

ระบบการจุ่มชั่วคราวสำหรับการขยายพันธุ์ไผ่หวานอย่างาง เพื่อการผลิตต้นกล้าในเชิงพาณิชย์

Temporary Immersion System (TIS) for Micropropagation of *Dendrocalamus latiflorus* in Commercial Production

ยุพา มงคลสุข¹

มะลิวัลย์ ธนะสมบัติ¹

รุ่งอรุณ สุ่มแก้ว¹

ปัทมา ลิขิตธรรมนิษฐ์¹

พนิดา วงษ์แหวน¹

Yupa Mongkolsook¹

Maliwan Tanasombut¹

Rungarun Sumkaew¹

Patima Likitthammanit¹

Panida Wongwean¹

¹ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
Kasetsart Agricultural and Agro-Industrial Product Improvement Institute, Kasetsart University,
Bangkok 10900, Thailand

ABSTRACT

Improvement of tissue culture techniques for shoots of Ma-chu Bamboo (*Dendrocalamus latiflorus*) were cultured in three different conditions in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with Benzylaminopurine (BAP) 4 mg l⁻¹, Naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-furfurylaminopurin (kinetin) 1, 1 mg l⁻¹ and coconut water 8 mg l⁻¹. The conditions included liquid medium with temporary immersion system (TIS), plant cultures by intermittent immersion in medium with this simple system by pneumatic and time controllers, for 1 minute in every 1 or 3 hours (TIS₁), 5 minutes in every 3 hours (TIS₂) and semi-solid medium. The highest shoot multiplication number in 60 days were obtained from liquid medium with TIS₂, 105 shoots (multiplication rate of 7.75 X) compared to 83 shoots (multiplication rate of 5.92 X) in TIS₁ and 27 shoots (multiplication rate of 1.25 X) in semi-solid conditions. The TIS₂ gave higher shoot production than semi-solid culture medium about 6.5 folds in shoot multiplication rate and shoots were healthy and produced internodes elongation. Therefore, the TIS is a promising technique for reducing costs of Ma-chu bamboo plantlets in commercial production from tissue culture technique in the future.

Key words: temporary immersion system (TIS), *Dendrocalamus latiflorus*, micropropagation

บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไผ่หวานอ่างช้าง (*Dendrocalamus latiflorus*) โดยเพาะเลี้ยงส่วนยอด ในอาหารสูตร Murashige and Skoog ที่เติม Benzylaminopurine (BAP) 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Naphthaleneacetic acid (NAA) และ 6-furfurylaminopurine (kinetin) อย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพของการเลี้ยงต่างกัน 3 วิธีคือ เลี้ยงในสภาพอาหารเหลวโดยใช้เทคนิค ระบบการจุ่มชั่วคราว (Temporary Immersion System, TIS) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีการให้สารละลายอาหารกับชิ้นส่วนพืชตามระยะเวลาและความถี่ที่สามารถกำหนดได้เป็นเวลา 1 นาทีทุกๆ 1 ชั่วโมงและ 5 นาที ทุกๆ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งซึ่งเป็นวิธีการเลี้ยงแบบเดิม ผลการทดลองพบว่าสภาพการเลี้ยงที่สามารถเพิ่มปริมาณยอดไผ่ได้สูงสุด ที่เวลา 60 วันคือเทคนิค ระบบการจุ่มชั่วคราว โดยการให้ชิ้นส่วนยอดได้รับสารละลายอาหารเป็นเวลา 5 นาทีทุกๆ 3 ชั่วโมง วิธีนี้สามารถผลิตยอดไผ่ได้สูงสุดคือ จำนวน 105 ยอด (อัตราการเพิ่มยอด 7.75 เท่าของจำนวนยอดเริ่มต้น) ในขณะที่การได้รับสารละลายอาหาร 1 นาทีทุกๆ 1 ชั่วโมงได้ 83 ยอด (อัตราการเพิ่มยอด 5.92 เท่า) สำหรับการเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งแข็งผลิตยอดไผ่ได้ 27 ยอด (อัตราการเพิ่มยอด 1.25 เท่า) ซึ่งระบบการจุ่มชั่วคราว โดยการให้ชิ้นส่วนยอดได้รับสารละลายอาหารเป็นเวลา 5 นาทีทุกๆ 3 ชั่วโมงให้อัตราการเพิ่มปริมาณยอดมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง 6.5 เท่า และยอดที่ได้มีลักษณะสมบูรณ์และมีการยืดยาวมากกว่า ดังนั้นเทคนิคระบบการจุ่มชั่วคราว จึงเป็นเทคนิคที่สมควรนำมาใช้ในการผลิตต้นกล้าไผ่หวานอ่างช้างเชิงพาณิชย์ เพื่อการลดต้นทุนการผลิตต้นพืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

คำสำคัญ: ระบบการจุ่มชั่วคราว การขยายพันธุ์ ไผ่หวานอ่างช้าง

คำนำ

ทั้งอดีตและปัจจุบันไผ่ตงถือเป็นไม้ไผ่เศรษฐกิจหลักของประเทศไทย แต่จากการที่มีการออกดอกและตายขยุเป็นพื้นที่กว้างในปี 2537 ทำให้เจ้าของสวนไผ่ได้รับผลกระทบรุนแรงจากรายได้ที่ลดลงจึงได้มีความพยายามหาไม้ไผ่ชนิดอื่นที่มีศักยภาพเสริมความมั่นคงของอาชีพการปลูกสร้างสวนไม้ไผ่ และทำรายได้ที่คุ้มค่ากับการลงทุน (สุทัศน์, 2544) ไผ่หวานอ่างช้างถือเป็นไม้เศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงเนื่องจากผลผลิตสามารถตอบสนองความต้องการของตลาดเหมาะสำหรับการส่งเสริมการปลูกเชิงพาณิชย์เนื่องจากมีลักษณะเด่นหลายประการ โดยเฉพาะหน่อไผ่หวานอ่างช้างเป็นที่ต้องการของตลาด (นคร, 2533) ปัจจุบันการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยใช้ดอกหรือเหง้า

การปักชำลำหรือข้อ การตอนกิ่งแขนง และการแยกกอจากลำขนาดเล็กที่ได้จากการเพาะเมล็ดไม่เพียงพอต่อการปลูกเชิงพาณิชย์อีกทั้งการขยายพันธุ์โดยวิธีไม่อาศัยเพศตามวิธีที่ได้กล่าวข้างต้นเป็นการต่ออายุจากต้นพันธุ์เดิม เพราะกล้าที่ได้จะมีอายุเท่าต้นแม่พันธุ์ ซึ่งจะถึงกำหนดการออกดอกพร้อมกันทำให้กล้าไผ่มีอายุการปลูกสั้นลงถ้าไม่รู้อายุของต้นแม่แล้วนับว่าเป็นการเสี่ยงต่อการออกดอกและตาย (อนันต์, 2532) และเนื่องจากในสภาพธรรมชาติดอกไผ่หวานอ่างช้างมีการผสมติดยากได้เมล็ดจำนวนน้อย และให้ต้นกล้าปกติในอัตราต่ำ (Zang and Chen, 1985) ดังนั้นการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อช่วยผลิตต้นกล้าให้ได้ต้นกล้าจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะทำให้มีต้นกล้าที่เพียงพอต่อการขยายพื้นที่ปลูกในอนาคต

ปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนิยมนำมาใช้เพื่อการขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจชนิดต่างๆ โดยทำการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารกึ่งแข็งที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตซึ่งมีผลกระตุ้นการเพิ่มปริมาณยอดจำนวนมากแล้วนำมาตัดแบ่งเลี้ยงบนอาหารใหม่เพื่อเพิ่มจำนวนให้มากขึ้น โดยต้นพืชที่ได้มีลักษณะตรงตามพันธุ์ทุกประการ (คำบุญ, 2542) แต่วิธีการดังกล่าวต้องใช้ต้นทุนในการผลิตค่อนข้างสูง เนื่องจากค่าแรงในการตัดแบ่งหรือการถ่ายเนื้อเยื่อเลี้ยงบนอาหารใหม่ซึ่งทำให้ต้นทุนสูงถึง 40-60 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด และใช้เวลาในการผลิตมาก (Chu, 1995) เทคนิคการจมน้ำชั่วคราว (temporary immersion) จึงได้รับการพัฒนาขึ้นมาเพื่อที่จะลดปัญหานี้โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวและมีการทำงานที่เป็นอัตโนมัติ (Etienne and Berthouly, 2002) ผลดีของการใช้เทคนิคนี้ต่อการขยายพันธุ์พืชคือ การเกิดยอดจำนวนมาก การพัฒนาเป็นหัวขนาดเล็ก และการเกิดเป็นต้นอ่อนจากเซลล์ร่างกาย (somatic embryogenesis) ได้มากกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งในเวลาที่เท่ากัน ตลอดจนสามารถเปลี่ยนขนาดภาชนะให้ใหญ่ขึ้นได้ มีความสะดวกในการเปลี่ยนอาหารใหม่ และสามารถทำความสะอาดที่ใช้แล้วได้ง่ายขึ้น (Alvard *et al.*, 1993) ทั้งนี้สิ่งที่ควรให้ความสำคัญในการใช้เทคนิคนี้คือช่วงเวลาและความถี่ในการให้อาหาร (duration or flush /frequency or rest time : ช่วงเวลาที่ต้นพืชสัมผัสและไม่สัมผัสกับอาหาร) เป็นตัวแปรที่มีความสำคัญที่ทำให้ระบบมีประสิทธิภาพ การใช้ปริมาณอาหารและขนาดของภาชนะที่เหมาะสมเป็นสิ่งช่วยเสริมให้ระบบมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับการเพิ่มปริมาณยอด การใช้เทคนิคนี้เป็นการพัฒนาคุณภาพของกล้าเนื่องจากช่วยเพิ่มความแข็งแรงของยอด ได้ต้นอ่อนจากเซลล์ร่างกายลักษณะปกติและไม่เกิดปัญหาการล้นน้ำของพืช ในการผลิตเพราะสามารถควบคุมสภาวะของการเลี้ยงได้โดยการปรับช่วงเวลาในการให้อาหาร ดังนั้นผลดีของการใช้เทคนิค

การจมน้ำชั่วคราว สำหรับการผลิตพืชจึงสามารถสรุปได้ดังนี้คือ (1) ลดต้นทุนในการผลิต (2) ลดขั้นตอนความยุ่งยากในการทำงาน (3) ลดพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง (4) ลดจำนวนของภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง (5) ให้จำนวนของการเกิดยอดหรือการเพิ่มปริมาณของผลผลิตมากกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งและเหลว (Etienne and Berthouly, 2002)

อุปกรณ์และวิธีการ

หลักการเพาะเลี้ยงพืชด้วยเทคนิคการจมน้ำชั่วคราว

การขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคการจมน้ำชั่วคราว เริ่มจากการศึกษาของ Harris and Mason (1983) ซึ่งสังเกตพบว่าผลการศึกษาที่รายงานโดย Stewart *et al.* (1952) เป็นการเลี้ยงชิ้นส่วนรากของแครอท (*Daucus carota*) โดยชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยงจะหยุดการเจริญเติบโตอย่างกะทันหันเมื่อจมน้ำอยู่ในอาหารเหลว เนื่องจากชิ้นส่วนพืชขาดออกซิเจน ส่วนชิ้นส่วนที่มีช่วงเวลาจมน้ำกับการสัมผัสอากาศจากการเขย่ามีการเจริญเติบโตดีกว่า ทั้งสองจึงออกแบบเครื่องมือและชุดเพาะเลี้ยงที่รู้จักกันในนามของ “auxophyton” ซึ่งจะหมุนเวียนภาชนะเลี้ยงพืชทำให้ต้นพืชได้รับออกซิเจน สลับกับจมน้ำในอาหารร่วมกับการเติมอากาศ หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 20 วันชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของแครอทมีน้ำหนักมากกว่า 2.6 เท่าเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง จากการศึกษาข้างต้นส่งผลให้มีการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยเทคนิคจมน้ำชั่วคราวในเวลาต่อมา

หลักการเพาะเลี้ยงพืชด้วยเทคนิคการจมน้ำชั่วคราวคือการให้สารละลายอาหารโดยอาศัยระบบลม (Pneumatic system) ที่ผ่านการกรองเชื้อจุลินทรีย์ด้วยชุดกรองที่มีแผ่นกรองความละเอียด 0.2 ไมโครเมตรกับชิ้นส่วนพืชตามระยะเวลาและความถี่ที่สามารถกำหนดได้ด้วยเครื่องตั้งเวลา (Timer) ซึ่งมีการทำงานแบบกึ่งอัตโนมัติ ปัจจุบันหลักการนี้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายโดยนักวิจัยใน

หลายประเทศ โดยอ้างอิงแนวทางการปฏิบัติของ Teisson *et al.* (1999) ซึ่งได้รวบรวมวิธีปฏิบัติ ข้อจำกัดและข้อดีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยเทคนิคการจมชั่วคราวไว้ดังนี้

1. หลีกเลี่ยงการจมอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะทำให้การเจริญเติบโตและรูปร่างลักษณะผิดปกติ
2. จัดหาและเปลี่ยนถ่ายออกซิเจนให้เพียงพอ
3. จัดให้มีช่วงของการให้อาหาร (duration time or flush time : ช่วงเวลาที่ต้นพืชสัมผัสกับอาหาร) และความถี่ในการให้อาหาร (frequency time or rest time : ช่วงเวลาที่ต้นพืชไม่สัมผัสกับอาหาร) ที่เหมาะสม

4. ใช้แรงดันได้จำกัด
5. สามารถให้อาหารเป็นระยะแบบอัตโนมัติ
6. ลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์
7. ลดต้นทุนการผลิต

ระบบหรือสภาพในการเลี้ยงจะแตกต่างกันภายใต้เงื่อนไขของขนาดของภาชนะ ชนิดของอาหาร ช่วงเวลาการให้อาหารโดยการควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์ หรือเครื่องตั้งเวลาอย่างง่ายเครื่องให้อากาศซึ่งทำให้มีการเคลื่อนไหวในภาชนะ โดยการแทนที่ของอากาศต้นให้อาหารมีการเคลื่อนที่ นอกจากนี้ความแตกต่างระหว่างระบบการจมชั่วคราวยังรวมถึงการนำสารละลายอาหารไปผ่านกระบวนการปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ได้ระบบที่ 1 คือ APCS (The automated plant culture system) ซึ่งพัฒนาโดย Tisserat and Vandercook (1985), ระบบที่ 2 ที่พัฒนาโดย Aitken-Christie and Davies (1988) และ ระบบที่ 3 ที่พัฒนาโดย Simonton *et al.* (1991) แต่พบว่าใน 3 ระบบแรกมีความยุ่งยากในการใช้ และมีขนาดใหญ่ ดังนั้น Alvard *et al.* (1993) จึงได้ทำการพัฒนาชุดเพาะเลี้ยงพืชโดยแก้ไขให้ใช้งานได้ง่ายขึ้นคือระบบที่ 4 ซึ่งเป็นระบบที่ไม่มีกรนำสารละลายอาหารไปผ่านกระบวนการปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ ใช้ระบบลมช่วยให้สารละลายอาหารสัมผัสกับชิ้นส่วนพืช และดันสารละลายอาหารกลับภาชนะเดิมซึ่งอาศัยการตั้งโปรแกรมการเปิด-ปิดระบบลมทำให้แรงดันลมดันอาหารเคลื่อนเข้าสู่ภาชนะสำหรับ

เลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ เป็นการหลีกเลี่ยงการใช้ระบบท่อที่มากเกินไป ซึ่งภาชนะทั้งสองควรมีปริมาตรเท่ากัน และใช้วาล์วไฟฟ้า (solenoid valve) หรือเครื่องอัดอากาศที่ตั้งเวลาควบคุมการเปิด-ปิดแรงดันลมให้กับระบบ การเปลี่ยนถ่ายอาหารอยู่ระหว่าง 4-6 สัปดาห์โดยสามารถทำได้รวดเร็วและไม่จำเป็นต้องเคลื่อนย้ายชิ้นส่วนพืชจากภาชนะเดิม ซึ่งการแยกหรือรวมกันของส่วนเก็บอาหารกับส่วนเลี้ยงชิ้นส่วนพืชทำให้ระบบนี้มี 2 ระบบย่อย คือ ระบบขวดแบบสองชั้นและระบบขวดคู่

ระบบขวดแบบสองชั้น (Recipient for Automation Temporary immersion system, RITA®) ใช้ภาชนะขนาดต่างๆ กัน โดยแบ่งภาชนะออกเป็น 2 ส่วน ชั้นบนเป็นส่วนรองรับและเลี้ยงชิ้นส่วนพืช ชั้นล่างเป็นส่วนใส่สารละลายอาหารเหลว เมื่อให้แรงดันอากาศในภาชนะส่วนล่างซึ่งบรรจุสารละลายอาหารเหลวอยู่ อากาศจะเข้าไปแทนที่สารละลายอาหารเหลว ดันให้อาหารเหลวเคลื่อนที่ผ่านท่ออย่างซิลิโคนเข้าท่วมชิ้นส่วนพืชที่อยู่ในภาชนะด้านบน ช่วงเวลาของการท่วม (flush time) ขึ้นกับการตั้งเวลาของการให้แรงดันอากาศ ระหว่างที่ชิ้นส่วนจมอยู่ในสารละลายอาหารนั้น จะได้รับออกซิเจน 2 รูปแบบคือ จากฟองอากาศที่ดันและจะกวาดจากทางด้านข้างในแบบที่ 1 ส่วนแบบที่สองฟองอากาศจะขึ้นมาจากท่อเชื่อมที่อยู่กลางภาชนะและออกสู่บรรยากาศภายนอกโดยผ่านชุดกรองที่อยู่ด้านบน เมื่อหยุดให้แรงดันอากาศอาหารจะไหลลงสู่ภาชนะด้านล่างด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก

ระบบขวดคู่ (Twin flask System) พัฒนาขึ้นเพื่อให้สามารถใช้ภาชนะที่มีราคาถูกและดัดแปลงใช้วัสดุที่จัดหาได้ภายในประเทศ ซึ่งแนวทางการดัดแปลงคือแยกภาชนะออกเป็นสองขวด คือขวดใส่ชิ้นส่วนพืช และขวดสำหรับใส่สารละลายอาหารแล้วเชื่อมต่อกันด้วยท่ออย่างซิลิโคนซึ่งเป็นระบบทอกลม สามารถเพิ่มขนาดของภาชนะได้จาก 0.25 ถึง 10 ลิตร หลักการทำงานคล้ายกับระบบ RITA® แต่เนื่องจากภาชนะแยกกันระบบทอกลมจึงเป็นหัวใจสำคัญของระบบนี้คือเมื่อให้แรงดันอากาศกับภาชนะที่บรรจุสารละลายอาหาร อากาศจะเข้าไปแทนที่

สารละลายอาหาร ดันให้เคลื่อนที่ผ่านท่ออย่างซิลิโคน เข้าท่วมชิ้นส่วนพืชที่อยู่ในภาชนะ ระยะเวลาที่ชิ้นส่วนได้รับอาหารคือช่วงเวลาที่ชิ้นส่วนพืชถูกท่วมด้วยสารละลายอาหารและได้รับออกซิเจนจากฟองอากาศเช่นเดียวกับระบบ RITA® เมื่อได้เวลาตามที่กำหนดไว้แรงดันอากาศจะถูกปล่อยมายังภาชนะที่มีอาหารเหลวท่วมชิ้นส่วนพืชอยู่ ซึ่งอาหารจะถูกดันให้ไหลกลับสู่ภาชนะเดิมเป็นวงจรเช่นนี้ ตามที่ผู้เลี้ยงได้กำหนดไว้ วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อเปรียบเทียบวิธีการในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยอดไผ่หวาน อ่างขวางให้ได้จำนวนมากโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ด้วยเทคนิคอาหารกึ่งแข็งและ เทคนิคการจมชั่วคราว

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยเทคนิคการจมชั่วคราว

สำหรับการทดลองนี้ใช้ระบบขวดแบบสองชั้น ประกอบด้วย

1. ภาชนะ ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ภาชนะส่วนบน 0.5 ลิตร (เป็นส่วนสำหรับใส่ชิ้นส่วนพืชที่จะทำการเลี้ยงโดยจะมีตะแกรงรองรับและขอมให้ของเหลวไหลผ่าน) และภาชนะส่วนล่าง 0.5 ลิตร (ส่วนสำหรับใส่สารละลายอาหาร)

2. ท่อซิลิโคนทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างภาชนะส่วนบนและส่วนล่าง

3. ชุดกรองอากาศมีรูขนาด 0.2 μM

4. เครื่องอัดอากาศ

5. เครื่องจับเวลา

วิธีการ

นำยอดไผ่หวานอ่างขวางมาเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารสูตร Murashige and Skoog ที่เติม BA (6-benzylaminopurine) ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA (α -naphthaleneacetic acid), Kinetin (6-furfurylaminopurine) อย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำมะพร้าว (CW) 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพของการเลี้ยงต่างกัน 3 วิธีดังแสดงใน (Figure 1) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design จำนวน 3 ซ้ำบันทึกจำนวนยอดและลักษณะของยอดเมื่อเลี้ยงครบ 60 วัน

1. เทคนิคอาหารกึ่งแข็งโดยนำยอดไผ่หวานอ่างขวางจำนวน 3 ยอดต่อ 1 กอลงเลี้ยงในขวดอาหารกึ่งแข็งจำนวน 4 ขวดเป็น 1 ซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ เปลี่ยนอาหารทุกๆ 20 วัน เป็นเวลา 60 วัน

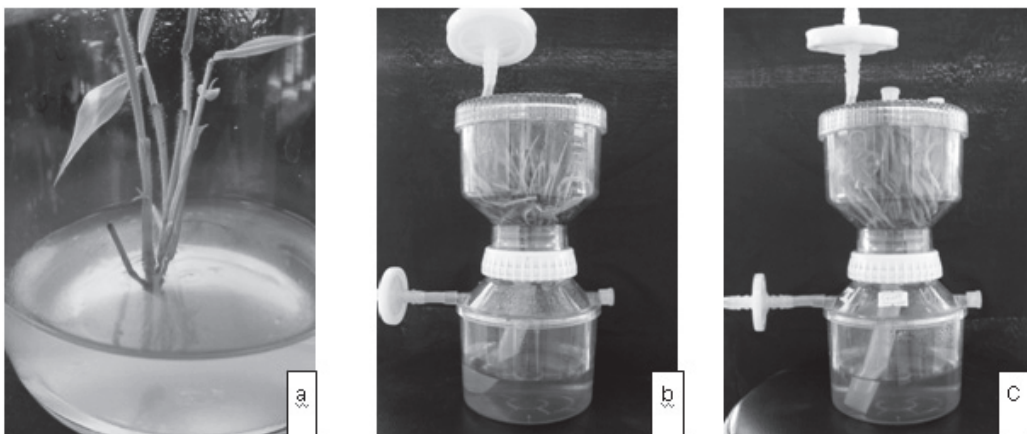


Figure 1. Technique for Ma-chu bamboo (*Dendrocalamus latiflorus*) shoots multiplication, a. semi-solid medium, b. temporary immersion technique (TIS1), immersion in medium 1 minutes in every 1 hours c. temporary immersion technique (TIS2) immersion in medium 5 minutes in every 3 hours.

2. เทคนิคจมชั่วคราว (TIS₁) โดยนำยอดไผ่หวานอย่างขางจำนวน 12 ยอดต่อชุดเพาะเลี้ยงเป็น 1 ขั้วจำนวน 3 ขั้ว เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวโดยให้สารละลายอาหาร 1 นาที่ทุกๆ 1 ชั่วโมง และเปลี่ยนอาหารทุกๆ 20 วัน เป็นเวลา 60 วัน

3. เทคนิคจมชั่วคราว (TIS₂) นำยอดไผ่หวานอย่างขางจำนวน 12 ยอดต่อชุดเพาะเลี้ยงเป็น 1 ขั้วจำนวน 3 ขั้ว มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวโดยให้สารละลายอาหาร 5 นาที่ทุกๆ 3 ชั่วโมง และเปลี่ยนอาหารทุกๆ 20 วันเป็นเวลา 60 วัน

ผลและวิจารณ์

จากการทดลองพบว่าการใช้เทคนิค Temporary Immersion System ในการเพาะเลี้ยงยอดไผ่หวานอย่างขาง มีผลให้ได้จำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง โดยเลี้ยงขึ้นส่วนยอดด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน มีผลให้อัตราการเพิ่มปริมาณยอด (multiplication rate) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ การเลี้ยงยอดไผ่ด้วยเทคนิคจมชั่วคราวโดยให้สารละลายอาหารนาน 5 นาที่ ทุกๆ 3 ชั่วโมง (TIS₂) ให้อัตราการเพิ่มปริมาณมากที่สุดรองลงมาคือเทคนิคจมชั่วคราวโดยให้สารละลายอาหารนาน 1 นาที่ทุกๆ 1 ชั่วโมง (TIS₁) และเทคนิคอาหาร

กึ่งแข็งเท่ากับ 7.75, 5.92 และ 1.25 เท่าของจำนวนยอดเริ่มต้นตามลำดับ (Table 1) และพบว่ายอดไผ่หวานอย่างขางที่เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคการจมชั่วคราว ยอดที่เกิดขึ้นมีลักษณะที่สมบูรณ์ การเกิดยอดหรือหน่อใหม่สามารถเกิดขึ้นได้ตามข้อซึ่งสัมผัสกับอาหาร ส่วนข้อที่สูงขึ้นไปซึ่งไม่สัมผัสกับอาหารพบว่ามีการเกิดยอดใหม่น้อย อีกทั้งมีการยืดยาวของหน่อที่เกิดขึ้น และใบมีการพัฒนาอย่างสมบูรณ์โดยไม่พบว่าเกิดอาการฉ่ำน้ำซึ่งมักจะเป็นอาการที่เกิดขึ้นกับชิ้นส่วนที่เลี้ยงในอาหารเหลว อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มช่วงเวลาของการให้อาหารและความถี่ของการให้อาหารจาก 1 นาที่เป็น 5 นาที่ และทุกๆ 1 ชั่วโมงเป็นทุกๆ 3 ชั่วโมงพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการเพิ่มปริมาณยอดได้จาก 5.92 เป็น 7.75 เท่าซึ่งสาเหตุน่าจะเกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ให้อาหารและความถี่ในการได้รับอาหารของชิ้นส่วนยอด ซึ่งการเพิ่มเวลาในการให้อาหารชิ้นส่วนพืชทำให้พืชได้รับสารละลายอาหารมากขึ้นในขณะเดียวกันยอดก็ต้องการช่วงเวลาหรือความถี่ในการได้รับอาหารที่ยาวขึ้น สำหรับในพืชอื่นๆ ความต้องการระยะเวลาในการให้อาหารและความถี่ของการให้อาหารมีความต้องการที่แตกต่างกันเพื่อให้เกิดความเหมาะสมต่อการเกิดยอด อีกทั้งรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าช่วงเวลาและความถี่ในการให้อาหารเป็นปัจจัยหลักที่มีผลกระทบต่ออัตราการเกิดยอดและการพัฒนาของพืช โดย Preil and Hempfling

Table 1. The average shoot number and multiplication rate of *Dendrocalamus latiflorus* Munro culture in MS medium supplemented with BA 4 mg/l, NAA, Kn and CCW 1, 1 mg/l and 8 ml/l for 60 day with different culture conditions

Culture conditions	Shoots number		Multiplication rate ^{1/}
Semi-solid medium (20 days subculture interval)	27	2	1.25a
Liquid medium with temporary immersion for 1 min in every 1 hr (20 days subculture interval)	83	3	5.92b
Liquid medium with temporary immersion for 5 min in every 3 hrs (20 days subculture interval)	105	2	7.75b

Remark: ^{1/} The same letter in each column indicated no statistically significant difference at p 0.05

(2002) พบว่ากล้วยไม้ *Phalaenopsis* ได้รับผลกระทบจากช่วงเวลาและความถี่ในการให้อาหารที่มีผลต่ออัตราการเติบโตโดยพบว่าการให้อาหาร 8 ครั้งเป็นเวลา 10 นาทีต่อวันให้อัตราการเจริญเติบโตที่สูงที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Akula *et al.* (2000) ซึ่งพบว่าอัตราการเพิ่มปริมาณยอดและการพัฒนาของต้นขา ได้ผลดีเมื่อให้อาหารเป็นเวลา 1 นาทีทุกๆ 6 ชั่วโมงสามารถให้อัตราการเพิ่มปริมาณยอดได้ 24 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารแข็ง โดยสรุปปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณและการพัฒนาก็คือปริมาณของธาตุอาหารและองค์ประกอบของอากาศภายในภาชนะเพาะเลี้ยงที่พืชได้รับนั่นเอง (Jimenez *et al.*, 1999)

ส่วนเหตุผลที่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยใช้อาหารเหลวมีผลให้ได้จำนวนยอดที่มากกว่า อาจเกิดจากการที่ส่วนของยอดมีโอกาสได้สัมผัสกับอาหารทั้งหมด และการที่ยอดของไผ่หวานอ่องขางได้รับสารละลายอาหารเป็นครั้งคราวโดยแรงดันของอากาศที่ผ่านการกรองเชื้อจุลินทรีย์ทำให้ยอดได้รับออกซิเจนมากขึ้นสำหรับจะนำมาใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม ทำให้ได้จำนวนยอดที่มากกว่าการเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งซึ่งมีเพียงส่วนของฐานที่สัมผัสกับอาหารเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับ Alvard *et al.* (1993) ซึ่งกล่าวว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยด้วยเทคนิคจุ่มหัวคร่าวยอดได้สัมผัสกับอาหารอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งชิ้น และการให้ได้รับสารละลายอาหารเป็นครั้งคราวทำให้กล้วยได้รับออกซิเจนดีขึ้นส่งผลให้ได้จำนวนยอดที่มากกว่าการเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง และเมื่อพิจารณาระยะเวลาในการให้ยอดไผ่ได้รับสารละลายอาหารจะพบว่าการให้ได้รับสารละลายอาหารนาน 5 นาทีทุกๆ 3 ชั่วโมงมีผลให้อัตราการเพิ่มของปริมาณยอดมากกว่าการให้ได้รับสารละลายอาหารนาน 1 นาทีทุกๆ 1 ชั่วโมง สอดคล้องกับการทดลองของ ยูพา และ วิเศษลักษณ์ (2543) ในการศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้และ Alvard *et al.* (1993) ซึ่งทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้พบว่าทำให้ชิ้นส่วนของพืชได้รับสารละลายอาหารเป็นเวลานานสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณยอดได้มากกว่าการให้ได้รับสารละลายอาหารระยะสั้นๆ ถึงแม้ว่าการได้รับสารละลายอาหารนาน 1 นาทีทุกๆ 12 ชั่วโมงจะเพียงพอต่อความต้องการของพืช

ในการดำรงชีวิต (Eteinne *et al.*, 1997) แต่จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้ชิ้นส่วนพืชอยู่ในสารละลายนานขึ้นและมีความถี่ในการให้อาหารที่เหมาะสมทำให้อัตราการเพิ่มปริมาณยอดมากขึ้น เนื่องจากการให้พืชได้รับอาหารเหลวแต่ละครั้งจะทำให้เกิดฟิล์มบางล้อมรอบพืชสามารถป้องกันการแห้งของชิ้นส่วนพืชที่ทำการเพาะเลี้ยง

สรุป

1. ไผ่หวานอ่องขางที่เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคจุ่มหัวคร่าว TIS₂ ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุดรองลงมาได้แก่ TIS₁ และเทคนิคอาหารกึ่งแข็ง คือ 105, 83 และ 27 ยอดตามลำดับ
2. การเพาะเลี้ยงไผ่หวานอ่องขางโดยใช้เทคนิคการจุ่มหัวคร่าว มีผลให้อัตราการเพิ่มปริมาณยอดสูงกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง 6.5 เท่า
3. ระยะเวลาการได้รับสารละลายอาหารมีผลต่อการเพิ่มปริมาณยอดโดยการให้ยอดไผ่ได้รับสารละลายอาหารนาน 5 นาที ทุกๆ 3 ชั่วโมงมีผลให้จำนวนยอดเฉลี่ยและอัตราการเพิ่มปริมาณยอดมากกว่าการให้ได้รับสารละลายอาหารนาน 1 นาทีทุกๆ 1 ชั่วโมง

คำนิยม

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายวิจัย มูลนิธิโครงการหลวง ที่สนับสนุนงบประมาณในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ และขอบคุณเจ้าหน้าที่มูลนิธิโครงการหลวงทุกท่านที่ทำให้โครงการสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- คำณูญ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- นคร เหลืองประเสริฐ. 2533. หม่างู อนาคตของอุตสาหกรรมหน่อไม้กระป๋องไทย. เกษตรเกษตร 14 (4) : 29-32

- ยูพามงคลสุขและ วิเศษลักษณ์ พงษ์จันทร์. 2543. การขยายพันธุ์
กลีอกซีเนีย (*Sinningia speciosa*) โดยเทคนิค
Temporary immersion ในการประชุมทางวิชาการ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. กรุงเทพฯ,
หน้า 387-390.
- สุทัศน์ เล้าสกุล. 2544. ไข่เศรษฐกิจที่น่าสนใจในประเทศไทย.
ใน รายงานการสัมมนาทางวนวัฒนวิทยา
“วนวัฒนวิทยาเพื่อการพัฒนาสวนป่าเศรษฐกิจ”.
ภาควิชาวนวัฒนวิทยา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
กรุงเทพฯ.
- อนันต์ อนันตโชติ. 2532. ลักษณะการออกดอกของไผ่บางชนิด
ในประเทศไทย. ใน การสัมมนา เรื่องไผ่ ครั้งที่ 2,
8-10 พฤศจิกายน 2532. คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- Aitken-Christie, J., and H. E. Davies. 1988. Development
of semi-automated micropropagation system.
Acta Hortic. 230: 81-87.
- Alvard, D., F. Cote and C. Teisson. 1993. Comparison of
methods of liquid medium culture for banana
micropropagation. Effects of temporary
immersion of explants. *Plant Cell, Tissue
Organ Culture* 32 : 55-60.
- Chu, I. 1995. Economic analysis of automated micropropagation.
In: Aitken-Christie, T. Kozai and M.A.L. Smith.
(eds) **Automation and environmental control
in plant tissue culture.** pp. 19-27. Kluwer
Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Etienne, H., M. Lartaud, N. Michaux - Ferriere, M. P.
Carron, M. Berthouly and C. Teisson. 1997.
Improvement of somatic embryogenesis in
Hevea brasiliensis (MÜLL. ARG.) using the
temporary immersion technique. *In vitro Cell.
Dev. Biol.-Plant.* 33: 81-87.
- Etienne, H. and M. Berthouly. 2002. Temporary
immersion system in plant micropropagation.
Plant Cell, Tissue Organ Culture 69 : 215-231.
- Harris, R.E., and E.B. Mason. 1983. Two machines for in
vitro propagation of plants in liquid media.
Can. J. Plant Sci. 63: 311-316.
- Jiménez, E., N. Pérez, M. de Fera, R. Barbón, A. Capote,
M. Chávez, E. Quiala and C. Pérez. 1999.
Improved production of potato microtubers
using a temporary immersion system. *Plant Cell,
Tissue Organ Culture* 59 : 19-23.
- Preil, W. and T. Hempfling. 2002. **Application Temporary
Immersion System in Propagation of
Phalaenopsis.** First International Symposium on
Liquid Systems In Vitro Mass Propagation of
Plants (pp. 47-48) Cost 843 Working Group.
Aas, Norway.
- Simonton, W., C. Robacker and S. Krueger. 1991. A
programmable micropropagation apparatus
using cycled medium. *Plant Cell, Tissue Organ
Culture.* 27: 211-218.
- Steward, F. D., S. Caplin and F. K. Millar. 1952.
Investigations on growth and metabolism of
plant cells. I. New technique for the investiga-
tions of metabolism, nutrition and growth in
undifferentiated cell. **Ann. Bot.** 16: 57-77.
- Teisson, C. and D, Alvard. 1999. In vitro production of
potato microtubers in liquid medium using
temporary immersion. **Potato Research.** 42:
499-504.
- Tisserat, B. and C. E. Vandercock. 1985. Development
of an automated plant culture system. *Plant Cell,
Tissue Organ Culture.* 5: 107-117.
- Zhang, G.C. and F.Q. Chen. 1985. Studies on Bamboo
hybridization, pp. 179-184. In A. N. Rao,
G. Dhanarajan and C.B. Sastry (eds.). **Recent
Research on Bamboo, Proceeding of the
International Bamboo Workshop.** Hangzhou,
People's Republic of China.