

การใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจุ่มชั่วคราวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อนุเบียสบาร์เทอร์บรอดลีฟ *Anubias barteri* 'Broad leaf'

Temporary Immersion Bioreactor for Micropropagation of *Anubias barteri* 'Broad leaf'

นิชารีย์ เทียนชาติสกุล¹ นงนุช เลหาะวิสุทธิ^{1*} และสมเกียรติ สีสอนง²
Nicharee Teanchartsakul¹, Nongnuch Laohavisuti^{1*} and Somkiat Seesanong²

บทคัดย่อ

การศึกษาการเพิ่มผลผลิตพรรณไม้น้ำอนุเบียสบาร์เทอร์บรอดลีฟ (*Anubias barteri* 'Broad leaf') ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจุ่มชั่วคราว โดยทำการศึกษาความถี่ในการให้อาหาร (3, 6, 12 ครั้ง/วัน) เปรียบเทียบกับระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารกึ่งแข็งเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าการเพาะเลี้ยงอนุเบียสในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจุ่มชั่วคราวที่ให้อาหาร 6 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 5 นาทีนั้น มีการเจริญเติบโตดีกว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารกึ่งแข็ง โดยสามารถชักนำให้เกิดขึ้นอ่อน (8.50 ± 0.26 ต้น), จำนวนใบ (4.75 ± 0.25 ใบ) และความสูงต้น (18.14 ± 0.91 มิลลิเมตร) มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยอัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนต้นอ่อนเป็น 2.48 เท่า ซึ่งมีจำนวนมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วนการศึกษาระยะการออกรากพบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งแข็งมีจำนวนราก (4.33 ± 0.26 ราก) มากกว่าระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจุ่มชั่วคราว (2.17 ± 0.24 ราก) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และเมื่อนำต้นอนุเบียสออกปลูกในสภาพแวดล้อมพบว่า มีอัตราการรอด 100% 0

คำสำคัญ: อนุเบียสบาร์เทอร์บรอดลีฟ ระบบไบโอรีแอคเตอร์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ความถี่การให้อาหาร

Abstract

The study on propagation aquatic plant of *Anubias barteri* "Board leaf" through tissue culture by temporary immersion bioreactor system. These experiments were conducted to find out the optimum feeding time (3, 6, 12 time/day) compared with traditional tissue culture (culture in semi-solid medium). After 6 weeks, the result showed that bioreactor system could significantly increase the growth rate of *Anubias* than traditional tissue culture. Feeding six times a day for five minutes showed the *Anubias* were increased of shoot number (8.50 ± 0.26 shoots/explant), leaves number (4.75 ± 0.25 leaves) and height plant (18.14 ± 0.91 millimeter). Multiplication of new shoots in temporary immersion bioreactor as many as 2.48 times more than control. The number of roots from tissue culture could significantly increase the roots number (4.33 ± 0.26 roots) more than the roots in bioreactor (2.17 ± 0.24 roots). The survival rate 100% were observed, when they were cultured in greenhouse.

Keywords: *Anubias barteri* 'Broad leaf', tissue culture, bioreactor system, feeds of frequency

¹ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

²ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

*corresponding author, Email: nongnuch.la@kmitl.ac.th

คำนำ

ตลาดพรรณไม้น้ำสวยงามในปัจจุบันนั้นได้มีการขยายตัวมากขึ้น และยังมีแนวโน้มที่จะขยายตัวมากขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส *Anubias* spp. เป็นพรรณไม้น้ำสวยงามอีกชนิดหนึ่งที่มีสีสันสวยงาม นิยมใช้ประดับตกแต่งในตู้ปลาและตู้พรรณไม้น้ำ แต่มีข้อจำกัด คือ อนูเบียสขยายพันธุ์ค่อนข้างยาก การนำมาเพาะเลี้ยงยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากอนูเบียสขยายพันธุ์ด้วยการแตกหน่อ (กาญจนรี, 2547) โดยแตกหน่อช้ามากในแต่ละปี ซึ่งในปัจจุบันสามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียสได้สำเร็จแล้วโดยนำชิ้นส่วนของพืชจากสภาพธรรมชาติ มาชักนำให้เป็นต้นหรืออวัยวะอื่น ๆ โดยการนำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว และนำไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีส่วนประกอบที่มีความจำเป็น และส่งเสริมการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยจะได้ต้นตรงตามพันธุ์ (นพมณี, 2549) ถึงแม้ว่าจะทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำเร็จแล้วก็ตาม แต่มีปริมาณต้นพันธุ์ที่ยังน้อยมาก ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาการนำเทคโนโลยีใหม่เข้ามาช่วยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ ได้แก่ ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจุ่มชั่วคราว (temporary immersion bioreactor; TIB) ซึ่งเป็นระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบบกึ่งอัตโนมัติที่มีการให้อาหารเหลวในการเพาะเลี้ยงเป็นช่วงเวลาเพื่อไม่ให้ต้นพืชจมอยู่ในอาหารเหลว ตลอดเวลา ระบบนี้มีการพัฒนาและใช้กันอย่างแพร่หลายมากขึ้น (Etienne and Berthouly, 2002) ซึ่งมีหลักการทำงานคือ มีภาชนะแยกระหว่างอาหารกับชิ้นส่วนของพืชออกเป็น 2 ภาชนะ และเชื่อมด้วยท่อซิลิโคน โดยการให้อาหารแก่ชิ้นส่วนพืชนั้นใช้แรงดันอากาศดันอาหารจากภาชนะใส่อาหารไปยังภาชนะเลี้ยงต้นพืชเพื่อให้พืชได้รับอาหารเหลวเพียงชั่วคราว เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดจะใช้แรงดันดันอาหารกลับสู่ภาชนะเก็บอาหารเช่นเดิม ซึ่งสภาพภายในขวดต้องเป็นสภาพที่ปลอดเชื้อ ดังนั้นอากาศที่ผ่านเข้าออกในระบบไบโอรีแอคเตอร์จะถูกกรองด้วยแผ่นกรองอากาศ (Alvard et al., 1993) ทำให้พรรณไม้น้ำเจริญเติบโตได้เร็วกว่า เพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ได้มากในระยะเวลาที่น้อยกว่าระบบการเลี้ยงแบบเดิม (Etienne and Berthouly, 2002) ช่วยลดต้นทุนการผลิต ลดการฉ่ำน้ำของต้นพืช และสามารถเปลี่ยนอาหารได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่ต้องมีการย้ายขวด นอกจากนี้ยังสามารถลดค่าแรงงานในการย้ายเนื้อเยื่อรวมถึงลดภาชนะและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ลดพื้นที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (นพมณี และคณะ, 2549) และสามารถควบคุมคุณภาพพรรณไม้น้ำอนูเบียสส่งออกให้ได้มาตรฐาน ดังนั้นการศึกษารายละเอียดของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบ TIB ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มผลผลิตพรรณไม้น้ำอนูเบียสบาร์เทอร์บรอดลีฟ (*A. barteri* 'Broad leaf') จะช่วยลดต้นทุนการผลิต และสามารถควบคุมคุณภาพพรรณไม้น้ำอนูเบียสส่งออกให้ได้มาตรฐาน

วิธีการศึกษา

การทดลองที่ 1 การศึกษาความถี่ในการให้อาหารด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณต้นอนูเบียสบาร์เทอร์บรอดลีฟ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยศึกษาความถี่ในการให้อาหาร ซึ่งใช้อาหารกึ่งแข็ง (ชุดควบคุม) กับระบบ TIB (Figure 1) ที่มีการให้อาหาร 3, 6 และ 12 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 5 นาที ทั้งหมด 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ

ทำการขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำอนูเบียสโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์สำหรับการทดลอง เมื่อได้ต้นพันธุ์อนูเบียสตามจำนวนที่ต้องการแล้ว นำเนื้อเยื่ออนูเบียสมาทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอ่อนจำนวน 5 ต้น ในปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอ่อนจำนวน 10 ต้น ในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในอาหารสูตรเดียวกันคือ MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับฮอริโมน 6-benzylamino purine (BA) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Adenine sulfate (Ads) 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระบบ TIB เมื่อจัดเตรียมทั้งเนื้อเยื่อ และอุปกรณ์เรียบร้อยแล้ว ตั้งเวลาในเครื่องควบคุมเวลา (Timer) เพื่อกำหนดความถี่ในการให้อาหาร บันทึกผลการทดลอง ตรวจสอบการเจริญเติบโตและ

การพัฒนาของเนื้อเยื่อทุกสัปดาห์ ในแต่ละชุดการทดลอง โดยนับจำนวนต้นอ่อนต่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ จำนวนใบ วัดความสูงต้น เมื่อครบ 6 สัปดาห์นำต้นอ่อนซึ่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นอ่อน จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตในระยะการออกรากของต้นอนุเบียสบาร์เทอร์บรอดลิฟ ระหว่างอาหารกึ่งแข็งกับการใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์

นำต้นพันธุ์อนุเบียสจากการขยายพันธุ์ในการทดลองที่ 1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งและระบบ TIB ในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยทำการเพาะเลี้ยงต้นพันธุ์จำนวน 5 ต้น ในอาหารกึ่งแข็งปริมาตร 50 มิลลิลิตร ส่วนระบบ TIB เลี้ยงต้นพันธุ์จำนวน 10 ต้น ในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในระบบ TIB กำหนดความถี่ในการให้อาหารเป็นความถี่ที่ทำให้ต้นอนุเบียสมีการเจริญเติบโตดีที่สุด จากการทดลองที่ 1 และบันทึกการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อทุกสัปดาห์ในแต่ละชุดการทดลอง โดยนับจำนวนต้นอ่อนต่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ จำนวนใบ จำนวนราก วัดความสูงต้น จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Independent sample t-test ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

การทดลองที่ 3 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นอนุเบียสบาร์เทอร์บรอดลิฟ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งและต้นอนุเบียสที่ได้จากระบบไบโอรีแอคเตอร์ เมื่อนำออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก

ปลูกอนุเบียสจากการทดลองที่ 2 ในระบบปลูกพืชไร้ดินแบบ DFT (Deep Flow Technique) โดยนำต้นอนุเบียสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยอาหารกึ่งแข็ง และระบบ TIB ตัดรากและใบออกบางส่วนเพื่อป้องกันการเน่าของราก พันด้วยใยหิน (rock wool) ใส่ลงถ้วยปลูก นำไปอนุบาลในกระบะที่คลุมด้วยพลาสติกใสจนพรรณไม้สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีความชื้นปกติ หลังจากนั้นเปิดพลาสติกคลุมออกเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ คัดเลือกต้นอนุเบียสที่มีขนาดใกล้เคียงกัน มาใช้ทดลองในระบบ DFT ที่มีสารละลายธาตุอาหาร โดยปรับสารละลายเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้น 0.75 มิลลิซีเมนต์ต่อเซนติเมตร จากนั้น ทำการเติมสารละลายธาตุอาหารและค่อยๆ ปรับระดับความเข้มข้นจนถึงระดับ 1.5 มิลลิซีเมนต์ต่อเซนติเมตรทุกสัปดาห์ สังเกตและบันทึกการเจริญเติบโต ได้แก่ จำนวนต้นอ่อน จำนวนใบ ความสูงต้น อัตราการรอด น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง เป็นระยะเวลานาน 16 สัปดาห์ จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Independent sample t-test ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

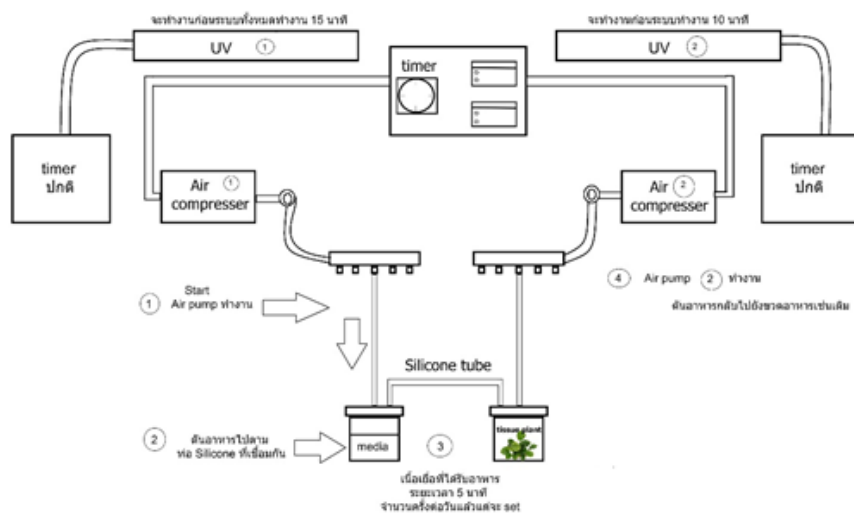


Figure 1 Temporary immersion bioreactor (TIB) system.

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การศึกษาความถี่ในการให้อาหารด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณต้นอณูเบียสบาร์เทอร์บรอดลีฟ

จากการทดลองนำเนื้อเยื่อตายอดอณูเบียสมาเพาะเลี้ยงในระบบ TIB โดยศึกษาความถี่ในการให้อาหารที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารกึ่งแข็ง (ชุดควบคุม) โดยกำหนดจำนวนครั้งในการให้อาหารที่ 3, 6 และ 12 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 5 นาที เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าระบบ TIB ที่มีความถี่ในการให้อาหาร 6 ครั้งต่อวัน สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อตายอดอณูเบียสเกิดต้นอ่อนมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) รองลงมาคือ 12 ครั้งต่อวัน, ชุดควบคุม และ 3 ครั้งต่อวัน โดยมีจำนวนต้นอ่อนเพิ่มขึ้น 8.50 ± 0.26 , 5.58 ± 0.23 , 3.42 ± 0.14 และ 1.92 ± 0.82 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (Table 1) โดยอณูเบียสที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIB ที่มีความถี่ในการให้อาหาร 6 ครั้งต่อวัน มีอัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนต้นอ่อนเป็น 2.48 เท่า ของการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง

ส่วนผลของความถี่ในการให้อาหารที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดใบและความสูงต้นนั้น พบว่าระบบ TIB ที่มีความถี่ในการให้อาหาร 6 ครั้งต่อวัน สามารถชักนำให้เกิดใบ และความสูงต้นมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) รองลงมาคือ 12 ครั้งต่อวัน, ชุดควบคุม และ 3 ครั้งต่อวัน โดยมีจำนวนใบเพิ่มขึ้นเท่ากับ 4.75 ± 0.25 , 2.92 ± 0.19 , 2.33 ± 0.22 และ 1.75 ± 0.49 ใบ ตามลำดับ และมีความสูงเพิ่มขึ้นเท่ากับ 18.14 ± 0.91 , 14.56 ± 0.57 , 15.46 ± 0.51 และ 9.33 ± 0.30 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Table 2)

Table 1 Effect of immersion frequency on the shoots number of *Anubias barteri* var. 'Broad leaf' during the cultivation in TIB compare with culturing in semi-solid culture.

Frequency of nutrient solution feed	Number of shoots	Multiplication rate
control	3.42 ± 0.14^c	+1.33
3	1.92 ± 0.82^d	-0.56
6	8.50 ± 0.26^a	+2.48
12	5.58 ± 0.23^b	+1.63

Mean $\pm$ SE with different superscript letters in each column are significantly different ($P<0.05$).

Table 2 Effect of immersion frequency on leaves number of of *Anubias barteri* var. 'Broad leaf' during the cultivation in TIB compare with culturing in semi-solid culture.

Frequency of nutrient solution feed	Number of leaves	Plant height (mm)
control	2.33 ± 0.22^{bc}	15.46 ± 0.51^b
3	1.75 ± 0.49^c	9.33 ± 0.30^c
6	4.75 ± 0.25^a	18.14 ± 0.91^a
12	2.92 ± 0.19^b	14.56 ± 0.57^b

Mean $\pm$ SE with different superscript letters in each column are significantly different ($P<0.05$).

นอกจากนี้ผลของความถี่ในการให้อาหารในระบบ TIB ที่มีความถี่ในการให้อาหาร 6 ครั้งต่อวัน สามารถทำให้ต้นอณูเบียส มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากที่สุด รองลงมาคือ 12 ครั้งต่อวัน, ชุดควบคุม และ 3 ครั้งต่อวัน

(Table 3) และเมื่อสังเกตลักษณะภายนอกของต้นอ่อนอณูเบียสในชุดการทดลองที่มีความถี่ให้อาหาร 6 ครั้งต่อวัน พบว่ามีลักษณะลำต้นและใบใหญ่กว่า รวมทั้งมีสีใบที่เข้มกว่าซึ่งแตกต่างกับชุดการทดลองที่มีความถี่ให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน โดยต้นอ่อนมีลำต้นและใบเล็ก ใบมีสีอ่อนเห็นได้ชัดเจน (Figure 2)

Table 3 Effect of immersion frequency on fresh weight and dry weight of *Anubias barteri* 'Broad leaf' during the cultivation in TIB compare with culturing in semi-solid culture.

Frequency of nutrient solution feed	Fresh weight (g/explant)	Dry weight (g/explant)
control	0.92±0.05 ^c	0.086±0.00 ^c
3	0.26±0.02 ^d	0.031±0.00 ^d
6	1.94±0.14 ^a	0.188±0.01 ^a
12	1.19±0.02 ^b	0.120±0.00 ^b

Mean ±SE with different superscript letters in each column are significantly different ($P<0.05$).



Figure 2 Effect of immersion frequency during the cultivation on *Anubias barteri* var. 'Broad leaf' growth in semi-solid culture and TIB for 6 weeks. (A) semi-solid culture (B) TIB frequency of nutrient solution feed 3 times/day (C) TIB frequency of nutrient solution feed 6 times/day and (D) TIB frequency of nutrient solution feed 12 times/day.

การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตในระหว่างการออกรากของต้นอนุเบียสบาร์เทอร์บรอดลีฟ ระหว่างอาหารกึ่งแข็งกับการใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์

จากการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในระหว่างการออกรากของต้นอนุเบียส ระหว่างอาหารกึ่งแข็งกับระบบ TIB พบว่าอนุเบียสบาร์เทอร์บรอดลีฟที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งแข็งมีจำนวนราก (4.33 ± 0.26) และความสูงต้น (14.06 ± 0.84) มากกว่าระบบ TIB อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ซึ่งอนุเบียสบาร์เทอร์บรอดลีฟที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งแข็งเริ่มมีรากงอกออกจากต้นอ่อนในสัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง แต่อนุเบียสบาร์เทอร์บรอดลีฟเพาะเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งแข็งมีจำนวนต้นอ่อน (0.83 ± 0.21) และใบ (0.92 ± 0.23) น้อยกว่าระบบ TIB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (Table 4) เนื่องจากในอาหารกึ่งแข็งนั้นมีวัฏเป็นองค์ประกอบ เมื่อแข็งตัวสามารถยืดหยุ่นได้และเหมาะกับการยึดเกาะของรากเป็นอย่างดี ทำให้พรรณไม้แตกรากได้ดีและมีจำนวนรากมากกว่า และมีระยะเวลาออกรากเกิดขึ้นเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB ซึ่งจากการทดลองพบว่า ต้นอนุเบียสที่เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งมีการเจริญเติบโตในระหว่างการออกราก จำนวนรากและความสูงดีกว่า แต่ในขณะเดียวกันอนุเบียสที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIB มีจำนวนต้นอ่อนและจำนวนใบที่มากกว่า ($P < 0.05$)

Table 4 Effect of TIB and semi-solid culture techniques on growth of *Anubias barteri* 'Broad leaf' during the cultivation.

Treatment	Number of roots	Number of shoots	Number of leaves	Plant height (mm)
control	4.33 ± 0.26^a	0.83 ± 0.21^b	0.92 ± 0.23^b	14.06 ± 0.84^a
TIB	2.17 ± 0.24^b	2.67 ± 0.14^a	3.33 ± 0.40^a	11.27 ± 0.24^b

Mean $\pm$ SE with different superscript letters in each column are significantly different ($P < 0.05$).

การทดลองที่ 3 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นอนุเบียสบาร์เทอร์บรอดลีฟ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งและต้นอนุเบียสที่ได้จากระบบไบโอรีแอคเตอร์ เมื่อนำออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก

จากการศึกษาอัตราการรอดและการเจริญเติบโตของอนุเบียสบาร์เทอร์บรอดลีฟ ที่ออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก พบว่าจำนวนต้นอ่อน จำนวนใบ ความสูง น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และอัตราการรอดของต้นอนุเบียสที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งและระบบ TIB เมื่อนำออกสู่การปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกมีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์ (Table 5) เนื่องจากความแข็งแรงของต้นพันธุ์ซึ่งต้นพันธุ์ที่แข็งแรง สมบูรณ์ดี เมื่อนำออกปลูกสภาพแวดล้อมภายนอกมีอัตราการรอดสูงขึ้น จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออนุเบียสในระบบ TIB ไม่ส่งผลต่ออัตราการรอดของการย้ายปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก

จากการทดลองเปรียบเทียบระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออนุเบียสในอาหารกึ่งแข็ง และระบบ TIB พบว่าการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB นั้นสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อตายอดอนุเบียสบาร์เทอร์บรอดลีฟ มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง ทั้งในด้านจำนวนต้นอ่อน จำนวนใบ ความสูงต้น และน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง เนื่องจากการเพาะเลี้ยงใน TIB นั้น เป็นระบบที่มีการหมุนเวียนอากาศภายในภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง ต้นพันธุ์พรรณไม้จึงสามารถนำก๊าซที่เข้าไปในระบบ ไปใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ (Murch *et al.*, 2004) นอกจากนี้จากการทดลองของ Liu *et al.* (2004) และ He *et al.* (2007) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Artemisia judaica* และ *Hydrastis canadensis* ด้วยระบบ TIB พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณต้นอ่อนได้ 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เนื่องจากระบบอาศัยการทำงานของปั๊มลมดันอาหารขึ้นไปสัมผัสกับต้นพันธุ์พรรณไม้ ทำให้ต้นพันธุ์พรรณไม้มีน้ำได้

รับปริมาณสารอาหารได้อย่างเต็มที่ และทั่วถึง จึงทำให้เกิดการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น การนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบ TIB มาใช้นั้น ทำให้เกิดข้อดีหลายอย่าง เช่น สามารถลดปัญหาเรื่องการขาดอากาศของพืชได้ เนื่องจากการเติมอากาศเข้าไปในระบบ ซึ่งอากาศที่เข้าไปจะผ่านการกรองด้วยตัวกรองฆ่าเชื้อ (Cui *et al.*, 2014) จึงไม่ส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนระหว่างการเลี้ยง สามารถเปลี่ยนอาหารใหม่ได้ง่าย จึงลดต้นทุนการผลิตในการจ้างแรงงานย้ายเนื้อเยื่อเพื่อเปลี่ยนอาหารใหม่ (นพมณี และคณะ, 2549)

Table 5 Effect of TIB and semi-solid culture techniques on growth and survival of *Anubias barteri* 'Broad leaf' during the cultivation.

Growth performance	Treatment		T-test
	Control	TIB	
Number of shoots	0.87±0.19	0.93±0.18	NS
Number of leaves	4.20±0.26	4.80±0.37	NS
Plant height (mm)	3.41±0.98	13.01±0.93	NS
Survival rate (%)	100±0.00	100±0.00	NS
Fresh weight (g)	3.36±0.14	3.40±0.14	NS
Dry weight (g)	1.50±0.09	1.55±0.10	NS

NS: not significant by $T \leq 0.05$

นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบ TIB มีปัจจัยหลายอย่างซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช ปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากคือ ความถี่ในการให้อาหารที่เหมาะสม จากการทดลองพบว่าความถี่ในการให้อาหารที่ทำให้ต้นอนุเบียงสาร์เทอร์บรอดลีมีการเจริญเติบโตดีที่สุดคือ 6 ครั้งต่อวัน แต่ความถี่ในการให้อาหารที่ 3 ครั้งต่อวันนั้น ทำให้ต้นอนุเบียงสาร์เทอร์บรอดลีมีขนาดเล็กกว่าชุดควบคุม เนื่องจากต้นอนุเบียงเป็นพืชน้ำตื้นต้องการความชุ่มชื้นในการเจริญเติบโต ซึ่งความถี่ในการให้อาหาร 3 ครั้งต่อวันนั้นน้อยเกินไป ทำให้อนุเบียงได้รับความชุ่มชื้นน้อย และได้รับสารอาหารน้อยจึงส่งผลต่อการเจริญเติบโตเป็นอย่างมาก การได้รับปริมาณอาหารเหลวน้อยเกินไป อาจส่งผลให้ต้นมีขนาดเล็กผิดปกติ และใบมีการเหี่ยวแห้งเกิดขึ้นได้ (Shan-Shan *et al.*, 2007) และหากถ้าได้รับปริมาณอาหารเหลวในระบบการทดลองมากเกินไปอาจเกิดอาการฉ่ำน้ำของต้นพันธุ์ และทำให้ต้นพันธุ์เสียหายได้ (Shaik *et al.*, 2010) จากการทดลองของ Ashraf *et al.* (2013) ที่ศึกษาความถี่ในการให้อาหารเนื้อเยื่อ *Chlorophytum borivilianum* ในระบบ TIB 32, 24 และ 19 ครั้งต่อวัน นานครั้งละ 15 นาที พบว่าความถี่ในการให้อาหารที่ 32 ครั้งต่อวัน ทำให้เกิดความเสียหายของต้นพันธุ์มากถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพืชชนิดนี้มีลักษณะการเจริญเติบโตที่ไม่ชอบน้ำมากนัก เพราะฉะนั้นเมื่อได้รับอาหารเหลวจากระบบมากเกินไป จึงทำให้เกิดอาการฉ่ำน้ำของต้นพันธุ์ได้ นอกจากนี้พัชรินทร์ (2553) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของอนุเบียงสนานา ในระบบ TIB ที่มีความถี่ของการให้อาหาร 4 ครั้งต่อวัน สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้มากที่สุด ส่วนรายงานการทดลองของ Zhao *et al.* (2009) ศึกษาความถี่ในการให้อาหารเนื้อเยื่อ *Rhodiola crenulata* ในระบบ TIB ที่ 24, 8, 5, 4 และ 3 ครั้งต่อวัน นานครั้งละ 3 นาที พบว่าการให้อาหาร 5 ครั้งต่อวัน ทำให้เกิดจำนวนต้นอ่อนมากที่สุด Ahmadian *et al.* (2017) ศึกษาความถี่ในการให้อาหารเนื้อเยื่อ *carnation* (*Dianthus caryophyllus* L.) ในระบบ TIB ที่ 4, 6 และ 12 ครั้งต่อวัน นานครั้งละ 2 นาที พบว่าการให้อาหาร 6 ครั้งต่อวัน ทำให้เกิดจำนวนต้นอ่อนมากที่สุด และ Pavlov *et al.* (2006) ศึกษาความถี่ในการให้อาหารเนื้อเยื่อ

Beta vulgaris L. ในระบบ TIB ที่ 32, 24, 19 และ 16 ครั้งต่อวัน นานครั้งละ 15 นาที พบว่าการให้อาหาร 19 ครั้งต่อวัน มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด เนื่องจากเป็นพืชที่มีลำต้นใต้ดิน ซึ่งจำเป็นต้องมีการสะสมอาหารไว้ในลำต้นใต้ดิน ดังนั้นจำเป็นต้องได้รับอาหารจำนวนครั้งมากกว่าพืชชนิดอื่น จึงสามารถเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งในพืชแต่ละชนิดนั้น จะมีความต้องการความถี่ในการได้รับอาหาร แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิด และสภาวะแหล่งที่อยู่ในการเจริญเติบโตของพืชชนิดต่างๆ อีกด้วย แต่ความถี่ให้อาหารไม่ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนต้นอ่อนของ *Salix viminalis* ในระบบ TIB (Regueira *et al.*, 2018)

ในการเพิ่มจำนวนต้นอ่อนนั้นพบว่าการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB สามารถเพิ่มจำนวนต้นอ่อนได้ในการศึกษาระยะการออกรากพบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งส่งผลให้มีจำนวนรากเพิ่มขึ้นมากกว่าในระบบ TIB เนื่องจากอาหารกึ่งแข็งสามารถเป็นวัสดุที่ยึดเกาะรากได้ดี จึงส่งผลให้มีจำนวนรากเพิ่มมากขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับ Zhang *et al.* (2018) เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Bletilla striata* ที่เลี้ยงในระบบ TIB ทำให้มีความสูงต้นและจำนวนหัวมากกว่าในอาหารกึ่งแข็ง เมื่อนำต้นอ่อนไปปลูกในสิ่งแวดล้อมภายนอกมี อัตราการรอด 100% เนื่องจากต้นอ่อนอยู่ในระบบ TIB มีความแข็งแรง ไม่เกิดการเสียหายจากอาการจุ่มน้ำ ดังนั้นการย้ายปลูกในสิ่งแวดล้อมภายนอกจึงมีอัตราการรอดสูง (Murch *et al.*, 2004)

สรุปผลการศึกษา

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำอโนเบียสบาร์เทอรียบรอดลีฟในระบบ TIB ที่มีความถี่ในการให้อาหาร 6 ครั้งต่อวัน สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อตายอดมีการเจริญเติบโตดีที่สุด และมีจำนวนต้นอ่อน ความสูงต้น จำนวนใบ และน้ำหนักมากที่สุด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่การศึกษาระยะการออกรากพบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งทำให้มีจำนวนรากมากกว่าในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจุ่มชั่วคราว และเมื่อนำต้นอ่อนไปปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกพบว่ามีอัตราการรอด 100%

เอกสารอ้างอิง

- กาญจนาрі พงษ์ฉวี. 2547. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออโนเบียส. เรื่องเตรียมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42: สาขาประมง สาขาอุตสาหกรรมเกษตร, กรุงเทพมหานคร. หน้า 45-52.
- นพมณี ไทบุญญานนท์, รังสิมา อัมพวัน, และพรรคดี บุญมณี 2549. วร : สนับสนุนผลงานวิจัยไม้ดอกเพื่อการส่งออก. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพมหานคร.
- มนีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ. 2540. ชนิดและปริมาณน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำสกุล *Anubias*. เอกสารวิชาการฉบับที่ 186. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพมหานคร. หน้า 1-18.
- พัชรินทร์ สายพัฒนะ. 2553. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออโนเบียส (*Anubias nana* Engler) ในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจุ่มชั่วคราวแบบขวดแผ่น. สาขาวิชาเทคโนโลยีประมง, มหาวิทยาลัยแม่โจ้. หน้า 1-92.
- Ahmadian, M., A. Babaei, S. Shokri and S. Hessami. 2017. Micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in liquid medium by temporary immersion bioreactor in comparison with solid culture. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 15: 309-315.
- Alrard, D., F. Cote and C. Teisson. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32: 55-60.
- Ashraf, M., A.A. Maheran, S. Johnson and A.K. Mihdzar. 2013. Optimization of immersion frequency and medium substitution on microtuberization of *Chlorophytum borivilianum* in RITA system on production of saponins. *Process Biochemistry* 48: 73-77.
- Berthouly, M and H. Etienne. 2005. Temporary immersion system: A new concept. In Hvorslef-Eide, A. K. and W. Preil. (eds.) *Liquid culture system for in vitro plant propagation*. Dordrecht: Springer 165-196.

- Cui, H-Y., H.N. Murthy, S.H. Moh, Y-Y. Cui, E-J. Lee and K-Y. Paek. 2014. Production of biomass and bioactive compounds in protocorm culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl using balloon type bubble bioreactors. *Industrial Crops and Products* 53: 28-33.
- He, S.S., C.Z Liu and P.K. Saxena. 2007. Plant regeneration of an endangered medicinal plant *Hydrastis canadensis* L. *Scientia Horticulturae*. 113: 82–86.
- Liu, C.Z., S.J Murch, M. El-Demerdash and P.K. Saxena. 2004. *Artemisia judaica* L. micropropagation and antioxidant activity. *Journal of Biotechnology* 110: 63–71.
- Murch, S., L. Chunzhao, M.R, Rosaura and K.S. Praveen 2004. In vitro culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 78: 63–68.
- Pavlov, A. and B. Thomas. 2006. Betalains biosynthesis by *Beta vulgaris* L. hairy root culture in a temporary immersion cultivation system. *Process Biochemistry* 41: 848–852.
- Regueira, M., E. Rial, B. Balanco, B. Bogo, A. Aldrey, B. Correa, C. Sanchez and N. Vidal. 2018. Micropropagation of axillary shoots of *Salix viminalis* using a temporary immersion system. *Trees* 32: 61–71.
- Shaik, S., Y.H. Dewir. N. Singha and A. Nicholasa. 2010. Micropropagation and bioreactor studies of the medicinally important plant *Lessertia (Sutherlandia) frutescens* L. *South African Journal of Botany* 76: 180–186.
- Shan-Shan, H., L. Chun-zhao and K.S. Praveen. 2007. Plant regeneration of an endangered medicinal plant *Hydrastis canadensis* L. *Scientia Horticulturae* 113: 82–86.
- Zhang, B., L. Song, L. D. Bekele, J. Shi, Q. Jia, B. Zhang, L. Jin, G. J. Duns and J. Chen. 2018. Optimizing factors affecting development and propagation of *Bletilla striata* in a temporary immersion bioreactor system. *Scientia Horticulturae* 232: 121-126.
- Zhao, Y., S. Wei, W. Ying, J.S. Praveen and L. Chun-Zhao. 2009. Improved mass multiplication of *Rhodiola crenulata* shoots using temporary immersion bioreactor with forced ventilation. *Applied Biochemistry Biotechnology* 166: 1480-1490.

วันรับบทความ (Received date) 3 พ.ค. 2560

วันแก้ไขบทความ (Revised date) 30 พ.ย. 2560

วันตอบรับบทความ(Accepted date) 5 ก.ย. 2561