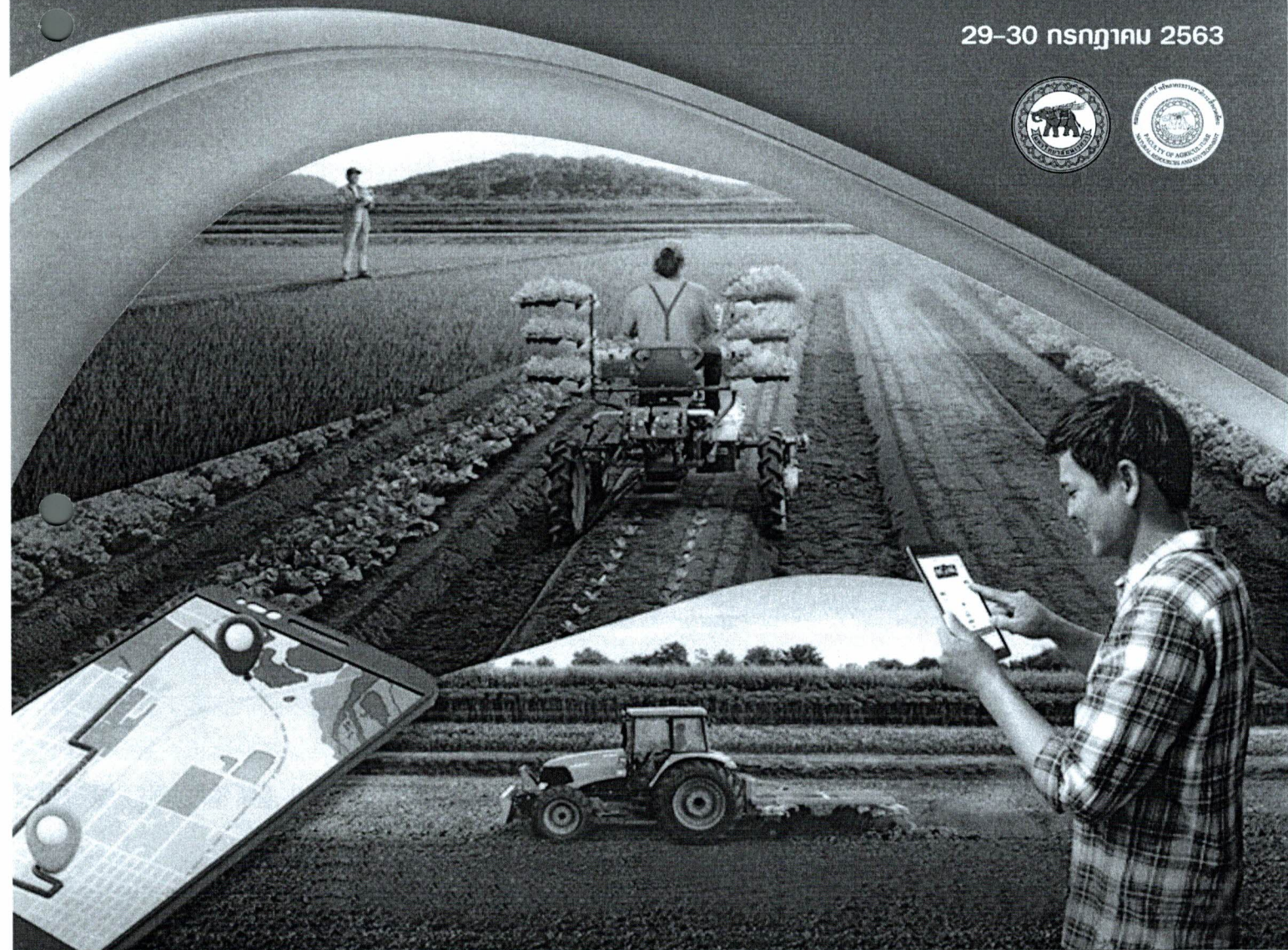
Vol. 51 No.1 (Suppl.) August–November 2020

การประชุมวิชาการ

งานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 17

“ฝ่าวิกฤตเศรษฐกิจไทย ด้วยนวัตกรรมเกษตร 4.0”

29-30 กรกฎาคม 2563



โดย

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผลของอาหารต่อการสร้างผนังเซลล์ในการเพาะเลี้ยงโปรโทพลาสต์แฝก (*Vetiveria zizanioides*)

Effect of Medium on Cell Wall Regeneration in Protoplast Culture
of Vetiver Grass (*Vetiveria zizanioides*)

คชาภรณ์ ทองดอนยอด¹ นุชจรี สิงห์พันธ์² และสุมนา เหลืองฐิติกาญจน์^{1*}

Khachapohn Thongdonyod¹ Nootjaree Singphan² and Sumana Leangthitikanchana^{1*}

¹ 19 หมู่ 2 สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา พะเยา 56000

² 83 หมู่ 11 สาขาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ เพชรบูรณ์ 67000

¹ 19 Moo 2 Department of Biotechnology, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao 56000, Thailand

² 83 Moo 11 Department of Plant Science, Faculty of Agriculture and Industrial Technology, Phetchabun Rajabhat University 67000, Thailand

*Corresponding author: sumana.le@up.ac.th

ABSTRACT

The comparison of suitable medium for cell wall regeneration in protoplast culture of vetiver was investigated in this study. Three types of vetiver, including Kamphaeng Phet 2, Prachuap Khiri Khan and binary fusion were cultured on liquid KM⁸P medium and modified KM⁸P media, such as KM⁸P-1, KM⁸P-2, KM⁸P-3 and KM⁸P-4, which supplemented with various kinds and concentrations of plant growth regulators. Then, the cell wall formation of protoplasts was investigated by 0.5% congo red staining after 2, 6, 12, 24 and 168 h of culture. The result showed that protoplasts of all vetiver's types could regenerate the new cell wall on all kinds of media after culture for 12 h. However, the cell wall regeneration was very low rate. When protoplasts were cultured for 24 and 168 h, the percentage of cell wall regeneration were increased. While, KM⁸P-4 was the most suitable medium for increasing the capability of the cell wall formation in protoplast culture of Kamphaeng Phet 2, Prachuap Khiri Khan and binary fusion which were obtained the highest percentage of cell wall formation (9.76, 9.58 and 9.87%, respectively) after 24 h of culture. This research could be useful for developing and generating of new cell wall in protoplast culture. Then, these protoplasts which had cell wall will be cultured for plant regeneration to further selection and genetic improvement of vetiver.

Keywords: vetiver grass, protoplast culture, cell wall formation

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เปรียบเทียบอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ของโปรโทพลาสต์แฝกสายพันธุ์กำแพงเพชร 2 ประจวบคีรีขันธ์ และโปรโทพลาสต์แฝกกลุ่มผสมแบบ binary fusion ภายหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร KM⁸P และอาหารสูตร KM⁸P ดัดแปลง ได้แก่ KM⁸P-1, KM⁸P-2, KM⁸P-3 และ KM⁸P-4 ที่มีการเติมชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันไป จากนั้นตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ของโปรโทพลาสต์ด้วย congo red 0.5% หลังการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 2, 6, 12, 24 และ 168 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าโปรโทพลาสต์แฝกทั้ง 3 ชนิด เริ่มมีการ

สร้างผนังเซลล์ใหม่หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารทุกสูตร แต่มีเปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ที่ต่ำมาก และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 24 และ 168 ชั่วโมง พบว่าโพรโทพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ที่เพิ่มขึ้น โดยอาหารดัดแปลงสูตร KM⁸P-4 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ของโพรโทพลาสต์ แผลก้ำแวงเพชร 2 ประจวบคีรีขันธ์ และโพรโทพลาสต์แผลกผสมแบบ binary fusion ได้ดีที่สุด พบเปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ เท่ากับ 9.76, 9.58 และ 9.87% ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง งานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์เพื่อให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ ก่อนจะนำไปเพาะเลี้ยงให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์เพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ: แผลก, การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์, การสร้างผนังเซลล์

บทนำ

แผลก (*Vetiveria zizanioides*) เป็นพืชตระกูลหญ้าที่มีบทบาทสำคัญในการอนุรักษ์ดินและน้ำ เนื่องจากมีระบบรากลึกและสานกันแน่น ช่วยกรองตะกอนและรักษาน้ำดิน ช่วยอุ้มน้ำ ป้องกันการพังทลายของดิน โดยปกติการขยายพันธุ์แผลกไม่นิยมขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด เนื่องจากดอกของแผลกมีลักษณะเป็นหมัน (Ruanjaichon *et al.*, 1997) ทำให้การปรับปรุงพันธุ์แบบวิธีปกติทำได้ยาก การนำเทคนิคการรวมโพรโทพลาสต์มาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ที่ไม่สามารถทำได้ในกรณีการผสมพันธุ์โดยวิธีปกติ และสามารถสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ต้องการได้

การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์เป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญ มีผลต่อความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยเทคนิคการรวมโพรโทพลาสต์ ซึ่งการที่โพรโทพลาสต์จะพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้นั้น ต้องเริ่มจากการสร้างผนังเซลล์กลับมาเป็นเซลล์พืชที่สมบูรณ์ ก่อนที่จะเกิดการแบ่งเซลล์ มีการเจริญและพัฒนาไปเป็นไมโครโคโลนี แคลลัส และต้นที่สมบูรณ์ตามลำดับ (Davey *et al.*, 2005; Keegstra, 2010) จากนั้นจึงนำต้นที่ได้ไปทำการคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ให้เกิดการพัฒนาการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่นั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญ ได้แก่ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงต้องมีความเหมาะสม ซึ่งมักประกอบด้วย วิตามิน สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ สารควบคุมแรงดันออสโมติก และสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยโพรโทพลาสต์ของพืชแต่ละชนิดมีความต้องการปริมาณและองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมแตกต่างกันไป (Kativat, 2014) จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาและปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมต่อการเจริญและพัฒนาของโพรโทพลาสต์ของพืชแต่ละชนิด

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาการสร้างผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์แผลกสายพันธุ์ก้ำแวงเพชร 2 ประจวบคีรีขันธ์ และโพรโทพลาสต์แผลกผสมแบบ binary fusion เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์แผลก และนำโพรโทพลาสต์ที่มีการสร้างผนังเซลล์แล้วไปใช้ประโยชน์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเลี้ยงแผลกในสภาพปลอดเชื้อ

นำหน่อแผลกสายพันธุ์ก้ำแวงเพชร 2 และประจวบคีรีขันธ์ มาลอกกาบใบออก 2-3 ใบ ล้างทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox[®] เข้มข้น 15% นาน 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 mg/L น้ำตาล 30 g/L และผงวุ้น 7 g/L เพาะเลี้ยงภายในห้องที่มีอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสงที่มีความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวันเป็นระยะเวลา 2 เดือน เพื่อชักนำให้เกิดต้นอ่อนของแผลกในสภาพปลอดเชื้อ

การแยกโพรโทพลาสต์

นำใบผักสาวยพันธุ์กำแพงเพชร 2 และประจวบคีรีขันธ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวน 0.5 กรัม หั่นใบตามขวาง จากนั้นเติมสารละลายล้างโพรโทพลาสต์ (protoplast washing solution; PWS) ปริมาตร 0.5 ml ที่ประกอบด้วย mannitol 0.5 M และ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mM ที่ pH 5.6 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที เพื่อปรับสภาพเซลล์ จากนั้นดูดสารละลาย PWS ออก แล้วเติมสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 5 ml โดยพันธุ์กำแพงเพชร 2 ใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย cellulase onozuka R-10 0.5% (w/v), macerozyme R-10 0.5% (w/v), mannitol 0.5 M และ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mM ที่ pH 5.6 และพันธุ์ประจวบคีรีขันธ์ใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย cellulase onozuka R-10 1.0% (w/v), macerozyme R-10 0.4% (w/v), mannitol 0.5 M และ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mM ที่ pH 5.6 ที่ผ่านการกรองด้วย millipore filter ขนาด 0.45 ไมครอน บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 40 รอบต่อนาที กรองโพรโทพลาสต์ด้วยตะแกรงเหล็กที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขนาด 40 เมช ผ่านไปยังหลอดขนาด 15 ml นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 800 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นแยกโพรโทพลาสต์ให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลายซูโครส 20% และนับจำนวนโพรโทพลาสต์ด้วย haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การรวมโพรโทพลาสต์

รวมโพรโทพลาสต์ระหว่างผักสาวยพันธุ์กำแพงเพชร 2 และประจวบคีรีขันธ์ โดยนำสารละลายโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากใบผัก 2 สายพันธุ์ มาปรับความหนาแน่น เท่ากับ 1×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย PWS ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 หยดในหลอด microcentrifuge เติมสารละลาย PEG 6000 เข้มข้น 10% ร่วมกับ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.5 M, KH_2PO_4 0.7 mM และ glucose 0.1 M ที่ pH 5.6 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว บ่มไว้ 10 นาที เติม washing medium (high Ca^{++} /high pH) ที่ประกอบด้วย $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.8 M, mannitol 0.1 M และ glycine 0.1 M ที่ pH 10.5 ทิ้งไว้ที่ระยะเวลา 30 นาที

การศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ผัก

นำโพรโทพลาสต์ผักสาวยพันธุ์กำแพงเพชร 2 ประจวบคีรีขันธ์ และโพรโทพลาสต์ผักลูกผสมแบบ binary fusion มาเพาะเลี้ยงด้วยวิธี hanging drop ในอาหารเหลว KM^0P และ KM^0P ดัดแปลง ที่มีการเติมชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันไป โดยมีจำนวนอาหาร 5 สูตร ได้แก่ KM^0P , $\text{KM}^0\text{P}-1$, $\text{KM}^0\text{P}-2$, $\text{KM}^0\text{P}-3$ และ $\text{KM}^0\text{P}-4$ (Table 1) โดยนำโพรโทพลาสต์มาปรับความหนาแน่น เท่ากับ 1×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร หยดโพรโทพลาสต์ลงในของฝาจานเพาะเลี้ยง โดยแต่ละหยดมีปริมาตร 50 μl คว่ำฝาจานเพาะเลี้ยงลงและปิดด้วยพาราฟิล์ม นำไปเพาะเลี้ยงในที่มืดอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ด้วย congo red 0.5% (ดัดแปลงจากวิธีของ Mitra and Loque, 2014) ภายหลังการเพาะเลี้ยง นาน 2, 6, 12, 24 และ 168 ชั่วโมง โดยดูดสารละลายโพรโทพลาสต์ปริมาตร 100 μl บ่มร่วมกับ congo red 0.5% ปริมาตร 50 μl เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนับจำนวนโพรโทพลาสต์ที่สร้างผนังเซลล์และจำนวนโพรโทพลาสต์ทั้งหมดบน haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งโพรโทพลาสต์ที่มีการสร้างผนังเซลล์ จะติดสีแดงของสีย้อม congo red ในขณะที่โพรโทพลาสต์ที่ไม่มีการสร้างผนังเซลล์จะไม่ติดสีย้อม โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์} = \frac{\text{จำนวนโพรโทพลาสต์ที่ติดสีย้อม}}{\text{จำนวนโพรโทพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

สถิติและการวิเคราะห์ผลการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลความแปรปรวนแบบ One-Way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p < 0.05$)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของอาหารต่อการสร้างผนังเซลล์ของโพโทพลาสต์แฟกหลังการเพาะเลี้ยง

จากการเพาะเลี้ยงโพโทพลาสต์แฟกกำแพงเพชร 2 ประจวบคีรีขันธ์ และโพโทพลาสต์แฟกผสมแบบ binary fusion ในอาหารเหลวสูตร KM⁰P และ KM⁰P ดัดแปลง จำนวน 5 สูตร ได้แก่ KM⁰P, KM⁰P-1, KM⁰P-2, KM⁰P-3 และ KM⁰P-4 (Table 1) เมื่อตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโพโทพลาสต์หลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 2, 6, 12, 24 และ 168 ชั่วโมง ด้วยสีย้อม congo red 0.5% พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงโพโทพลาสต์แฟกกำแพงเพชร 2 ประจวบคีรีขันธ์ และโพโทพลาสต์แฟกผสมแบบ binary fusion ในอาหารทุกสูตร เป็นระยะเวลา 2 และ 6 ชั่วโมง (Figure 1A, B and C) ยังไม่เกิดการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าโพโทพลาสต์เริ่มมีการสร้างผนังเซลล์ และมีแนวโน้มการสร้างผนังเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 24 และ 168 ชั่วโมง ซึ่งอาหารสูตร KM⁰P-4 เป็นสูตรที่เหมาะสมที่ช่วยเพิ่มความสามารถในการสร้างผนังเซลล์ของโพโทพลาสต์แฟกทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด โดยพบเปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ในแฟกกำแพงเพชร 2 ประจวบคีรีขันธ์ และโพโทพลาสต์แฟกผสมแบบ binary fusion เท่ากับ 9.76, 9.58 และ 9.87% ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง (Table 2, Figure 1D, E and F) และมีเปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ เท่ากับ 12.58, 10.27 และ 11.30% ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 168 ชั่วโมง (Table 2)

การสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่เป็นขั้นตอนแรกที่สามารถสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อมีการพัฒนาของโพโทพลาสต์ภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม ซึ่งประกอบด้วย สารควบคุมแรงดันออสโมติก วิตามิน สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Kativat, 2014) ในการทดลองนี้พบว่า อาหารดัดแปลงสูตร KM⁰P-4 ซึ่งประกอบด้วยอาหารสูตรพื้นฐาน KM⁰P ที่เติม 2,4-D 0.2 mg/l, NAA 2.0 mg/l และ BA 1.5 mg/l เป็นสูตรที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มความสามารถในการสร้างผนังเซลล์ของโพโทพลาสต์แฟกกำแพงเพชร 2 ประจวบคีรีขันธ์ และโพโทพลาสต์แฟกผสมแบบ binary fusion ได้ดีที่สุด ซึ่งอาหารสูตร KM⁰P อุดมไปด้วย วิตามิน สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ น้ำตาล และเป็นอาหารที่มีสารควบคุมความดันออสโมติกในระดับที่เหมาะสม ที่ช่วยคงความสมดุลแรงดันภายในโพโทพลาสต์ไว้เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์แตกหรือสูญเสีย น้ำ อาหาร KM⁰P เป็นที่นิยมนำมาใช้และประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโพโทพลาสต์ในพืชหลาย ๆ ชนิด ได้แก่ *Pelargonium odoratissimum* (Miyazaki et al., 1992) และ *Broussonetia papyrifera* (Phansiri et al., 2001) เป็นต้น

นอกจากนี้การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพิ่มเข้าไปในอาหารสูตรพื้นฐาน ยังมีผลช่วยกระตุ้นการสร้างผนังเซลล์ได้ ซึ่งในอาหารสูตร KM⁰P-4 นั้น มีการเติม 2,4-D และ NAA ที่เป็นสารในกลุ่มออกซิน มีบทบาทในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และขยายขนาดของเซลล์ เร่งการเจริญเติบโตและควบคุมการพัฒนาของเซลล์ นอกจากนี้การเติม BA ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไซโตไคนิน จะช่วยส่งเสริมการแบ่งเซลล์ การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ได้ (Beyl et al., 2015) ถึงแม้ว่าในการศึกษานี้อาหารเหลวสูตร KM⁰P-1, KM⁰P-2 และ KM⁰P-3 มีการเติมออกซินและไซโตไคนินเช่นเดียวกับสูตร KM⁰P-4 แต่มีระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า ซึ่งอาจไม่เพียงพอต่อการกระตุ้นความสามารถในการสร้างผนังเซลล์ของโพโทพลาสต์ได้ดีเท่ากับอาหารเหลวสูตร KM⁰P-4 อย่างไรก็ตามอาหาร KM⁰P ดัดแปลง ทั้ง 4 สูตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโพโทพลาสต์ที่ดีกว่าชุดควบคุม ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพิ่มจากสูตรพื้นฐาน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mastuti et al. (2003) ได้เพาะเลี้ยงโพโทพลาสต์ของหน่อไม้ฝรั่ง (*Celosia cristata* L.) ในอาหารสูตร KM⁰P ที่เติม 2,4-D 0.2 mg/l, NAA 2.0 mg/l และ Zeatin 1.5 mg/l พบว่าสามารถชักนำให้โพโทพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์และพัฒนาไปเป็นไมโครโคโลนีได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร KM⁰P ที่เติม 2,4-D 0.2 mg/l, NAA 1.0 mg/l, BA 0.5 mg/l และ zeatin 0.5 mg/l ในขณะที่ Benmoussa et al. (1997) และ Kaimuk and Te-Chato (2008) ได้เพาะเลี้ยงโพโทพลาสต์หน่อไม้ฝรั่งและกล้วยไม้ช้างแดง พบว่าการใช้ NAA และ 2,4-D ร่วมกับ BA ในอาหารเพาะเลี้ยงโพโทพลาสต์ สามารถเพิ่มความสามารถของโพโทพลาสต์ให้มีการสร้างผนังเซลล์ การแบ่งเซลล์และการเกิดไมโครโคโลนีได้

ซึ่งการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ระยะแรกนั้นต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งกลุ่มออกซินร่วมกับไซโตไคนิน แต่ต้องการสัดส่วนของออกซินในอัตราที่สูงกว่าไซโตไคนิน เพื่อกระตุ้นการพัฒนาของโพรโทพลาสต์ (Henn *et al.*, 1998)

ในการทดลองนี้ยังพบว่าโพรโทพลาสต์แฟกเริ่มมีการสร้างผนังเซลล์ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง แต่ยังให้เปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ที่ต่ำ และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีการสร้างผนังเซลล์เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร KM⁸P-4 ให้การสร้างผนังเซลล์ที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ถึงแม้ว่าการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ที่ระยะเวลา 168 ชั่วโมง จะพบการสร้างผนังเซลล์ที่สูงกว่าระยะเวลา 24 ชั่วโมง แต่ก็ยังเป็นระยะเวลาที่นานเกินไป จึงเลือกระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนย้ายโพรโทพลาสต์ที่มีการสร้างผนังเซลล์แล้วไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตรเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช ซึ่งสอดคล้องกับพืชหลายชนิดที่พบการสร้างผนังเซลล์ใหม่ภายหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารนาน 24 ชั่วโมง เช่น หงอนไก่ (Mastuti *et al.*, 2003), *Anubias nana* (Pongchawee *et al.*, 2006) และ Legumes (Wiszniewska and Piwowerczyk, 2014) เป็นต้น ซึ่งระยะเวลาการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโพรโทพลาสต์อาจใช้ระยะเวลาเพียงไม่กี่นาที่ ชั่วโมง หรือใช้ระยะเวลาหลายวันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (Davey *et al.*, 2005) ดังนั้นจำเป็นต้องทราบระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนย้ายโพรโทพลาสต์ที่มีผนังเซลล์แล้วไปยังอาหารสูตรสำหรับการพัฒนาไปเป็นแคลลัส และชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์แฟกด้วยเทคนิคการรวมโพรโทพลาสต์ต่อไป

สรุป

จากการศึกษาพบว่า อาหารเหลวสูตร KM⁸P-4 ที่ประกอบด้วยอาหาร KM⁸P ที่เติม 2,4-D 0.2 mg/l, NAA 2.0 mg/l และ BA 1.5 mg/l เป็นสูตรที่เหมาะสมและช่วยเพิ่มความสามารถในการสร้างผนังเซลล์ของโพรโทพลาสต์แฟกกำแพงเพชร 2 ประจวบคีรีขันธ์ และโพรโทพลาสต์แฟกลูกผสมแบบ binary fusion ได้ดีที่สุด โดยโพรโทพลาสต์เริ่มมีการสร้างผนังเซลล์ใหม่หลังการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง และพบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เป็นระยะที่เหมาะสมก่อนการย้ายโพรโทพลาสต์ที่สร้างผนังเซลล์แล้วไปเพาะเลี้ยงต่อไป ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์แฟกให้เกิดการพัฒนา ก่อนที่จะนำไปชักนำให้เป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์เพื่อการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์แฟก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (กปร.)

เอกสารอ้างอิง

- Arellano, M.L., S. Dhir, C.N. Albino, A. Santiago, T. Morris and S.K. Dhir. 2015. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from protoplast culture of *Stevia rebaudiana*. Br. Biotechnol. J. 5(1): 1 – 12.
- Benmoussa, M., S. Mukhopadhyopadhyay and Y. Desjardins. 1997. Factors influencing regeneration from protoplasts of *Asparagus densiflorus* cv. Sprenger. Plant Cell Rep. 17(2): 123 – 128.
- Beyl, C.A., D.W. Burger, and Z.M. Cheng. 2015. Plant growth substances used in propagation. In Beyl, C.A. and R.N. Trigiano. eds. Plant Propagation Concepts and Laboratory Exercises. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor and Francis Group, LLC. pp. 47 – 64.
- Davey, M.R., P. Anthony, J.B. Power and K.C. Lowe. 2005. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. J. adv. biol. biotechnol. 23(2): 131 – 171.
- Henn, H.J., R. Wingender and H. Schnabl. 1998. Regeneration of fertile interspecific hybrids protoplast fusions between *Helianthus annuus* L. and wild *Helianthus* species. Plant Cell Rep. 18(3 – 4): 220 – 224.

- Kaimuk, W. and S. Te-Chato. 2008. Protoplast isolation and culture of *Rhynchosyilis gigantea* ver. *rubrum* Sagarik. J. Agric. Sci. 24(3): 187 – 198. (in Thai)
- Kao, K.N. and M.R. Michayluk. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta. 126(2): 105 – 110.
- Kativat, C. 2014. Protoplast culture and development of Sunflower maintainer line via protoplast fusion. MS Thesis, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima. (in Thai)
- Keegstra, K. 2010. Plant cell walls. Future perspectives in plant biology. Plant Physiol. 154: 483 – 486.
- Lee, K.J.D., S.E. Marcus and J.P. Knox. 2011. Cell wall biology: perspectives from cell wall imaging. Mol. Plant Pathol. 4: 212 – 219.
- Ling, M.H., Z.X. Qiang and B.X. Ming. 2010. Protoplast culture and plant regeneration of Midnight II (*Poa Pratensis* L.). Chinese academic j. 18(1): 103 – 107.
- Mastuti, R., H. Miyake, T. Taniguchi and Y. Takeoka. 2003. Isolation and culture of *Celosia cristata* L. cell suspension protoplasts. Berk. Penel. Hayati. 9: 1 – 6.
- Mitra, P.P. and D. Loque. 2014. Histochemical staining of *Arabidopsis thaliana* secondary cell wall elements. J. Vis. Exp. 87: 1 – 11.
- Miyazaki, H., N. Oka and M. Fukushima. 1992. Plant regeneration from protoplasts of scented-leaved geranium. Plant Tissue Cult. Lett. 9(2): 99 – 103.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A Revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 15: 473 – 497.
- Phansiri, S., R. Charoensub, P. Plasilmongkol and T. Taniguchi. 2001. Plant regeneration from protoplasts of paper mulberry, Thai variety. Proceedings of Paper Mulberry and Hand-Made Paper for Rural Development, Bangkok, Thailand, Mar. 19 - 24. 81 – 88.
- Pongchawee, K., N. Uthairat, L. Siranut, P. Supawadee and P. Salak. 2006. Factors affecting the protoplast Isolation and culture of *Anubias nana* Engler. Int. J. Botany. 2: 193 – 200.
- Ruanjaichon, V. 1997. The use of random amplified polymorphic DNA technique for the identification of vetiveria grass ecotype in Thailand. MS Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Sonntag, K., B.R. Wehling and P. Wehling. 2009. Protoplast isolation and culture for somatic hybridization of *Lupinus angustifolius* and *L. subcamosus*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 96(3): 297 – 305.
- Wiszniewska, A. and B. Piwowerczyk. 2014. Studies on cell wall regeneration in protoplast culture of Legumes the effect of organic medium additives on cell wall components. Czech J. Genet. Plant Breed. 50(2): 84 – 91.

Table 1 Composition of liquid KM⁸P medium and modified KM⁸P media, KM⁸P-1, KM⁸P-2, KM⁸P-3 and KM⁸P-4, which supplemented with various kinds and concentrations of plant growth regulators for protoplast culture of vetiver.

Media	Plant growth regulators (mg/l)			References
	2,4-D	NAA	BA	
KM ⁸ P	-	-	-	Kao and Michayluk (1975)
KM ⁸ P-1	0.2	1.0	0.5	Arellano <i>et al.</i> (2015)
KM ⁸ P-2	1.0	-	0.3	Ling <i>et al.</i> (2010)
KM ⁸ P-3	0.5	1.0	0.2	Sonntag <i>et al.</i> (2009)
KM ⁸ P-4	0.2	2.0	1.5	Mastuti <i>et al.</i> (2003)

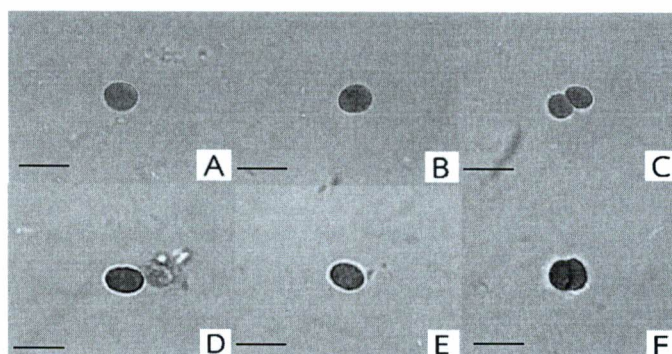


Figure 1 The capability of cell wall regeneration was investigated by 0.5% congo red staining, when protoplasts of Kamphaeng Phet 2, Prachuap Khiri Khan and binary fusion were cultured on KM⁸P-4 medium after 6 h (A, B and C, respectively) and 24 h (D, E and F, respectively) of culture.

Table 2 The effect of culture medium on cell wall regeneration in protoplast culture of vetiver grass including Kamphaeng Phet 2, Prachuap Khiri Khan and binary fusion.

Culture medium	Time after culturing (h)				
	2	6	12	24	168
Kamphaeng Phet 2					
KM ⁸ P	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.72±1.50 ^a	6.34±1.51 ^{ab}	6.95±1.73 ^b
KM ⁸ P-1	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.01±1.75 ^a	7.60±2.15 ^{ab}	8.16±0.83 ^b
KM ⁸ P-2	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	2.62±0.21 ^a	7.10±2.25 ^{ab}	7.41±0.65 ^b
KM ⁸ P-3	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	2.10±1.84 ^a	6.20±1.00 ^b	8.70±2.64 ^b
KM ⁸ P-4	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	3.66±1.78 ^a	9.76±1.66 ^a	12.58±1.80 ^a
Prachuap Khiri Khan					
KM ⁸ P	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.98±1.70 ^a	6.37±0.89 ^b	7.32±2.63 ^a
KM ⁸ P-1	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	2.12±1.83 ^a	7.69±2.18 ^{ab}	9.21±1.74 ^a
KM ⁸ P-2	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	2.95±2.74 ^a	6.54±1.00 ^b	8.81±1.91 ^a
KM ⁸ P-3	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.80±1.56 ^a	6.73±1.62 ^{ab}	6.87±1.27 ^a
KM ⁸ P-4	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	3.56±1.51 ^a	9.58±1.65 ^a	10.27±0.53 ^a
Binary fusion					
KM ⁸ P	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.88±1.63 ^a	5.19±1.91 ^b	6.06±0.73 ^b
KM ⁸ P-1	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.76±1.31 ^a	6.40±0.94 ^b	6.93±1.64 ^b
KM ⁸ P-2	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	1.76±1.53 ^a	5.40±0.6 ^b	6.57±1.07 ^b
KM ⁸ P-3	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	2.14±1.92 ^a	6.47±0.42 ^b	7.28±2.23 ^b
KM ⁸ P-4	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	3.20±0.45 ^a	9.87±1.16 ^a	11.30±1.14 ^a

Values represent mean±Standard Deviation. Values followed by different letters in a column are significantly different at $P \leq 0.05$



คำสั่งคณะกรรมการศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

ที่ ๕๕/๒๕๖๓

เรื่อง แต่งตั้งคณะกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการ“งานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ ๑๗”

ด้วยคณะกรรมการศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้จัดงานประชุมวิชาการ“งานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ ๑๗” ในวันที่ ๒๙ - ๓๐ กรกฎาคม ๒๕๖๓ ณ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก โดยรูปแบบการจัดงานเป็นการประชุมทางวิชาการ โดยการนำเสนอบทความวิจัยภาคบรรยาย และโปสเตอร์ ด้านวิทยาศาสตร์การเกษตร อุตสาหกรรมเกษตร และ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

เพื่อให้การดำเนินการจัดทำบทความวิจัยฉบับเต็ม เพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร ปีที่ ๕๑ ฉบับที่ ๑ (พิเศษ) เป็นไปด้วยความเรียบร้อย และมีประสิทธิภาพ ฉะนั้น อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๑๗ และ ๒๐ แห่งพระราชบัญญัติมหาวิทยาลัยนเรศวร พ.ศ. ๒๕๓๓ แก้ไขเพิ่มเติม (ฉบับที่ ๒) พ.ศ. ๒๕๔๑ จึงขอแต่งตั้งคณะกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการ “งานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ ๑๗” ดังนี้

- | | |
|--|--|
| ๑ ศาสตราจารย์ ดร.ทวนทอง จุฑาเกตุ | คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี |
| ๒ รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรพร กงบังเกิด | คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร |
| ๓ รองศาสตราจารย์ ดร.จรัณธร บุญญานุภาพ | คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร |
| ๔ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรัตน์ เจริญยั่งยืน | คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร |
| ๕ รองศาสตราจารย์ ดร.กนิดา ธนเจริญชนภาส | คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร |
| ๖ รองศาสตราจารย์ กมลวรรณ โรจน์สุนทรกิตติ | คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร |
| ๗ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธวิช อินทรพันธุ์ | คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ |
| ๘ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิราภรณ์ อินทสาร | คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ |
| ๙ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รชา เทพชร | คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ |
| ๑๐ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสาวคนธ์ เหมวงษ์ | คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม |
| ๑๑ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณวิภา แก้วประดิษฐ์ พลพินิจ | คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| ๑๒ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลวดี ปิ่นวิมานะ | คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม |
| ๑๓ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยวรรณ ศุภวิทิตพัฒนา | คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร
มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม |
| ๑๔ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณรทมล เล้าห์รอดพันธ์ | คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร
มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม |
| ๑๕ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร พงศ์ธรรพักษ์ | คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ |

๑๖	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฤทัยรัตน์ โพธิ	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
๑๗	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริตา ธนสุกาญจน์	มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์
๑๘	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพวรรณ ทองสุข	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๑๙	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา น้อยทัฬห	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๒๐	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา รุตรตนมงคล	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๒๑	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิติพงศ์ จิตร์โกชน์	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๒๒	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอินท์ ประไซโย	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๒๓	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณฑนา วีระวัฒนากร	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๒๔	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภา หอมหวล	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๒๕	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มยุรี กระจายกลาง	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๒๖	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คำพร รัตนสุต	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๒๗	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันวิสาข์ ปั่นศักดิ์	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๒๘	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทศพร อินเจริญ	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๒๙	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรภร ทศพงศ์	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๓๐	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ เขียวขจรเขต	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๓๑	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จวงจันทร์ จำปาทอง	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๓๒	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เหรียญทอง สิงห์จามูนสงค์	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๓๓	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัชพล การะเกตุ	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๓๔	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนชัสสัณห์ พูนไพบูลย์พิพัฒน์	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๓๕	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มหัทธนี ภิญโญ	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๓๖	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นสพ.นิรันดร์ เอกศิริ	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๓๗	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วภากร ศิริวงศ์	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๓๘	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นวลกมล อารณพงษ์	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๓๙	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ทาวงค์	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๔๐	ดร.ปิยวัฒน์ ปองผดุง	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๔๑	ดร.ฐนิตา บุญสร้างสม	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๔๒	ดร.เทพสุตา รุ่งรัตน์	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๔๓	ดร.เสาวลักษณ์ รุ่งแจ้ง	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๔๔	ดร.ณิชากร คอนดี	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๔๕	ดร.อนุพงษ์ วงศ์ดามี	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๔๖	ดร.ปานิสร่า เทพกุศล	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร

๔๗	ดร.ศศิวิมล จิตรากร	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๔๘	ดร.วิลาสินี อินญาวิเลิศ	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๔๙	ดร.กุลยาภัสร์ วุฒิจาริ	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๕๐	ดร.กัลย์กนิต พิสมयरมย์	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๕๑	ดร.นุชนาฏ ภักดี	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๕๒	ดร.ภาวรัช วิจาริตน์	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๕๓	ดร.ณัฐฐา เพ็ญสุภา	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๕๔	ดร.สุพรรณิกา อินต๊ะนนท์	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๕๕	ดร.พจนานถ ฝ่องเจริญ	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๕๖	ดร.กมล ไม้กร่าง	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
๕๗	ดร.สหัชญา ทองสาร	วิทยาลัยพลังงานทดแทน มหาวิทยาลัยนเรศวร
๕๘	ดร.อัษฎาวุธ สนั่นนาม	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา วิทยาเขตพิษณุโลก
๕๙	ดร.สุริยาพร นิพรมย์	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา วิทยาเขตพิษณุโลก
๖๐	ดร.อุษณีย์ภรณ์ สร้อยเพชร	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา วิทยาเขตพิษณุโลก
๖๑	ดร.สุกัญญา มิ่งใหญ่	คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน
๖๒	ดร.ไพรวลัย ประมัย	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
๖๓	ดร.คุณากร ชิตศิริ	คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา
๖๔	อาจารย์ธนสรณ์ รักคนตรี	คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ทั้งนี้ ตั้งแต่บัดนี้เป็นต้นไป

สั่ง ณ วันที่ ๑๙ มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๖๓

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท)
คณบดีคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

การประชุมวิชาการ

งานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 17

“ฝ่าวิกฤตเศรษฐกิจไทย ด้วยนวัตกรรมเกษตร 4.0”

29-30 กรกฎาคม 2563

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยนเรศวร

