การขยายพันธุ์อเมซอน (*Echinodorus* sp.) ด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว

Micropropagation of Amazon (*Echinodorus* sp.) by Temporary Immersion Bioreactor

แววดาว หมื่นสำราญ[1] และ นพมณี โทปุญญานนท์[1]

Weawdao Muensumran[1] and Nopmanee Topoonyanont[1]

Abstract

Echinodorus sp. was micropropagated by Temporary Immersion Bioreactor (TIB) system from the stage of shoot initiation to multiplication, elongation, rooting and transplanting. For shoot initiation stage, different culture media were investigated consisting of modified MS (1962) medium containing TDZ (0.5 and 1.0 mg/L) or BA (1.0 and 2.0 mg/L) together with 0.3 mg/L IAA or 0.3 mg/L NAA. After 4 weeks it was found that medium with the combination of 1.0 mg/L TDZ and 0.3 mg/L IAA resulted in the greatest number of shoots (1.8±0.18). For the multiplication stage, a comparison was made between culturing the explant material on semi-solid medium and using the TIB system, both using MS medium supplemented with TDZ (0.25, 0.5 and 1.0 mg/L) or BA (0.25, 0.5 and 1.0 mg/L). After 4 weeks the greatest number of new shoots (6.3±0.59) grown in the TIB on medium containing 1.0 mg/L TDZ was found. The samples grown on medium containing BA failed to generate new shoots either in semi - solid medium or in the TIB. For the elongation stage, a comparison was made between growing the shoots on semisolid medium and TIB system, both using MS medium without plant growth regulators. After 8 weeks the mean length of shoots grown in the TIB was longer than those grown in semi-solid medium, and new shoots also appeared. In the rooting stage a comparison was again made between semi-solid medium and TIB system, and it was found that after 4 weeks the plants in the TIB had more roots than those on semi - solid medium. When the plants were transferred to growing conditions *ex vitro*, those from TIB were larger, more robust and had more leaves and roots than those from semi-solid medium and from conventional propagation.

Keywords: Echinodorus (*Echinodorus* sp.), micropropagation, Temporary Immersion Bioreactor (TIB), Thidiazuron (TDZ)

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[1] Program of Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

รับเรื่อง : สิงหาคม 2554

*Corresponding author: nopmanee@mju.ac.th

บทคัดย่อ

ทำการขยายพันธุ์ต้นอเมซอน (*Echinodorus* sp.) ด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว (Temporary Immersion Bioreactor: TIB) ตั้งแต่ขั้นตอนการชักนำการเกิดต้น การเพิ่มปริมาณ การยืดยาว การออกรากและการออกปลูก ในขั้นตอนชักนำให้เกิดต้นอ่อน ทดลองเพาะเลี้ยงตาของต้นอเมซอนบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีการเติม TDZ (0.5 และ 1.0 มก/ล) หรือ BA (1.0 และ 2.0 มก/ล) ร่วมกับ IAA 0.3 มก/ล หรือ NAA 0.3 มก/ล พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ ในอาหารที่มี TDZ 1.0 มก/ล ร่วมกับ IAA 0.3 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนจำนวนมากที่สุดคือ 1.8±0.18 ต้น จากนั้นได้ทำการศึกษาการเพิ่มปริมาณต้น โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนอเมซอนบนอาหารแข็งเปรียบเทียบกับเพาะเลี้ยงใน TIB โดยใช้อาหารสูตร MS ที่มีการเติม TDZ (0.25, 0.5 และ 1.0 มก/ล) หรือ BA (0.25, 0.5 และ 1.0 มก/ล) พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงใน TIB ที่มี TDZ 1.0 มก/ล มีจำนวนต้นต่อกอมากที่สุดคือ 6.3±0.59 ต้น ในขณะที่ BA ไม่มีการแตกตาเพิ่ม ไม่ว่าจะเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งหรือ TIB จากนั้นทำการศึกษาการยืดยาวของต้นอเมซอน โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งกับ TIB ในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 8 สัปดาห์ พบว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน TIB ต้นมีขนาดใหญ่กว่าต้นจากอาหารแข็ง และยังพบการเพิ่มจำนวนของต้นเล็กกลุ่มอีกด้วย และในระยะการออกรากของต้น ทำการเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งกับ TIB พบว่าหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ต้นที่เพาะเลี้ยงใน TIB มีจำนวนรากมากกว่าต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง และเมื่อนำไปออกปลูกในสภาพธรรมชาติพบว่าต้นที่เพาะเลี้ยงใน TIB ต้นมีสภาพที่แข็งแรง ต้นโต จำนวนใบและจำนวนรากมากกว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง และต้นจากการขยายพันธุ์ในสภาพธรรมชาติ

คำนำ

ปัจจุบันการเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจ ของประเทศเป็นไปอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะบริเวณเมืองใหญ่ๆ ของประเทศ จึงเกิดการหลั่งไหลของผู้คนเข้ามาทำงานในเมืองหลวงและเมืองใหญ่ๆ กันมากขึ้น ประกอบกับพื้นที่ในเมืองใหญ่มีราคาแพงและจำกัด ผู้คนส่วนใหญ่จึงพักอาศัยอยู่ในคอนโดมิเนียมหรือหอพัก เมื่อต้องอาศัยอยู่ในห้องหรือพื้นที่ที่จำกัด จึงหันมาสนใจดึงเอาธรรมชาติมาไว้ในที่พัก กิจกรรมที่ได้รับความนิยมมาก คือ การนำตู้ปลามาประดับที่พักเพื่อความสวยงามและสร้างความสุข จึงทำให้ธุรกิจตู้ปลา ในปัจจุบันได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก นอกจากเลี้ยงปลาสวยงามแล้ว ยังมีการนำพรรณไม้น้ำหลากหลายชนิดมาประดับและตกแต่ง เพื่อให้เกิดความสวยงามเพิ่มสีสันให้กับตู้ปลามากขึ้น และยังช่วยเพิ่มออกซิเจนในตู้ปลา พรรณไม้น้ำชนิดหนึ่งที่เป็นที่นิยมนำมาประดับตกแต่งตู้ปลา ได้แก่ อเมซอน (*Echinodorus* sp.) เนื่องจากอเมซอนเป็นพรรณไม้น้ำที่มีความสวยงาม ทนทาน และมีราคาปานกลาง อเมซอนถูกจัดอยู่ในวงศ์ Alismataceae สกุล *Echinodorus* (Allgayer and Teton, 1987) เป็นพืชใต้น้ำหรือเจริญขึ้นเหนือน้ำ ลำต้นเป็นเหง้า (rhizome) ฝังอยู่ในพื้นน้ำที่เป็นทรายหรือดินปนทราย อเมซอนสามารถผสมข้ามพันธุ์ได้ง่าย จึงมีลูกผสมมีลักษณะแตกต่างกันมาก เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว แผ่นใบมีสีเขียวถึงสีน้ำตาล ช่อดอกยาวโค้ง มีดอกสีขาวออกเป็นกลุ่มตามข้อ มีกลีบดอก 3 กลีบ (Rataj and Horeman, 1977) การขยายพันธุ์อเมซอนสามารถทำโดยการตัดต้นอ่อนบนก้านช่อดอกไปปลูก อเมซอนบางชนิดที่เกิดดอกและต้นอ่อนยากจะใช้วิธีการตัดแบ่งเหง้าที่มีอายุไปเพาะชำ หรือบางชนิดใช้การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด ซึ่งวิธีการขยายพันธุ์ทั้งหมดที่กล่าวมาใช้เวลาค่อนข้างยาวนาน ดังนั้นจึงมีการนำวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาขยายพันธุ์อเมซอนและพรรณไม้น้ำอื่น (Ruangnarong, 1999 , Laohawisuth, *et al*., 2003, Pereira *et al*., 2000) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่รวดเร็ว ได้ต้นปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว ปัจจุบันมีเทคโนโลยีใหม่เพื่อช่วย

เพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว (Temporary Immersion Bioreactor: TIB) เพื่อเพิ่มปริมาณต้นได้เร็วกว่าการใช้อาหารแข็ง (Escalona *et al*.,1999) โดยมีการนำ TIB มาใช้ในการเพิ่มจำนวนต้นในพืชต่างๆ ได้แก่ สับปะรด (Escalona *et al*.,1999) ฟาแลนนอฟซิส (Park *et* al., 2000; Hempfling and Preil, 2005) ปทุมมา (Topoonyanont *et al*., 2005, Topoonyanont *et al*., 2009) ยูคาลิปตัส (Alister *et al*.,2001) กล้วย (Roles *et al*., 2005) อ้อย (Bernal *et al*., 2008) มันฝรั่ง (Karppinen *et al*., 2010) เป็นต้น มีปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชที่เพาะเลี้ยงด้วย TIB หลายปัจจัย รวมทั้งจำนวนครั้งและเวลาในการให้อาหาร จากงานวิจัยของ Topoonyanont *et al*. (2011) ได้ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปทุมมาเพื่อเพิ่มจำนวนต้น พบว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงใน TIB ที่มีการให้อาหาร 6 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 1 นาที มีจำนวนต้นมากกว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงใน TIB ที่มีการให้อาหาร 2 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 1 หรือ 15 นาที และอาหารแข็ง Troch *et al*. (2010) ทำการเพาะเลี้ยง Chestnut ใน TIB พบว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงใน TIB ที่มีการให้อาหาร 60 นาที ทุก 24 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตดีกว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงใน TIB ที่มีการให้อาหาร 2 นาที ทุก 3 ชั่วโมง 15 นาที ทุก 6 ชั่วโมง และ 30 นาที ทุก 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมี Roles *et al*. (2005) ทำการขยายพันธุ์กล้วยพันธุ์ *Musa* AAB พบว่าชิ้นส่วนกล้วยที่เพาะเลี้ยงใน TIB ที่มีการให้อาหาร 7 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 22 นาทีมีอัตราการเพิ่มจำนวนต้นมากกว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงใน TIB ที่มีการให้อาหาร 3 หรือ 5 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 22 นาที ซึ่งระบบ TIB จะเป็นประโยชน์ในเชิงเศรษฐกิจที่สำคัญของการผลิตพรรณไม้น้ำให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมซอนด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว เพื่อเป็นการเพิ่มผลผลิตต้นอเมซอนให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาดและสามารถควบคุมคุณภาพการผลิต เพื่อพัฒนาให้ธุรกิจการผลิตพรรณไม้น้ำเจริญเติบโตต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 การทดลอง ตามระยะการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออเมซอนต่อเนื่องกัน ได้แก่ ระยะการชักนำให้เกิดต้น ระยะเพิ่มปริมาณต้น ระยะการยืดยาว และออกรากของต้น ดังนี้

ระยะการชักนำให้เกิดต้น

ทำการศึกษาชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ ไซโตไคนิน (TDZ หรือ BA) ร่วมกับออกซิน (IAA หรือ NAA) ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดต้นอ่อนอเมซอน ในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำต้นอเมซอนมาเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% จากนั้นตัดส่วนของใบและรากออก นำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 1 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ 10% นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำชิ้นส่วนตาที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog 1962) ดัดแปลง ที่มีการเติม BA (1.0 และ 2.0 มก/ล) หรือ TDZ (0.5 และ 1.0 มก/ล) ร่วมกับ IAA 0.3 มก/ล หรือ NAA 0.3 มก/ล นอกจากนั้นยังมีการเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ โดยทำการทดลอง 5 วิธีการทดลอง การทดลองละ 10 ซ้ำ

ระยะเพิ่มปริมาณต้น

ทำการศึกษาผลของ TDZ หรือ BA ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของต้นอเมซอน ในอาหารแข็ง และ TIB การเตรียมต้น โดยนำชิ้นส่วนปลอดเชื้อที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (1962) ดัดแปลง ที่มีการเติม TDZ 0.25, 0.5 และ 1.0 มก/ล หรือ BA 0.25, 0.5 และ 1.0 มก/ล โดยมีน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ใน TIB และอาหารแข็งที่มีการเติมวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร โดยจำนวนชิ้นส่วนตั้งต้นต่อภาชนะใน TIB มี 10 ชิ้นส่วนต่ออาหารเหลว 300 มิลลิลิตร และมีการให้อาหารด้วยระบบ TIB จำนวน 2 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 5 นาที ส่วนในขวดที่มีอาหารแข็งมีจำนวนชิ้นส่วนตั้งต้น 5 ชิ้นส่วนต่ออาหาร 150 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ โดยทำการทดลอง 6 วิธีการทดลอง การทดลองละ 5 ซ้ำ

ระยะการยืดยาวของต้น

ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการยืดยาวของต้นอเมซอน ระหว่างอาหารแข็งเปรียบเทียบกับ TIB โดยนำต้นเล็กกลุ่มที่ได้จากเพิ่มปริมาณมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (1962) ดัดแปลง ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยมีน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ใน TIB และอาหารแข็งที่มีการเติมวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร โดยจำนวนชิ้นส่วนตั้งต้นต่อภาชนะใน TIB มี 10 กอต่ออาหารเหลว 300 มิลลิลิตร และมีการให้อาหารด้วยระบบ TIB จำนวน 2 ครั้งต่อวัน 2 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 5 นาที ส่วนในขวดที่มีอาหารแข็งมีจำนวนชิ้นส่วนตั้งต้น 5 กอต่ออาหาร 150 มิลลิลิตร โดยทำการทดลอง 2 วิธีการทดลอง การทดลองละ 5 ซ้ำเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ระยะออกรากของต้น

ทำการศึกษาการออกรากของต้นอเมซอนที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเปรียบเทียบกับเพาะเลี้ยงใน TIB โดยนำต้นอเมซอนที่มีขนาด 5-7 เซนติเมตร จากการทดลองการยืดยาวของต้น มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (1962) ดัดแปลง ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยมีน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในTIB และอาหารแข็งที่มีการเติมวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร โดยจำนวนชิ้นส่วนตั้งต้นต่อภาชนะใน TIB มี 10 ต้นต่ออาหารเหลว 300 มิลลิลิตร และมีการให้อาหารด้วยระบบ TIB จำนวน 2 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 5 นาที ส่วนในขวดที่มีอาหารแข็งมีจำนวนชิ้นส่วนตั้งต้น 5 ต้นต่ออาหาร 150 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ โดยทำการทดลอง 2 วิธีการทดลอง การทดลองละ 5 ซ้ำ

ขวดเพาะเลี้ยงทั้งที่เป็นอาหารแข็งและ TIB ในการทดลอง 4 ระยะ ดังกล่าว นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่มีการให้แสงที่มีความเข้มแสงเท่ากับ 40 μmol $m^{-2}s^{-1}$ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน และอุณหภูมิห้องเท่ากับ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดในการวิจัยครั้งนี้ใช้โปรแกรม Statgraphics Plus 5.1 วิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย one-way analysis ที่ระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลและวิจารณ์

ระยะการชักนำให้เกิดต้น

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาในอาหารชักนำให้เกิดต้นใหม่ พบว่าชิ้นส่วนตาที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี TDZ 1.0 มก/ล ร่วมกับ IAA 0.3 มก/ล ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ แต่ในชิ้นส่วนตาที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี BA 1.0 มก/ล ร่วมกับ IAA 0.3 มก/ล BA 2.0 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.3 มก/ล และ TDZ 0.5 มก/ล ร่วมกับ IAA 0.3 มก/ล มีการปนเปื้อนเชื้อมากที่สุดคือ 40% และจากตาราง 1 จะเห็นได้ว่า การชักนำการเกิดต้นของอเมซอนเกิดต้นได้น้อย เพียง 1-2 ต้นต่อกอเท่านั้น โดยอาหารที่มีการเติม TDZ 1.0 มก/ล ร่วมกับ IAA 0.3 มก/ล ให้จำนวนต้นต่อกอสูงที่สุดคือ 1.8±0.18 ต้น ส่วนชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี TDZ 0.5 มก/ล และอาหารที่มี BA ไม่มีการแตกต้นอ่อนใหม่ หลังจากนั้นได้ทำการนำต้นที่ปลอดเชื้อไปเพาะเลี้ยงในอาหาร TDZ 1 มก/ล นานอีก 4 สัปดาห์ จึงนำมาเพาะเลี้ยงในระยะเพิ่มปริมาณ

ระยะเพิ่มปริมาณต้น

จากการศึกษาผลของ TDZ หรือ BA ต่อการเพิ่มปริมาณของต้นอเมซอนที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งและ TIB เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าต้นที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งมีลักษณะต้นเล็ก ในขณะที่ต้นที่เพาะเลี้ยงใน TIB พบว่าต้นมีลักษณะแข็งแรง ต้นโต และต้นมีสีเขียวกว่าต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง

จากตาราง 2 จะเห็นได้ว่า TDZ มีผลต่อการเพิ่มจำนวนต้นต่อกออย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ ให้สูงขึ้นจาก 0.25 เป็น 1.0 มก/ล จำนวนต้นเฉลี่ยจะสูงมากยิ่งขึ้นจาก 3 เป็น 7 ต้นต่อกอ ซึ่งต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี TDZ ต้นมีขนาดเล็ก แต่มีการแตกต้นใหม่จำนวนมาก ในขณะที่ BA ไม่ตอบสนองเท่าที่ควรคือ ไม่พบการแตกต้นใหม่ทั้งในอาหารแข็งและ TIB ซึ่งต้นมีขนาดใหญ่ เป็นต้นแก่

ตาราง 1 จำนวนต้นเกิดใหม่เฉลี่ยต่อกอในระยะชักนำให้เกิดต้น ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในอาหารที่มี BA หรือ TDZ ร่วมกับ IAA หรือ NAA ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนต้นเฉลี่ยต่อกอ[1/]	C.V. (%)
1.0 mg/L BA และ 0.3 mg/L IAA	1.1±0.17a	15.45
2.0 mg/L BA และ 0.3 mg/L IAA	1.0±0.17a	17.00
2.0 mg/L BA และ 0.3 mg/L NAA	1.0±0.17a	17.00
0.5 mg/L TDZ และ 0.3 mg/L IAA	1.1±0.17a	15.45
1.0 mg/L TDZ และ 0.3 mg/L IAA	1.8±0.18b	10.00

[1/] ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามหลังตัวอักษรในลำเดียวกัน (a, b) ที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้ด้วยวิธี One-way ANOVA Multiple Range Test

ตาราง 2 จำนวนต้นเฉลี่ยต่อกอในระยะเพิ่มปริมาณต้น ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในอาหารที่มี TDZ หรือ BA ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนต้นเฉลี่ยต่อกอ			
	อาหารแข็ง[1/]	C.V. (%)	TIB[1/]	C.V. (%)
0.25 mg/L TDZ	2.8±0.49bc	17.50	3.4±0.35c	10.29
0.5 mg/L TDZ	3.2±0.49c	15.31	4.2±0.61cd	14.52
1.0 mg/L TDZ	5.4±0.49de	9.07	6.3±0.61e	9.68
0.25 mg/L BA	1.0±0.49a	49.00	1.0±0.43a	43.00
0.5 mg/L BA	1.0±0.53a	53.00	1.0±0.35a	35.00
1.0 mg/L BA	1.4±0.49a	35.00	1.0±0.35a	35.00

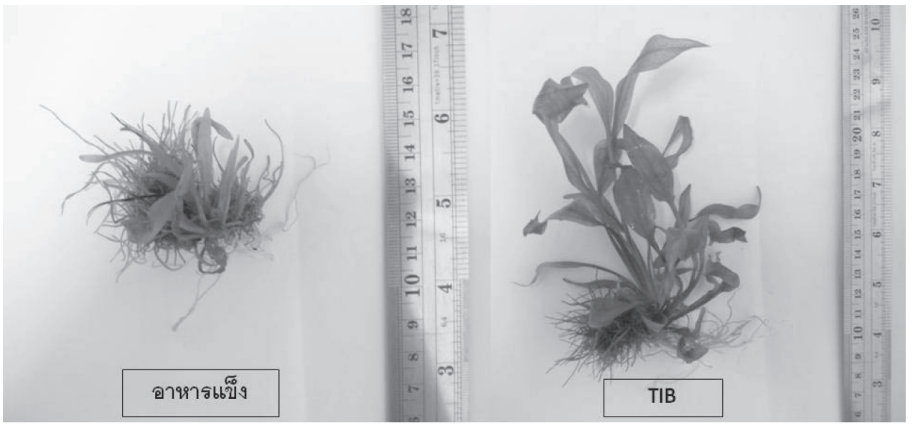
[1/] ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามหลังตัวอักษรในลำเดียวกัน (a, b, c, d, e) ที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้ด้วยวิธี One-way ANOVA Multiple Range Test

นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงต้นอเมซอนในอาหารที่มี TDZ และเพาะเลี้ยงใน TIB ให้จำนวนต้นต่อกอมากกว่าต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง โดยเฉพาะ TDZ 1.0 มก/ล ใน TIB มีจำนวนต้นเฉลี่ย 6.3±0.61 ต้น รองลงมาคือชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี TDZ 0.5 และ 0.25 มก/ล มีจำนวนต้นเฉลี่ย 4.2±0.61 และ 3.4±0.35 ต้นต่อกอ ตามลำดับ ในขณะที่อาหารแข็ง ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี TDZ 1.0, 0.5 และ 0.25 มก/ล มีจำนวนต้นเฉลี่ย 5.4±0.49, 3.20±0.49 และ 2.8±0.49 ต้นต่อกอ ตามลำดับ

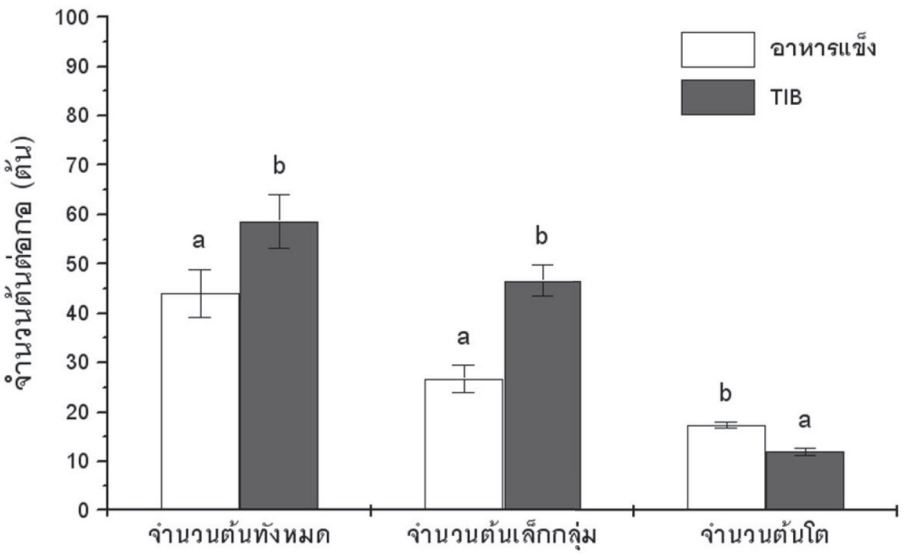
ระยะการยืดยาวของต้น

กลุ่มของต้นอเมซอนที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog 1962) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อให้เกิดการยืดยาวของต้น พบว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเป็นต้นขนาดเล็ก และต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน TIB ต้นมีขนาดใหญ่กว่า นอกจากนี้ยังพบการเกิดต้นเล็กกลุ่มจากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งและ TIB (ภาพ 1)

จากภาพ 2 จะเห็นได้ว่าจำนวนต้นเล็กกลุ่มที่เพาะเลี้ยงใน TIB มีจำนวนต้นมากกว่าอาหารแข็ง คือมีจำนวนเฉลี่ย 58.6±3.13 ต้นต่อกอ ส่วนในอาหารแข็งมีจำนวนเฉลี่ย 44.1±3.65 ต้นต่อกอ นอกจากนั้นต้นเล็กกลุ่มมีการเพิ่มจำนวนขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วย ซึ่งใน TIB มีการเพิ่มจำนวนของต้นเล็กกลุ่มมากกว่าในอาหารแข็ง โดยใน TIB มีจำนวนต้นเล็กกลุ่มเฉลี่ย 46.6±3.08 ต้นต่อกอ ส่วนในอาหารแข็งมีจำนวนต้นเล็กกลุ่มเฉลี่ย 17.3±3.60 ต้นต่อกอ



ภาพ 1 ลักษณะของต้นอเมซอนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นเล็กกลุ่ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS ดัดแปลง (1962) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ในอาหารแข็งและ TIB



ภาพ 2 จำนวนต้นต่อกอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นเล็กกลุ่ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ในอาหารสูตร MS ดัดแปลง (1962) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ในอาหารแข็งและ TIB

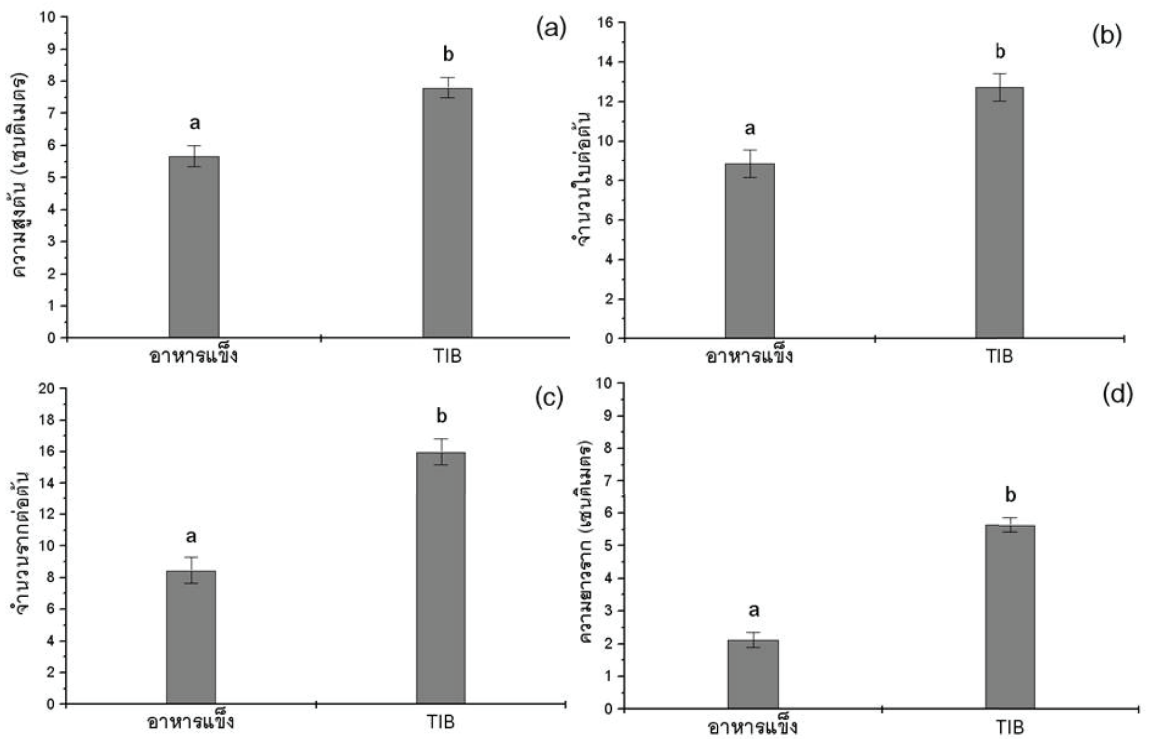
ระยะการออกรากของต้น

ต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง ต้นมีขนาดเล็กกว่า ใบมีสีเขียวอ่อนกว่าต้นใน TIB และบางต้นปลายใบมีสีเหลืองหรือสีน้ำตาลและแห้ง ส่วนต้นใน TIB ต้นมีสีเขียวเข้ม สด แข็งแรง ต้นโต มีใบที่ใหญ่ และต้นมีรากที่ใหญ่แข็งแรงกว่าต้นในอาหารแข็ง

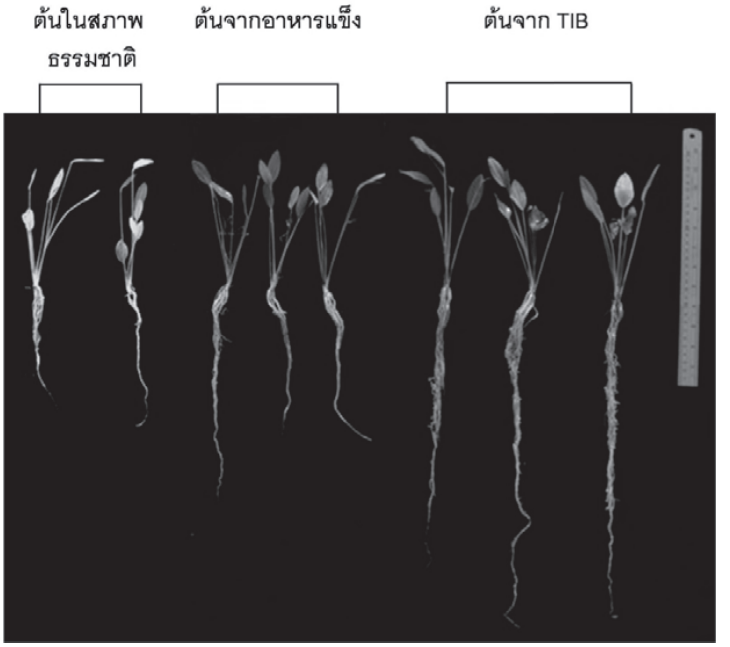
เมื่อพิจารณาถึงคุณภาพของต้นอเมซอนในระยะการออกราก พบว่าต้นอเมซอนที่เพาะเลี้ยงใน TIB มีความสูงมากกว่าต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง (5.67±0.32 เซนติเมตร) โดยมีความสูงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพ 3a) ส่วนจำนวนใบต่อต้น พบว่าต้นที่เพาะเลี้ยงใน TIB มีจำนวนใบเฉลี่ยต่อต้นมากกว่าต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเช่นกัน (ภาพ 3b) จำนวนรากต่อต้น พบว่าต้นที่เพาะเลี้ยงใน TIB มีจำนวนรากเฉลี่ย 16.0±0.82 ราก มากกว่าจำนวนรากจากต้นในอาหารแข็ง 1 เท่า ซึ่งมีจำนวนรากเฉลี่ยเพียง 8.5±0.82 ราก (ภาพ 3c) ในทางเดียวกันความยาวราก ของต้นใน TIB ยาวมากกว่าต้นในอาหารแข็ง โดยต้นใน TIB มีความยาวรากเฉลี่ย 5.65±0.22 เซนติเมตร ส่วนต้นในอาหารแข็งมีความยาวรากเฉลี่ย 2.12±0.22 เซนติเมตร (ภาพ 3d)

และเมื่อนำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็งและ TIB ไปทำการเพาะปลูกในสภาพธรรมชาติ เปรียบเทียบกับต้นที่ได้จากการขยายพันธุ์ ในสภาพธรรมชาติ พบว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน TIB ต้นมีสภาพแข็งแรง ต้นโต มีจำนวนใบและจำนวนรากมากกว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง และต้นจากการตัดชำในสภาพธรรมชาติ (ภาพ 4)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงต้นอเมซอนใน TIB ให้คุณภาพต้นดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง ตลอดจนจำนวนต้นต่อกอเพิ่มขึ้นมากกว่า มีรากจำนวนมากและคุณภาพของต้นดีกว่า โดยเฉพาะเมื่อออกปลูกในสภาพธรรมชาติต้นจะแข็งแรงกว่า ทั้งนี้เนื่องจากพืชที่เพาะเลี้ยงใน TIB ได้รับอาหารจากทุกส่วนของต้นและในระหว่างที่มีการให้อาหาร TIB มีการแลกเปลี่ยนก๊าซ โดยการให้อาหารแก่ต้นพืชนั้นจะใช้อากาศเพื่อดันอาหารให้ต้นพืช ซึ่งในขณะเดียวกันจะมีแก๊สอื่นๆ ออกมาด้วย ซึ่ง Ziv (2005) ได้รายงานว่าระบบ TIB มีการใช้อากาศเพื่อดันอาหารไปเลี้ยงพืช จึงทำให้มีการไล่เอาอากาศเดิมที่สะสมอยู่ในขวดออก ซึ่งอากาศที่ถูกขับไล่ออกมานั้นมีผลเสียต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น แก๊สเอทิลีน เป็นต้น ดังนั้นระบบ TIB จึงมีการควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงได้ดี และทำให้พืชที่เพาะเลี้ยงเจริญเติบโตได้ดี โดย Roels *et al*. (2006) พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชด้วย TIB นั้นมีก๊าซ CO_2 และแก๊สเอทิลีน สะสมในขวดเพาะเลี้ยงน้อยกว่าอาหารแข็ง ทำให้ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงใน TIB มีอัตราการเพิ่มจำนวนต้นได้มากกว่า และต้นมีคุณภาพดีกว่าต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง



ภาพ 3 ความสูงต้น (a) จำนวนใบต่อต้น (b) จำนวนรากต่อต้น (c) และความยาวราก (d) ของต้นอเมซอน หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ ในอาหารแข็งและ TIB ในอาหารสูตร MS ดัดแปลง (1962) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต



ภาพ 4 สภาพต้นอเมซอนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งและ TIB ที่ออกปลูกในอ่างเป็นระยะเวลานาน 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับต้นที่ได้จากการตัดชำ

สรุป

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า การขยายพันธุ์ อเมซอน (*Echinodorus* sp.) ด้วย TIB ในระยะชักนำให้เกิดต้นเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาในอาหารแข็งสูตร MS ที่มี TDZ 1.0 มก/ล ร่วมกับ IAA 0.3 มก/ล นาน 4 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นที่ได้มาเพาะเลี้ยงใน TIB ที่มีอาหารสูตร MS ที่มี TDZ 1.0 มก/ล เพื่อเพิ่มจำนวนต้น เมื่อทำการเพิ่มจำนวนต้นได้จำนวนมากแล้ว นำต้นที่ไปทำการเพาะเลี้ยงในระยะยืดยาว ใน TIB ที่มีอาหารสูตร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อให้ต้นเกิดการยืดยาวและโต จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในระยะออกราก ใน TIB ที่อาหารที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญ แล้วชักนำให้ต้นเกิดราก เพื่อนำไปทำการออกปลูกในสภาพธรรมชาติต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Alister B. M., J. Finnie and F. Blankeway. 2002. Use of temporary immersion system (RITA® for the production of commercial *Eucalyptus* clones at Mondi Forests (SA). Cited by González, E.J. 2005. Mass propagation of tropical crops in temporary immersion systems. pp.197-211. In Liquid Culture System for *in vitro* Plant Propagation. Dordrecht: Springer.

Allgayer, R. and J. Teton. 1987. The Complete Book of Aquarium Plants. Ward Lock Limited, London. 157 p.

Bernal, A., P. Machado and A. D. Arencibia. 2008. Priming and biopriming integrated into the sugarcane micropropagation technology by temporary immersion bioreactors (TIBS). Sugar Tech 10(1): 42-47.

Escalona, M., J.C. Lorenzo, B. Gonzalez, M. Daquinta, J.L. Gonzalez, Y. Desjardins and C.G. Borroto. 1999. Pineapple (*Anans comosus* L. Merr) Micropropagation in Temporary Immersion Systems. Plant Cell Rep. 18: 743-748.

Etienne, H. and M. Berthouly. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 69: 215–231.

Hempfling, T. and W. Preil. 2005. Application of a temporary immersion system in mass propagation of *Phalaenopsis*. pp.231-242. In Liquid Culture System for *in vitro* Plant Propagation. Dordrecht: Springer.

Karppinen, T. K., E. Virtanen and A. M. Pirttila. 2010. Novel bioreactor technology for mass propagation of potato microtubers. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 101: 245-249.

Laohavisuit, N., M. Wangwibulkit and N. Itthisunthorn. 2003. Micropropagation of the aquatic plant *Echinodorus barthii* for export. In Annual Aquaculture Seminar 2003 on 7-9 July, Department of Fisheries. Bangkok, pages 417-421 (in Thai).

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiol. 15: 473-497.

Park, S.Y., H.N.Murthy and K.Y.Peak. 2000. Mass multiplication of protocorm like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 63: 67-72.

Pereira, F.D., J.E.B. Pereira Pinto, M.D.G. Cardoso and O. A. Lameira. 2000. Propagation *in vitro* of “CHAPÉU-DE-COURO” (*Echinodorus cf. scaber* RATAJ), a medicinal plant. Ciênc. agrotec., Lavras. 24: 74-80.

Rataj, K. and T.J. Horeman. 1977. Aquarium Plants: “Their identification, cultivation and ecology”. T.F.H. Pub, Inc. Ltd., London. 448 p.

Roels, S., C. Noceda, M. Escalona, J. Sandoval, M.J. Canal, R. Rodriguez and P. Debergh. 2006. The effect of headspace renewal in a Temporary Immersion Bioreactor on plantain (*Musa* AAB) shoot proliferation and quality. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 84: 155-163.

Roels, S., M. Escalona and P. Debergh. 2005. Optimization of plantain (*Musa* AAB) micropropagation by temporary immersion system. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 82: 57–66.

Ruangnarong, Urai. 1999. Tissue Culture and Induced Mutations *Echinodorus argentinensis*. M.S. thesis, Kasetsart University, Bangkok. 92 pages (in Thai).

Topoonyanont, N., M. Unjai, S. Jaikanta and T. Taychasinpitak. 2009. New shipping system for *Curcuma* hybrid plantlets cultured from twin-flasks temporary immersion bioreactor. Acta Hortic. 829: 407-411.

Topoonyanont, N., S. Chantawong, M. Unjai, T. Kaenket, U. Pliansinchai, N. Kongthaisong and N. Kongnonkog. 2010. Production of sugarcane plants by using temporary immersion bioreactor (TIB) system. In Temporary immersion system development for disease-free sugarcane plantlet micropropagation 2010, National Research Council of Thailand. Bangkok, pages 87-133 (in Thai).

Topoonyanont, N., S. Chongsang, S. Chujum, S. Somsueb and P. Nuamjaroen. 2005. Micropropagation Scheme of *Curcuma alismatifolia* Gagnep. Acta Hortic. 673: 705-712.

Topoonyanont, N., S. Jaikanta and P. Boonmanee. 20011. *Curcuma alismatifolia* Gagnep. Micropropagation in Twin-Flasks Temporary Immersion Bioreactor. Acta Hortic. 886: 267-272.

Troch, V., H. Sapeta, S. Werbrouck, D. Geelen and M.-C. Van Labeke. 2010. In Vitro Culture of Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Using Temporary Immersion Bioreactors. Acta Hortic. 885: 383-390.

Ziv, M. 2005. Simple Bioreactors for Mass Propagation Plant. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 81: 277-285.