การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชสวนพันธุ์ดี โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบจมชั่วคราว

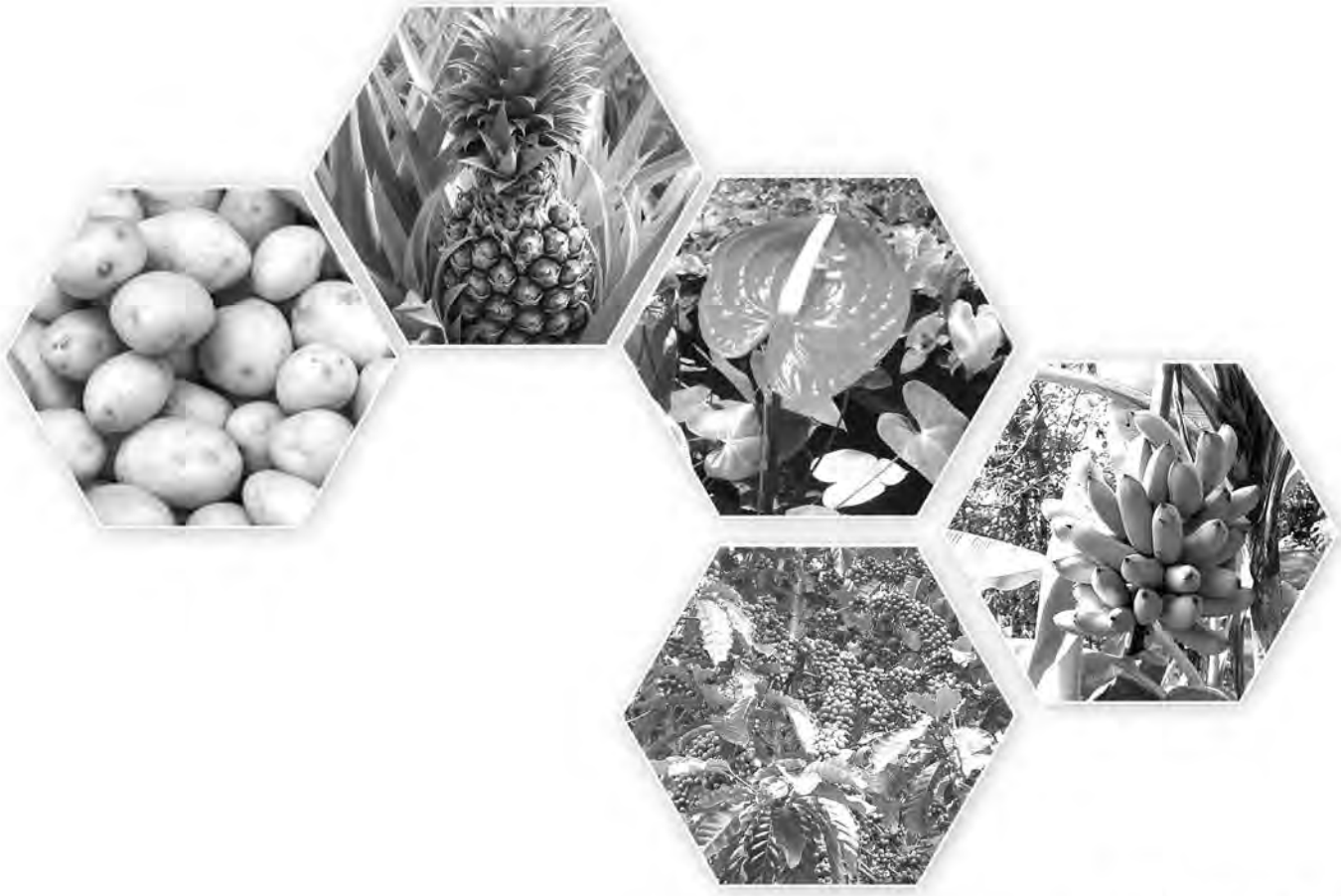
Enhancing Efficiency of Horticultural Crop Micropropagation Using Temporary Immersion Bioreactor System

สถาบันวิจัยพืชสวน
กรมวิชาการเกษตร
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ISBN: 978-974-436-906-2

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชสวนพันธุ์ดี
โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบจุ่มชั่วคราว

Enhancing Efficiency of Horticultural Crop Micropropagation Using Temporary Immersion Bioreactor System



ห้ามพิมพ์โดยมิได้รับอนุญาต

สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ISBN : 9789744369062

คำนำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชระบบจมชั่วคราว (Temporary Immersion Bioreactor System: TIBs) เป็นเทคนิคใหม่ มีประโยชน์อย่างมากทางด้านการเกษตร สามารถใช้ในการขยายพืชพันธุ์ดีได้ในปริมาณมาก รวดเร็ว และตรงตามพันธุ์ ช่วยลดต้นทุนด้านแรงงานที่ต้องใช้ในการถ่ายเนื้อเยื่อลงในอาหารใหม่ (Subculture) และประหยัดพื้นที่ที่ใช้ในการผลิตพืช เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในรูปแบบเดิม

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ระบบ TIBs ยังเป็นเรื่องที่มีการเผยแพร่อยู่ในวงจำกัด ในขณะที่นักวิจัยของสถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร มีการทำงานวิจัยเรื่องนี้อย่างต่อเนื่องมาเป็นเวลาหลายปี และมีข้อมูลที่น่าสนใจ เหมาะสมในการเผยแพร่แก่บุคคลทั่วไป สถาบันวิจัยพืชสวนจึงได้จัดทำองค์ความรู้เรื่องนี้ขึ้น โดยมีตัวอย่างพืชที่ประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์ด้วยระบบ TIBs คือ กาแฟโรบัสต้า กล้วยไม้สกุลแวนด้า หน้าวัวลูกผสม สับปะรด กล้วย และมันฝรั่ง สถาบันวิจัยพืชสวนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าเอกสารวิชาการนี้จะเป็นประโยชน์แก่เกษตรกร นักเรียน นักศึกษา ผู้ประกอบการ นักวิชาการและผู้สนใจทั่วไป

(นายสมบัติ ตงเต้า)
ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยพืชสวน
กันยายน 2560

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
บทที่ 1 วิวัฒนาการของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	4
บทที่ 2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs	6
บทที่ 3 รูปแบบของระบบ TIBs	10
บทที่ 4 ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs	18
บทที่ 5 พืชที่ประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์โดยใช้ ระบบ TIBs	23
5.1 กาแฟโรบัสต้า	23
5.2 กล้วยไม้สกุลแวนด้า	30
5.3 หน้าวัวลูกผสม	33
5.4 สับปะรด	38
5.5 กล้วย	57
5.6 มันฝรั่ง	61
บทที่ 6 การควบคุมคาร์บอนไดออกไซด์ในระบบ TIBs	65
บทที่ 7 สรุป	71
บรรณานุกรม	72
ภาคผนวก	75

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวโดยใช้ระบบ TIBs	8
ตารางที่ 2	จำนวนของต้นอ่อนกาแฟโรบัสต้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระยะ pregerminated ในระบบ TIBs ชนิดต่างๆ	29
ตารางที่ 3	จำนวนต้นอ่อน (plantlet) และสายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าที่ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรผลิตได้จาก TIBs แบบใช้ปั๊มอากาศขวดแก้วใส่ต้นพืช ตั้งแต่กรกฎาคม 2550 ถึง ธันวาคม 2555	30
ตารางที่ 4	น้ำหนัก ขนาดและจำนวนต้นอ่อนกล้วยไม้แวนดา JK 315 ที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIBs ด้วยความหนาแน่นของโปรโตคอร์มเริ่มต้นต่างกัน ในอาหารสูตร NMD เป็นเวลา 4 เดือน	33
ตารางที่ 5	ผลของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs นาน 3 เดือน	36
ตารางที่ 6	ระยะเวลาและต้นทุนต้นสับปะรดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบต่างๆ ของศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	53
ตารางที่ 7	ขนาดและจำนวนต้นอ่อนของสับปะรด MD2 หลังการเปลี่ยนอาหาร	55
ตารางที่ 8	ผลของอัตราและระยะเวลาการเกิดยอดอ่อนของสับปะรด MD2 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 3 ระบบ	55
ตารางที่ 9	ค่าใช้จ่ายในการผลิตสับปะรด MD2 ในระบบอาหารแข็ง อาหารเหลว และ TIBs ต่อการผลิต 10,000 ต้น	56
ตารางที่ 10	ค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น ความยาวราก จำนวนราก และเปอร์เซ็นต์การรอดตายที่ 1 เดือน ของต้นอ่อนมันฝรั่งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบ TIBs และความสูงที่อายุ 60 วัน จำนวนหัวเฉลี่ยต่อต้น ของต้นมันฝรั่งที่ย้ายปลูกลงในวัสดุปลูก ปี 2557-2558	62
ตารางที่ 11	การเจริญของต้นอ่อนแวนด้าในระบบ TIBs ที่มีการให้คาร์บอนไดออกไซด์ระดับต่างๆ	68

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 12	อัตราการเพิ่มเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลแวนด้าที่เลี้ยงใน TIBs ที่ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน	68
ตารางที่ 13	การเจริญของกล้วยไม้หวายโสมสวลีที่เลี้ยงใน TIBs ที่ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน	69
ตารางที่ 14	ขนาดและจำนวนต้นของกล้วยไม้หวายโสมสวลีที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIBs ที่ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน	70
ตารางที่ 15	การเพิ่มน้ำหนักของกล้วยไม้หวายโสมสวลีที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIBs ที่ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน	70
ตารางที่ 16	อัตราเพิ่มการเจริญเติบโตของกล้วยไม้หวายโสมสวลีที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIBs ที่ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน	70

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยอาหารเหลวอัตโนมัติ (Automated Plant Culture System)	11
ภาพที่ 2	ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยอาหารเหลวแบบกึ่งอัตโนมัติของ Aitken-Christie and Jones (1987) และ Aitken-Christie and Davies (1988)	12
ภาพที่ 3	ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยอาหารเหลวของ Simonton	13
ภาพที่ 4	ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ TIBs โดยใช้แรงดันลมแบบ RITA system	14
ภาพที่ 5	ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ TIB Twin flasks system โดยใช้แรงดันลม	15
ภาพที่ 6	ระบบ TIBs ที่พัฒนาโดย Docus และคณะ	16
ภาพที่ 7	ระบบการเพาะเลี้ยงแบบพีทีเอสไบโอรีแอคเตอร์ (PTS Bioreactor) ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อของ บริษัท ไพฑูรย์สะพลี จำกัด	17
ภาพที่ 8	การทำงานของระบบการเพาะเลี้ยงแบบพีทีเอสไบโอรีแอคเตอร์ (PTS Bioreactor)	17
ภาพที่ 9	ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาแฟโรบัสต้าด้วยวิธี Somatic embryogenesis	23
ภาพที่ 10	ชิ้นส่วนใบที่มีการพัฒนาของแคลลัสภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 – 10 เดือน	24
ภาพที่ 11	embryogenic callus	25
ภาพที่ 12	ต้นอ่อนรูปตอปิโด	25
ภาพที่ 13	ระบบ TIBs แบบใช้เครื่องปั๊มอากาศ ชนิดที่ภาชนะบรรจุต้นพืชทำจากกล่องพลาสติก	27
ภาพที่ 14	ระบบ TIBs แบบไม่ใช้เครื่องปั๊มอากาศ	29
ภาพที่ 15	ระบบ TIBs แบบใช้ปั๊มอากาศขวดแก้วบรรจุต้นพืช และต้นอ่อนกาแฟโรบัสต้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยง	30

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 16	ลักษณะของกลุ่มเนื้อเยื่อที่สร้างจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนแวนด้าลุมพินี เรด และเหลืองสุรัช	31
ภาพที่ 17	การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้าในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs	32
ภาพที่ 18	กล้วยไม้สกุลแวนด้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs ที่นำไปอนุบาลในเรือนเพาะชำ	33
ภาพที่ 19	แผนผังการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวลูกผสมพันธุ์ใหม่	35
ภาพที่ 20	การเพาะเลี้ยงแคลลัสหน้าวัวสายพันธุ์ HC084 ในระบบ TIBs เริ่มต้นเพาะเลี้ยง (ซ้าย) เมื่อเก็บเกี่ยว (ขวา)	35
ภาพที่ 21	ต้นอ่อนหน้าวัวสายพันธุ์ต่างๆ จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs นาน 3 เดือน ด้วยอาหารสูตร kio.5	37
ภาพที่ 22	การตรวจสอบเชื้อไวรัส 2 สายพันธุ์คือ PMWaV-1 และ PMWaV-2 ด้วยเทคนิค RT-PCR	39
ภาพที่ 23	ต้นแม่พันธุ์สับปะรดปลอดโรคเหี่ยวในสภาพปลอดเชื้อ	39
ภาพที่ 24	ขั้นตอนการขยายพันธุ์สับปะรดปลอดโรคเหี่ยวในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs	40
ภาพที่ 25	ต้นกล้าสับปะรดปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs ที่อายุ 3 เดือนของศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร	42
ภาพที่ 26	ต้นกล้าสับปะรดปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs ที่พร้อมนำไปอนุบาลในเรือนเพาะชำ	42
ภาพที่ 27	ระบบ TIBs (ชุดเล็ก) ที่ใช้เพิ่มจำนวนต้นสับปะรดปลอดโรคของมหาวิทยาลัยแม่โจ้	44
ภาพที่ 28	ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนต้นสับปะรดปลอดโรคเหี่ยวและการจัดส่งไปยังศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี	45
ภาพที่ 29	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดโดยใช้ระบบอาหารแข็งศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษหลังการเปลี่ยนอาหาร 2 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์	46
ภาพที่ 30	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าและต้นอ่อนที่ได้ของศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	47

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 31	ต้นสับปะรดปกติและต้นที่เกิดอาการฉ่ำน้ำ เมื่อใช้อาหารเหลว MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรนาน 4 สัปดาห์ ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	47
ภาพที่ 32	การพัฒนาของต้นสับปะรดหลังให้อาหารตามสูตร MS ที่ลดระดับ BA 5 3 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	48
ภาพที่ 33	ขนาดต้นสับปะรดที่อายุต่างๆ คือเมื่อเริ่มชำในถาดหลุม (0 7 14 21 และ 28 วัน)	49
ภาพที่ 34	การอนุบาลต้นสับปะรดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ต้นกล้าที่ออกจากห้องปฏิบัติการ	49
ภาพที่ 35	การเตรียมต้นสับปะรดปลอดโรคเหี่ยวเพื่อส่งไปปลูกในแหล่งต่างๆ	50
ภาพที่ 36	แปลงผลิตหน่อสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียปลอดโรคเหี่ยวที่ได้จากต้นที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่พร้อมบังคับดอก	51
ภาพที่ 37	หน่อพันธุ์ปลอดโรคที่พร้อมจำหน่ายให้เกษตรกร	51
ภาพที่ 38	ผลสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียปลอดโรคเหี่ยวที่ปลูกจากต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	51
ภาพที่ 39	ผลการตรวจหาเชื้อไวรัส PMWaV 1 และ 2 ด้วยเทคนิค RT-PCR ของตัวอย่างสับปะรดที่มีการตรวจสอบ ลำดับที่ 99 101 107 และ 109 แสดงแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส PMWaV 1 และ 2 ที่มีขนาด 600 bp ชัดเจนมาก	52
ภาพที่ 40	ผลการตรวจหาเชื้อไวรัส PMWaV 1 และ 2 ด้วยเทคนิค RT-PCR ของตัวอย่างสับปะรดจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรอุทัยธานี 49 ตัวอย่าง ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส PMWaV 1 และ 2	52
ภาพที่ 41	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรด MD2 ในอาหารแข็ง	55
ภาพที่ 42	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรด MD2 ในอาหารเหลว	55
ภาพที่ 43	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรด MD2 ในระบบ TIBs	56
ภาพที่ 44	แสดงชิ้นส่วนเริ่มต้นของกล้วยไข่ ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ และการพัฒนาของชิ้นส่วนที่ระยะเวลา 7 14 21 และ 28 วัน หลังเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs	59
ภาพที่ 45	แสดงชิ้นส่วนเริ่มต้นของกล้วยน้ำว้า ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ และการพัฒนาของชิ้นส่วนที่ระยะเวลา 7 14 21 และ 28 วัน หลังเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs	60
ภาพที่ 46	ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนมันฝรั่งในอาหารเหลวโดยใช้ระบบ TIBs	63

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 47	ลักษณะการเชื่อมต่อชุดอุปกรณ์ และขวดอาหารเข้ากับเครื่อง bioreactor และการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนมันฝรั่งด้วย GA ในระบบ TIBs อายุ 3 สัปดาห์	63
ภาพที่ 48	การปลูกต้นแม่พันธุ์มันฝรั่งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในวัสดุปลูก	64
ภาพที่ 49	แผนผังระบบวัดและควบคุมสภาวะอากาศดัดแปลง	66
ภาพที่ 50	แผนผังโปรแกรมระบบวัดและควบคุมสภาวะอากาศดัดแปลง	67
ภาพที่ 51	ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในระบบ TIBs ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังการให้อาหาร	67
ภาพที่ 52	ระบบ TIBs ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้หวายโสมสวลี ที่ให้คาร์บอนไดออกไซด์ในระดับต่างๆ	68

บทนำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture/ *in vitro* culture/ aceptic culture/ micropropagation) เป็นเทคนิคการขยายพันธุ์พืชที่นำส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ ก้านดอก ตา หน่ออ่อน เป็นต้น มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เป็นอาหารแข็ง (solid media) อาหารกึ่งแข็ง (semi-solid media) หรืออาหารเหลว (liquid media) ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น แสง ปริมาณและการถ่ายเทของอากาศ เป็นต้น ส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาได้หลายรูปแบบก่อนชักนำให้เกิดเป็นต้นได้เป็นจำนวนมาก

หลักการสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ ต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อตัดชิ้นส่วนของพืชที่ไม่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์มาเลี้ยงในภาชนะที่บรรจุอาหารสังเคราะห์ ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อเซลล์จากชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยงได้รับสารอาหาร วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นได้โดยตรง (direct embryo) หรืออาจเกิดเป็นกลุ่มเซลล์เนื้อเยื่อที่เรียกว่า แคลลัส (callus) หรือ โปรเอมบริโอนิคแคลลัส (proembryonic callus) ก่อนเจริญเป็นต้นอ่อนต่อไป

นอกจากประโยชน์โดยตรงทางการเกษตรแล้ว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ยังมีประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมและทางการแพทย์ ดังนี้

1. การผลิตต้นพันธุ์พืชปริมาณมากและตรงตามสายพันธุ์ที่ต้องการในเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยการดัดแปลง และปรับปรุงอาหารสังเคราะห์ รวมทั้งใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบต่างๆ เช่น การเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์กึ่งแข็ง (semi-solid media) อาหารเหลว (liquid media) และอาหารเหลวแบบจมชั่วคราว (temporary immersion system) เทคนิคการขยายพันธุ์ด้วยวิธีเหล่านี้ได้มีการพัฒนาและประยุกต์ใช้ในเชิงการค้าและประสบความความสำเร็จในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น กล้วยไม้ หน้าวัว สับปะรด กาแฟ กล้วย พืชตระกูลปาล์ม เป็นต้น

2. การผลิตพืชที่ปราศจากโรค ต้นพืชที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะเป็นต้นที่ปราศจากโรคที่เกิดจากเชื้อราและแบคทีเรียเป็นอันดับแรก เพราะถ้ามีอนุภาคของเชื้อเหล่านี้ตกลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง อนุภาคของเชื้อทั้ง 2 ชนิด สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วบนอาหาร การปนเปื้อนของเชื้อ (contamination) โดยปรากฏเป็นกลุ่มเชื้อ (colony) ที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า ทำให้สามารถกำจัดทิ้งได้

นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังสามารถผลิตต้นพืชที่ปราศจากเชื้อไวรัสได้ แม้ว่าต้นพืชต้นนั้นมีอนุภาคของไวรัสอยู่ โดยการนำปลายยอดพืช (apical meristem) และเนื้อเยื่อของคัพภะ (embryo) ที่อยู่ในเมล็ดซึ่งเป็นส่วนของพืชที่ปลอดจากเชื้อไวรัสมากที่สุด เนื่องจากอนุภาคไวรัสสามารถเคลื่อนย้ายไปตามท่อน้ำท่ออาหาร แต่เนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีท่อน้ำและท่อ

อาหารที่ติดต่อกับส่วนอื่นๆ ของต้นพืช มาคัดเลือกและตรวจสอบเนื้อเยื่อ จนแน่ใจว่าปลอดจากเชื้อไวรัส จากนั้นจึงทำการเพาะเลี้ยงและชักนำให้เกิดต้น ทำให้ได้ต้นพืชที่ปลอดจากไวรัส

3. การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ ในระบบการเกษตรยุคปัจจุบัน เกษตรกรมักเลือกปลูกพันธุ์พืชที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคเพียงไม่กี่พันธุ์ พันธุ์พืชพื้นเมืองจึงถูกละเลยและทอดทิ้ง ทำให้มีโอกาสที่พันธุ์พืชเหล่านี้จะสูญพันธุ์ไป นักวิชาการจึงได้พยายามคิดหาวิธีเก็บรักษาพันธุ์พืชต่างๆ ไว้ให้ได้นานที่สุด โดยใช้พื้นที่เก็บรักษาน้อยที่สุด เพื่อเป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับคนรุ่นหลัง มีการนำหลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ โดยพยายามปรับปรุงสูตรอาหารด้วยการปรับปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิด เพื่อให้พืชมีอัตราการเจริญเติบโตช้าลงอย่างมาก เพื่อลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการย้ายเนื้อเยื่อ เมื่อต้องการเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อก็สามารถย้ายเนื้อเยื่อลงเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปกติของพืชชนิดนั้นๆ นอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำถึง –196 องศาเซลเซียส ทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อพืชสามารถคงสภาพและมีชีวิตอยู่ได้ยาวนาน

4. การแลกเปลี่ยนพันธุ์พืช การแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุกรรมโดยส่งพืชในสภาพปลอดเชื้อในขวดหรือหลอดทดลอง มีความสะดวกและปลอดภัยมากกว่าการส่งเมล็ดพันธุ์ ชิ้นส่วนพืชหรือต้นพืช เป็นการลดความเสี่ยงของการแพร่กระจายโรคที่อาจติดมากับชิ้นส่วนพืชเหล่านี้

5. การปรับปรุงพันธุ์พืช การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์นั้น จะเป็นประโยชน์มากมายโดยการสร้างพันธุ์พืชให้มีลักษณะตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ เช่น การผลิตพันธุ์พืชทนทานและต้านทานโรคและแมลง ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ทนต่อดินกรด ทนเค็ม หรือการสร้างพันธุ์พืชใหม่ๆ โดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเทคนิคด้านพันธุวิศวกรรมโดยการตัดต่อยีนที่ไม่ต้องการออกและการใส่ยีนที่ต้องการเข้าไป เป็นต้น

6. การผลิตสารต่างๆ หรือยาจากพืช พืชหลายชนิดมีสารที่มีคุณสมบัติทางเภสัชหรือมีประโยชน์ด้านอุตสาหกรรม เช่น สารหอมระเหย สารสี สารอัลคาลอยด์จากพืชสมุนไพร เป็นต้น แทนที่จะต้องสกัดสารเหล่านั้นจากต้นพืช สามารถใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้เนื้อเยื่อปริมาณมาก แล้วนำไปสกัดสารที่ต้องการโดยไม่ต้องสกัดจากต้นพืช เป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย

7. การศึกษาทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของพืช เช่น การตอบสนองของพืชต่อสารฆ่าแมลง สารกำจัดศัตรูพืช หรือสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช สามารถติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงของต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้ง่ายกว่าต้นพืชที่ปลูกในแปลงทดลอง รวมทั้งสามารถควบคุมตัวแปรต่างๆ ได้ด้วย

8. การผลิตเมล็ดเทียม (artificial seeds) การผลิตเมล็ดพันธุ์เป็นการค้าเป็นการลงทุนที่เสียค่าใช้จ่ายสูงทั้งในด้านแรงงานและต้องใช้พื้นที่จำนวนมาก การสร้างเมล็ดพันธุ์พืชในห้องปฏิบัติการจากเทคนิค somatic embryo แล้วนำ embryo ที่ได้ไปเคลือบด้วยสารเคมีและสารป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถลดค่าใช้จ่ายในการผลิตได้

บทที่ 1

วิวัฒนาการของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

วิวัฒนาการของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เริ่มจากการค้นพบว่าสิ่งมีชีวิตประกอบด้วยอนุภาคขนาดเล็กที่เรียกว่า เซลล์ มีการศึกษาอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งสามารถแยกเซลล์พืชมาเลี้ยงเพื่อการวิจัยและศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ จนสามารถเพาะเลี้ยงอวัยวะ (organ) และแคลลัส (callus) ของพืชได้หลายชนิด จากนั้นเป็นต้นมา เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้มีการพัฒนาไปอย่างกว้างขวาง มีการค้นพบเทคนิคใหม่ๆ มากมาย โดยเฉพาะการขยายพันธุ์พืชในปริมาณมากเพื่ออุตสาหกรรมและการค้า ซึ่งมีวิวัฒนาการตามลำดับดังนี้

ค.ศ. 1893 Schanwann และ Schlelden ได้ตั้งทฤษฎีเซลล์ โดยมีใจความว่า สิ่งมีชีวิตทั้งหลายประกอบด้วยอนุภาคขนาดเล็ก เรียกว่า เซลล์

ค.ศ. 1902 Haberlandt นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันทำการแยกเซลล์พืชมาเลี้ยงเพื่อศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ พบว่าเซลล์มีการขยายขนาดขึ้น แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จในการทำให้เซลล์แบ่งตัว

ค.ศ. 1904 Hanning สามารถเลี้ยงคัพภะของพืชตระกูลกระหล่ำบางสายพันธุ์ เช่น *Raphanus sativus, R. landra, R. candatus* และ *Cochiearia danica* ให้งอกเป็นต้นได้ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีน้ำตาล

ค.ศ. 1922 Knudson สามารถเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในหลอดทดลองได้สำเร็จ

ค.ศ. 1939 Gautheret และ White ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงแคลลัส ในขณะที่ Nobecourt เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากหัวแครอทเป็นแคลลัส

ค.ศ. 1945 Lao เพาะเลี้ยงปลายยอดของหน่อไม้ฝรั่งได้สำเร็จ

ค.ศ. 1952 Morel และ Martin สามารถเพาะเลี้ยงต้นรักเร่จากปลายยอด (apical meristem culture) ให้ปราศจากโรคไวรัสได้สำเร็จเป็นครั้งแรก ต่อมาได้มีการนำเอาเทคนิคนี้ไปใช้ในการขยายพันธุ์พืชอย่างกว้างขวาง

ค.ศ. 1958 Maheshware และ Rangaswamy สามารถชักนำให้เกิด Somatic embryo จากเนื้อเยื่อ nucellus ของส้ม ในขณะที่ Reinert และ Steward ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากแครอทแบบ embryogenesis โดยเซลล์แขวนลอยของต้นแครอท มีพัฒนาการเป็นระยะต่างๆ ดังต่อไปนี้ คือ pro-embryonic, globular, heart-shaped และ torpedo shaped ก่อนเจริญเป็น embryo

ค.ศ. 1962 Murashige และ Skoog ได้คิดสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งต่อมาเป็นที่รู้จักและใช้กันอย่างแพร่หลาย ในชื่ออาหารสูตร MS ส่วน Kunta และคณะพัฒนาเทคนิคการ

ผสมเกสรและการปฏิสนธิในหลอดทดลอง โดยเพาะเลี้ยงรังไข่และละอองเกสรบนอาหารวิทยาศาสตร์ในขวดเดียวกันและสามารถผลิตลูกผสมได้สำเร็จ ต่อมามีการใช้เทคนิคนี้อย่างแพร่หลายกับพืชที่ไม่สามารถผสมติดในธรรมชาติ

ค.ศ. 1967 Bourgin และ Nitsch สามารถผลิต haploid plant จากการเลี้ยงเรณูของยาสูบได้สำเร็จ ต่อมาได้มีการนำเทคนิคนี้ไปใช้กับพืชอื่นๆ เช่น ข้าว

ค.ศ. 1971 Takebe และคณะ สามารถชักนำโปรโตพลาสต์จนเป็นต้นพืชได้สำเร็จเป็นครั้งแรก

ค.ศ. 1977 Chiton และคณะ ประสบความสำเร็จในการถ่าย Ti-plasmid จาก Agrobacterium เข้าสู่พืช

ค.ศ. 1982 Kren และคณะ สามารถย้าย DNA บริสุทธิ์เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้โดยตรง

ค.ศ. 1997 Etienne และคณะ ได้ปรับปรุงการขยายพันธุ์ยางโดยวิธี Somatic embryogenesis ในระบบ Temporary Immersion Systems

ค.ศ. 1999 Desjardine สามารถขยายพันธุ์สับปะรดในระบบ Temporary Immersion Systems

ค.ศ. 2007 Ducos และคณะ พัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวด้วยระบบ Temporary Immersion Systems เพื่อใช้ในการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้า โดยวิธี Somatic Embryogenesis ในระดับอุตสาหกรรม

ค.ศ. 2014 Mujib และคณะ เปรียบเทียบการขยายพันธุ์กุหลาบโดยเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง และ TIBs พบว่าการขยายพันธุ์ใน TIBs ใช้เวลาในการพัฒนาเป็นต้นน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง

ค.ศ. 2015 Florez ออกแบบและประดิษฐ์ TIBs แบบประหยัดสำหรับขยายพันธุ์โกโก้ในปริมาณมากโดยอาศัยแรงโน้มถ่วงของโลกในขบวนการผลิต ซึ่งเป็นการประหยัดพลังงาน

บทที่ 2

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs

การขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในเชิงอุตสาหกรรมนั้น ผู้ผลิตต้องคำนึงถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ ทั้งเรื่องคุณภาพ ปริมาณต้นพืชที่ต้องการผลิต และเวลาที่ใช้ในการขนส่ง ซึ่งจะต้องทำการศึกษาอย่างละเอียดเพื่อให้เข้าใจวิธีการ นอกจากนั้นยังต้องคำนึงถึงต้นทุนการผลิตด้วย การนำระบบTIBs มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวนั้นถือเป็นการลดต้นทุนการผลิตทั้งในด้านแรงงาน เวลาที่ใช้ และค่าวัสดุ เมื่อเปรียบเทียบกับปัจจัยต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารกึ่งแข็งที่มีการใช้อย่างแพร่หลายเป็นเวลานาน

ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยการใช้อาหารกึ่งแข็ง

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่จะเป็นการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารกึ่งแข็ง (semi - solid media) เนื่องจากมีข้อดีที่การลงทุนเริ่มต้นไม่สูงมาก หากเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจะเกิดเฉพาะบางขวด ก่อให้เกิดความเสียหายไม่มาก นอกจากนั้นผู้ปฏิบัติงานยังไม่จำเป็นต้องมีทักษะมากนัก อย่างไรก็ตาม หากต้องการขยายพันธุ์พืชในปริมาณมาก การเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารกึ่งแข็งยังมีข้อจำกัด โดยมีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึง ประกอบด้วย

1. พื้นที่ในการเพาะเลี้ยง เนื่องจากการเพาะเลี้ยงวิธีนี้ ต้นพืชจะต้องวางอยู่บนอาหารที่มีส่วนประกอบจากวุ้น ดังนั้นหากต้องการผลิตพืชปริมาณมาก จำเป็นต้องมีการสร้างห้องเพาะเลี้ยง (culture room) ขนาดใหญ่ด้วย ทั้งนี้ Smith (1985) รายงานว่าในการผลิตต้น *Pinus radiate* จำนวน 1,100 ต้น ต้องใช้พื้นที่ผิวหน้าของอาหารจำนวน 1 ตารางเมตรต่อเดือน การสร้างห้องเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ ทำให้มีต้นทุนในการดูแลและควบคุมสภาพแวดล้อมในห้องเพาะเลี้ยงสูงขึ้น

2. แรงงาน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยอาหารกึ่งแข็ง ต้องมีการตัดถ่ายต้นที่เกิดใหม่ลงสู่อาหารใหม่ (subculture) ทุก 4 - 6 สัปดาห์ เพื่อให้ต้นพืชได้รับอาหารอย่างต่อเนื่องและเพียงพอเนื่องจากอาหารในขวดเก่าถูกใช้จนหมด พืชบางชนิดต้องเปลี่ยนอาหารถึงเจ็ดครั้งต่อการเพาะเลี้ยงหนึ่งรอบ นอกจากแรงงานในการเปลี่ยนถ่ายอาหารและตัดแต่งต้นพืชซึ่งต้องมีความเชี่ยวชาญเฉพาะแล้ว ยังต้องใช้แรงงานในการเตรียมอาหาร กรอกอาหารใส่ขวด และล้างขวดอาหาร ซึ่งค่าใช้จ่ายด้านแรงงานนี้สูงถึง 40 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด (นพมณี และคณะ, 2548; Berthouly and Etienne, 2005)

จากเหตุผลดังกล่าว ทำให้ต้นทุนต่อหน่วยของการผลิตต้นพืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยอาหารกึ่งแข็งสูงตามไปด้วย เป็นข้อจำกัดของการขยายพันธุ์พืชปริมาณมากด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยการใช้อาหารเหลว

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวแบบ TIBs เป็นวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบบใหม่ที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมัก เพื่อผลิตโปรตีนหรือสารชีวเคมีต่างๆ แต่ระบบ TIBs ต่างจากระบบถังหมัก เนื่องจากมีการให้อาหารเป็นครั้งคราว เนื้อเยื่อพืชไม่ได้จมอยู่ในอาหารเหลวตลอดเวลาดังเช่นระบบถังหมัก

ระบบ TIBs ส่วนมากประกอบด้วยภาชนะ 2 ส่วน คือ ภาชนะใส่เนื้อเยื่อพืชที่จะเพาะเลี้ยงและภาชนะใส่อาหารที่จะให้ต้นพืชเชื่อมต่อกันด้วยสายยางซิลิโคน (Escalona *et al.*, 2003) มีหลักการทำงานทั่วไป คือ มีการให้อาหารและอากาศตามระยะเวลาที่ต้องการ เช่น ในแอสเตอร์ (*Callistephus hortensis*) ให้อาหาร 5 – 10 นาที ทุก 12 ชั่วโมง (Tesserat and Vandercook, 1985) ในกล้วย ให้อาหาร 20 นาที ทุก 2 ชั่วโมง (Alvard *et al.*, 1993) เป็นต้น ระยะเวลาการให้อาหารของแต่ละพืช ต้องคำนึงถึงปริมาณ ธาตุอาหารที่พืชจะได้รับให้เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มมวลของเนื้อเยื่อเจริญต่างๆ เพื่อให้สามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้เป็นจำนวนมาก

ข้อดีของระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ TIBs

1. ลดต้นทุนค่าแรงงานในการถ่ายเนื้อเยื่อลงในอาหารใหม่ (subculture) การขยายพันธุ์อ้อยด้วยระบบ TIBs สามารถลดต้นทุนค่าแรงงานได้ 20 ถึง 46 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการขยายพันธุ์ในอาหารแข็ง/กึ่งแข็ง (นพมณี, 2548; Escalona *et al.*, 1999; Loreazo *et al.*, 1998)

2. ลดปริมาณอาหารและระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงปทุมมาลง 3.2 เท่า และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง (นพมณี, 2548)

3. อัตราการเจริญเติบโตและการเพิ่มมวลของเนื้อเยื่อพืชที่ทำการเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs สูงกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็ง/กึ่งแข็ง (ตารางที่ 1)

4. ลดอาการผิดปกติของต้นพืชที่เกิดจากการขาดออกซิเจน และลดการสะสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซเอทิลีน เนื่องจากเป็นระบบที่มีการถ่ายเทอากาศโดยผ่านแผ่นกรองอากาศ

5. การให้อาหารแต่ละครั้ง ทำให้เกิดฟิล์มบางๆ เคลือบทุกส่วนของเนื้อเยื่อพืช ทำให้เนื้อเยื่อพืชสามารถนำอาหารที่เคลือบอยู่ไปใช้ได้ และยังป้องกันการแห้งของเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงด้วย

6. ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จากอากาศด้วยแผ่นกรองอากาศ

7. การเปลี่ยนอาหารใหม่ทำได้สะดวก ไม่ต้องเปลี่ยนขวดใส่เนื้อเยื่อพืชใหม่ ทำให้ลดต้นทุนค่าพลังงานในการฆ่าเชื้อลง และไม่ทำให้พืชเกิดความเสียหายจากการย้ายลงขวดอาหารใหม่

8. ประหยัดพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง เนื่องจากขวดเพาะเลี้ยงมีขนาดไม่ใหญ่มาก แต่สามารถผลิตต้นพืชได้ปริมาณมากต่อขวด

ตารางที่ 1 ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวโดยใช้ระบบ TIBs

ชนิดพืช	กระบวนการที่ใช้ขยายพันธุ์	อัตราเพิ่มของการเจริญเติบโต*	ผู้ทดลอง
Vitis vinifera	เพาะเลี้ยงตายอด	จำนวนตาเพิ่ม 7 เท่า	Harris and Mason (1983)
Potinera spp.	เพาะเลี้ยงตายอด	น้ำหนักตายอดเพิ่ม 4 เท่า	Tisserat and Vandercook (1985)
Callistephus hortensis (Aster)	เพาะเลี้ยงตายอด	น้ำหนักตายอดเพิ่ม 1 เท่า	Tisserat and Vandercook (1985)
Phenix dactylifera (date palm)	เพาะเลี้ยง Embryogenic callus	น้ำหนักแคลลัสเพิ่ม 3.2 เท่า	Tisserat and Vandercook (1985)
Mitragyna inermis (cow tree)	เพาะเลี้ยงตายอด	น้ำหนักตายอดเพิ่ม 1.8 เท่า	Tisserat and Vandercook (1985)
Musa acuminata	เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของตายอด	จำนวนตายอดเพิ่ม 2.5 เท่า	Alvard *et. al.* (1993)
Solanum tuberosum	Tuberization	จำนวนหัวเพิ่ม 3-4 เท่า	Akita and Takayama (1994)
Musa spp. (Triploid banana)	Somatic embryogenesis	จำนวนต้นอ่อนเพิ่มขึ้น 3 เท่า	Escalant *et al.* (1994)
Coffea arabica and *C. canephora*	Microcuttings	จำนวนตาเพิ่มขึ้น 2 เท่า	Berthouly *et al.* (1995)
Hevea brasiliensis	Somatic embryogenesis	จำนวนต้นอ่อนเพิ่มขึ้น 4 เท่า และ 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้นอ่อนที่มีใบเลี้ยง	Etienne *et al.* (1997)
Saccharum spp.	เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของตายอด	จำนวนตายอดเพิ่มขึ้น 4-6 เท่า	Lorenzo *et al.* (1998)
Coffea arabica	Somatic embryogenesis	90 เปอร์เซ็นต์ของแคลลัสพัฒนาเป็น torpedo embryos	Etienne-Barry *et al.* (1999)
Coffea canephora	Somatic embryogenesis จากใบอ่อน	Torpedo embryos น้ำหนัก 1 กรัม พัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ 55 – 297 ต้น	Ducos et. al. (2007), ประภาพรและคณะ (2551)
Vanda sp.	Somatic embryogenesis จากราก	แคลลัสน้ำหนัก 1 กรัม พัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ 40 ต้น	ยุพินและคณะ (2553)
Anthurium sp.	เพาะเลี้ยงตาข้อ	น้ำหนักต่อต้น จำนวนต้นเพิ่มขึ้น 2 – 8 เท่า	ประภาพรและคณะ (2558)
Phalaenopsis spp.	เพาะเลี้ยงตายอด	จำนวนตายอดเพิ่มขึ้น 3 เท่า	บริษัท ไพฑูรย์สะพลี จำกัด (2559)

ชนิดพืช	กระบวนการที่ใช้ขยายพันธุ์	อัตราเพิ่มของการเจริญเติบโต*	ผู้ทดลอง
Musa spp.	เพาะเลี้ยงหน่ออ่อน	จำนวนต้นอ่อนเพิ่มขึ้น 5 เท่า	บริษัท ไพฑูรย์สะพลี จำกัด (2559)
Zingiber officinale	เพาะเลี้ยงหน่ออ่อน	จำนวนต้นอ่อนเพิ่มขึ้น 5 เท่า	บริษัท ไพฑูรย์สะพลี จำกัด (2559)
Cucuma longa	เพาะเลี้ยงหน่ออ่อน	จำนวนต้นอ่อนเพิ่มขึ้น 5 เท่า	บริษัท ไพฑูรย์สะพลี จำกัด (2559)

หมายเหตุ * เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยอาหารแข็งหรือกึ่งแข็ง

ข้อจำกัดของระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ TIBs

1. การลงทุนเริ่มต้นค่อนข้างสูง เนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาแพง
2. หากเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ จะเกิดความเสียหายในปริมาณมาก
3. ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญในการใช้อุปกรณ์

บทที่ 3

รูปแบบของระบบ TIBs

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวเริ่มขึ้นเป็นครั้งแรกเมื่อ Stewart *et al*., (1952) ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อรากแครอท (*Daucus carota* L.) ในอาหารเหลวบนเครื่องมือที่เรียกว่า auxophyton ซึ่งทำงานโดยวางขวดใส่เนื้อเยื่อบนวงล้อ และวงล้อจะหมุนสลับเพื่อให้อาหารสัมผัสกับเนื้อเยื่อเป็นครั้งคราว แต่เนื้อเยื่อเจริญเติบโตช้ามาก เนื่องจากได้รับออกซิเจนน้อย อย่างไรก็ตามเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 20 วัน เนื้อเยื่อแครอทมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง 2.6 เท่า

Harris and Mason (1983) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงตาข้างองุ่น (*Vitis vinifera*) โดยวางขวด Erlenmeyer flask ที่มีอาหารเหลวและเนื้อเยื่อพืชบนเครื่องมือที่ทำให้ขวดเอียงตัวในมุม 30 – 40 องศา ทุก 30 วินาที เพื่อให้อาหารไหลเวียนได้ทั่ว โดยไม่มีการเปลี่ยนอาหารตลอดการเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงระบบนี้ทำให้ตาข้างขององุ่นเจริญเติบโตเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง 7 เท่า

Tesserat and Vandercook (1985) ได้พัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงให้ขวดใส่เนื้อเยื่อมีขนาดใหญ่ขึ้นและเป็นแบบกึ่งอัตโนมัติ โดยได้ทดลองเพาะเลี้ยงพืชหลายชนิด เช่น กล้วยไม้ (*Potinera* spp.), แอสเตอร์ (*Callistephus hortensis*), อินทผาลัม (*Phenix dactylifera*), cow tree (*Mitragyna insrmis*) และแครอท

การเพาะเลี้ยงระบบกึ่งอัตโนมัติ ต้องคำนึงถึงปัจจัยหลักต่างๆ ได้แก่

1. หลีกเลี่ยงการให้อาหารอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะส่งผลในทางลบต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนารูปร่างของต้นพืช
2. ควบคุมการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนให้เหมาะสม
3. การควบคุมการแลกเปลี่ยนของก๊าซต่างๆ ให้มีระดับที่เหมาะสม
4. ลดความเครียดให้เนื้อเยื่อพืช
5. เพิ่มความสะดวกในการเปลี่ยนอาหาร
6. อัตราการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ต่ำ
7. ต้นทุนต่ำ

ความแตกต่างของการออกแบบระบบ TIBs ขึ้นอยู่กับ

1. ขนาด ชนิดและวัสดุของภาชนะที่ใช้บรรจุอาหารและเนื้อเยื่อพืช ว่ามีขนาดเล็กหรือใหญ่เพียงใด สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หรือไม่ ความยากง่ายในการฆ่าเชื้อความทนทานของวัสดุที่ใช้ เป็นต้น

2. ระบบควบคุมการให้อาหาร ว่าต้องการระบบอย่างง่าย ควบคุมด้วยมือ หรือใช้ระบบควบคุมอัตโนมัติ

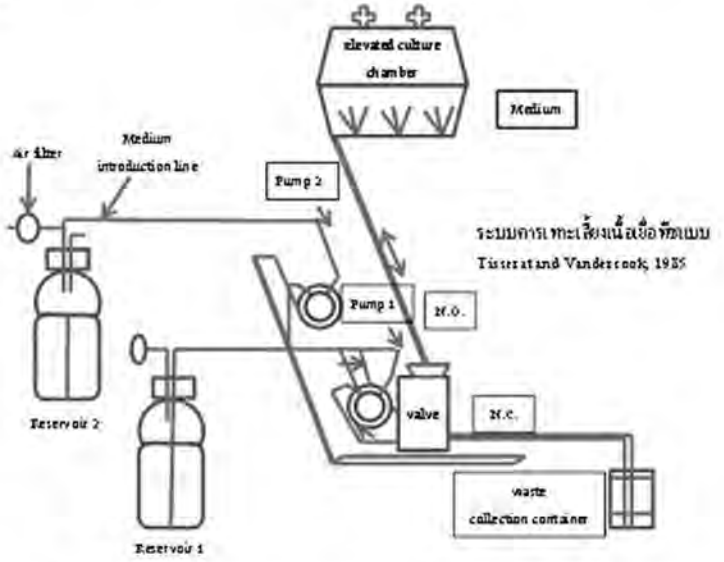
3. ชนิดของปั๊มลมที่ใช้ เป็นแบบปั๊มไฟฟ้าหรือปั๊มเครื่องยนต์

4. อุปกรณ์เชื่อมต่อระบบ ระหว่าง ปั๊ม ภาชนะบรรจุอาหาร และภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อ ว่ามีความทนทานต่อการใช้งาน ประสิทธิภาพในการทำงาน และความทนทานต่อการฆ่าเชื้อที่ผู้ออกแบบระบบนำมาใช้งาน

นอกจากนี้แล้ว การออกแบบระบบ TIBs ยังต้องคำนึงถึงความต่อเนื่องในการใช้งาน ความยากง่ายในการปฏิบัติและดูแลรักษา ทำให้สามารถจำแนกระบบ TIBs ออกเป็น 3 แบบ ดังนี้

3.1 การให้เนื้อเยื่อพืชจมในอาหารเหลวเป็นครั้งคราวและสามารถเปลี่ยนอาหารได้ มีหลักการสำคัญ คือ การให้อาหารเหลวท่วมเนื้อเยื่อพืชเป็นระยะเวลาหนึ่งตามต้องการ หลังจากนั้นปล่อยให้อาหารไหลกลับสู่ขวดอาหาร ข้อดีของระบบนี้ คือ ลดอาการฉ่ำน้ำของพืช (hyperhydricity) สามารถขยายขนาดของภาชนะและเปลี่ยนอาหารใหม่ได้ง่าย เนื่องจากมีการแยกภาชนะบรรจุอาหารเหลวจากภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อพืช

Tisserat and Vandercook (1985) ได้พัฒนาและเผยแพร่ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยอาหารเหลวอัตโนมัติ (Automated Plant Culture System, APCS) เป็นครั้งแรกในปี คศ. 1985 ระบบนี้ประกอบด้วย สายยางซิลิโคน ปั๊ม 2 ตัว ขวดแก้วใส่อาหาร 2 ขวด วาล์วสแตนเลสสามทาง ภาชนะใส่เนื้อเยื่อพืช และระบบควบคุมการทำงานของปั๊ม สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ในระยะยาว (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยอาหารเหลวแบบอัตโนมัติ (Automated Plant Culture System)

3.2 การให้เนื้อเยื่อพืชอยู่ในอาหารเหลวไม่สมบูรณ์เป็นครั้งคราวและสามารถเปลี่ยนอาหารได้ โดยภาชนะใส่อาหารและภาชนะใส่เนื้อเยื่อพืชแยกออกจากกันเพื่อความสะดวกในการเปลี่ยนอาหาร หลักการทำงานของระบบนี้ คือ เนื้อเยื่อพืชจะอยู่บนสิ่งที่ช่วยพยุงอยู่เสมอ เช่น อาหารวุ้น แผ่นตาข่าย หรือแผ่นเซลลูโลส มีการให้อาหารเหลวเป็นครั้งคราวและเฉพาะส่วนล่างของชิ้นส่วนพืชเท่านั้นที่สัมผัสอาหารเหลวเป็นระยะเวลาหนึ่ง

Aitken-Christie and Jones (1987) และ Aitken-Christie and Davies (1988) ได้พัฒนาและเผยแพร่ระบบนี้ในแบบกึ่งอัตโนมัติ โดยใช้ภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อพืชที่ทำจากโพลีคาร์บอเนต ขนาด 250x390x120 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2) ในการเลี้ยงตาข้างของสน (Pinus) บนอาหารวุ้น และให้อาหารเหลวโดยปั๊มอาหารเข้าออกเป็นเวลา อาหารใหม่จะผ่านมาทางท่อที่เชื่อมต่อระหว่างภาชนะใส่อาหาร ครั้งละ 4 – 6 ชั่วโมง จากนั้นจะปั๊มอาหารออกทางท่อไปเก็บในขวดของเสีย วัตถุประสงค์หลักของการใช้งานระบบนี้ก็เพื่อเพิ่มอาหารหรือสารบางอย่าง เช่น ฮอร์โมนพืชในช่วงเวลาหนึ่งของการเพาะเลี้ยง เช่น การเติมออกซินในอาหารเหลวก่อนนำออกอนุบาลต่อไป อาหารเหลวที่ใช้แล้วจะไม่นำกลับมาใช้ใหม่

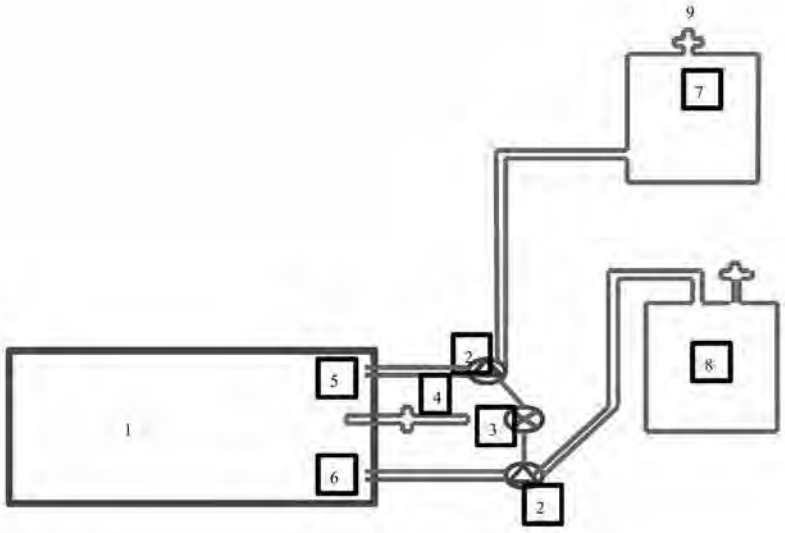
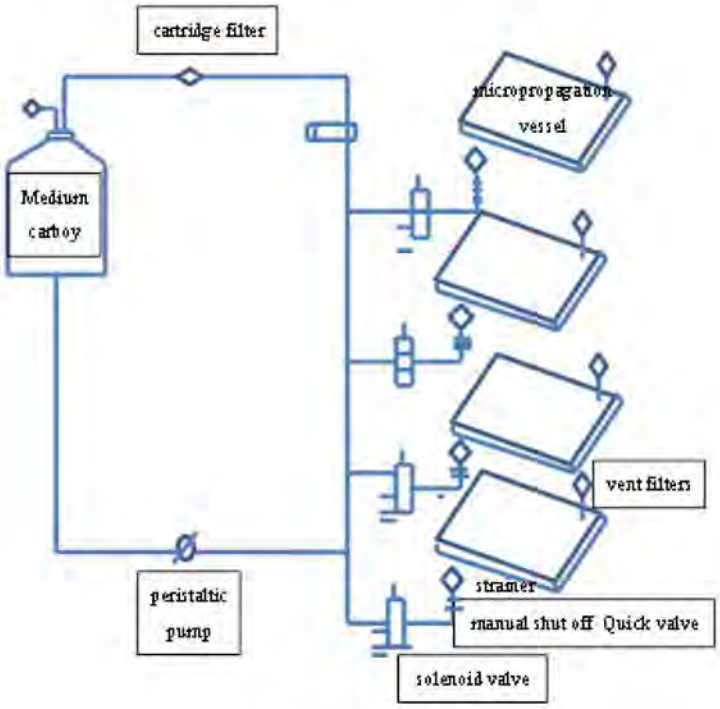


Diagram 0f semi-automated systerm

1. Container	4. Aeration port	7. nutrient reservoir
2. Peristaltic pumps	5. Nutrient inlet	8. Waste reservoir
3.Programmable time clock	6. Nutrient outlet	9. Aeration ports

ภาพที่ 2 ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยอาหารเหลวแบบกึ่งอัตโนมัติของ Aitken-Christie and Jones (1987) และ Aitken-Christie and Davies (1988)

หลังจากนั้น Simonton *et al.* (1991) ได้พัฒนาระบบนี้ต่อโดยเพิ่มการควบคุมการทำงานของปั๊มด้วยคอมพิวเตอร์ มีการหมุนวนอาหารเหลวมาใช้ใหม่ และเปลี่ยนอาหารได้ สามารถเพิ่มปริมาณและขนาดของภาชนะใส่เนื้อเยื่อได้ อย่างไรก็ตาม ต้องพิจารณาปริมาณของอาหารให้เพียงพอต่อปริมาณเนื้อเยื่อด้วย ในตัวอย่างนี้ ขวดใส่อาหารมีขนาดบรรจุ 7 ลิตร สำหรับภาชนะใส่เนื้อเยื่อ 4 ชั้น (ภาพที่ 3) มีข้อดี คือประหยัดภาชนะบรรจุอาหาร ลดต้นทุนของระบบควบคุมต่างๆ และสามารถเพิ่มพื้นที่สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้จำนวนมาก แต่ข้อจำกัดคือ ต้องมีระบบที่ดีเพื่อควบคุมการปนเปื้อนเชื้อ เนื่องจากถ้าเกิดการปนเปื้อนเชื้อในส่วนใดส่วนหนึ่ง จะเกิดความสูญเสียของเนื้อเยื่อพืชทั้งหมด

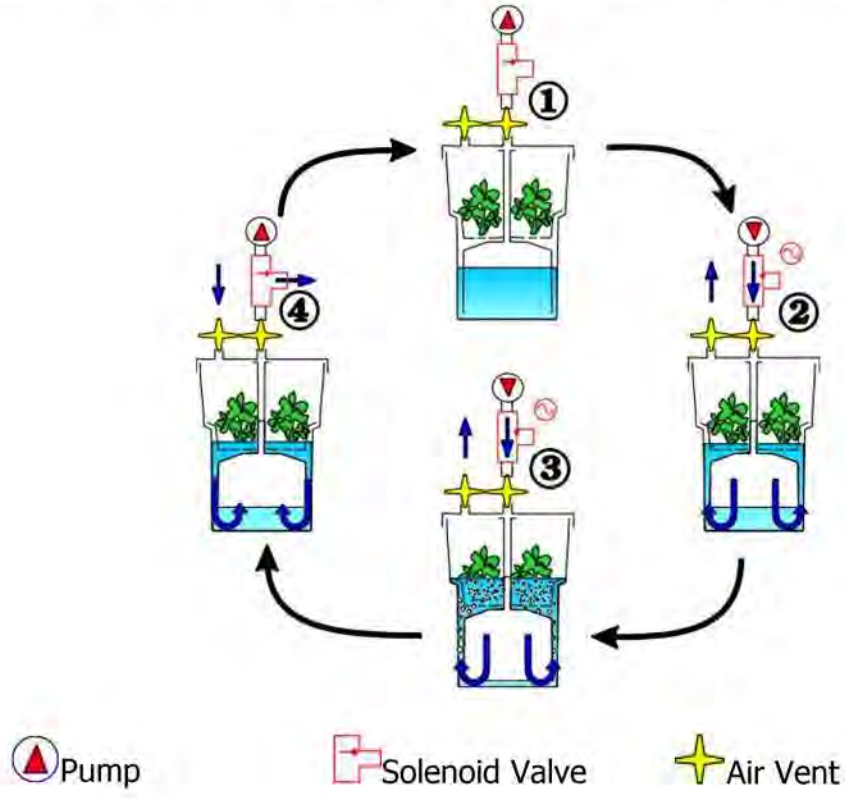


ภาพที่ 3 ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยอาหารเหลวของ Simonton

3.3 การให้เนื้อเยื่อพืชจมในอาหารเหลวเป็นครั้งคราวโดยใช้แรงดันลมเป็นตัวผลักดันการไหลของอาหารเหลว ระบบนี้มีการเผยแพร่ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1993 โดย Alvard และคณะ จุดมุ่งหมายหลักของระบบคือ ไม่ซับซ้อน ใช้งานง่าย การประกอบชิ้นส่วนต่างๆ ไม่ยุ่งยาก การให้อาหารเหลวแก่ชิ้นส่วนพืชใช้แรงดันลมจากปั๊มอากาศที่จะทำงานเมื่อถึงเวลาที่ตั้งไว้ โปรแกรมจะกำหนดทั้งเวลาเริ่มทำงานและระยะเวลาที่ให้อาหาร ซึ่งจะขึ้นกับชนิดพืชและวิธีการขยายพันธุ์พืชที่เลือกใช้ เมื่อถึงเวลาที่กำหนดไว้แรงดันลมจากปั๊มอากาศ จะดันอาหารเหลวในภาชนะบรรจุอาหารไปสู่ภาชนะบรรจุชิ้นส่วนพืชจนหมด ทำให้อาหารเหลวสัมผัสกับชิ้นส่วนพืชทุกส่วน หลังจากนั้นถ้ายังมีการให้แรงดันลมต่อไป อากาศดีจะเข้ามาแทนที่เพื่อให้ชิ้นส่วนพืชใช้งาน ทำให้มีการแลกเปลี่ยนอากาศในระบบ และอากาศเสีย เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ เอทิลีน ถูก

ดันผ่านตัวกรองอากาศออกไป เมื่อถึงกำหนดเวลาที่ตั้งไว้ ระบบควบคุมจะหยุดการให้แรงดันลม ทำให้อาหารเหลวที่อยู่ในภาชนะบรรจุชิ้นส่วนพืช ไหลกลับมาสู่ภาชนะบรรจุอาหารเช่นเดิม ในระบบนี้ควรทำการเปลี่ยนอาหารทุก 4 – 6 สัปดาห์ ซึ่งการเปลี่ยนอาหารทำได้ง่ายและรวดเร็ว โดยไม่ต้องเปลี่ยนภาชนะบรรจุชิ้นส่วนพืช

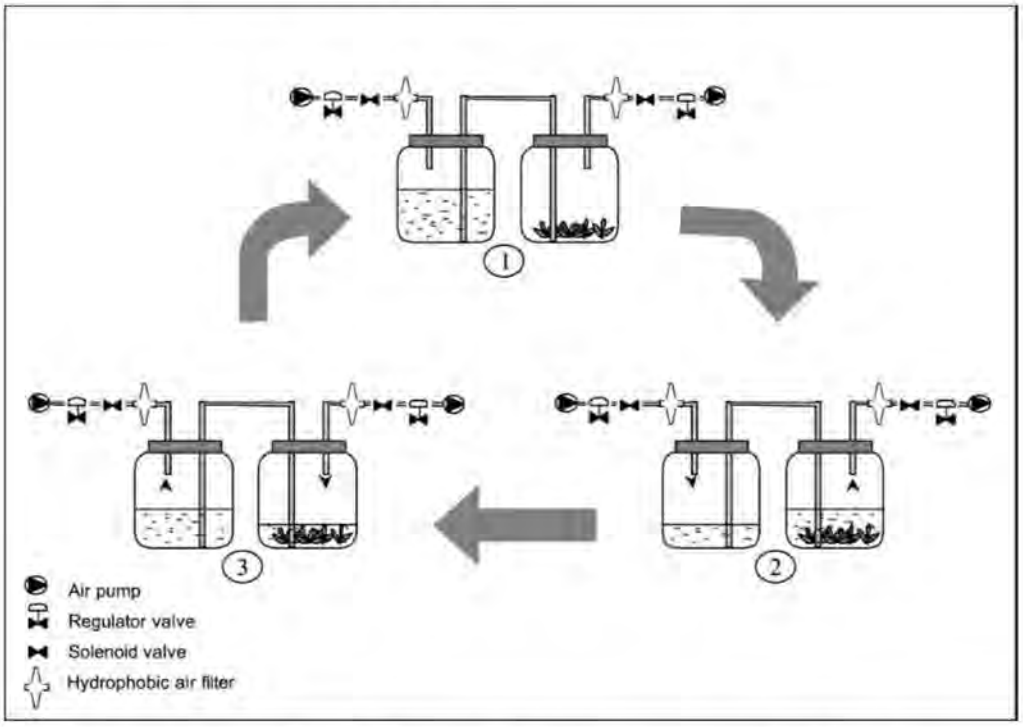
Teisson and Alvard (1995) ได้ออกแบบระบบ TIBs โดยการใช้แรงดันลมเป็นตัวให้อาหารที่เรียกว่า RITA system (ภาพที่ 4) ขนาดภาชนะบรรจุ 1 ลิตรประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ด้านบนบรรจุชิ้นส่วนพืช และด้านล่างบรรจุอาหารเหลว แรงดันลมจะให้ทางด้านล่างทำให้อาหารวิ่งขึ้นมาด้านบน พืชได้สัมผัสอาหารเหลวตลอดเวลาที่มีการให้แรงดันลม ระหว่างการให้อาหารนั้น จะมีฟองอากาศผสมมาด้วย อากาศจะไหลออกทางตอนบนสุดผ่านแผ่นกรองอากาศ เพื่อลดความแรงของการไหลของอาหารเหลวและทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนอากาศภายในระบบ ส่วนมากแล้วระบบ RITA จะใช้ในการขยายพันธุ์พืชในปริมาณมากด้วยการใช้ somatic embryogenesis



ภาพที่ 4 ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ TIBs โดยใช้แรงดันลมแบบ RITA system

ต่อมาในปี คศ. 1999 Escalona และคณะ ได้พัฒนาระบบ TIBs เป็นขวดคู่แฝด ที่มีการเชื่อมต่อของขวดสองขวดที่วางคู่กัน ขวดหนึ่งบรรจุชิ้นส่วนพืชและอีกขวดบรรจุอาหารเหลว ขวดทั้งสองจะเชื่อมต่อกับปั๊มอากาศทั้งสองขวด ลักษณะการทำงานจะให้แรงดันลมผ่านเข้าทางขวดบรรจุอาหาร ดันให้อาหารไหลผ่านท่อที่เชื่อมต่อขวดทั้งสองไปยังขวดบรรจุชิ้นส่วนพืช เมื่อได้

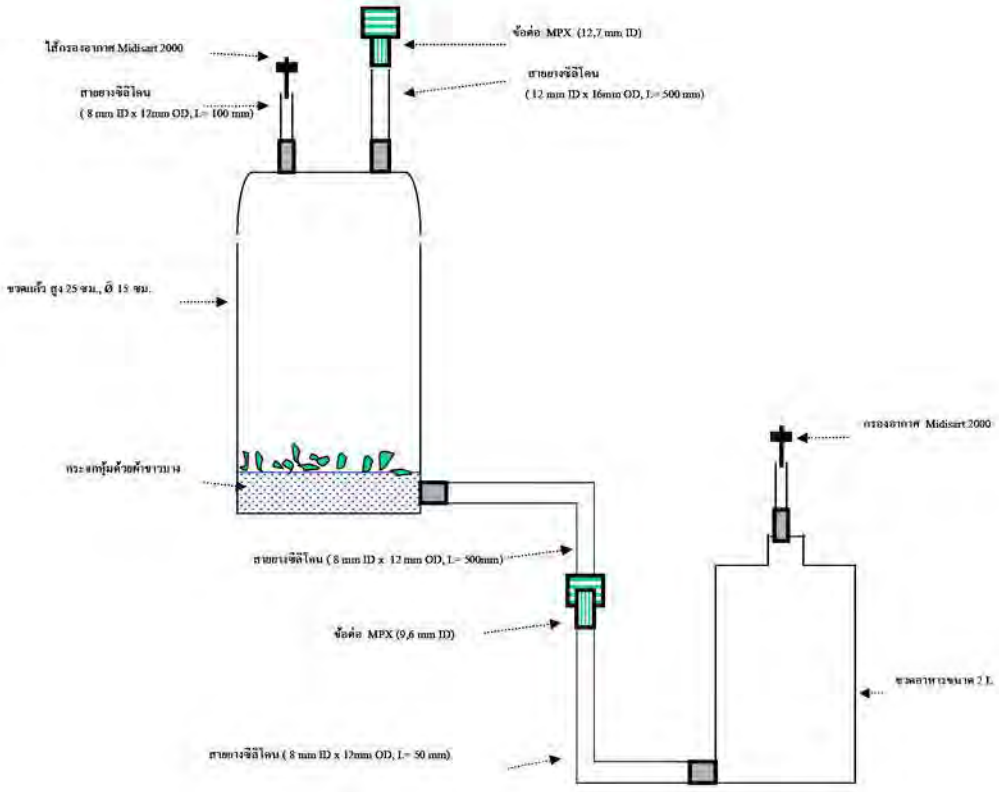
เวลาที่กำหนดไว้ ปั๊มอากาศที่เชื่อมกับขวดบรรจุอาหารจะหยุดทำงาน และปั๊มอากาศที่เชื่อมกับขวดบรรจุชิ้นส่วนพืชจะทำงาน ทำให้แรงดันลมผลักดันอาหารจากขวดบรรจุเนื้อเยื่อพืชกลับมายังขวดบรรจุอาหารจนหมด (ภาพที่ 5) ซึ่งนพมณีและคณะ (2548) ได้พัฒนาระบบ TIBs แบบขวดแฝดต้นทุนต่ำ นำมาใช้ในการขยายพันธุ์ปทุมมา



ภาพที่ 5 ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ TIB Twin flasks system โดยใช้แรงดันลม

ในปี ค.ศ. 2007 Docus และคณะ ได้พัฒนาระบบ TIBs ในรูปแบบเดียวกันแต่ขยายขนาดของภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อให้ใหญ่ขึ้นและการไหลกลับของอาหารจากภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อไปยังภาชนะบรรจุอาหารใช้แรงโน้มถ่วงของโลก ระบบนี้ประกอบด้วยภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อพืชที่ผลิตจากพลาสติกหรือแก้ว สามารถขยายขนาดภาชนะได้ถึง 10 ลิตร (ทำจากแก้ว) หรือภาชนะที่ให้พื้นที่ขนาด 1,260 ตารางเซนติเมตร ภาชนะบรรจุอาหาร สามารถขยายขนาดให้เหมาะสมกับภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อ เพื่อให้เนื้อเยื่อพืชได้รับอาหารอย่างเพียงพอ ภาชนะทั้งสองนี้เชื่อมต่อกันด้วยสายยางซิลิโคน โดยมีข้อต่อเพื่อสะดวกในการเปลี่ยนภาชนะบรรจุอาหาร

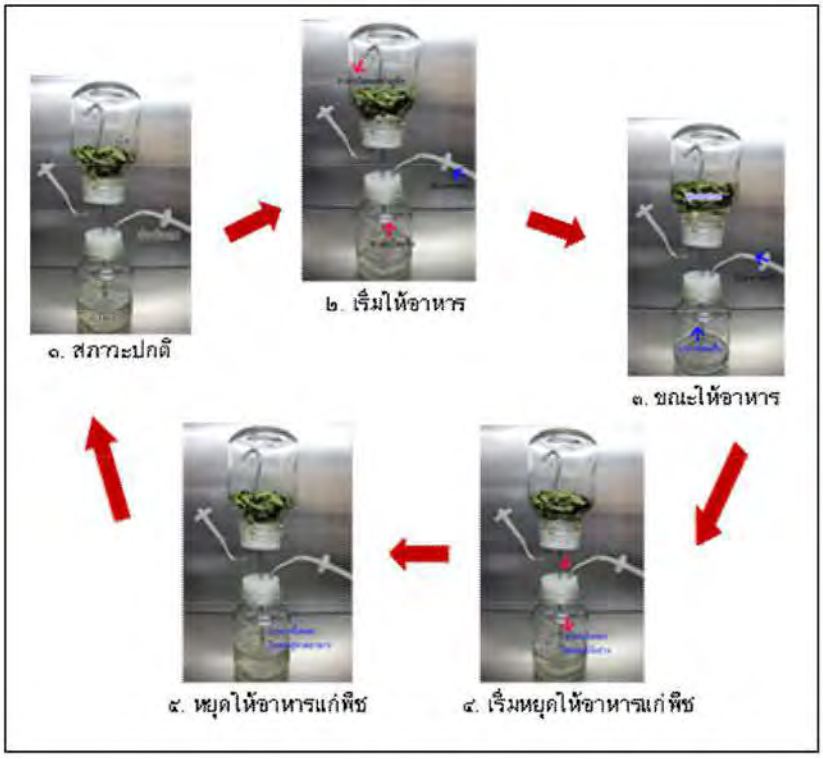
ระบบนี้ทำงานโดยใช้ปั๊มอากาศให้แรงดันลมผ่านตัวกรองอากาศดันให้อาหารเหลวที่วางอยู่ในระดับต่ำกว่าภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อพืชไหลขึ้นไปสู่ภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อพืชตามเวลาที่ต้องการ เมื่อได้เวลาที่กำหนดปั๊มอากาศจะหยุดทำงาน ทำให้อาหารเหลวทั้งหมดไหลกลับลงมาสู่ภาชนะบรรจุอาหารและทำงานวนเวียนซ้ำๆ จนพืชเจริญเติบโตตามที่ต้องการ (Ducos *et al.*, 2007) ข้อดีของระบบนี้คือ สามารถเพิ่มขนาดและปริมาณของภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อและอาหารเหลว รวมทั้งใช้งานได้สะดวก (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ระบบ TIBs ที่พัฒนาโดย Docus และคณะ

ในปี พ.ศ. 2550 บริษัท ไพฑูรย์สะพลี จำกัด ได้พัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงที่ใช้แรงดันลมในการให้อาหารแบบพีทีเอสไบโอรีแอคเตอร์ (Phototransferase system : PTS Bioreactor) ซึ่ง **ชุดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ** ประกอบด้วยภาชนะใส่ต้นพืชและภาชนะใส่อาหาร (ขวดแก้ว 670 มิลลิลิตร) วางเรียงกันในแนวดิ่งโดยคว่ำขวดบนให้ปากขวดตรงกับขวดล่าง ทั้ง 2 ขวดมีจุกยางปิดและต่อถึงกันด้วยท่อสแตนเลส แต่ละขวดมีท่อระบายอากาศโดยมีกรองอากาศที่ปลายท่อ (ภาพที่ 7) เมื่อใส่เนื้อเยื่อพืชในขวดพืชและใส่อาหารลงในขวดอาหารแล้วต่อท่อลมเข้ากับชุดเพาะเลี้ยง ตั้งเวลาและช่วงเวลาการให้อาหาร เมื่อถึงช่วงเวลาการให้อาหาร ปั๊มจะเริ่มอัดอากาศผ่านน้ำยาฆ่าเชื้อและกรองอากาศเข้าสู่ขวดอาหาร อาหารจะถูกดันขึ้นสู่ขวดพืช เมื่ออาหารถูกส่งขึ้นสู่ขวดพืชทั้งหมด ปั๊มก็จะอัดอากาศต่อเนื่อง ทำให้เกิดฟองอากาศในขวดพืช เป็นการเพิ่มออกซิเจนให้แก่พืช เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาให้อาหาร ปั๊มจะหยุดทำงาน อาหารทั้งหมดจะไหลลงขวดอาหารโดยแรงโน้มถ่วง (ภาพที่ 8)

ภาพที่ 7 ระบบการเพาะเลี้ยงแบบพีทีเอสไบโอรีแอคเตอร์ (PTS Bioreactor)
ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อ บริษัท ไพฑูรย์สะพลี จำกัด



ภาพที่ 8 การทำงานของระบบการเพาะเลี้ยงแบบพีทีเอสไบโอรีแอคเตอร์ (PTS Bioreactor)

บทที่ 4

ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs

ปัจจัยสำคัญในการเลือกใช้ระบบ TIBs ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบไปด้วย 5 ปัจจัย ได้แก่ ระยะเวลาและความถี่ของการให้อาหารเหลวกับเนื้อเยื่อพืช ปริมาณของอาหารเหลว ภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืช การแลกเปลี่ยนอากาศระหว่างในและนอกระบบ และลักษณะของต้นพืชที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยระบบ TIBs

4.1 ระยะเวลาและความถี่ของการให้อาหารเหลวกับเนื้อเยื่อพืช

ระยะเวลาและความถี่ที่ของการให้อาหารเหลวในระบบ TIBs ขึ้นอยู่กับ

4.1.1 ชนิดของพืช เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันฝรั่งระยะเวลาในการให้อาหารเหลวจะค่อนข้างนานและบ่อยกว่าการเพาะเลี้ยงกาแฟและยางพารา (Berthouly *et al*., 1995) โดย Piao *et al*. (2003) ตัดชำข้อมันฝรั่ง และแช่ต้นอ่อนมันฝรั่งในอาหารสูตร MS 12 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 60 นาที จะทำให้มีน้ำหนักยอด และเส้นผ่าศูนย์กลางต้นอ่อนสูงที่สุด ส่วนการชำข้อกาแฟอาราบิก้าในสภาพปลอดเชื้อให้อาหาร 15 นาที ทุก 6 ชั่วโมง ในขณะที่ กาแฟโรบัสต้าให้อาหาร 1 นาที ทุก 6 ชั่วโมง (Berthouly *et al*., 1995)

4.1.2 วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้ เช่น การเพาะเลี้ยงตาข้าง การเพาะเลี้ยงหัวสะสมอาหาร Somatic embryogenesis เป็นต้น

4.1.3 ชนิดและรูปแบบของระบบ TIBs ที่ใช้ เช่น การใช้ระบบ Tilting machines สำหรับเพาะเลี้ยงตาข้างองุ่นเถา (grapevine) มีความถี่ในการให้อาหารโดยการเอียงของเครื่องทุกๆ 30 วินาที

ระยะเวลาที่ชิ้นส่วนพืชจมอยู่ในอาหาร (immersion time) มีผลโดยตรงต่อการฉ่ำน้ำ (hyperhydricity) ของชิ้นส่วนพืช ในการเพาะเลี้ยงตาข้างของ Serviceberry โดยให้อาหารเหลวเป็นเวลา 5 นาที ทุก 30 นาที พบว่าชิ้นส่วนตาข้างมีอาการฉ่ำน้ำมากกว่าการให้อาหารเหลวเป็นเวลา 5 นาที ทุก 60 นาที (Krueger *et al*., 1991) การเพิ่มระยะเวลาในการให้อาหารมากขึ้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาแฟอาราบิก้าด้วยวิธี somatic embryogenesis มีแนวโน้มทำให้ได้ต้นอ่อนที่มีอาการฉ่ำน้ำมากขึ้น โดยการให้อาหารครั้งละ 15 นาที 2 ครั้งต่อวันจะพบต้นอ่อนมีอาการฉ่ำน้ำ 64 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าให้อาหาร 6 ครั้งต่อวัน อาการฉ่ำน้ำจะเพิ่มเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ (Berthouly and Etienne, 2002)

การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชแต่ละชนิด ต้องการระยะเวลาและความถี่ในการให้อาหารแตกต่างกัน เช่น ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงตาข้าง Serviceberry การให้อาหารเหลว 5 นาที ทุก 30 นาที ให้ผลในการเจริญเติบโตได้ดี เพราะตาข้างต้องการสารอาหารมากในการเจริญเติบโต หลังจากได้ตาข้างจำนวนมากพอแล้ว จะให้อาหารเหลว 5 นาที ทุก 60 นาที เพื่อเพิ่มคุณภาพตา

ข้างที่ได้ เนื่องจากการให้อาหารเหลวที่ความถี่น้อยลงนั้น ชิ้นส่วนพืชจะมีเวลานานขึ้นในการนำสารอาหารที่ได้ไปใช้ และลดอาการฉ่ำน้ำก่อนนำออกอนุบาล สำหรับการเพาะเลี้ยงกาแฟโดยใช้วิธี somatic embryogenesis นั้นระยะเวลาและความถี่ของการให้อาหารเหลวในแต่ละขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงมีความแตกต่างกัน ในช่วงแรกที่กระตุ้นให้ใบเลี้ยงของเอมบริโอเจริญเติบโต (germination embryos) ให้อาหารเหลว 15 นาที ทุก 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะชักนำให้เอมบริโอมีการพัฒนาของใบจริงโดยให้อาหารเหลว 1 นาทีทุก 24 ชั่วโมง (Berthouly *et al.*, 1995)

ระยะเวลาและความถี่ของการให้อาหาร ยังส่งผลต่อการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต ทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ พบว่าการเพาะเลี้ยงตาข้างของสน (pine) โดยการให้อาหารเหลวทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 2 ครั้ง จะให้น้ำหนักสดมากกว่า 1.2 เท่า และคุณภาพของตาข้างดีกว่า 1.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการให้อาหารทุก 2 หรือ 4 สัปดาห์ (Aitken-Christie and Jones, 1987) ส่วนการเพาะชำกาแฟในสภาพปลอดเชื้อ (microcuttings) นั้น ระยะเวลาการให้อาหารเหลวมีผลต่อการเพิ่มจำนวนข้อเป็นทวีคูณเมื่อเพาะเลี้ยง 6 สัปดาห์ โดยเมื่อเพิ่มระยะเวลาการให้อาหารจาก 1 นาที เป็น 15 นาที ทุก 6 ชั่วโมง พบอัตราการเพิ่มของจำนวนข้อ จาก 3.5 เท่า เป็น 8.4 เท่า ในพืชหัว เช่น ปทุมมา การให้อาหารเหลวครั้งละ 1 นาที วันละ 6 ครั้ง ให้จำนวนต้นจิ๋ว (plantlets) เพิ่มขึ้นมากที่สุดถึง 1,469 ต้น ในขณะที่การให้อาหารเหลวครั้งละ 15 นาที วันละ 2 ครั้ง ให้จำนวนต้นจิ๋วเพียง 86 ต้นเท่านั้น (นพมณี และคณะ, 2548)

4.2 ปริมาณของอาหารเหลว

ปริมาณของอาหารเหลวที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยใช้ระบบ TIBs ต้องมีความเหมาะสมกับปริมาณของชิ้นส่วนพืชที่จะทำการเพาะเลี้ยง และขึ้นกับ

4.2.1 ชนิดของพืชและวิธีการเพาะเลี้ยงที่ใช้ เช่น การเพาะเลี้ยงตาข้างของอ้อย ปริมาณของอาหารเหลวที่ใช้ต่อชิ้นส่วนพืชจะอยู่ที่ 5-50 มิลลิลิตรต่อชิ้นส่วนพืช ปริมาณอาหารเหลวที่เหมาะสมจะทำให้ตาข้างมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น แต่ไม่มีผลต่อการยืดตัวของตาข้าง ในขณะที่ความต้องการอาหารเหลวในการเพาะเลี้ยงตาข้างของสับปะรดจะอยู่ที่ 200 มิลลิลิตรต่อหนึ่งตาข้าง (Lorenzo *et al.*, 1998)

4.2.2 ระบบ TIBs ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ถ้าเป็นระบบที่ไม่มีการเปลี่ยนอาหารตลอดการเพาะเลี้ยง เช่น ระบบ Twin flasks หรือ RITA systems ต้องคำนวณปริมาณอาหารที่เหมาะสมและเพียงพอต่อชิ้นส่วนพืชตลอดการเพาะเลี้ยง เนื่องจากในการเพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนพืชมีการใช้ธาตุอาหาร และผลิตของเสียออกมาปะปนอยู่ในอาหาร หากปริมาณอาหารน้อยเกินไป เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไประยะหนึ่ง อาหารอาจไม่เพียงพอกับความต้องการของพืช แต่ถ้ามีการใส่อาหารมากเกินไป จะทำให้ความเข้มข้นและการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนพืชที่ใช้ลดลง ส่งผลให้การกระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชตอบสนองต่อการทำงานของฮอร์โมนพืชลดลงด้วย (Escalona *et al.*, 1999)

4.3 ภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืช

ภาชนะบรรจุชิ้นส่วนพืชของระบบ TIBs ทุกระบบจะมีขนาดใหญ่เท่าไรก็ได้ขึ้นอยู่กับความสะดวกในการดำเนินงาน โดยสามารถใช้ภาชนะที่มีขนาดตั้งแต่ 1-20 ลิตร การใช้ภาชนะขนาดใหญ่จะเป็นผลดีต่อการเพาะเลี้ยง เนื่องจากทำให้ชิ้นส่วนพืชหรือต้นอ่อนพืชที่เพาะเลี้ยงไม่แออัด ต้นสามารถยืดยาวและพัฒนาได้เต็มที่ นอกจากนั้น ยังทำให้สามารถใช้ภาชนะใส่อาหารที่มีขนาดใหญ่ด้วย

4.4 การแลกเปลี่ยนอากาศระหว่างในและนอกระบบ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยอาหารเหลวในช่วงแรกชิ้นส่วนพืชจะจมอยู่ในอาหารตลอดเวลา การแลกเปลี่ยนอากาศระหว่างในระบบกับภายนอกมีน้อยมาก เนื่องจากผู้ออกแบบระบบไม่ได้คำนึงถึงการแลกเปลี่ยนอากาศ จนกระทั่ง Alvard *et al.* (1993) รายงานผลของการขาดออกซิเจนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยที่ใช้เนื้อเยื่อเจริญในอาหารเหลว ทำให้ชิ้นส่วนขนาดเล็กเจริญเติบโตไม่ดี เป็นผลจากการที่ฟองอากาศในอาหารเหลวไม่มีการไหลเวียนที่ดี ชิ้นส่วนพืชจึงได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอ

ต่อมาเมื่อมีการพัฒนาระบบ TIBs ด้วยการให้เนื้อเยื่อพืชจมในอาหารเหลวเป็นครั้งคราว โดยใช้แรงดันลมผลักดันการไหลของอาหารเหลว ทำให้การหมุนเวียนของอากาศภายในระบบกับภายนอกมีความสมบูรณ์มากขึ้น การแลกเปลี่ยนอากาศเริ่มขึ้นเมื่อมีการให้แรงดันลมไปผลักดันอาหารให้ไหลไปยังภาชนะบรรจุชิ้นส่วนพืชจนหมด หลังจากนั้น อากาศจากปั๊มลมจะไหลเข้าไปแทนที่อาหาร และดันให้อากาศที่มีอยู่ในภาชนะบรรจุชิ้นส่วนพืช รวมถึงอากาศเสียที่ชิ้นส่วนพืชสร้างขึ้นมาไหลออกไปทางช่องกรองอากาศที่อยู่ในภาชนะบรรจุชิ้นส่วนพืช ปกติแล้วภาชนะขนาด 1 ลิตร ใช้เวลา 5 นาที ในการแลกเปลี่ยนอากาศภายในระบบกับภายนอกอย่างสมบูรณ์ การแลกเปลี่ยนอากาศนอกจากทำให้พืชนำอากาศดีไปใช้ในการเจริญเติบโตแล้ว ยังกระตุ้นให้ต้นพืชปรับตัวได้ง่ายขึ้นเมื่อนำต้นพืชออกอนุบาลอีกด้วย

4.5 ลักษณะของต้นพืชที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยระบบ TIBs

4.5.1 ลักษณะทางกายภาพ

การตอบสนองของพืชในแต่ละวิธีการ เช่น วิธี Somatic embryogenesis ของกาแฟ Microcutting ของหน้าวัว เป็นต้น หรือชิ้นส่วนพืชที่เลือกใช้ในการขยายพันธุ์นั้น มีความแตกต่างกัน เช่น การเพาะเลี้ยงตาข้างของสับปะรดนั้น ต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยระบบ TIBs จะเกิดกลุ่มหน่อขนาดเล็กจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น และก้านใบจะมีขนาดเล็กลงด้วยเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็ง การเกิดลักษณะดังกล่าวส่งผลให้ไม่สามารถเก็บเกี่ยวต้นอ่อนได้ในครั้งเดียว เนื่องจากต้นอ่อนบางส่วนมีขนาดเล็กเกินกว่าจะรอดตายจากการอนุบาลในเรือนเพาะชำ และยังเป็นการเพิ่มเวลาในขั้นตอนการเก็บเกี่ยว เนื่องจากผู้เก็บเกี่ยวต้องคัดเลือกต้นที่มี

ขนาดใหญ่เท่านั้น สำหรับในบางพืช เช่น Cow tree และ Serviceberry ต้นอ่อนที่ได้จะมีขนาดที่ยาวและจำนวนใบที่มากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง

การเพาะเลี้ยง Somatic embryo ในระบบ TIBs นั้น ให้ผลตรงข้ามกับการเพาะเลี้ยงตาข้าง ไม่ว่าจะเป็นพืชตระกูลส้ม กาแฟ ยางพารา และกล้วย โดยต้นอ่อนที่ได้ จะมีการพัฒนาของใบเลี้ยงและตายอดที่ดี มีลักษณะทางกายภาพอื่นๆ ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง เช่น ในยางพารา จะได้ต้นอ่อนที่มีลักษณะผิดปกติน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็ง ร้อยละ 50 ซึ่งความแข็งแรงของต้นอ่อน ส่งผลต่ออัตราการรอดตายในเรือนเพาะชำอย่างมาก ลักษณะของต้นอ่อนที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยว คือ มีขนาดต้นไม่น้อยกว่า 4-5 มิลลิเมตร น้ำหนักเพิ่มขึ้นหนึ่งเท่าจากช่วงเริ่มต้น และพื้นที่ของใบเลี้ยงเหมาะสม

4.5.2 ลักษณะทางคุณภาพ

อาการฉ่ำน้ำของต้นพืชจากการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว เป็นสิ่งที่ไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ เนื่องจากต้นพืชได้รับอาหารเหลวบ่อยครั้งหรือบางระบบได้รับอาหารเหลวอย่างต่อเนื่อง เนื้อเยื่อพืชจึงสัมผัสกับอาหารเหลวตลอดเวลาหรือเป็นเวลานาน เซลล์ของพืชจะดูดซับอาหารเหลวเข้าไปในเซลล์ตลอดเวลา เป็นเหตุให้ต้นพืชแสดงอาการใส มองเห็นผลึกน้ำภายในเนื้อเยื่อ เนื้อเยื่อเปราะ แตกหักง่าย ตายอดและใบมีการเจริญเติบโตผิดปกติ ส่งผลถึงอัตราการรอดตายในการอนุบาลต้นพืชในเรือนเพาะชำ

การลดอาการฉ่ำน้ำในต้นพืช สามารถทำได้โดยการเพิ่มอากาศในระบบการเลี้ยง และลดเวลาที่ให้อาหารสัมผัสกับเนื้อเยื่อพืชลง แต่ต้องไม่กระทบต่อความต้องการอาหารของต้นพืช ซึ่งปัจจัยทั้งสองนี้เป็นหลักสำคัญที่ใช้ในการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs โดยการควบคุมความถี่และระยะเวลาการให้อาหาร ให้เพียงพอต่อความต้องการของต้นพืช ในขณะเดียวกันก็ต้องไม่มากเกินไปจนทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดอาการฉ่ำน้ำ จึงควรมีการศึกษาความถี่และระยะเวลาการให้อาหารที่เหมาะสมในแต่ละพืช เพื่อลดการเกิดอาการฉ่ำน้ำ เพื่อให้พืชเจริญเติบโตสูงสุด และลดอัตราการตายของต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยระบบ TIBs ในเรือนเพาะชำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยในระบบ TIBs พบว่า ต้นกล้วยที่ได้ไม่มีอาการฉ่ำน้ำเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวที่ให้อาหารอย่างต่อเนื่อง แม้ว่าในการให้อาหารเหลวนั้นจะมีการเพิ่มฟองอากาศเข้าไปก็ตาม ส่วนการเพาะเลี้ยงตาข้างของ Serviceberry ในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs ที่มีการให้อาหาร 30 วินาที ทุก 5 นาที พบว่าต้นพืชที่ได้มีอาการฉ่ำน้ำมากกว่าต้นพืชที่มีการให้อาหาร 5 นาที ทุกชั่วโมง โดยพบต้นพืชมีอาการที่เนื้อเยื่อโปร่งแสง ใบและลำต้นหนาและแตกหักง่าย

การเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs เป็นเวลานานทำให้พืชมีโอกาสเกิดการฉ่ำน้ำมากขึ้น เช่น ในการเพาะเลี้ยงยอดสน พืชจะมีการเจริญเติบโตไม่สม่ำเสมอ มีการแตกหน่อใหม่ ทำให้ต้อง

เพาะเลี้ยงในระบบ TIBs เป็นเวลานาน และต้องเก็บเกี่ยวต้นที่มีการเจริญเติบโตเพียงพอที่จะย้ายไปอนุบาลในโรงเรือนเป็นระยะๆ นั้น พบต้นพืชมีอาการฉ่ำน้ำในการเก็บเกี่ยวครั้งแรกเพียง 7 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มขึ้นเป็น 59 เปอร์เซ็นต์ ในการเก็บเกี่ยวครั้งที่ 8 โดยต้นสนมีอาการฉ่ำน้ำมากในส่วนบริเวณส่วนล่างของภาชนะบรรจุต้นพืชมากกว่าส่วนบนของภาชนะ

ในการเพาะเลี้ยงกาแฟแบบตัดชำในระบบ TIBs ช่วงแรกที่มีการให้อาหาร 15 นาที ทุก 6 ชั่วโมง ไม่พบต้นกาแฟมีอาการฉ่ำน้ำ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น กลับพบอาการฉ่ำน้ำ ซึ่งเมื่อลดเวลาการให้อาหารเป็น 1 นาที ทุกชั่วโมง อาการฉ่ำน้ำของต้นกาแฟลดลง ลักษณะอาการฉ่ำน้ำนี้พบเช่นเดียวกันในการเพาะเลี้ยงกาแฟด้วยวิธี Somatic embryogenesis ใน TIBs ในขั้นตอนเพาะเลี้ยงแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นพืช เมื่อลดเวลาการให้อาหารจาก 15 นาที ทุก 6 ชั่วโมง เป็น 1 นาที ทุก 6 ชั่วโมง ทำให้อาการฉ่ำน้ำของต้นกาแฟลดลง

4.5.3 การปรับสภาพต้นอ่อนพืช ในระบบ TIBs ก่อนการย้ายปลูก

ตัวชี้วัดความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอีกประการหนึ่งคือ อัตราการรอดตายของต้นพืชหลังการย้ายปลูกในเรือนเพาะชำ เนื่องจากภายใต้สภาพการเพาะเลี้ยงในระบบปลอดเชื้อที่มีความชื้นสูง ต้นพืชจะมีปากใบจำนวนมาก การนำต้นพืชมาสู่สภาพธรรมชาติ จึงต้องเตรียมต้นพืชให้สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพการเจริญเติบโตในเรือนเพาะชำได้ ซึ่งจะส่งผลให้อัตราการรอดตายของต้นพืชสูงขึ้น

การปรับสภาพต้นพืชในระบบ TIBs นั้นทำได้โดยการลดเวลา และความถี่ในการให้อาหารลง รวมทั้งอาจงดให้อาหารก่อนการย้ายปลูกสู่เรือนเพาะชำ 1-2 สัปดาห์ การปรับสภาพต้นอ่อนสับปะรดที่มีขนาด 6 เซนติเมตร ขึ้นไป ทำให้อัตราการรอดตายในเรือนเพาะชำสูงถึง 90 - 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนต้นที่มีขนาดเล็กกว่า 6 เซนติเมตร ยังสามารถเพาะเลี้ยงต่อไปให้มีขนาดใหญ่ได้

บทที่ 5

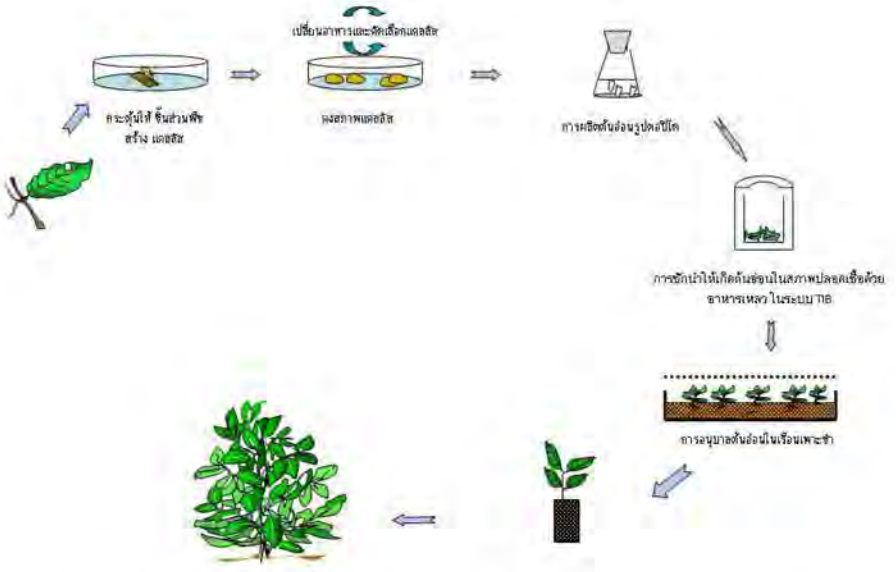
พืชที่ประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์โดยใช้ระบบ TIBs

5.1 กาแฟโรบัสต้า

การขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้า ปกติจะใช้วิธีการปักชำหรือเสียบยอด เพื่อให้ได้ต้นที่ตรงตามพันธุ์เดิมมากที่สุด แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ จำเป็นต้องมีต้นแม่พันธุ์จำนวนมากเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ปริมาณมาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเซลล์ร่างกายให้พัฒนาเป็นต้นอ่อนหรือตัวอ่อนโดยไม่มีเซลล์พันธุกรรมมาเกี่ยวข้อง (somatic embryogenesis) จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าให้ได้ปริมาณมากและตรงตามพันธุ์ในเวลาจำกัด

การขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าที่ศูนย์วิจัยพืชสวน (ศวส.) ชุมพรดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน สามารถแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ การผลิตต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ และการย้ายปลูกสู่สภาพธรรมชาติ

การผลิตต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อเป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบกาแฟในห้องปฏิบัติการ แบ่งออกเป็นขั้นตอนย่อยดังนี้ (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาแฟโรบัสต้าด้วยวิธี Somatic embryogenesis

1. การชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของใบ (explant)

ใบกาแฟที่จะนำมาเตรียมเป็น explant ควรเป็นใบไม่อ่อนไม่แก่จนเกินไป มักเป็นใบยอดคู่แรกที่คลี่เต็มที่แล้ว ใบสมบูรณ์เป็นมัน ไม่ฉีกขาดหรือบิดเบี้ยว ไม่มีโรคและแมลง ตัดใบกาแฟจากต้นแม่พันธุ์ที่คัดเลือกไว้ เก็บในถุงพลาสติกเพื่อรักษาความชื้น เมื่อถึงห้องปฏิบัติการ นำใบกาแฟมาทำความสะอาดในน้ำสบู่ (detergent) แล้วล้างด้วยน้ำไหลให้สะอาด ก่อนจุ่มใบลงในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 30 วินาที และนำไปแช่ในสารละลาย Calcium hypochlorite ($CaCl_2O_2$) เข้มข้น 40% ประมาณ 30 นาที ล้างในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

นำใบกาแฟที่ได้มาตัดแต่งให้มีขนาดประมาณ 3X3 มิลลิเมตร โดยใช้เฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อใบเท่านั้น วางชิ้นส่วนใบที่ตัดแต่งแล้วบนจานเลี้ยงเนื้อเยื่อที่บรรจุอาหาร 23A (ภาคผนวก 1) ใช้พาราฟิล์มพันรอบปากจาน 2 รอบ เก็บในที่มืด อุณหภูมิประมาณ 23 - 26 องศาเซลเซียส และทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 เดือน หลังจากนั้นประมาณ 8 – 10 เดือน จะพบกลุ่มเนื้อเยื่อ (แคลลัส) สร้างขึ้นบริเวณขอบชิ้นส่วนใบ (ภาพที่ 10)

ภาพที่ 10 ชิ้นส่วนใบที่มีการพัฒนาของแคลลัสภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 – 10 เดือน

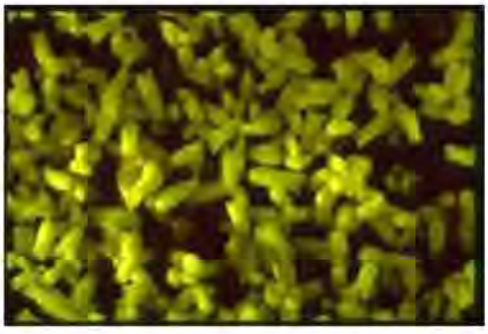
2. การคัดเลือกและคงสภาพแคลลัส

เราสามารถเลี้ยงแคลลัสที่ได้ให้คงสภาพเหมือนกับมีการชักนำให้เกิดแคลลัส จากชิ้นส่วนใบ โดยการคัดเลือกแคลลัส ที่มีลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง และมีศักยภาพสูงในการสร้างเป็น torpedo embryo ซึ่งจะเรียกแคลลัสนี้ว่า embryogenic callus (ภาพที่ 11) จากนั้นนำ embryogenic callus ไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง 23A ลักษณะแคลลัสที่ดีจะเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อที่อัดตัวกันค่อนข้างแน่น แต่มีความยืดหยุ่น (friable) มีสีเขียวอ่อน ส่วน embryogenic callus ที่มีสีน้ำตาล หรือสีขาวเนื้อเยื่อนิ่ม ฉ่ำน้ำ หรือเป็นก้อนแข็ง (nodule) เป็นลักษณะ แคลลัสที่ไม่ดี ควรกำจัดออก ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 6 – 8 สัปดาห์ ทุกครั้งที่เปลี่ยนอาหารควรทำการคัดเลือกแคลลัสด้วยกล้องจุลทรรศน์ ไม่ควรเก็บ embryogenic callus นานเกิน 18 เดือน เนื่องจาก embryogenic callus จะอ่อนแอและเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตช้า

ภาพที่ 11 embryogenic callus

3. การผลิตต้นอ่อนรูปตอปิโด (torpedo embryo production)

เมื่อได้ embryogenic callus ที่ดีในปริมาณเพียงพอที่จะผลิตต้นอ่อนรูปตอปิโดแล้ว เตรียมอาหาร 23 MS (ภาคผนวก 1) 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร สัปดาห์ที่ 1 เลือก embryogenic callus ปริมาณ 0.05 – 0.2 กรัม ใส่ลงในขวดอาหารที่เตรียมไว้ วางขวดรูปชมพู่บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 110 – 120 รอบต่อนาที ให้แสง 0.1 - 0.6 กิโลลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ในสัปดาห์ที่ 3 นำ embryogenic callus ที่เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด มาถ่ายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ที่ใส่อาหารเหลว 500 มิลลิลิตร จากนั้นวางขวดบนเครื่องเขย่าเพื่อให้ได้รับออกซิเจนตลอดเวลา เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลาประมาณ 11 – 13 สัปดาห์ ต้นอ่อนรูปตอปิโดจะมีขนาดใหญ่พอที่จะเก็บเกี่ยวได้ (ภาพที่ 12) วางต้นอ่อนรูปตอปิโดที่เก็บเกี่ยวได้บนกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำให้แห้งอย่างช้าๆ เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ ต้นอ่อนรูปตอปิโดเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียว ก่อนนำไปเลี้ยงในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 12 ต้นอ่อนรูปตอปิโด

การชักนำให้เกิดต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ (Pre-germination and germination) เป็นการนำต้นอ่อนรูปตอปิโดมาเลี้ยงในอาหารแข็ง DES1 (ภาคผนวก 1) ที่เตรียมไว้ในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 14 เซนติเมตร หรือสามารถนำต้นอ่อนรูปตอปิโดไปเลี้ยงในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs เพื่อให้พัฒนาเป็นต้นอ่อนที่มีใบเลี้ยงและระบบรากที่แข็งแรงพร้อมที่จะย้ายปลูกในเรือนอนุบาลต่อไป

จากการศึกษาระบบ TIBs แบบต่างๆ รวมทั้งแบบของภาชนะที่ใช้ในการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้า สามารถจำแนกได้เป็น 3 ระบบ คือ

1. ระบบ TIBs แบบใช้เครื่องปั๊มอากาศ ประกอบด้วยขวดแก้วสองใบ ใบแรกเป็นขวดใส่ต้นพืชขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร ใบที่สองเป็นขวดบรรจุอาหารมีปริมาตร 2 ลิตร วางขวดบรรจุอาหารและขวดบรรจุต้นพืชต่างระดับกัน เชื่อมต่อขวดทั้งสองด้วยสายยางซิลิโคน (ภาพที่ 6) เมื่อต้องการให้อาหาร ปั๊มลมจะทำงานโดยให้แรงดันลมดันอาหารจากขวดบรรจุอาหารที่วางอยู่ต่ำกว่าขวดบรรจุต้นพืช ให้วิ่งขึ้นไปสู่ขวดบรรจุต้นพืช อาหารจะสัมผัสถูกต้นพืชโดยตรง ในการให้อาหารนั้นจะมีอากาศผ่านเข้ามาพร้อมกับอาหารด้วย ทำให้อากาศในขวดบรรจุต้นพืชมีการถ่ายเทแลกเปลี่ยนกับอากาศภายนอก เมื่อให้อาหารตามเวลาที่กำหนดแล้ว ปั๊มลมจะหยุดทำงาน อาหารที่อยู่ภายในขวดบรรจุต้นพืชจะไหลกลับลงสู่ขวดบรรจุอาหารที่วางอยู่ข้างล่างตามหลักของแรงโน้มถ่วง ระบบนี้มีข้อดีและข้อจำกัดของการใช้งานดังนี้

ข้อดี

1. อุปกรณ์ของระบบนี้สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ทั้งหมด โดยการฆ่าเชื้อด้วยระบบไอน้ำแรงดันสูง (Autoclave) ซึ่งเป็นระบบที่ใช้ฆ่าเชื้อทั่วไปในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. การเปลี่ยนอาหารทำได้ง่าย รวดเร็ว และใช้แรงงานน้อย
3. สามารถต่อเข้ากับระบบการให้อาหารแบบอัตโนมัติได้
4. การประกอบอุปกรณ์ต่างๆ เพื่อใช้งานทำได้ง่าย
5. การเก็บเกี่ยวต้นอ่อนทำได้ง่ายและต้นไม่บอบช้ำ
6. อัตราการปนเปื้อนของเชื้อต่ำ

ข้อจำกัด

1. อุปกรณ์ที่เป็นเครื่องแก้วต้องผลิตจากแก้วที่ทนต่อความร้อนและแรงดันสูงได้
2. ส่วนที่ใส่ต้นพืชเป็นภาชนะทรงกลม เนื่องจากข้อจำกัดของการขึ้นรูปภาชนะที่เป็นเครื่องแก้ว ทำให้ต้นพืชได้รับแสงไม่สม่ำเสมอ โดยต้นพืชที่อยู่รอบนอกและส่วนบนจะได้รับแสงมากกว่าต้นพืชที่อยู่ตรงกลาง เป็นเหตุให้การเจริญเติบโตของต้นพืชไม่มีความสม่ำเสมอกัน
3. ผู้ประกอบระบบต้องมีความระมัดระวังและได้รับการฝึกอบรมการใช้งานระบบมาอย่างดี เพราะอุปกรณ์ต่างๆ แตกหักเสียหายได้ง่าย
4. พื้นที่เพาะเลี้ยงถูกจำกัดตามขนาดของขวดแก้ว ทำให้การเพิ่มพื้นที่เพาะเลี้ยงโดยผู้เพาะเลี้ยงเองทำได้ยาก

2. ระบบ TIBs แบบใช้เครื่องปั๊มอากาศที่ภาชนะบรรจุต้นพืชทำมาจากกล่องพลาสติกโพลีคาร์บอเนตสี่เหลี่ยมห่อหุ้มด้วยถุงพลาสติกที่ทำจากโพลีเอทิลีนความหนา 152 ไมโครเมตร สำหรับภาชนะที่สองเป็นขวดแก้วบรรจุอาหารมีปริมาตร 5 ลิตร เพื่อเพิ่มพื้นที่ภาชนะบรรจุต้นพืชและเพิ่มพื้นที่รับแสง โดยวางขวดบรรจุอาหารและภาชนะบรรจุต้นพืชต่างระดับกัน เชื่อมต่อภาชนะ

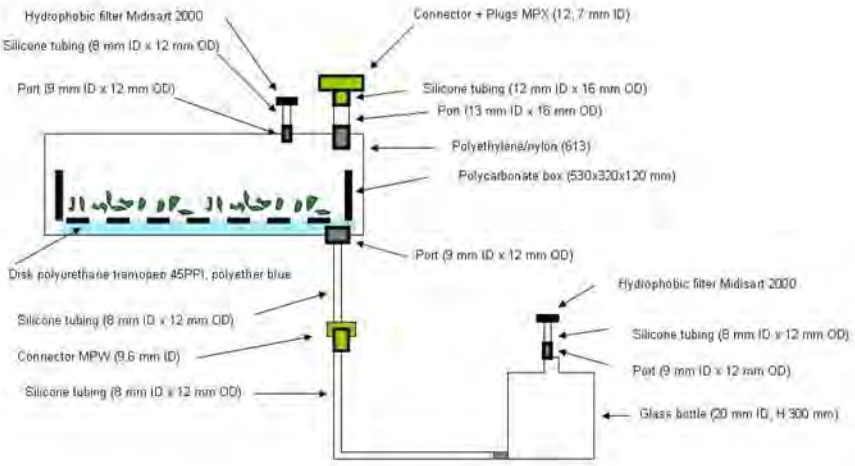
ทั้งสองด้วยสายยางซิลิโคน (ภาพที่ 13) การให้อาหารใช้ระบบแรงดันลมเช่นเดียวกับระบบที่ 1 ระบบนี้มีข้อดีและข้อจำกัดการใช้งานดังนี้

ข้อดี

1. มีพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงมาก และสามารถเพิ่มพื้นที่เพาะเลี้ยงได้ไม่จำกัด โดยผู้เพาะเลี้ยงสามารถประกอบอุปกรณ์ได้ด้วยตนเอง
2. เนื่องจากพื้นที่ของกล่องเป็นแบบสี่เหลี่ยมแบนราบ ดังนั้นต้นพืชส่วนใหญ่มีโอกาสได้รับแสงสม่ำเสมอ ทำให้มีการเจริญเติบโตดี
3. เปลี่ยนอาหารง่าย ใช้แรงงานน้อย
4. สามารถต่อเข้ากับระบบการให้อาหารแบบอัตโนมัติได้

ข้อจำกัด

1. ผู้ดำเนินการต้องใช้ความระมัดระวังอย่างสูงในการประกอบอุปกรณ์ที่ใส่ต้นพืช เพื่อไม่ให้มีรอยรั่วในการเชื่อมต่ออุปกรณ์ทุกอย่าง เพราะจะเป็นเหตุให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อได้
2. เนื่องจากถุงที่ใช้ใส่กล่องพลาสติกนั้นต้องเป็นพลาสติกชนิดโพลีเอทิลีน ซึ่งมีความทนทานแรงดันลมในการให้อาหารแต่ละครั้ง แต่พลาสติกชนิดนี้ไม่สามารถนำไปฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำสูงได้ ต้องใช้การฉายรังสีในการฆ่าเชื้อภาชนะบรรจุต้นพืช ดังนั้นผู้เพาะเลี้ยงจึงต้องมีเครื่องมือที่ใช้ในการฉายรังสีเพื่อฆ่าเชื้ออุปกรณ์
3. ต้องมีการควบคุมแรงดันลมในการให้อาหารแต่ละครั้ง เพื่อป้องกันการเกิดรอยรั่วของอุปกรณ์
4. ภาชนะบรรจุต้นพืชสามารถใช้งานได้เพียงครั้งเดียว ไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ทำให้ต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูง



ภาพที่ 13 ระบบ TIBs แบบใช้เครื่องปั๊มอากาศ ชนิดที่ภาชนะบรรจุต้นพืชทำจากกล่องพลาสติก

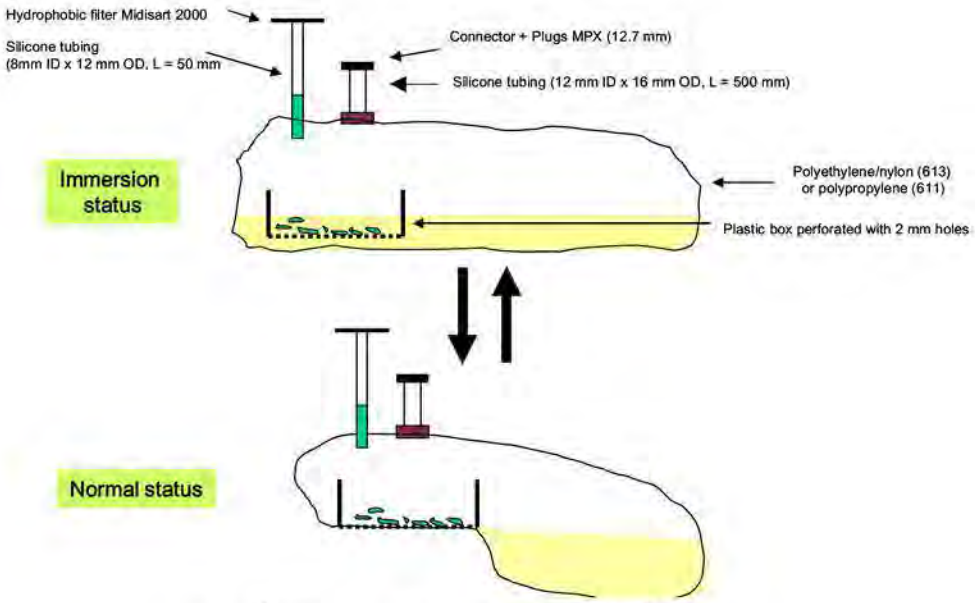
3. ระบบ TIBs แบบไม่ใช้เครื่องปั๊มอากาศ ที่มีแนวคิดให้มีการใช้งานง่าย อุปกรณ์ไม่มาก การทำงานไม่ซับซ้อน ประกอบขึ้นจากกล่องพลาสติกบรรจุในถุงพลาสติกที่มีขนาดใหญ่กว่ากล่องประมาณเท่าตัว เวลาให้อาหารก็เพียงปรับระดับกล่องให้อยู่ในระนาบเดียวกับระดับอาหาร เมื่อไม่ให้อาหารก็ยกกล่องให้สูงกว่าระดับอาหาร (ภาพที่ 14) ซึ่งระบบ TIBs แบบนี้มีข้อดีและข้อจำกัดการใช้งานดังนี้

ข้อดี

1. ราคาถูก ระบบใช้งานง่าย ไม่ซับซ้อน ผู้เพาะเลี้ยงสามารถผลิตระบบได้ด้วยตนเอง
2. ระบบการให้อาหารทำได้ง่าย ผู้เพาะเลี้ยงที่ไม่มีเครื่องปั๊มอากาศ ก็สามารถใช้งานระบบนี้ได้
3. อัตราการปนเปื้อนเชื้อในระหว่างการใช้งานต่ำ เพราะไม่มีการเปลี่ยนอาหาร
4. การฆ่าเชื้อสามารถทำได้ทั้งการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงและการใช้รังสี การเลือกวิธีการฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดของพลาสติกที่นำมาใช้งาน เนื่องจากระบบนี้ ไม่ต้องการพลาสติกที่มีความเหนียวมากนัก เพราะในการให้อาหารไม่ต้องใช้แรงดันลม ทำให้สามารถเลือกใช้พลาสติกชนิดโพลีโพไพลีน ที่มีความเหนียวน้อยกว่าโพลีเอทิลีน แต่ทนต่อการฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูงได้

ข้อจำกัด

1. ระบบนี้ไม่สามารถเปลี่ยนอาหารตลอดการเพาะเลี้ยงได้ หรือถ้าเปลี่ยนได้ก็มีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนเชื้อ เนื่องจากวิธีการเปลี่ยนอาหารค่อนข้างยุ่งยาก ทำให้ระบบนี้ไม่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงต้นพืชที่ใช้เวลาในการเจริญเติบโตในระบบ TIBs มากกว่าหนึ่งเดือน
2. การแลกเปลี่ยนอากาศของระบบนี้ไม่ดี เนื่องจากไม่มีการให้อากาศใหม่เข้าไปในระบบที่จะทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนอากาศได้ เป็นเหตุให้เกิดการสะสมของก๊าซต่างๆที่พืชขับออกมาระหว่างการเจริญเติบโต เช่น เอทิลีน หากมีการสะสมมากเกินไป จะเป็นพิษต่อพืช



ภาพที่ 14 ระบบ TIBs แบบไม่ใช้เครื่องปั๊มอากาศ

เมื่อเปรียบเทียบระบบ TIBs ทั้งสามระบบในการผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้า (ตารางที่ 2) พบว่าระบบ TIBs ที่ใช้ปั๊มอากาศโดยมีกล่องพลาสติกใส่ต้นพืช มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยต้นอ่อนรูปตอปิโดหนึ่งกรัมสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนได้ถึง 297 ต้น ในขณะที่ระบบ TIBs แบบไม่ใช้ปั๊มอากาศมีประสิทธิภาพต่ำสุด

ตารางที่ 2 จำนวนของต้นอ่อนกาแฟโรบัสต้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระยะ pregerminated ในระบบ TIBs ชนิดต่างๆ

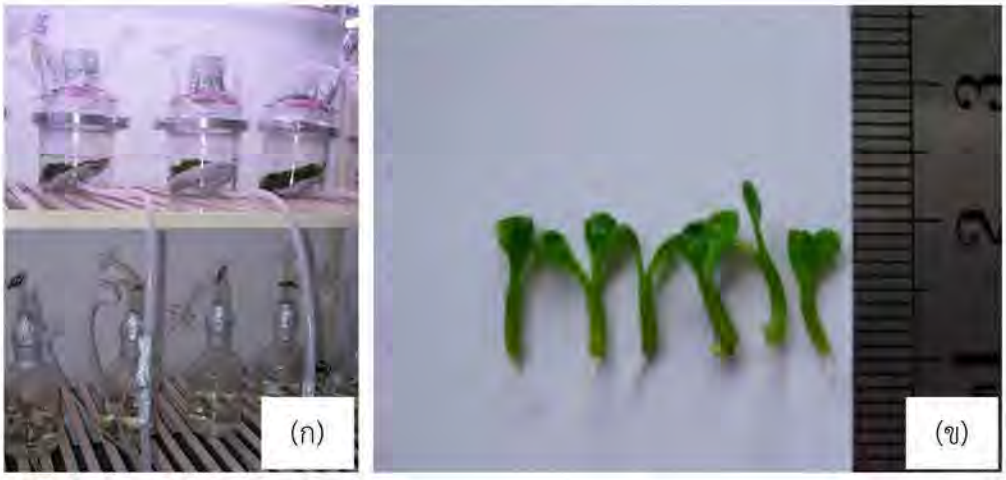
ระบบ TIBs	สายพันธุ์กาแฟ	นน. เริ่มต้นของต้นอ่อนรูปตอปิโด (กรัม)	จำนวนต้นอ่อนที่เก็บเกี่ยวได้ (ต้น)	ประสิทธิภาพการเปลี่ยนต้นอ่อนรูปตอปิโดเป็นต้นอ่อน (กรัม : ต้น)
ใช้ปั๊มอากาศขวดแก้วใส่ต้นพืช	FRT 23	10	2,200	1 : 220
	FRT 27	10	1,400	1 : 140
	FRT 65	10	1,300	1 : 130
ใช้ปั๊มอากาศกล่องพลาสติกใส่ต้นพืช	FRT 23	90	26,800	1 : 297
ไม่ใช้ปั๊มอากาศ	FRT 23	10	700	1 : 70
	FRT 27	10	550	1 : 55

ที่มา : Chantanumut (2005) และ ประภาพรและยุพิน (2551)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเปลี่ยนต้นอ่อนรูปตอปิโดเป็นต้นอ่อน ข้อดีและข้อจำกัดของระบบ TIBs แต่ละแบบที่ทดลองใช้ในการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าในระยะ pregermination แล้ว ศวส. ชุมพร ได้เลือกใช้ระบบ TIBs แบบใช้ปั๊มอากาศขวดแก้วใส่ต้นพืชในการผลิตต้นกล้ากาแฟโรบัสต้า ตั้งแต่เดือน กรกฎาคม 2550 เนื่องจากสามารถใช้กับระบบการฆ่าเชื้อที่ศูนย์ฯ ใช้งานอยู่ จนถึงเดือนธันวาคม 2555 สามารถผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้าสายพันธุ์ดี 6 สายพันธุ์ ได้จำนวนต้นอ่อนที่ทำการย้ายปลูกในเรือนเพาะชำจำนวน 218,000 ต้น (ตารางที่ 3 และภาพที่ 15)

ตารางที่ 3 จำนวนต้นอ่อน (plantlet) และสายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าที่ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรผลิตจาก TIBs แบบใช้ปั๊มอากาศขวดแก้วใส่ต้นพืช ตั้งแต่กรกฎาคม 2550 - ธันวาคม 2555

สายพันธุ์กาแฟ	การเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs (ครั้ง)	จำนวนต้นอ่อน (ต้น)
FRT 27	2	1,400
FRT 23	25	86,700
FRT68	2	2,600
FRT 65	20	36,500
FRT 09	41	90,800
รวมทั้งหมด	90	218,000



ภาพที่ 15 ระบบ TIBs แบบใช้ปั๊มอากาศขวดแก้วบรรจุต้นพืช (ก) และต้นอ่อนกาแฟโรบัสต้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยง (ข)

5.2 กล้วยไม้สกุลแวนด้า

กล้วยไม้สกุลแวนด้า (Vanda) เป็นหนึ่งในสกุลกล้วยไม้ที่ได้รับความนิยมเลี้ยง สามารถปลูกได้ดีในทุกพื้นที่ของไทย แวนด้าบางสายพันธุ์มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย เช่น ฟ้ามุ่ย ทำให้กล้วยไม้สกุลแวนด้าได้รับความนิยมจากผู้พัฒนาสายพันธุ์ ให้มีสายพันธุ์ใหม่ๆ เพื่อเพิ่มทางเลือก

ให้แก่เกษตรกรผู้ปลูกเลี้ยง โดยทั่วไปการขยายพันธุ์กล้วยไม้แวนด้าลูกผสมใหม่ๆ จะใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารกึ่งแข็ง ซึ่งใช้เวลานานกว่าจะได้ต้นอ่อน จึงเป็นข้อจำกัดในการขยายพันธุ์กล้วยไม้ในเชิงอุตสาหกรรม จึงมีการศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้าพันธุ์เหลืองสุรัชและลุมพินีเรด ด้วยอาหารเหลวในระบบ TIBs โดยมีขั้นตอนการดำเนินการดังนี้

1. กระตุ้นให้เกิดเนื้อเยื่อ

นำใบอ่อนของกล้วยไม้เหลืองสุรัชและลุมพินีเรด (ภาพที่ 16) ไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร Modified MS ใบอ่อนของกล้วยไม้ทั้งสองพันธุ์ จะสร้างกลุ่มเนื้อเยื่อและ Direct embryo ด้วยใช้เวลาประมาณ 120 วัน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร NDM (ภาคผนวก 2) เพื่อให้กลุ่มเนื้อเยื่อกลายเป็นโปรโตคอร์ม (Protocorms) ปริมาณมาก ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 45 – 50 วัน โดยทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อในที่มืด

(ก) (ข)

ภาพที่ 16 ลักษณะของกลุ่มเนื้อเยื่อที่สร้างจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนแวนด้าลุมพินีเรด (ก) และเหลืองสุรัช (ข)

2. การเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs

เมื่อได้โปรโตคอร์มปริมาณเพียงพอที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวด้วย TIBs (ภาพที่ 17) แบบใช้ปั๊มอากาศขวดแก้วบรรจุชิ้นส่วนพืช ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร เตรียมอาหารสูตร Modified MS3 ปริมาณ 1 ลิตรต่อโปรโตคอร์ม 30 กรัม เปลี่ยนอาหารเหลวทุกเดือน โปรโตคอร์มจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเขียวเมื่อได้รับแสง มีการขยายขนาดและเพิ่มปริมาณมากขึ้นภายใน 2 เดือน โปรโตคอร์มจะเพิ่มปริมาณจาก 30 กรัม เป็น 320 กรัม ทำการเก็บเกี่ยวรอบที่ 1 จะได้โปรโตคอร์มและต้นอ่อนขนาดเล็ก ซึ่งส่วนใหญ่ยังไม่สามารถนำไปอนุบาลได้ แบ่งโปรโตคอร์มจำนวน 50 กรัม ออกมาเลี้ยงในระบบ TIBs ต่อเป็นเวลาประมาณ 2 เดือน จะพบการพัฒนาเป็นต้นอ่อนเพิ่มมากขึ้น ต้นอ่อนส่วนใหญ่จะเจริญบนผิวหน้าตัดของขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อและมีระบบรากที่แข็งแรง สามารถเก็บเกี่ยวต้นอ่อนในรอบที่ 2 ได้ 378 กรัม สุ่มต้นอ่อนน้ำหนัก 20 กรัม นำมาแยกเป็นต้นขนาดต่างๆ ได้ 3 ขนาด คือ ความยาวมากกว่า 2 เซนติเมตรขึ้นไป ความยาว 1-2 เซนติเมตร และความยาวน้อยกว่า 1 เซนติเมตร รวมกับส่วนที่ยังเป็นโปรโตคอร์มอยู่

เมื่อนำต้นอ่อนขนาดเล็กรวมกับโปรโตคอร์มบางส่วนที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้จากการเก็บเกี่ยวครั้งที่ 2 น้ำหนัก 100 กรัม เลี้ยงใน TIBs อีกเป็นเวลา 2 เดือน จึงทำการเก็บเกี่ยวครั้งที่ 3 ซึ่งจะได้ต้นกล้วยไม้ขนาดใหญ่มากกว่าการเก็บเกี่ยวครั้งที่ 2 เมื่อนำมาคัดขนาดต้นสามารถแยกออกได้เป็น 5 ขนาด พบต้นตกเกรดและต้นที่มีลักษณะคล้ายกลายพันธุ์คิดเป็น 3.11 และ 7.53 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก (ภาพที่ 18) ต้นกล้ากล้วยไม้ที่ได้จากการเลี้ยงในระบบนี้มีลักษณะแข็งแรงและไม่มีอาการฉ่ำน้ำ

ภาพที่ 17 การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้าในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs

ภาพที่ 18 กล้วยไม้สกุลแวนด้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs ที่นำไปอนุบาลในเรือนเพาะชำ

3. ความหนาแน่นของโปรโตคอร์มเริ่มต้น

ความหนาแน่นของ โปรโตคอร์มเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงแวนดาพันธุ์ JK315 ในระบบ TIBs ในอาหารเหลวสูตร NDM และเติม activated carbon 0.5 g/l โดยใช้ inoculums density 3 ระดับ ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที เปลี่ยนอาหารเดือนละครั้ง พบว่า ที่ความหนาแน่น 40 กรัม จะให้ต้นที่มีขนาดใหญ่และกลางรวมกันถึง 37 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) ซึ่งต้นขนาดใหญ่และขนาดกลางนี้เมื่อนำออกไปอนุบาลในเรือนเพาะชำจะรอดตายทั้งหมด และมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่าต้นขนาดเล็ก และขนาดต้นที่ได้นั้นจะแปรผันตามขนาดโปรโตคอร์มเริ่มแรกในขณะที่จำนวนต้นจะแปรผกผัน

ตารางที่ 4 น้ำหนัก ขนาดและจำนวนต้นอ่อนกล้วยไม้แวนดา JK 315 ที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIBs ด้วยความหนาแน่นของโปรโตคอร์มเริ่มต้นต่างกัน ในอาหารสูตร NMD เป็นเวลา 4 เดือน

น้ำหนักโปรโตคอร์ม (ก)	ขนาด และจำนวนต้นหลังเก็บเกี่ยว									รวม (ต้น)
	เล็ก			กลาง			ใหญ่			
	น้ำหนัก (ก)	จำนวน (ต้น)	เปอร์เซ็นต์	น้ำหนัก (ก)	จำนวน (ต้น)	เปอร์เซ็นต์	น้ำหนัก (ก)	จำนวน (ต้น)	เปอร์เซ็นต์	
30	18.33	165	66.80	24.95	50	20.24	31.76	32	12.96	247
40	19.26	173	63.37	29.94	60	10.97	39.78	40	14.65	273
50	33.04	297	64.57	64.44	129	28.04	33.96	34	7.39	460

5.3 หน้าวัวลูกผสม

หน้าวัวเป็นไม้ตัดดอกเมืองร้อนที่ได้รับความนิยมและมีบทบาททางเศรษฐกิจเพิ่มขึ้น ประเทศไทยมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมในการผลิตหน้าวัวเพื่อตัดดอกและเป็นไม้กระถาง มีพื้นที่ปลูกกระจายตามภาคต่างๆ ประมาณ 150 ไร่ ได้แก่ กรุงเทพฯ นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สมุทรสาคร สมุทรสงคราม นครราชสีมา เลย ฉะเชิงเทรา ลำปาง เชียงใหม่ เชียงราย กำแพงเพชร ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา ตรัง กระบี่ และพังงา ผลผลิตทั่วประเทศประมาณ 4,800,000 ดอกต่อปี ส่วนใหญ่ใช้ในประเทศ และเริ่มส่งออกมากขึ้น

จากการที่ศักยภาพในการส่งออกหน้าวัวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น จึงมีความพยายามในการขยายพื้นที่ปลูก แต่เทคโนโลยีในการผลิต ขยายพันธุ์ยังมีน้อย ต้นพันธุ์และความหลากหลายของสายพันธุ์มีไม่เพียงพอ จึงมีการนำเข้าต้นพันธุ์หน้าวัวลูกผสมกว่า 200,000 ต้นจากประเทศเนเธอร์แลนด์และสหรัฐอเมริกา ซึ่งนอกจากต้นพันธุ์มีราคาแพงแล้ว บางครั้งยังพบการปนเปื้อนและอ่อนแอต่อโรคใบแห้ง โรคใบไหม้ และโรคไวรัส ดังนั้นการส่งเสริมให้ปลูกเลี้ยงหน้าวัวโดยใช้พันธุ์จากต่างประเทศ แม้เป็นทางเลือกหนึ่งแต่สามารถทำได้เฉพาะผู้ปลูกเลี้ยงที่มีเงินลงทุนสูง การพัฒนาการปลูกเลี้ยงหน้าวัวสำหรับเกษตรกรทั่วไปจำเป็นต้องมีการวิจัยและพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้หน้าวัวพันธุ์ใหม่ และผลิตต้นพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ให้ตรงตามพันธุ์ในปริมาณมาก ต้นที่ได้มีความแข็งแรง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs โดย

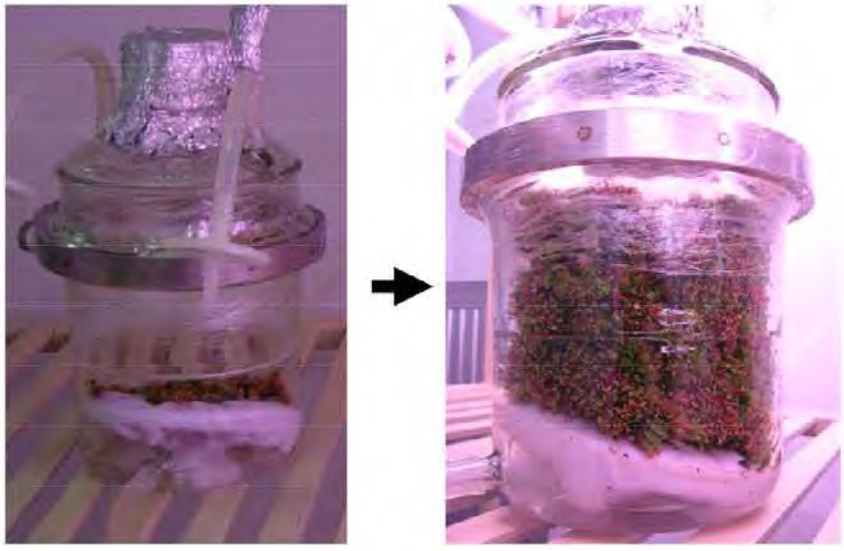
พืชสวนชุมพร จึงเป็นการสนับสนุนโครงการปรับปรุงพันธุ์หน้าวัวสายพันธุ์ใหม่ที่จะมีการแนะนำพันธุ์สู่เกษตรกรต่อไป

ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวสายพันธุ์ HC028 HC034 HC049 HC084 และ HC132 ซึ่งเป็นลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ที่จะเสนอเป็นพันธุ์แนะนำของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรลำปาง โดยมีขั้นตอนการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 19) ดังนี้

1. การชักนำให้เกิดแคลลัสและโปรโตคอร์ม ทำการฆ่าเชื้อใบหน้าวัว แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Modified MS จนกระทั่งเป็นแคลลัสและโปรโตคอร์ม

2. การเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เริ่มมีโปรโตคอร์มเล็กๆ ในอาหารเหลวสูตร kio.5 (ภาคผนวก 2) ด้วยระบบ TIBs แบบใช้ปั๊มอากาศ เพื่อให้ได้แคลลัสปริมาณมาก ภาชนะบรรจุชิ้นส่วนพืชเป็นขวดแก้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร ให้อาหารนาน 1 นาที 2 ครั้งต่อวัน เปลี่ยนอาหารเหลวทุกเดือน หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ถึง 18 เท่า จากน้ำหนักแคลลัสเริ่มต้นเพียง 28 กรัม สามารถเก็บเกี่ยวแคลลัสได้ถึง 519 กรัม (ภาพที่ 19 และ 20)

ภาพที่ 19 แผนผังการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวลูกผสมพันธุ์ใหม่



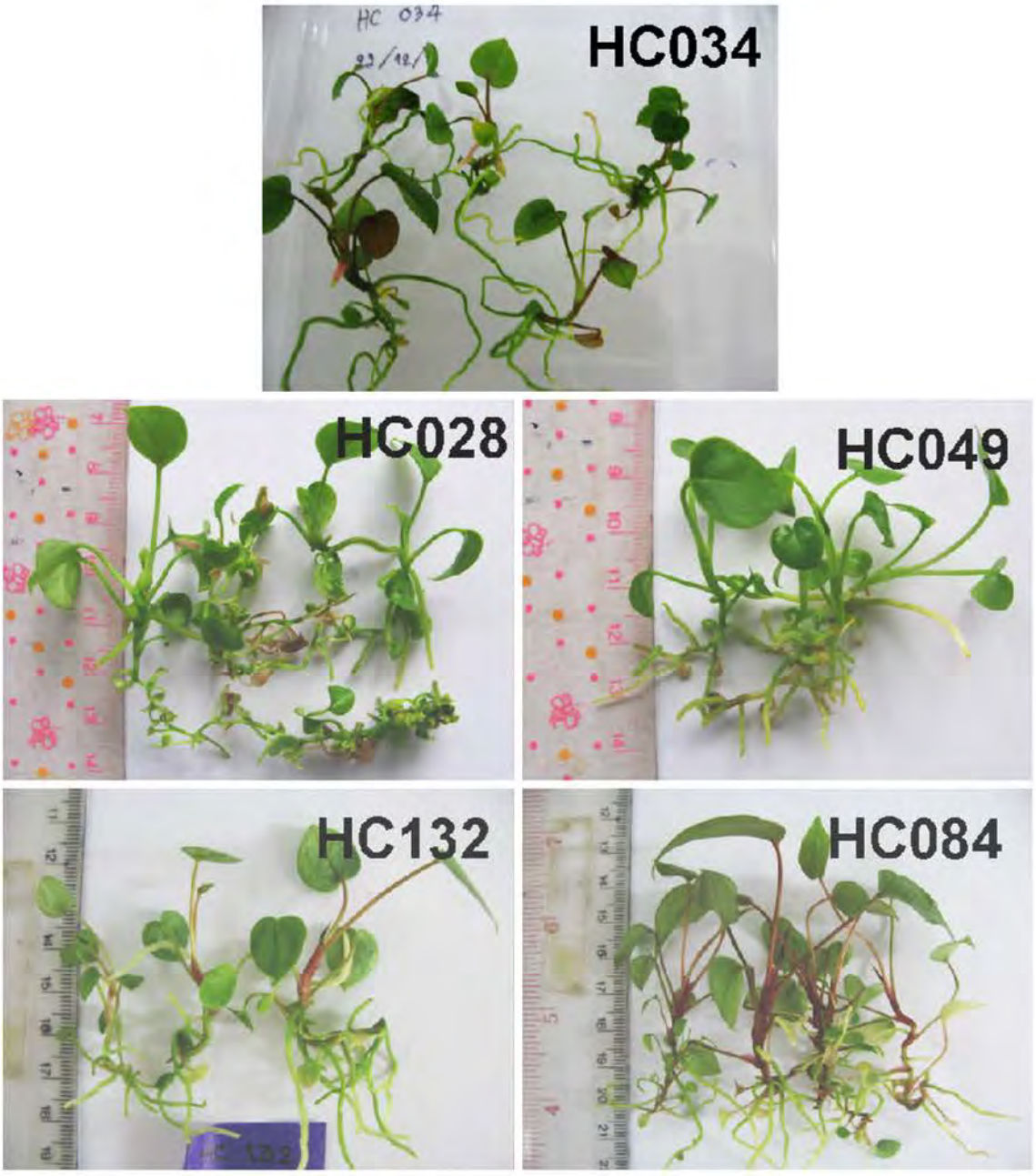
ภาพที่ 20 การเพาะเลี้ยงแคลลัสหน้าวัวสายพันธุ์ HC084 ในระบบ TIBs เริ่มต้นเพาะเลี้ยง (ซ้าย) พร้อมสำหรับเก็บเกี่ยว (ขวา)

3. หลังจากเลี้ยงแคลลัสจนพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มแล้ว นำโปรโตคอร์มมาตัดเป็นชิ้น แต่ละชิ้นมีข้อหนึ่งข้อ ความยาวไม่เกิน 1 เซนติเมตร สามารถเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม ที่มีน้ำหนักต่อต้นตั้งแต่ 0.06 กรัม หรือ 60 มิลลิกรัมขึ้นไป โดยใช้ระบบ TIBs แบบปั๊มลม ในอาหารสูตร kio.5 ภาชนะบรรจุชิ้นส่วนพืชเป็นขวดแก้ว ให้อาหารครั้งละ 1 นาที วันละ 2 ครั้ง เปลี่ยนอาหารทุกเดือน ทำการเพาะเลี้ยงประมาณ 2 – 3 เดือน ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีการเพิ่มขึ้นทั้งน้ำหนักรวม น้ำหนักต่อต้น และจำนวนต้นในทุกสายพันธุ์ (ตารางที่ 5) และสามารถนำไปอนุบาลในเรือนเพาะชำได้ (ภาพที่ 21)

ตารางที่ 5 ผลของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหน้าวัวสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs นาน 3 เดือน

สายพันธุ์หน้าวัว	น้ำหนัก (กรัม)		น้ำหนักต่อต้น (กรัม)		จำนวนต้นอ่อน (ต้น)	
	เริ่มต้น	เก็บเกี่ยว	เริ่มต้น	เก็บเกี่ยว	เริ่มต้น	เก็บเกี่ยว
HC028	19.2	54.1	0.5	0.5	30	108
HC034	10.8	39.8	-	0.5	-	79
HC049	20.6	41.5	0.23	0.33	94	125
HC084	12	119	0.08	0.2	180	595
HC132	7	26.8	-	0.29	-	92

จากตารางที่ 5 พบว่า หน้าวัวแต่ละสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs แตกต่างกัน เช่น สายพันธุ์ HC084 มีการตอบสนองมาก โดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นทั้งน้ำหนักรวม น้ำหนักต่อต้น และจำนวนต้นสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ในขณะที่สายพันธุ์ HC049 มีการตอบสนองต่ำกว่าสายพันธุ์อื่นๆ



ภาพที่ 21 ต้นอ่อนหน้าวัวสายพันธุ์ต่างๆ จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs นาน 3 เดือน ด้วยอาหารสูตร kio.5

5.4 สับปะรด

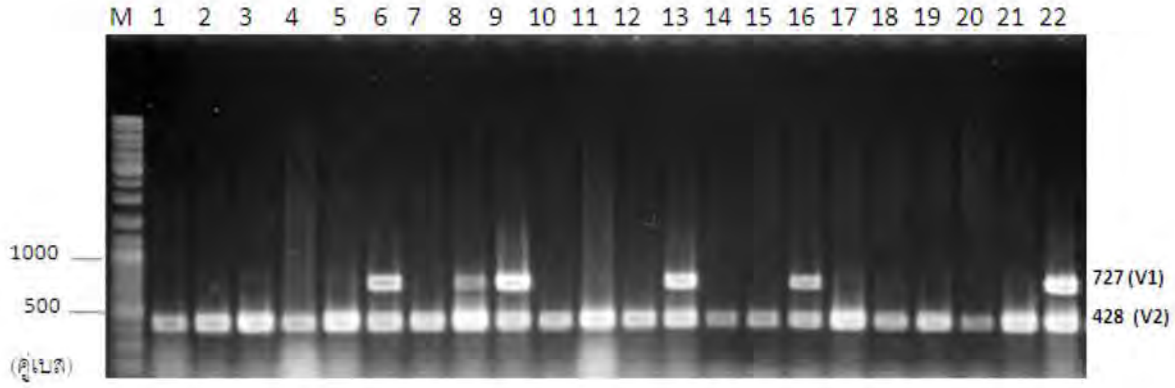
สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียเป็นสับปะรดในกลุ่ม Cayenne ที่มีการปลูกมากในประเทศไทย เนื่องจากใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการทำสับปะรดกระป๋อง ในช่วงสิบปีที่ผ่านมามีการระบาดของโรคเหี่ยวตายของสับปะรด (Mealy Bug Wilt) อย่างรุนแรงเนื่องจากสับปะรดพันธุ์นี้มีความอ่อนแอต่อโรคนี้มาก โดยพบการทำลายทุกพื้นที่ปลูกในประเทศ และรุนแรงมากในแปลงต้นตอมากกว่าแปลงต้นปลูก เนื่องจากขาดการดูแลรักษาหลังเก็บผลผลิตต้นปลูกไปแล้ว การระบาดในแปลงต้นตอมีความสำคัญมาก เพราะเป็นแหล่งผลิตหน่อพันธุ์ของเกษตรกร สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อไวรัส Pineapple mealybug wilt associated virus (PMWaV) กลุ่มคลอสเตอโรไวรัส (Closterovirus) มีรูปร่างแบบท่อนยาว ขนาดประมาณ 1,200 x 12 นาโนเมตร กระจายอยู่หนาแน่นเฉพาะภายในเซลล์ท่ออาหารของสับปะรด เมื่อเกษตรกรนำต้นตอจากแปลงที่มีการระบาดไปปลูกในพื้นที่แหล่งใหม่ โรคจึงกระจายตัวไปยังแหล่งอื่น ผลสับปะรดจากต้นที่เป็นโรคจะไม่พัฒนาส่งผลกระทบให้ผลผลิตสับปะรดลดลง จากการที่โรคนี้มีสาเหตุจากเชื้อไวรัส ซึ่งมีเพลี้ยแป้งเป็นพาหะ ทำให้โรคสามารถติดต่อระหว่างต้น การรักษาโรคนี้จึงทำได้ยาก การควบคุมการกระจายพื้นที่ของการระบาดทำได้โดยการใช้หน่อพันธุ์ที่ปลอดโรค ซึ่งวิธีการที่จะได้หน่อพันธุ์ปลอดโรคทำได้วิธีเดียว คือ การนำเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดที่เจริญเติบโตรวดเร็วกว่าการเจริญของไวรัสมาใช้ขยายพันธุ์ เพื่อให้ต้นพันธุ์ที่ได้ปลอดโรค นอกจากจะได้ต้นพันธุ์ปลอดโรคแล้วการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังสามารถผลิตต้นพันธุ์ได้มากในระยะเวลาที่รวดเร็ว เป็นวิธีที่มีศักยภาพมากกว่าการขยายพันธุ์สับปะรดตามปกติที่ใช้หน่อ จุก หรือ ตะเกียง ซึ่งมีปริมาณจำกัด

Zuraida *et al.* (2011) รายงานถึงความสำเร็จในการขยายพันธุ์สับปะรดปริมาณมากโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลว ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณได้มากกว่าอาหารแข็งจากความสำเร็จในการใช้ระบบ TIBs ในการขยายพันธุ์พืชหลายชนิด เช่น กล้วย กาแฟ ซึ่งมีอัตราเพิ่มปริมาณยอดมากกว่าการเลี้ยงในอาหารแข็ง 5-10 เท่า และมีข้อดี คือ ชิ้นส่วนพืชไม่มีอาการฉ่ำน้ำ ประหยัดเวลาและแรงงานที่ไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารบ่อยๆ เมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว จึงได้มีการใช้ระบบ TIBs ในการขยายพันธุ์สับปะรดปัตตาเวียปลอดเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวและสับปะรดบริโภคสดพันธุ์ MD2 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีศักยภาพในการส่งออกผลสด เพื่อเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ให้เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกร

ส่วนที่ 1 การผลิตต้นอ่อนสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียปลอดเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระบบ TIBs

1. การเตรียมต้นแม่พันธุ์ปลอดโรค

ตรวจสอบต้นพันธุ์ที่จะนำมาใช้เป็นต้นแม่พันธุ์ ว่าปลอดจากเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวโดยเทคนิคทางอณูวิทยา (Reverse transcription polymerase chain reaction : RT-PCR) (ภาพที่ 22) ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 22 การตรวจสอบเชื้อไวรัส 2 สายพันธุ์ คือ PMWaV-1 และ PMWaV-2 ด้วยเทคนิค RT-PCR

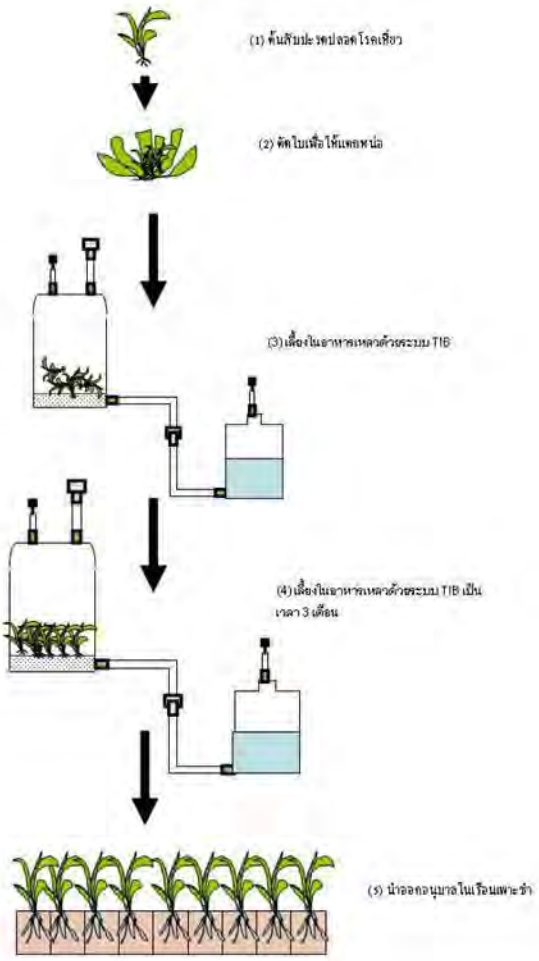
ภาพที่ 23 ต้นแม่พันธุ์สับปะรดปลอดโรคเหี่ยวในสภาพปลอดเชื้อ

2. การเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์สับปะรดปลอดโรคเหี่ยวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ดำเนินการ 3 สถานที่ คือ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ โดยแต่ละแห่งมีการดำเนินการดังนี้

2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดปลอดเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวในระบบ TIBs ของศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร

ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ได้นำเอาระบบ TIBs มาใช้ในการผลิตหน่อสับปะรดปลอดโรคเหี่ยว โดยศูนย์ฯ ได้รับต้นสับปะรดปลอดโรคเหี่ยวในสภาพปลอดเชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งจากสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จากนั้นได้ทำการตัดยอดและทำลายตายอดของหน่อสับปะรด และเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เพื่อให้หน่อแตกต้นอ่อนจำนวนมาก เมื่อได้ต้นอ่อนที่มีขนาดความสูงประมาณ 1 – 1.5 เซนติเมตร จำนวนมากเพียงพอแล้ว นำต้นอ่อนดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs มีขั้นตอนดังนี้ (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 ขั้นตอนการขยายพันธุ์สับปะรดปลอดโรคเหี่ยวในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs

เตรียมอาหารเหลวสูตร 23MS (ภาคผนวก 3) บรรจุในภาชนะบรรจุอาหาร ภาชนะบรรจุต้นพืชเป็นขวดแก้ว ขนาดของต้นอ่อนเริ่มต้นที่ใช้เพาะเลี้ยงมีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ความหนาแน่นของต้นอ่อนสับปะรดต่ออาหารเหลว 1 ลิตรอยู่ที่ 30 กรัมหรือประมาณ 150 ต้น นำไปเพาะเลี้ยงโดยใช้ระบบ TIBs แบบใช้เครื่องปั๊มอากาศ ประกอบภาชนะบรรจุอาหารเข้ากับภาชนะบรรจุต้นพืช นำระบบ TIBs ที่ประกอบเรียบร้อยไปฆ่าเชื้อด้วยระบบไอน้ำแรงดันสูงที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที หลังจากนั้นนำมาวางในห้องเพาะเลี้ยงโดยต่อกับระบบแรงดันลมแบบอัตโนมัติ ตั้งเวลาให้อาหารเป็นเวลา 1 นาที ทุก 12 ชั่วโมง หลังจาก 2 สัปดาห์ เมื่อแน่ใจว่าระบบที่เตรียมไว้ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อ นำต้นอ่อนสับปะรดที่เตรียมไว้ ใส่ลงในภาชนะบรรจุต้นพืช แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยง โดยให้อาหารต้นอ่อนสับปะรด 1 นาที ทุก 12 ชั่วโมง และเปลี่ยนอาหารเหลวทุก 3 สัปดาห์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1.5 – 2 เดือน จะได้ต้นกล้าสับปะรดที่พร้อมจะนำไปอนุบาลในเรือนเพาะชำ (ภาพที่ 25) โดยต้นกล้าที่ได้นั้น มีทั้งต้นกล้าที่สามารถนำไปย้ายปลูกในเรือนเพาะชำ (ภาพที่ 26ก) และที่ยังไม่สามารถนำไปเพาะปลูกในเรือนเพาะชำได้ (ภาพที่ 26ข) ในอัตราส่วนประมาณ 1 : 1

ต้นกล้าที่ดีจะมีสีเขียวเข้ม ไม่มีข้อปรากฏชัดเจน ความสูงตั้งแต่ 3 เซนติเมตรขึ้นไป ส่วนใหญ่จะเป็นต้นกล้าที่เจริญเติบโตอยู่ส่วนขอบของระบบ TIBs ซึ่งได้รับแสงมากกว่าต้นกล้าที่เจริญเติบโตในบริเวณส่วนกลางของระบบ

สำหรับต้นกล้าที่คัดออก (ภาพที่ 26ค) นั้นมีทั้งต้นที่มีขนาดเล็กกว่า 3 เซนติเมตร และต้นกล้าที่มีการยืดต้นจากการได้รับแสงน้อยเกินไป ต้นกล้าทั้ง 2 แบบนี้สามารถนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวต่อได้

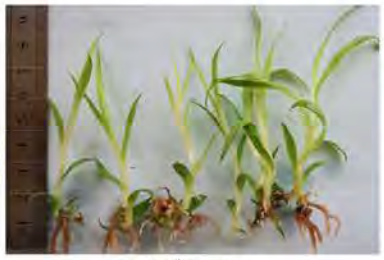
ในการเปลี่ยนอาหารแต่ละครั้ง จะต้องเตรียมอาหารให้เหมาะสมกับปริมาณและความสูงของต้นกล้า ในเดือนแรกต้นกล้าที่ยังมีจำนวนน้อย อาจให้อาหารเพียงหนึ่งลิตรต่อระบบ และเพิ่มปริมาณอาหารเป็นสองลิตรต่อระบบในการเปลี่ยนอาหารครั้งต่อไป เพื่อให้ต้นกล้าทุกต้นได้รับอาหารเพียงพอ

(ก) ต้นสับปะรดในระบบ **TIBs** ที่พร้อมเก็บเกี่ยว

(ข) ต้นสับปะรดที่เจริญในส่วนตรงกลางของระบบ **TIBs**

ภาพที่ 25 ต้นกล้าสับปะรดปลอดโรคเหี่ยว จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระบบ TIBs ที่อายุ 3 เดือนของศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร

(ก) ต้นลักษณะดี



(ข) ต้นที่มีใบสีขาว

(ค) ต้นคัดทิ้ง

ภาพที่ 26 ต้นกล้าสับปะรดปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs ที่พร้อมนำไปอนุบาลในเรือนเพาะชำ

2.2 การเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์สับปะรดปลอดโรคโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบ TIBs ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ มีการดำเนินการ 2 ชุด ดังนี้

2.2.1 การเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs ชุดเล็ก (ขวดแฝด) 190 ชุด

มีขั้นตอนการดำเนินงาน ดังนี้คือ

1) เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสับปะรด โดยใช้สูตร MS ที่มีการเติม TDZ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเพิ่มปริมาณ และใช้อาหารที่ไม่มีการเติม TDZ เมื่อต้องการยืดต้นและกระตุ้นการ

ออกราก ค่า pH เท่ากับ 5.8 โดยปริมาตรอาหารเหลวที่ใช้ในระบบ TIBs ขนาดเล็กเท่ากับ 300 มิลลิลิตรต่อขวดอาหาร 1 ขวด

2) เตรียมต้นสับปะรด คัดเลือกต้นสับปะรดที่เพาะในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีการเติม TDZ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร มาตัดเป็นกอ กอละ 4 - 5 ต้น สูงประมาณ 2 เซนติเมตร ใส่ในขวด ขวดละ 30 กอ ในอาหารสูตร MS จากนั้นนำขวดแฝดที่มีการต่อหัวเรียบร้อยมาต่อเข้ากับระบบ โดยต่อหัวตัวกรองเข้ากับท่อลม พร้อมตั้งเวลาให้อาหารครั้งละ 5 นาที วันละ 8 ครั้ง นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการควบคุมสภาพแวดล้อม โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิภายในห้อง 25 ± 2 องศาเซลเซียส

3) คัดขนาดต้นสับปะรดเพื่อนำไปเพาะชำ หลังการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ จึงนำต้นสับปะรดที่เพาะเลี้ยงทั้งหมดมาคัดแยกเป็น 3 ขนาด คือ ต้นขนาดใหญ่กว่า 5 เซนติเมตร ต้นขนาด 3 - 5 เซนติเมตร และต้นขนาดเล็กกว่า 3 เซนติเมตร ต้นขนาดใหญ่และขนาดกลางส่งไปเพาะชำที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี ส่วนต้นเล็กนำไปปลูกในโรงเรือนเพื่อให้ต้นโตก่อนส่งให้ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี

2.2.2 การเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs ชุดใหญ่ ขนาด 20 ลิตร จำนวน 4 ชุด

1) การเตรียมต้นสับปะรด นำต้นสับปะรดที่เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีการเติม TDZ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร มาตัดเป็นกอๆ ละ 4 - 5 ต้น วางบนอาหารแข็งที่ไม่มีฮอร์โมนในขวดที่ฟอกฆ่าเชื้อขวดละ 20 กอ เพื่อนำมาเป็นชิ้นส่วนที่เตรียมสำหรับลงในถังระบบ TIBs ขนาดใหญ่ เพื่อให้ง่ายต่อการตรวจดูเชื้อ โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นคีบต้นออกจากอาหารแข็งมาใส่ในขวดเปล่าที่นึ่งฆ่าเชื้อที่เตรียมไว้ เพื่อถ่ายพืชที่เตรียมไว้ในขวดฟอกลงในถังขนาดใหญ่ ขั้นตอนนี้มีผู้ปฏิบัติงาน 2 คน ใช้ชิ้นส่วนทั้งหมด 250 กอต่อถัง จำนวน 4 ถัง นำถังภาชนะที่มีการต่อหัวเรียบร้อยมาต่อเข้ากับระบบโดยต่อหัวตัวกรองเข้ากับท่อลม พร้อมตั้งเวลาให้อาหารครั้งละ 10 นาที วันละ 12 ครั้ง โดยใช้ระบบคอมพิวเตอร์ ระบบ TIBs ใหญ่นี้อยู่ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเฉพาะที่มีการควบคุมสภาพแวดล้อม โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิภายในห้อง 25±2 องศาเซลเซียส หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ นำต้นสับปะรดออกปลูก โดยคัดแยกต้นที่มีขนาดใหญ่กว่า 5 เซนติเมตร ส่งศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี ส่วนต้นขนาดเล็กกว่า 5 เซนติเมตร นำไปปลูกในโรงเรือนเพาะชำเพื่อรอส่งมอบต่อไป

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระบบ TIBs 2 ขนาด คือชุดเล็ก (ขวดแฝดขนาด 300 มิลลิลิตร) จำนวน 190 ชุด (ภาพที่ 27) และชุดใหญ่ขนาด 20 ลิตร จำนวน 4 ชุด ได้ผลิตและส่งต้นกล้าสับปะรดขนาด 5 เซนติเมตร ให้ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี จำนวน 5 ครั้ง รวม 77,240 ต้น เพื่อเพาะชำในโรงเรือน มีเปอร์เซ็นต์ต้นที่รอดตายระหว่างการเพาะชำเฉลี่ย 92 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีการคัดแยกต้นที่มีขนาดเล็กกว่า 5 เซนติเมตร นำไปเพาะชำที่เรือนเพาะชำของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ก่อน เมื่อดูแลรักษาจนต้นมีขนาดประมาณ 5 เซนติเมตร จึงจัดส่งมาที่

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี โดยใส่ถุงพลาสติกก่อนบรรจุในกล่องโฟมและขนส่งทางรถยนต์ในตอนกลางคืน เพื่อลดความร้อนที่อาจทำให้ต้นเสียหาย (ภาพที่ 28)

ภาพที่ 27 ระบบ TIBs (ชุดเล็ก) สำหรับเพิ่มจำนวนต้นสับปะรดปลอดโรคของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ต้นสับปะรดในระบบ TIBs 20 ลิตร (A)

ล้างต้นสับปะรดก่อนออกจากขวด (B)

เอาต้นออกจากขวด (C)

คัดเลือกและแยกต้น (D)

บรรจุลงถุงพลาสติก (E)

ใส่ในกล่องโฟม (F)

เตรียมส่งรถทัวร์ (G)

ต้นที่ปลูกในโรงเรือน พร้อมส่ง (H)

ต้นสับปะรดที่ปลูกในโรงเรือน รอส่ง (I)

ต้นที่ปลูกที่ ศวพ. เพชรบุรี (J)

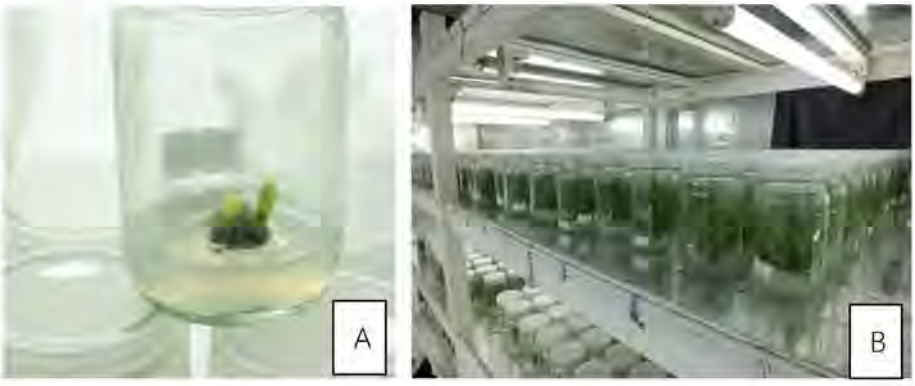
ภาพที่ 28 ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนต้นสับปะรดปลอดโรคเหี่ยวของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ และการจัดส่งไปยังศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี (A-J)

2.3 การเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์สับปะรดปลอดโรคโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ

ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 3 ระบบ คือ ระบบอาหารแข็ง ระบบอาหารเหลว และระบบ TIBs โดยศึกษาระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในอาหารสูตร MS ร่วมด้วย โดยให้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ วันละ 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีผลการดำเนินงานดังนี้

การเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง

ใช้อาหารสูตร MS เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัม ค่า pH 5.8 พบว่าสามารถชักนำให้สับปะรดแตกยอดอ่อนใหม่ 3-5 ยอดในเวลา 30 วัน และจากการเพิ่มระดับความเข้มข้นของ BA เป็น 3 5 และ7 มิลลิกรัมต่อลิตร แม้ว่าจะมีการเกิดยอดอ่อนสับปะรดมากขึ้น แต่ต้นสับปะรดที่ได้ชะงักการเจริญเติบโตและต้นมีขนาดเล็กคล้ายต้นหญ้า แต่หลังจากปรับสูตรอาหารเป็นสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน ต้นสับปะรดกลับมาเป็นต้นสมบูรณ์ดังเดิม แต่พบต้นสับปะรดเกิดการกลายพันธุ์ (ใบมีแถบเหลือง) 2 – 3 ต้น หรือ 0.0024 เปอร์เซ็นต์ จึงได้คัดต้นดังกล่าวออก และใช้อาหารแข็งสูตร MS เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสูตรมาตรฐานจนเริ่มหยุดการเจริญให้ปรับมาเป็นอาหารสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 29)

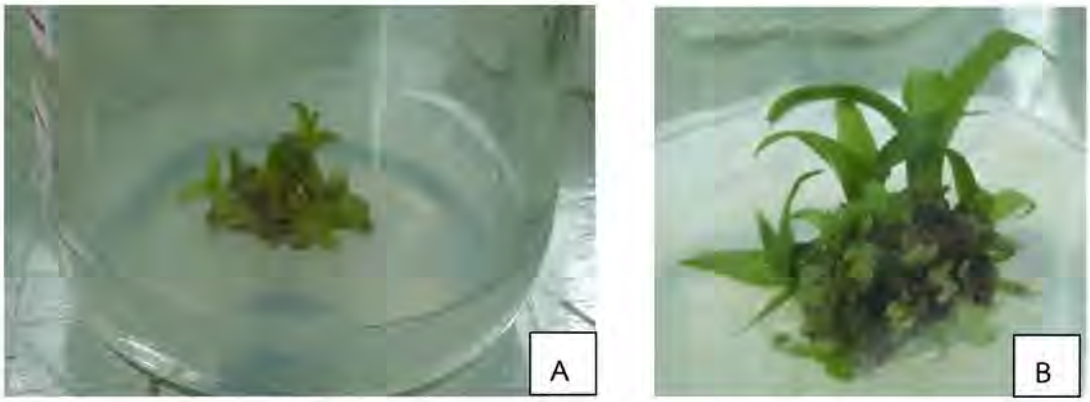


ภาพที่ 29 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดโดยใช้ระบบอาหารแข็งศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษหลังการเปลี่ยนอาหาร 2 สัปดาห์ (A) และ 6 สัปดาห์ (B)

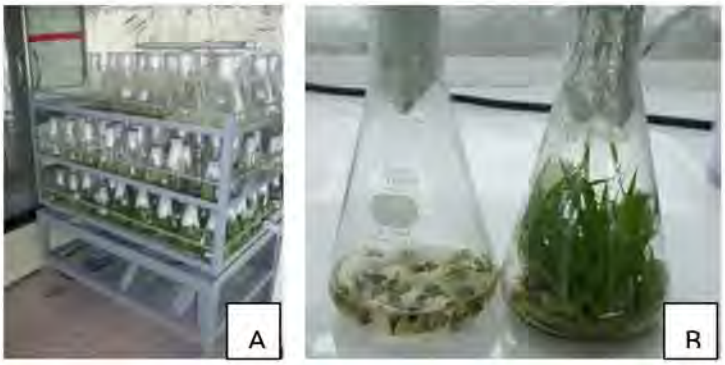
การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

ช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนสับปะรดในระบบอาหารเหลวใช้อาหารสูตร MS ที่มี BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ต้นสับปะรดมีการแตกยอดใหม่ เฉลี่ย 8 - 10 ยอดต่อต้น (ภาพที่ 30) ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวนาน 4 สัปดาห์ จะพบอาการฉ่ำน้ำ โดยต้นสับปะรดมีขนาดใหญ่ สีอ่อนลง สีต้นใส ฉ่ำ (ภาพที่ 30) และมีการแตกกอลดลง ต้องย้ายลงอาหารแข็งสูตร MS ที่เพิ่ม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 1 สัปดาห์ ต้นสับปะรดจึงกลับมาสมบูรณ์ดังเดิม หลังเลี้ยงในอาหารแข็ง 2 สัปดาห์ จึงสามารถย้ายลงอาหาร

เหลวอีกครั้ง วิธีนี้สามารถขยายปริมาณต้นสับปะรดได้เร็วกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง 10 - 20 เท่า



ภาพที่ 30 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า (Shaker: A) และต้นอ่อนที่ได้ (B) ของศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ



ภาพที่ 31 ต้นสับปะรดปกติ (A) และต้นที่เกิดอาการฉ่ำน้ำ (B) เมื่อใช้อาหารเหลว MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรนาน 4 สัปดาห์ ของศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ

การเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs

การเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs ช่วงแรกใช้อาหารสูตร MS + BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที พบว่า ได้ยอดใหม่ 10 – 20 ยอดต่อต้น หลังการเลี้ยง 4 สัปดาห์ เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของ BA จาก 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า หลังการเลี้ยง 4 สัปดาห์ ทุกระดับความเข้มข้น มีการแตกยอดอ่อน 20 - 40 ยอดต่อต้น แต่ต้นอ่อนเริ่มเกิดอาการฉ่ำน้ำเช่นเดียวกับการเลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งอาจเกิดจากความเข้มข้นของ BA สูงเกินไป จึงเปลี่ยนมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 1 สัปดาห์ ทำให้ต้นสับปะรดกลับมาสมบูรณ์ดังเดิม แม้ว่าการใช้ BA ความเข้มข้นสูง โดยไม่ลดปริมาณน้ำตาล ทำให้อัตราการขยายต้นสับปะรดเร็วกว่าการเลี้ยงในอาหารแข็งถึง 50 เท่า แต่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้นาน จึงได้ปรับลดความเข้มข้นของ BA และระยะเวลาการเลี้ยง โดยเริ่มต้นการเลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS + BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 1 สัปดาห์ ปรับสูตรอาหารเป็น MS + BA 3 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร นาน 1 สัปดาห์ และ MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 2 สัปดาห์ ก่อนย้ายลงอาหารสูตร MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรนาน 2 สัปดาห์ เพื่อเร่งให้เกิดรากพร้อมสำหรับออกปลูก วิธีการดังกล่าวทำให้มีอัตราการรอดตายมากกว่าร้อยละ 90 และไม่พบอาการกลายพันธุ์หลังออกปลูก ดังนั้นการขยายต้นสับปะรดปลอดโรคในระบบ TIBs ที่เพิ่มปริมาณต้นอ่อนได้ดีที่สุดของศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ สรุปเป็นขั้นตอนได้ดังนี้ (ภาพที่ 32)

1. ใช้อาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 1 สัปดาห์
2. ใช้อาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 1 สัปดาห์
3. ใช้อาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 2 สัปดาห์
4. ใช้อาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มขัน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 2 สัปดาห์

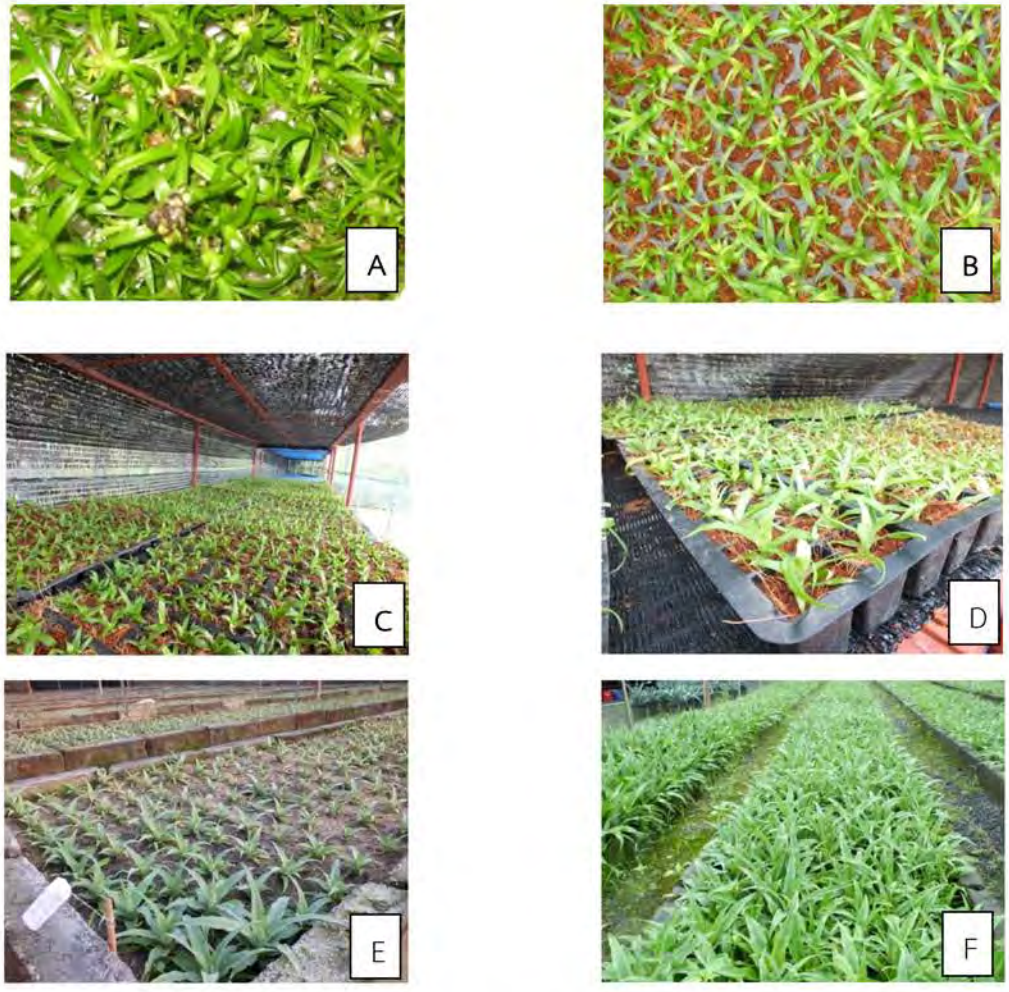
รวมระยะเวลาการเลี้ยงจนต้นพร้อมออกปลูก ประมาณ 6 สัปดาห์ แต่ต้นที่ได้จะมีขนาดเล็กกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยระบบอาหารแข็งและอาหารเหลว

ภาพที่ 32 การพัฒนาของต้นสับปะรดหลังให้อาหารสูตร MS ที่ลดระดับ BA 5 3 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (A B และ C) ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ

3. การอนุบาลต้นอ่อนในเรือนเพาะชำและการปลูกต้นสับปะรดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในแปลงปลูกและการผลิตหน่อพันธุ์

หลังการขยายจำนวนต้นพันธุ์สับปะรดปลอดโรคเหี่ยวในห้องปฏิบัติการประมาณ 3 เดือน ต้นสับปะรดมียอดและรากสมบูรณ์พร้อมออกปลูก ซึ่งทำได้โดยการชำต้นอ่อนในถาดเพาะชำพลาสติกขนาด 104 หลุม ใช้ขุยมะพร้าวเป็นวัสดุปลูก และต้องให้ความชื้นสม่ำเสมอ การอนุบาลใช้เวลานานประมาณ 14 – 30 วัน เมื่อต้นในถาดเพาะเริ่มชนกัน ต้องย้ายลงปลูกในแปลงอนุบาล หลังจากนั้นประมาณ 2 – 3 เดือน ต้นจะมีขนาดใหญ่ ความยาวใบประมาณ 15 เซนติเมตร พร้อมที่จะย้ายลงปลูกในแปลงกลางแจ้งหรือแหล่งปลูก (ภาพที่ 33 และ 34) ก่อนการย้ายปลูก ให้งดการให้น้ำ 2-3 วัน แล้วจึงถอนต้นจากแปลงเพาะชำ ล้างทำความสะอาดและจุ่มในสารป้องกันเชื้อรา ผึ่งต้นให้พอหมาดก่อนบรรจุในตะกร้าพลาสติกหรือห่อด้วยซาแลนทำการขนส่งไปยังแหล่งปลูก (ภาพที่ 35)

ภาพที่ 33 ขนาดต้นสับปะรดที่อายุต่างๆ หลังการชำในถาดหลุม (0 7 14 21 และ 28 วัน)

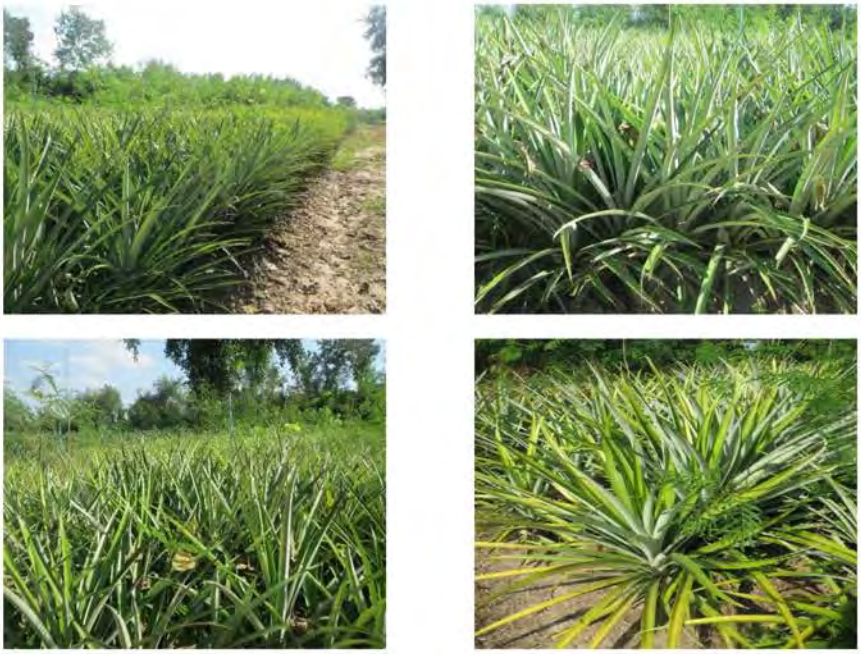


ภาพที่ 34 การอนุบาลต้นสับปะรดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ต้นกล้าที่ออกจากห้องปฏิบัติการ (A) และชำในถาดหลุม (B) ชำในถาดหลุมอายุ 2 สัปดาห์ (C) 4 สัปดาห์ (D) ต้นอายุ 2 เดือน ในกระบะเพาะชำ (E) ต้นอายุ 3 เดือน พร้อมปลูกในแปลง (F)

ภาพที่ 35 การเตรียมต้นสับปะรดปลอดโรคเหี่ยวเพื่อส่งไปปลูกในแหล่งต่างๆ
การดูแลต้นกล้าในเรือนเพาะชำ (A) งดน้ำ 2-3 วันก่อนถอนกล้า (B) ขนาดต้นโตพร้อมถอนแยกนำปลูกในแปลง (C) ถอนต้นกล้า ล้างและจุ่มในสารป้องกันเชื้อรา (D) ผึ่งต้นที่จุ่มสารให้หมาด (E) บรรจุในตะกร้าพลาสติก (F) หรือห่อด้วยซาแลน (F) การขนส่ง (G)

การปลูก เตรียมแปลงปลูก โดยไถพรวนตากดินอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ปลูกโดยใช้ระยะปลูก 25 × 50 × 100 เซนติเมตร และให้น้ำ หลังจากนั้น 1 เดือน สำรวจมดและเพลี้ยแป้ง ถ้าพบให้พ่นสารชนิดใดชนิดหนึ่งตามคำแนะนำ เช่น thiamethoxam 25% WG อัตรา 2 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หรือ imidacloprid 70% WG อัตรา 4 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หรือ dinotefuran 10% WP อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร โดยพ่นเฉพาะแนวขอบแปลงที่ติดกับแปลงข้างเคียงหรือเฉพาะจุดที่พบเพลี้ยแป้งเป็นรัศมีโดยรอบ กำจัดวัชพืชในแปลงโดยใช้จอบถาก ส่วนรอบแปลงปลูกใช้สารเคมีกำจัดวัชพืช สำหรับการจัดการด้านอื่นๆ ให้ปฏิบัติตามหลักเกษตรดีที่เหมาะสมของสับปะรด

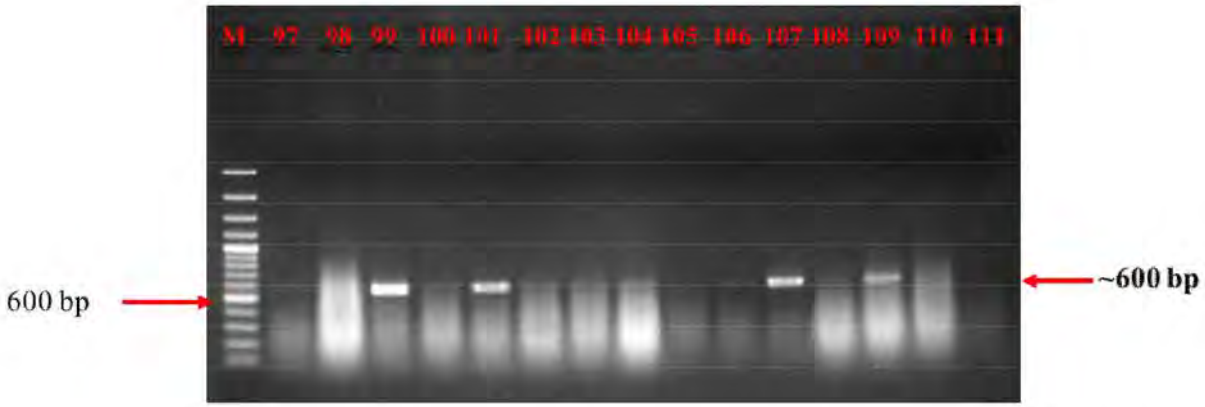
เมื่อต้นมีน้ำหนักประมาณ 2 - 2.5 กิโลกรัม (ภาพที่ 36) ทำการบังคับดอกโดยใช้เอทิฟอน 52 เปอร์เซ็นต์ อัตรา 6 มิลลิลิตรร่วมกับยูเรีย 300 กรัมผสมน้ำ 20 ลิตร หยอดต้นละ 60 มิลลิลิตร ในช่วงเย็นจำนวน 2 ครั้งห่างกัน 7 วัน หลังบังคับดอก 60 วันจะทำการตัดดอกทิ้ง ใส่ปุ๋ยและให้น้ำเพื่อกระตุ้นให้เกิดการแตกหน่อเร็วขึ้นหลังจากตัดดอก สับปะรดจะเริ่มมีการแตกหน่อใหม่ หลังหน่อเจริญ 2 - 3 เดือนทำการหักหน่อออก (ภาพที่ 37) ต้นที่ไม่ตัดดอกจะให้ผลเจริญเติบโตตามปกติ (ภาพที่ 38) โดยหน่อที่หักจะนำไปตรวจสอบหาเชื้อไวรัส PMWaV 1 - 2 ด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (ภาพที่ 39 และภาพที่ 40) ก่อนนำไปจำหน่ายให้เกษตรกร



ภาพที่ 36 แปลงผลิตหน่อสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียปลอดโรคเหี่ยวที่ได้จากต้นที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่พร้อมบังคับดอก

ภาพที่ 37 หน่อพันธุ์ปลอดโรคที่พร้อมจำหน่ายให้เกษตรกร

ภาพที่ 38 ผลสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียปลอดโรคเหี่ยวที่ปลูกจากต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ



ภาพที่ 39 การตรวจหาเชื้อไวรัส PMWaV 1 และ 2 ด้วยเทคนิค RT-PCR ของตัวอย่างสับปะรดที่มีการตรวจสอบ ลำดับที่ 99 101 107 และ 109 แสดงแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส PMWaV 1 และ 2 ที่มีขนาด 600 bp ชัดเจนมาก

ภาพที่ 40 การตรวจหาเชื้อไวรัส PMWaV 1 และ 2 ด้วยเทคนิค RT-PCR ของตัวอย่างสับปะรดจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรอุทัยธานี 49 ตัวอย่าง ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส PMWaV 1 และ 2

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตต้นสับปะรดด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบอาหารแข็ง ระบบอาหารเหลวและระบบ TIBs ตั้งแต่การเพิ่มจำนวนต้นในห้องปฏิบัติการจนได้ต้นพร้อมออกปลูกในแปลง พบว่า ระบบอาหารแข็งมีต้นทุนการผลิตต่อต้นสูงสุด (53.3 และ 6.95 บาท เมื่อผลิต 1,000 และ 10,000 ต้น ตามลำดับ) และใช้ระยะเวลานานสุด (191 วัน) รองมาคือระบบอาหารเหลว (ต้นทุน 40.8 และ 5.7 บาทต่อต้น และใช้เวลา 151 วัน) ส่วนระบบ TIBs มีต้นทุนการผลิตต่อต้นและระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่ำสุด (32.8 และ 4.72 บาทต่อต้น และ129 วัน ตามลำดับ) (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ระยะเวลาและต้นทุนการผลิตต้นสับปะรดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบต่างๆ ของศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ

รายการ	ระบบอาหารแข็ง	ระบบอาหารเหลว	ระบบ TIBs
1. ระยะเวลา (วัน)	191	151	129
2. จำนวนอุปกรณ์ที่ใช้ (ชุด)	10,000	10,000	2
3. ต้นทุนการผลิต (บาท)			
3.1) 1,000 ต้น	53.3	40.8	32.8
3.2) 10,000 ต้น	6.9	5.7	4.7

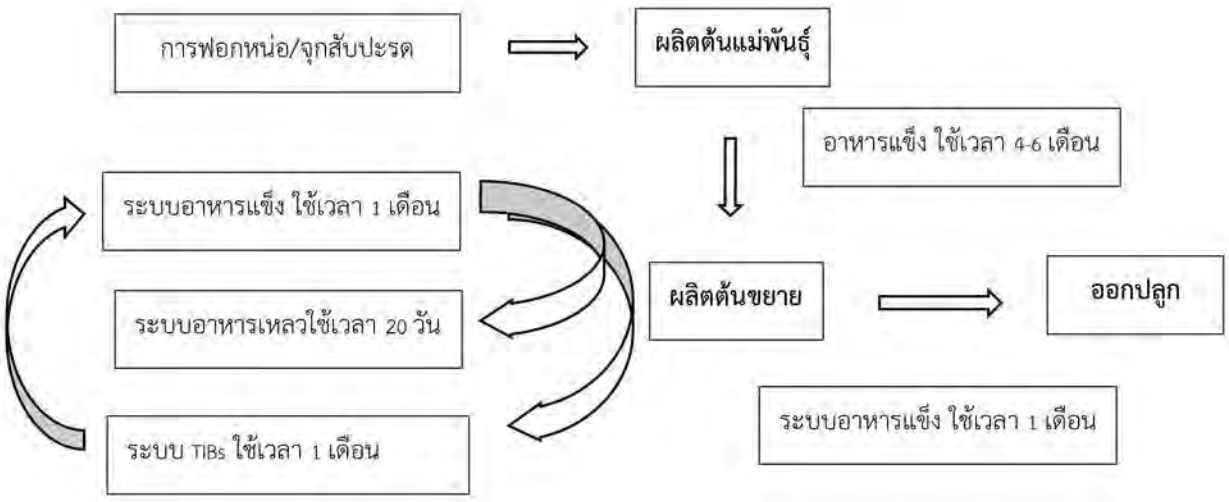
หมายเหตุคำนวณที่
- ค่าแรงวันละ 300 บาท ทำงานวันละ 8 ชั่วโมง
- ค่าอุปกรณ์ ระบบอาหารแข็งและอาหารเหลวเลี้ยงในขวดแก้ว (flask) ขนาด 8 ออนซ์ ชุดละ 24 บาท ใช้ได้ 20
- ครั้งไฟฟ้าเดือนละ 5,000 บาท

ส่วนที่ 2 การผลิตต้นอ่อนสับปะรดพันธุ์ MD2 โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืช คัดเลือกต้นแม่พันธุ์ MD2 ที่มีความสมบูรณ์ ทรงผลรูปสี่เหลี่ยม (square shape) น้ำหนักผลมากกว่า 1 กิโลกรัม จากแปลงเกษตรกร จ.เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และระยอง เก็บผลสับปะรดที่ความสุกแก่ 25-30 เปอร์เซ็นต์ มาตรวจสอบคุณภาพ และนำส่วนขยายพันธุ์มาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำจุกผลและหน่อจากต้นแม่พันธุ์มาลอกเอาใบออก นำเอาเนื้อเยื่อพืชส่วนเจริญมาทำการฟอกฆ่าเชื้อ โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) แช่ชิ้นส่วนพืชใน Alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ และเขย่าเป็นเวลา 15 นาที
2) แช่ชิ้นส่วนพืชใน NaOCl 0.9 เปอร์เซ็นต์ โดยใส่ Clorox 8.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 12.25 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร + น้ำยาล้างจาน 2 ช้อนชา เขย่าเป็นเวลา 20 นาที
3) แช่ชิ้นส่วนพืชใน NaOCl 0.6 เปอร์เซ็นต์ โดยใส่ Clorox 8.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 7.8 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 15 นาที
4) นำชิ้นส่วนพืชไปล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง
5) ตัดแต่งชิ้นส่วนพืช ปักลงในอาหารที่เตรียมไว้ ซึ่งจะได้เป็นต้นแม่พันธุ์สำหรับใช้ในการขยายเพิ่มจำนวนตามระบบต่างๆ

แผนผังการผลิตสับปะรดพันธุ์ MD2



การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรด MD2

การฟอกจุก/หน่อสับปะรดในการเปลี่ยนอาหารรุ่นที่ 1 แม้จะได้ต้นที่มีขนาดประมาณ 10 - 15 เซนติเมตร แต่ต้นมีการเจริญเติบโตช้า ได้จำนวนต้นเพียง 1 - 2 ต้น และใช้เวลา 30 วัน ในการเปลี่ยนอาหาร ครั้งที่ 2 - 5 จะได้ต้นที่มีขนาดต้นเล็กลงและมีการแตกเพิ่ม 3 - 4 ต้น (ใช้เวลา 20 - 30 วัน) ในการเปลี่ยนอาหาร ครั้งที่ 6 จะมีขนาดต้นเล็กลงเพียง 5 - 8 เซนติเมตร และมีการแตกเพิ่มจำนวนมาก (ใช้เวลา 20 วัน) จะเห็นได้ว่าขั้นตอนการขยายแม่พันธุ์เป็นขั้นตอนที่ช้าที่สุดใช้เวลา 5 - 6 เดือน จึงจะพร้อมนำไปเพิ่มจำนวนต้น ดังนั้นการเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาที่รวดเร็วขึ้น จะต้องเตรียมต้นแม่พันธุ์ให้พร้อมและมีจำนวนที่เหมาะสม (ตารางที่ 7)

การเปลี่ยนอาหารต้นสับปะรดรุ่นที่ 4 - 6 ดำเนินการในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 3 ระบบ คือ ระบบอาหารแข็ง ระบบอาหารเหลวและระบบ TIBs พบว่า

- ระบบอาหารแข็งใช้อาหารสูตร MS + BA 8 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 41) ได้จำนวนต้นใหม่น้อยสุด 4 - 10 ต้น ในระยะเวลา 20 วัน
- ระบบอาหารเหลวใช้อาหารสูตร MS + BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 42) ได้ต้นใหม่ 10 - 20 ต้น ในระยะเวลา 20 วัน
- ระบบ TIBs ใช้อาหารสูตร MS + BA 7 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 43) ได้จำนวนต้นใหม่มากสุด 20 - 100 ต้น ในระยะเวลา 30 วัน มากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและอาหารแข็งประมาณ 5 และ 10 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 8) รวมทั้งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ใช้เวลาสั้นกว่า และมีต้นทุนการผลิตต่อต้นถูกกว่าวิธีการอื่น (ตารางที่ 9) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในปริมาณมากจะทำให้ต้นทุนการผลิตต่อหน่วยลดลง

ตารางที่ 7 ขนาดและจำนวนต้นอ่อนของสับปะรด MD2 หลังการเปลี่ยนอาหาร

ลักษณะ	การเปลี่ยนอาหาร (ครั้ง)					
	1	2	3	4	5	6
ความกว้างต้นอ่อน (เซนติเมตร)	10-15	10-12	10-12	8-10	8-10	5-8
จำนวนต้นอ่อน (ต้น)	1-2	1-2	2-3	2-3	2-3	3-4
ระยะเวลา (วัน)	30	25-30	20-25	20-25	20-25	20

ตารางที่ 8 ผลของอัตราและระยะเวลาการเกิดยอดอ่อนของสับปะรด MD2 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 3 ระบบ

ระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	จำนวนยอดอ่อน	ระยะเวลา (วัน)
1. อาหารแข็ง	4-10	20
2. อาหารเหลว	10-20	20
3. TIBs	20-100	30

ภาพที่ 41 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรด MD2 ในอาหารแข็ง

ภาพที่ 42 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรด MD2 ในอาหารเหลว

ภาพที่ 43 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรด MD2 ในระบบ TIBs

ตารางที่ 9 ค่าใช้จ่ายในการผลิตสับปะรด MD2 ในระบบอาหารแข็ง อาหารเหลวและ TIBs ต่อการผลิต 10,000 ต้น

รายการ	ระบบอาหาร		
	อาหารแข็ง	อาหารเหลว	TIBs
เวลา (วัน)	150-180	120-150	60-90
จำนวน flask ที่ใช้	1,000	1,000	20
ค่าแรงงานในการเปลี่ยนอาหาร (บาท)	7,800	7,800	4,200
ค่าแรงงานล้างภาชนะเครื่องแก้ว (บาท)	900	900	600
ค่าแรงการดูแลในโรงเรือนเพาะชำ (บาท)	15,000	15,000	15,000
ค่าอุปกรณ์/เครื่องมือ (บาท)	48,000	48,000	4,000
ค่าอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (บาท)	14,000	10,800	3,600
ค่าไฟฟ้า (บาท)	30,000	10,800	3,600
รวม/ 10,000 plantlets (บาท)	115,700	93,000	35,800
ต้นทุนการผลิต/ต้น (บาท)	11.57	9.3	3.58

หมายเหตุ

- ค่าแรง 300 บาท/วัน
- Flask 24 บาท/ชุด ใช้ได้ 20 ครั้ง, TIBs 50,000 บาท/ชุด + อุปกรณ์ 500 บาท/ครั้ง (ใช้ได้ 100 ครั้ง)
- อาหาร MS 630 บาท/200 ขวด และ10 ต้น/ขวด ส่วน TIBs ใช้ 1 ลิตร/ครั้ง

5.5 กล้วย

กล้วยเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ทั้งการบริโภคภายในประเทศ และส่งออกสร้างรายได้ในแต่ละปีไม่ต่ำกว่า 300 ล้านบาท ปัจจุบันมีการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกกล้วยเชิงการค้ามากขึ้น เพื่อรองรับความต้องการของประเทศนำเข้าที่สำคัญอย่างญี่ปุ่น ซึ่งมีความต้องการนำเข้าปริมาณมากในแต่ละปี โดยทั่วไปการขยายพันธุ์กล้วยนิยมใช้หน่อ แต่จำนวนหน่อต่อกอน้อย ไม่เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญยิ่งในการขยายพันธุ์กล้วย เพื่อให้ได้ต้นพันธุ์จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว ปลอดจากโรคและแมลงที่เป็นปัญหาในปัจจุบัน ได้แก่ โรคตายพรายและหนอนกอ ได้สายพันธุ์ที่มีความสม่ำเสมอ และการเก็บเกี่ยวทำได้พร้อมกันจำนวนมาก

การเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์กล้วยปลอดโรคโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในปัจจุบัน มี 2 ระบบ คือ ระบบอาหารแข็ง และระบบ TIBs

1. การเพาะเลี้ยงในระบบอาหารแข็ง มีขั้นตอนและวิธีการ ดังนี้

1.1 การเตรียมชิ้นส่วน และการฟอกฆ่าเชื้อ

1. เลือกหน่อที่สภาพสมบูรณ์ ไม่มีร่องรอยการเข้าทำลายจากศัตรูพืช และอื่นๆ
2. ตัดส่วนใบทิ้ง และตัด/เฉือนส่วนกาบใบรอบนอกที่มีดินติดออกให้หมด
3. ลอกส่วนกาบใบออกให้เหลือส่วนในที่มีหัว (corm) และส่วนยอ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร มีความยาวของส่วนในที่มีหัว (corm) ประมาณ 3 เซนติเมตร และส่วนยอดยาวประมาณ 3 เซนติเมตร
4. นำชิ้นส่วนจากข้อ 3 มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที และเปลี่ยนลงสารละลายคลอร็อกซ์เข้มข้น 15 และ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 และ 15 นาที ตามลำดับ นำเข้าตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง

1.2 การชักนำให้เกิดยอด/ต้นอ่อน

1. ลอกกาบใบด้านนอกที่เสียหายจากการฟอกฆ่าเชื้อออก 1 - 2 ชั้น ให้ได้ชิ้นส่วนที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 1 - 1.5 เซนติเมตร มีความยาวของส่วนหัว (corm) ประมาณ 1 เซนติเมตร และส่วนยอดยาวประมาณ 1.5 - 2 เซนติเมตร

2. ตัดแบ่งชิ้นส่วนพืชออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน ให้ผ่านจุดศูนย์กลาง (⊕) นำชิ้นส่วนที่ตัดแบ่งแล้ว มาปักเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 - 5 มิลลิลิตรต่อลิตร[1/] และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์

3. วางบนชั้นที่มีแสงประมาณ 2,000 ลักซ์ ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ช่วงเวลาให้แสง 15 ชั่วโมง ช่วงมืด 9 ชั่วโมง เลี้ยงไว้ 1 เดือน เปลี่ยนอาหารใหม่สูตร MS ที่เติม BA 2 - 5 มิลลิลิตรต่อลิตร[1/] ตัดเนื้อเยื่อส่วนที่ดำออกและตัดแบ่งครึ่งชิ้นส่วน (▽) ประมาณเดือนที่ 2 เริ่มเกิดหน่อใหม่

1.3 การขยายเพิ่มปริมาณยอด/ต้นอ่อน

1. ตัดแยกหน่อใหม่ออก ตัดส่วนยอดและผ่าแบ่งครึ่งผ่านจุดศูนย์กลาง (⏀) โดยใส่ 5 ชิ้นต่อขวด (1 ต้นได้ 2 ชิ้น) เลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม

2. หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จะมีการแตกหน่อใหม่เพิ่มขึ้น ให้เพิ่มปริมาณโดยเปลี่ยนอาหารใหม่สูตรเดิม ตัดแยกและผ่าแบ่งครึ่งหน่อใหม่ ทุก 3-5 สัปดาห์[2/] (ขึ้นกับชนิดกล้วย) จนได้ปริมาณต้นเพียงพอตามต้องการ หลังทำการเพาะเลี้ยง 3-5 สัปดาห์ กล้วยไข่ 1 ชิ้น มีการเพิ่มปริมาณ 2.7 เท่า และกล้วยน้ำว้า มีการเพิ่มปริมาณ 2.2 เท่า

1.4 การชักนำให้ออกราก

ย้ายต้นอ่อนลงอาหารแข็งสูตร MS ประมาณ 3-4 สัปดาห์ จะได้ต้นและรากที่แข็งแรงสมบูรณ์ เพื่อนำออกอนุบาลในเรือนเพาะชำต่อไป

2. การเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs มีขั้นตอนและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนี้

การเตรียมต้นพันธุ์ปลอดโรค ในขั้นตอน **การเตรียมชิ้นส่วนและการฟอกฆ่าเชื้อ** และ **การชักนำให้เกิดยอด/ต้นอ่อน** ให้ดำเนินการเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงในระบบอาหารแข็ง

2.1 การขยายเพิ่มปริมาณยอด/ต้นอ่อน

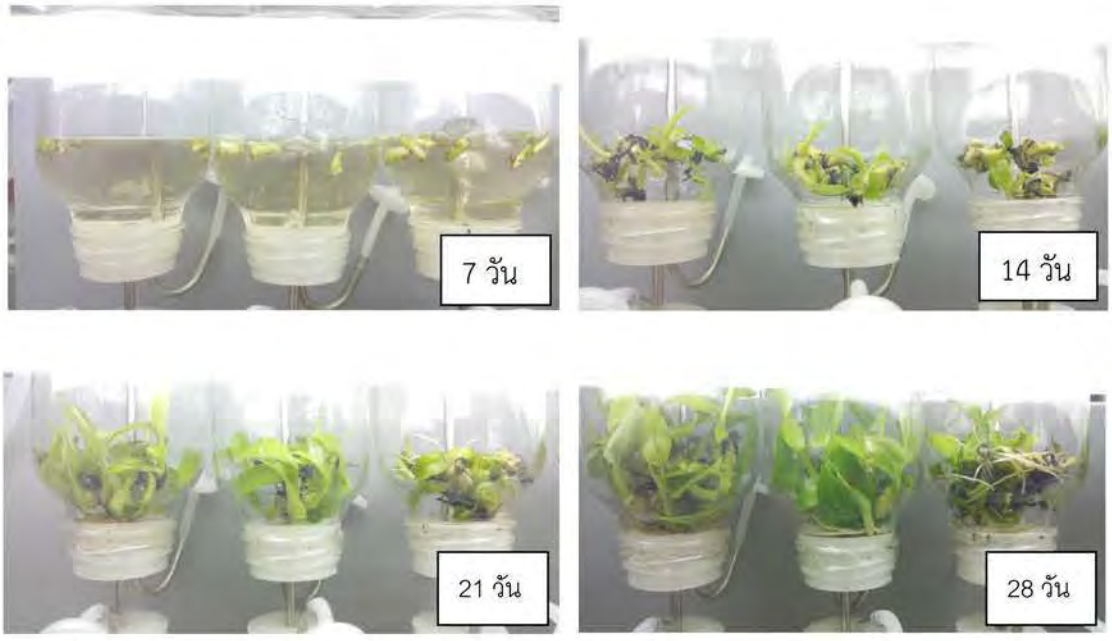
1. ตัดแยกหน่อใหม่ออก ตัดส่วนยอดและผ่าแบ่งครึ่งผ่านจุดศูนย์กลาง (⏀) โดยใส่ 7-10 ชิ้นต่อขวด (1 ต้นได้ 2 ชิ้น) ทำการเลี้ยงในระบบ TIBs โดยใช้อาหารสูตรเดิมแต่ไม่เติมวุ้น ให้อาหารครั้งละ 2 นาที 6 ครั้งต่อวัน

2. หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ จะแตกหน่อใหม่เพิ่มขึ้น ทำการเพิ่มปริมาณโดยเปลี่ยนอาหารใหม่สูตรเดิมและเวลาการได้รับอาหารเท่าเดิม ตัดแยกและผ่าแบ่งครึ่งหน่อใหม่ ทุก 3-4 สัปดาห์ กล้วยไข่ 1 ชิ้น มีการเพิ่มปริมาณ 4.0 เท่า และกล้วยน้ำว้า มีการเพิ่มปริมาณ 3.4 เท่า

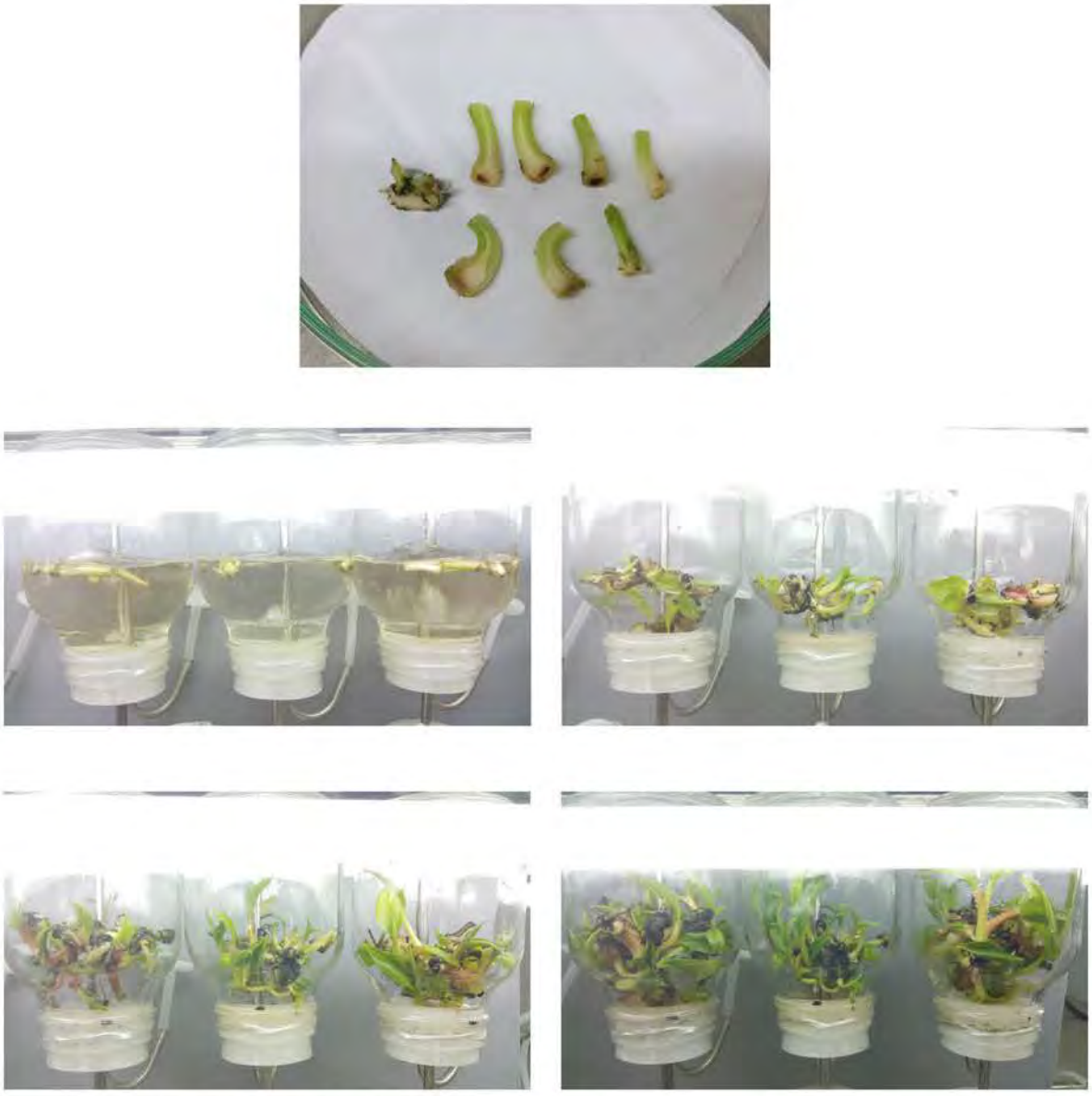
2.2 การชักนำให้ออกราก

กล้วยไข่และกล้วยน้ำว้าที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIBs สามารถออกรากได้ภายใน 3 - 4 สัปดาห์ แต่จะพบการแตกหน่อร่วมด้วย ทำให้ไม่เหมาะที่จะนำไปอนุบาล จึงควรตัดแยกต้นก่อนและทำการย้ายลงอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ประมาณ 3 - 4 สัปดาห์ จะได้ต้นและรากที่แข็งแรงสมบูรณ์ เพื่อนำออกอนุบาลในเรือนเพาะชำต่อไป (ภาพที่ 44 และ 45)

1/ และ 2/ กล้วยไข่ เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 5 มิลลิลิตรต่อลิตร และตัดเปลี่ยนอาหารสูตรเดิม ทุก 3 สัปดาห์
กล้วยน้ำว้า เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิลิตรต่อลิตร และตัดเปลี่ยนอาหารสูตรเดิม ทุก 5 สัปดาห์



ภาพที่ 44 ชิ้นส่วนเริ่มต้นของกล้วยไข่ ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ และการพัฒนาของชิ้นส่วนที่ระยะเวลา 7 14 21 และ 28 วัน หลังเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs



ภาพที่ 45 ชิ้นส่วนเริ่มต้นของกล้วยน้ำว้า ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ และการพัฒนาของชิ้นส่วนที่ระยะเวลา 7 14 21 และ 28 วัน หลังเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs

5.6 มันฝรั่ง

มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum L.*) เป็นพืชอุตสาหกรรมที่ปลูกได้ในเขตอบอุ่นจนถึงเขตหนาว มีความสำคัญอยู่ในอันดับที่สี่ของโลกรองจาก ข้าว ข้าวสาลีและข้าวโพด จัดเป็นพืชหนึ่งที่ทำรายได้สูงให้แก่เกษตรกรในเขตภาคเหนือ โดยรายได้เฉลี่ยต่อไร่อยู่ระหว่าง 15,000-25,000 บาท แหล่งผลิตที่สำคัญอยู่ที่จังหวัดเชียงใหม่ โดยมีผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 90 ของผลผลิตทั้งประเทศ ปัจจุบันมีการขยายพื้นที่ปลูกไปยังจังหวัดอื่นๆ เช่น จังหวัดตาก เชียงราย พะเยา ลำพูน ลำปาง และบางพื้นที่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดหนองคาย สกลนคร และเลย

จากการขยายตัวอย่างรวดเร็วของอุตสาหกรรมแปรรูปมันฝรั่งในประเทศโดยเฉพาะมันฝรั่งทอดกรอบ เพื่อจำหน่ายในประเทศ และส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศ (สนองและคณะ, 2551; อรทัย, 2557) ทำให้ผู้ประกอบการมีความต้องการวัตถุดิบเพื่อป้อนโรงงานเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกษตรกรมีความต้องการหัวพันธุ์มันฝรั่งเพื่อใช้เป็นหัวพันธุ์ขยาย และผลิตหัวมันฝรั่งส่งโรงงาน (รัฐบาลไทย, 2555) การผลิตหัวพันธุ์ใช้ภายในประเทศมีปริมาณน้อย ไม่เพียงพอต่อความต้องการ ประกอบกับหัวพันธุ์มันฝรั่งที่เกษตรกรเก็บไว้ใช้เองไม่มีคุณภาพ ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพง ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูง ปัญหาดังกล่าวจึงเป็นข้อจำกัดต่อการขยายตัวของอุตสาหกรรมแปรรูปมันฝรั่งในประเทศไทย

ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ กรมวิชาการเกษตร ได้ดำเนินการวิจัยเพื่อลดขั้นตอนการผลิตต้นอ่อนปลอดเชื้อโดยใช้ระบบ TIBs ในห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับการตัดข้อของต้นอ่อนมันฝรั่ง เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตต้นอ่อนปลอดเชื้อจำนวนมาก ในเวลาน้อยกว่า 1 เดือน โดยได้ต้นที่ปลอดจากโรคไวรัส และโรคเหี่ยวเขียวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* และมีความแข็งแรง ให้ผลผลิตสูง ก่อนนำไปขยายเป็นต้นแม่พันธุ์ต่อไป (ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่, 2557; อรทัย, 2557)

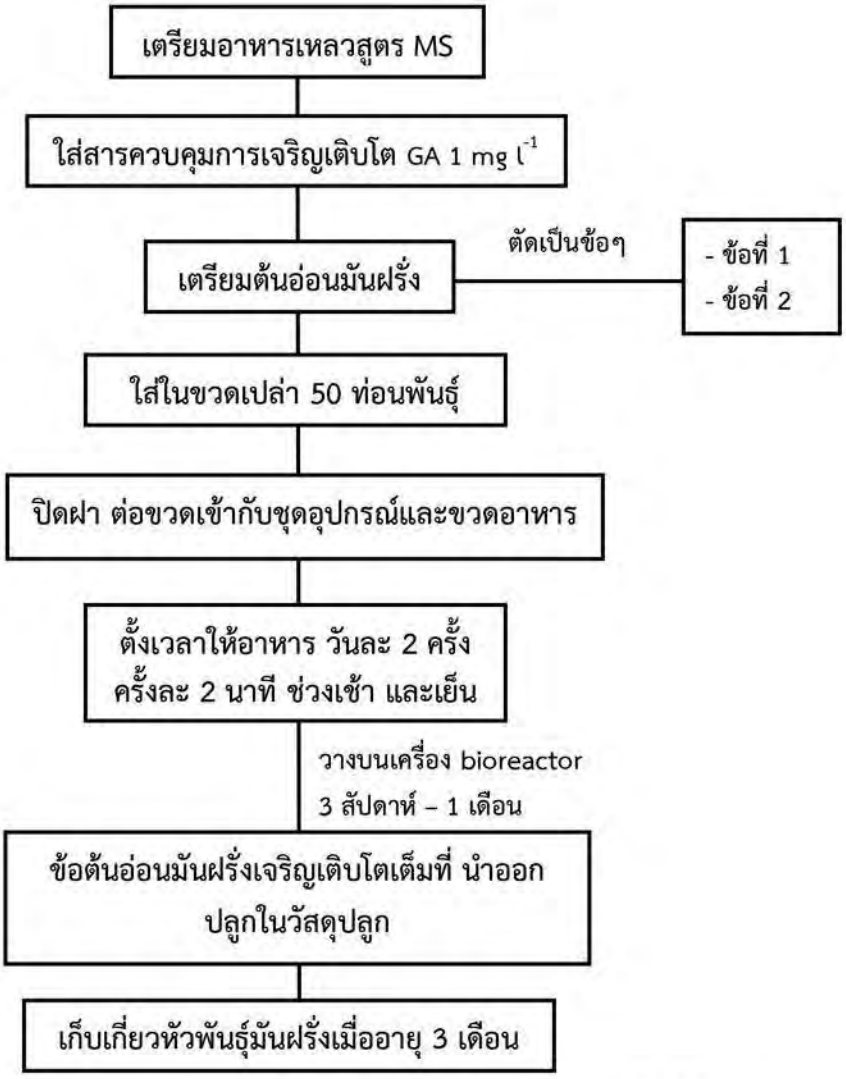
ขั้นตอนดำเนินการประกอบด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมต้นอ่อนมันฝรั่ง โดยใช้กรรไกรตัดต้นมันฝรั่งเป็นข้อๆ ให้นับข้อจากบนลงล่าง ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ตัดใบทิ้ง นำไปใส่ในขวดเปล่า ขวดละ 50 ท่อนพันธุ์ ปิดฝาขวดด้วยชุดอุปกรณ์ ซึ่งเชื่อมต่อกับขวดอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อพันด้วยฟิล์มถนอมอาหาร นำไปวางบนเครื่องไบโอรีแอคเตอร์ (bioreactor) หรือ TIBs ที่ต่อเข้ากับชุดทำงานของเครื่องในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตั้งเวลาให้อาหาร วันละ 2 ครั้ง ช่วงเช้า และเย็น ครั้งละ 2 นาที หลังจาก 3 สัปดาห์ ถึง 1 เดือน พืชจะเจริญเติบโตเต็มที่สามารถนำออกปลูกได้โดยไม่ต้องเปลี่ยนสูตรอาหาร (ภาพที่ 46 และ 47)

การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนมันฝรั่งในอาหารเหลวโดยใช้ระบบ TIBs โดยใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต GA ร่วมกับการตัดข้อที่ 1 มีความเหมาะสมในการผลิตต้นอ่อนปลอดเชื้อด้วยระบบ TIBs มากที่สุด สามารถผลิตต้นอ่อนปลอดเชื้อได้เป็นจำนวนมาก ในเวลาน้อยกว่า 1 เดือน ให้น้ำหนักเฉลี่ย ความยาวราก และจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด 144.4 มิลลิกรัม 4.71 เซนติเมตรและ

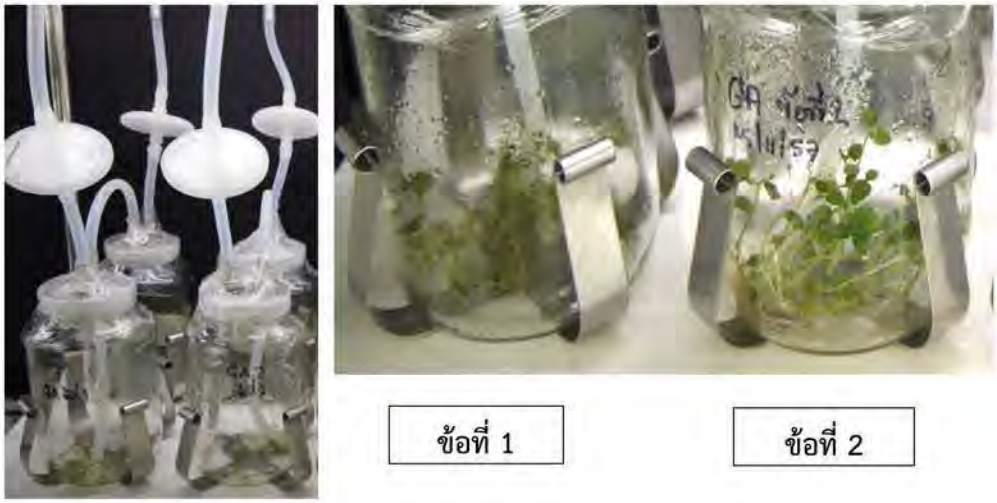
9.6 ราก ตามลำดับ มีเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น 0.51 มิลลิเมตร และพบเปอร์เซ็นต์การรอดตายที่ 1 เดือนเฉลี่ยมากที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ GA ร่วมกับการตัดข้อที่ 2, 3 และ 4 จะให้น้ำหนักต้น เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นเฉลี่ย ความยาวราก จำนวนราก และเปอร์เซ็นต์การรอดตายไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 10 ภาพที่ 47) จากนั้นนำต้นอ่อนมันฝรั่งที่ได้ไปย้ายปลูกลงในวัสดุปลูกเพอร์ไลท์ ผสมมีเดียปลูก อัตรา 1:1 ส่วน จากนั้น 1-2 สัปดาห์ ย้ายปลูกในวัสดุปลูก ได้แก่ ดิน แกลบดิบ แกลบดำ ปุ๋ยคอก อัตรา ½: 1: 1:1 ส่วน อบฆ่าเชื้อที่ 100°C เมื่อต้นมันฝรั่งอายุ 60 วัน การใช้ GA ร่วมกับการตัดข้อที่ 2 ให้จำนวนหัวต่อต้นเฉลี่ยมากที่สุด 6.7 หัว รองลงมาได้แก่ การใส่ GA ร่วมกับการตัดข้อที่ 4, ข้อที่ 1 และข้อที่ 3 ได้ 6.5, 6.2 และ 6.0 หัว ตามลำดับ (ตารางที่ 10, ภาพที่ 48)

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น ความยาวราก จำนวนราก และเปอร์เซ็นต์การรอดตายที่ 1 เดือน ของต้นอ่อนมันฝรั่งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบ TIBs และความสูงที่อายุ 60 วัน จำนวนหัวเฉลี่ยต่อต้น ของต้นมันฝรั่งที่ย้ายปลูกลงในวัสดุปลูก ปี 2557-2558

ปัจจัยที่ 1	ปัจจัยที่ 2	ระบบ TIBs					วัสดุปลูก	
		น้ำหนัก (มก.)	Ø ลำต้น (มม.)	ความยาวราก (ซม.)	จำนวนราก (ราก)	การรอดตายที่ 1 เดือน (%)	ความสูงที่ 60 วัน (ซม.)	จำนวนหัวต่อต้น (หัว)
GA	ข้อที่ 1	144.4	0.51	4.71	9.6	100.0	37.85	6.2
	ข้อที่ 2	127.4	0.64	4.30	6.3	98.0	41.30	6.7
	ข้อที่ 3	133.5	0.55	4.30	4.9	96.0	46.20	6.0
	ข้อที่ 4	125.0	0.47	4.83	6.5	96.3	37.00	6.5

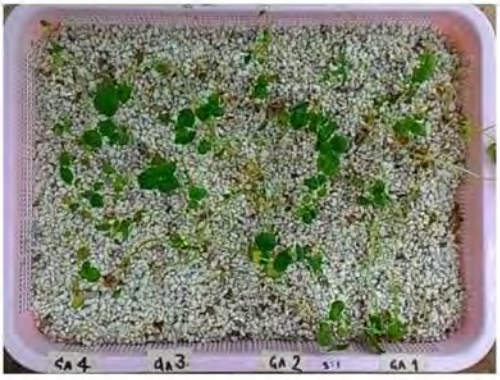


ภาพที่ 46 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนมันฝรั่งในอาหารเหลวโดยใช้ระบบ TIBs



ภาพที่ 47 ลักษณะการเชื่อมต่อชุดอุปกรณ์ และขวดอาหารเข้ากับเครื่อง bioreactor และการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนมันฝรั่งด้วย GA ในระบบ TIBs อายุ 3 สัปดาห์

ก) เปรียบเทียบการเจริญเติบโตในอาหารแข็งและในระบบ TIBs



ก) ย้ายปลูกลงวัสดุปลูก perlite

ข) ย้ายปลูกในดินปลูก เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ ระยะปลูก 10x10 ซม.

ค) การเจริญของต้นเมื่ออายุ 1 เดือน หลังย้ายปลูก

ง) เก็บเกี่ยวหัวพันธุ์มันฝรั่งเมื่ออายุ 3 เดือน

ภาพที่ 48 การปลูกต้นแม่พันธุ์มันฝรั่งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในวัสดุปลูก

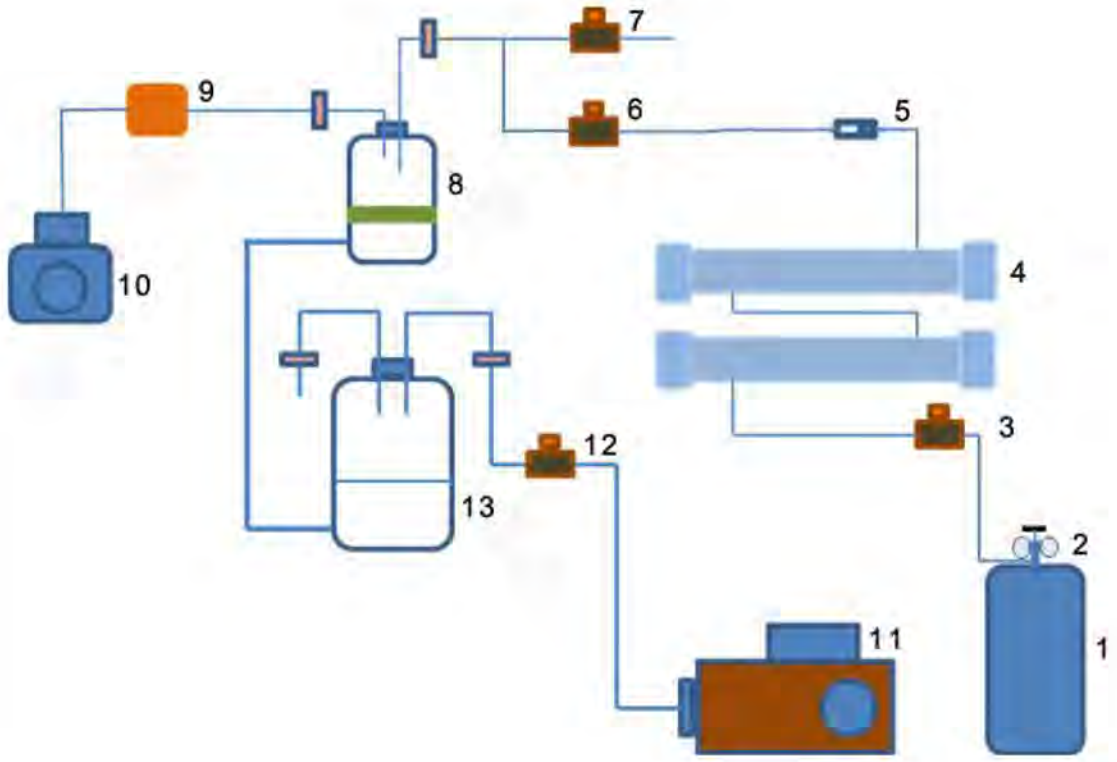
บทที่ 6

การควบคุมปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในระบบ TIBs

ในการขยายพันธุ์พืชใหม่ให้ทันความต้องการของตลาด นอกจากการพัฒนาสูตรอาหารแล้วยังมีแนวคิดในการนำเอาก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แทนการใช้น้ำตาลในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช แต่เครื่องวัดและควบคุมปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากต่างประเทศมีราคาสูง กรมวิชาการเกษตรจึงได้ดำเนินการสร้างและทดสอบเครื่องควบคุมสภาวะอากาศดัดแปลงในระดับห้องปฏิบัติการ ที่มีความเที่ยงตรงสูง เป็นที่ยอมรับและสามารถตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) ความสามารถในการวัดซ้ำ (Repeatability) ช่วงวัดที่เหมาะสม (Sensitivity) และสามารถผลิตตามต้นแบบได้โดยต้องวัดความเข้มข้นของก๊าซที่ต้องการอย่างแม่นยำและควบคุมก๊าซในปริมาณที่ต้องการ โดยควบคุมการปิดเปิดวาล์วรวมทั้งการแสดงผลเป็นตัวเลข เพื่อใช้เป็นแหล่งให้คาร์บอนไดออกไซด์ในระบบ TIBs ซึ่งเป็นพัฒนาการของการเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์พืชขึ้นอีกระดับหนึ่ง และได้เทคโนโลยีที่สามารถขยายผลไปสู่ผู้ประกอบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ผลิตต้นกล้ากล้วยไม้เพื่อการส่งออกได้อย่างมีคุณภาพมีมาตรฐานตรงตามความต้องการของลูกค้าด้วยต้นทุนและความเสียหายที่ต่ำเท่าที่จะเป็นไปได้

เครื่องควบคุมสภาวะอากาศดัดแปลงในระดับห้องปฏิบัติการมีหลักการทำงาน ดังภาพที่ 49 ระบบวัดและควบคุมสภาวะอากาศดัดแปลงประกอบด้วยถังบรรจุก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งอยู่ในสภาพของเหลวแรงดันสูง ทำให้คาร์บอนไดออกไซด์เปลี่ยนสภาพจากของเหลวเป็นก๊าซโดยการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ผ่านวาล์วปรับแรงดันก๊าซเข้าสู่แคปซูลบรรจุคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งมีลักษณะเป็นท่อปิดสองท่อต่อกันด้วยสายลม การปล่อยก๊าซเข้าแคปซูลถูกควบคุมด้วยโซลินอยด์วาล์วตัวที่หนึ่ง ก๊าซจากแคปซูลผ่านวาล์วนิรภัย วาล์วปรับแรงดันก๊าซ และโซลินอยด์วาล์วตัวที่สองเข้าสู่โถเลี้ยง อากาศจากภายนอกห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านกรองอากาศและโซลินอยด์วาล์วตัวที่สามเข้าสู่โถเลี้ยง อากาศและคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่โถเลี้ยงในช่องทางเดียวกันโดยการต่อข้อต่อ วัดและควบคุมปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในโถด้วยหัววัดความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้ปั๊มสูญญากาศในการดูดก๊าซในระบบ

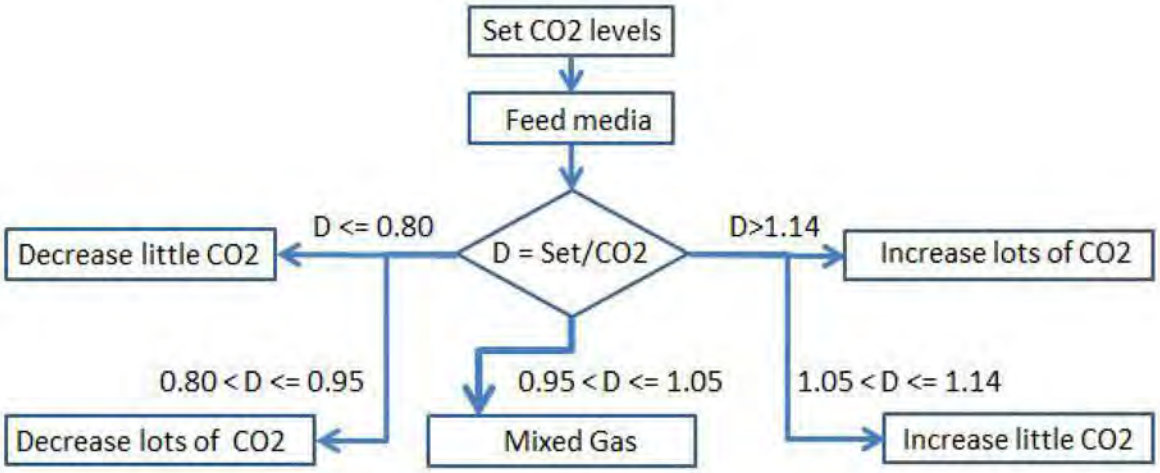
สัญญาณจากหัววัดความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ถูกต่อเข้ากับวงจรรับ ขยาย และปรับสภาพสัญญาณ แปลงสัญญาณ Analog เป็น Digital การวิเคราะห์ประมวลผล แสดงผล และควบคุมปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยไมโครคอนโทรลเลอร์โดยต่อเข้ากับวงจรรีเลย์เพื่อควบคุมการเปิดปิดโซลินอยด์วาล์วทุกตัวและควบคุมการเปิดปิดปั๊มสูญญากาศ



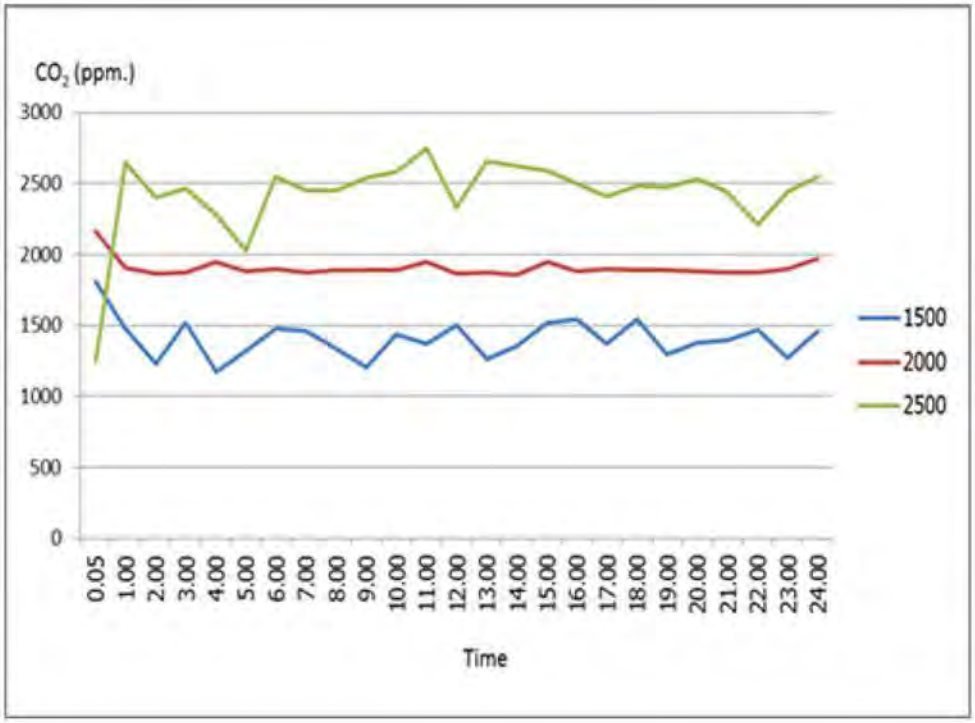
ภาพที่ 49 แผนผังระบบวัดและควบคุมสภาวะอากาศดัดแปลง 1) ถังคาร์บอนไดออกไซด์, 2) วาล์วปรับแรงดันก๊าซ, 3) โซลินอยด์วาล์ตัวที่หนึ่ง, 4) ถังแคปซูลบรรจุคาร์บอนไดออกไซด์, 5) วาล์วนิรภัย, 6) โซลินอยด์วาล์วตัวที่สอง, 7) โซลินอยด์วาล์วตัวที่สาม, 8) โถเลี้ยง, 9) เซ็นเซอร์วัดคาร์บอนไดออกไซด์, 10) ปั๊มสูญญากาศ, 11) ปั๊มลม, 12) โซลินอยด์วาล์วตัวที่สี่ และ 13) โถบรรจุอาหาร

หลักการทำงานของโปรแกรมระบบวัดและควบคุมสภาวะอากาศดัดแปลง

โปรแกรมการทำงานของระบบวัดและควบคุมสภาวะอากาศเริ่มต้นจากการเลือกระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต้องการ โปรแกรมจะทำการจดจำค่าเก็บไว้ในตัวแปร ไมโครคอนโทรลเลอร์รับค่าสัญญาณจากหัววัดความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แปลงเป็นค่าคาร์บอนไดออกไซด์ในระบบขณะนั้น ระบบทำการคำนวณอัตราส่วนระหว่างค่าคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต้องการและคาร์บอนไดออกไซด์ในระบบ เมื่ออัตราส่วนมีค่าสูงระบบจะทำการเพิ่มปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปในขวดเลี้ยง ถ้าอัตราส่วนมีค่าต่ำก็จะทำการเพิ่มอากาศเข้าไปในขวดเลี้ยง เมื่ออัตราส่วนนี้มีค่าระหว่าง 0.95 – 1.05 หมายถึงได้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณที่ต้องการในขวดเลี้ยง ระบบจะปิดการทำงานของโซลินอยด์วาล์วตัวที่สอง สาม และปั๊มสูญญากาศเพื่อให้เป็นระบบปิด ในกรณีที่อัตราส่วนมีค่าต่ำกว่าอัตราส่วนดังกล่าว ระบบจะทำการดูดอากาศเข้ามาในขวดเลี้ยงเพื่อรักษาปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในขวดเลี้ยงให้อยู่ในระดับที่ต้องการ เป็นต้น (ภาพที่ 50 และ 51)



ภาพที่ 50 แผนผังโปรแกรมระบบวัดและควบคุมสภาวะอากาศดัดแปลง



ภาพที่ 51 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ระดับต่างๆ ในระบบ TIBs ในระยะเวลา 24 ชัวโมงหลังการให้อาหาร

การเพาะเลี้ยงกล้วยไม้แวนด้า JK315 ในสภาพดัดแปลงที่มีการควบคุมการให้ CO_2

การเจริญของต้นอ่อนแวนด้าJK315 ใน TIBs ที่มีการควบคุมการให้คาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2,000 และ 2,500 ppm ให้จำนวนต้น และน้ำหนักต้นรวม สูงกว่า control (ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ในห้องปฏิบัติการ) และ การให้คาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้น 1,500 ppm (ตารางที่ 11, 12 และ ภาพที่ 52)

ตารางที่ 11 การเจริญของต้นอ่อนแวนด้าในระบบ TIBs ที่มีการให้คาร์บอนไดออกไซด์ ระดับต่าง ๆ

คาร์บอนไดออกไซด์ (ppm)	นน. รวม (กรัม)	จำนวนต้น	นน./ต้น (กรัม)
1,500	66.63	67.67	0.90
2,000	71.60	74.00	0.96
2,500	70.41	74.50	1.01
control	63.64	54.00	0.94

ตารางที่ 12 อัตราการเพิ่มเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลแวนด้าที่เลี้ยงใน TIBs ที่ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน

คาร์บอนไดออกไซด์ (ppm)	เปอร์เซ็นต์เพิ่มเมื่อเทียบกับ control		
	นน. รวม (กรัม)	จำนวน (ต้น)	นน.ต่อต้น (กรัม)
1,500	4.70	25.37	-4.28
2,000	12.51	37.04	2.13
2,500	10.64	37.96	7.45

ภาพที่ 52 ระบบ TIBs ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้หวายโสมสวลีที่ให้คาร์บอนไดออกไซด์ระดับต่างๆ

การเพาะเลี้ยงกล้วยไม้หวายโสมสวลีในระบบ TIBs ที่มีการควบคุมการให้คาร์บอนไดออกไซด์

การให้คาร์บอนไดออกไซด์จะช่วยเพิ่มจำนวนต้นของกล้วยไม้หวายโสมสวลี มากกว่าการเพิ่มน้ำหนักต้นเมื่อเปรียบเทียบกับ control (ตารางที่ 13, 14 และภาพที่ 52) โดยคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 1500 ppm จะเพิ่มปริมาณต้นอ่อนได้มากที่สุด โดยเพิ่มมากเป็น 2.55 1.40 และ

1.34 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ control คาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 2,000 และ 2,500 ppm ตามลำดับ

สำหรับการเพิ่มน้ำหนักหรือขยายขนาด พบว่า control สามารถเพิ่มน้ำหนักของต้นอ่อนขนาดเล็ก ได้ดีกว่าการเพิ่มของคาร์บอนไดออกไซด์ทุกระดับความเข้มข้น (ตารางที่ 15 และ 16) ในขณะที่การเลี้ยงต้นอ่อนขนาดกลาง พบว่าการให้คาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้น 2,000 ppm จะมีการเพิ่มน้ำหนักได้มากกว่า control และ คาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 1,500 ppm และ 2,500 ppm (ตารางที่ 15 และ 16)

ตารางที่ 13 การเจริญของกล้วยไม้หวายโสมสวลีที่เลี้ยงใน TIBs ที่ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน

ความเข้มข้น CO_2	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)		น้ำหนักเก็บเกี่ยว			
	น้ำหนักรวม (กรัม)	น้ำหนักต่อต้น (กรัม)	น้ำหนักรวม (กรัม)	จำนวนต้นรวม (ต้น)	น้ำหนักต่อต้น (กรัม)	น้ำหนักเพิ่มต่อต้น (กรัม)
control	20	0.07	25.17	30	0.84	0.77
	25	0.13	51.20	179	0.29	0.16
	25	0.15	46.10	198	0.32	0.08
		รวม	**122.77**	**407**	**0.45**	**0.34**
1,500	20	0.07	48.79	470	0.10	0.03
	25	0.13	65.20	378	0.17	0.43
	25	0.15	42.91	189	0.23	0.08
		รวม	**91.56**	**1037**	**0.17**	**0.05**
2,000	20	0.07	68.32	353	0.19	0.12
	25	0.13	5.038	182	0.29	0.16
	25	0.15	51.49	204	0.25	0.10
		รวม	**124.85**	**739**	**0.25**	**0.13**
2,500	20	0.07	53.23	240	0.22	0.15
	25	0.13	75.03	298	0.25	0.21
	25	0.15	46.22	237	0.20	0.05
		รวม	**174.48**	**775**	**0.22**	**0.11**

ตารางที่ 14 ขนาดและจำนวนต้นกล้วยไม้หวายโสมสวลีที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIBs ที่ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน

ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ (ppm)	ขนาดต้นหลังเก็บเกี่ยว			จำนวนต้นรวม	อัตราส่วนขนาดต้น (เปอร์เซ็นต์)			ต้นเสีย (กรัม)
	เล็ก	กลาง	ใหญ่		เล็ก	กลาง	ใหญ่	
control	339	67	1	407	83.29	16.46	0.25	43.70
1,500	962	56	19	1037	92.77	5.40	1.83	12.12
2,000	515	189	35	739	69.69	25.58	4.74	23.15
2,500	582	164	29	775	75.10	21.16	3.74	23.23

ตารางที่ 15 การเพิ่มน้ำหนักของกล้วยไม้หวายโสมสวลีที่เพาะเลี้ยงใน TIBs ที่ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน

น้ำหนักเริ่มต้น	น้ำหนักเพิ่มต่อต้นหลังเก็บเกี่ยวที่ความเข้มข้น CO_2 ระดับต่างๆ (กรัม)			
	Control	1,500 ppm	2,000 ppm	2,500 ppm
ต้นเล็ก (0.07 กรัม/ต้น)	0.769	0.034	0.123	0.152
ต้นกลาง (0.13 และ 0.15 กรัม/ต้น)	0.238	0.086	0.256	0.167

ตารางที่ 16 อัตราเพิ่มการเจริญเติบโตของกล้วยไม้หวายโสมสวลีที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIBs ที่ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน

คาร์บอนไดออกไซด์ (ppm)	เปอร์เซ็นต์เพิ่มเมื่อเทียบกับ control		
	นน. รวม (กรัม)	จำนวนต้น (ต้น)	นน.ต่อต้น (กรัม)
1,500	-25.4	154	-62
2,000	1.7	81.6	-44
2,500	42.1	90.4	-51

Norikane และคณะ (2010) ทดลองให้คาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 3,000 ppm ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ Cymbidium เป็นเวลา 90 วัน ภายใต้การให้แสงที่ 45 และ 75 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ก่อนนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติเป็นเวลา 30 วัน พบว่าน้ำหนักแห้งของยอดและรากเพิ่มขึ้น 216 และ 249 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ภายใต้แสง 45 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ในขณะที่การให้แสง 75 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที สามารถเพิ่มน้ำหนักแห้งของยอดและรากเพิ่มขึ้น 223 และ 436 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สรุปได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ในระบบปิดสามารถเพิ่มคุณภาพต้นพันธุ์กล้วยไม้ในการผลิตเชิงการค้าได้

บทที่ 7

สรุป

ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวแบบ Temporary Immersion Bioreactor (TIBs) เป็นระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบบใหม่ที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมัก แต่แตกต่างจากระบบถังหมัก โดยที่ต้นพืชจะไม่ได้จมอยู่ในอาหารเหลวตลอดเวลา เพื่อลดความผิดปกติของต้นพืชจากอาการฉ่ำน้ำ ซึ่งเป็นผลจากการที่ต้นพืชจมอยู่ในอาหารเหลวตลอดเวลา

ในปัจจุบันระบบ TIBs จะประกอบด้วยภาชนะสองชิ้น ซึ่งอาจจะทำจากแก้วหรือพลาสติกก็ได้ โดยภาชนะส่วนหนึ่งเป็นที่ใส่เนื้อเยื่อพืชที่จะเพาะเลี้ยง และอีกส่วนหนึ่งเป็น ที่ใส่อาหารเหลวให้ต้นพืช เชื่อมต่อกันด้วยสายยางซิลิโคนหรือท่อโลหะ ระบบการทำงาน อาศัยแรงดันลมจากปั๊มลมดันให้อาหารเหลวจากส่วนล่างวิ่งขึ้นไปส่วนบน เมื่อหยุดให้อาหาร อาหารจะไหลกลับด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก ทั้งนี้สามารถกำหนดความถี่และระยะเวลาให้อาหารแก่ต้นพืชให้เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด โดยคำนึงถึงความต้องการธาตุอาหารและลักษณะการเจริญเติบโตของพืช

ข้อดีของการนำระบบ TIBs ไปใช้ในการขยายพันธุ์พืช คือ ลดแรงงานในการเปลี่ยนอาหาร ซึ่งปกติสูงถึง 46 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระดับอุตสาหกรรม โดยระบบ TIBs สามารถลดต้นทุนค่าแรงงานได้ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังสามารถลดพื้นที่ในห้องเก็บพืช และต้นทุนค่าอาหาร พืชที่เลี้ยงด้วยระบบ TIBs เจริญเติบโตเร็วกว่าที่เลี้ยงในอาหารแข็ง สามารถพัฒนาระบบ TIBs ให้เป็นระบบกึ่งอัตโนมัติได้ นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ในระบบปิดสามารถเพิ่มคุณภาพต้นพันธุ์กล้วยไม้ในการผลิตเชิงการค้าได้ อย่างไรก็ตามการลงทุนเริ่มต้นของระบบ TIBs นี้ค่อนข้างสูง ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญในการต่อระบบและการใช้อุปกรณ์ เพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะก่อให้เกิดความเสียหายในปริมาณมาก

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs สามารถใช้ในการขยายพันธุ์พืชได้ทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น สับปะรด ปทุมมา และพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น กาแฟโรบัสต้า กล้วยไม้หน้าวัว การนำระบบนี้ไปใช้กับพืชแต่ละชนิด ผู้ปฏิบัติจะต้องมีความเข้าใจลักษณะการเจริญเติบโต ความต้องการธาตุอาหารในแต่ละขั้นตอนเพาะเลี้ยงของพืช เพื่อให้การใช้ระบบนี้ประสบความสำเร็จ

บรรณานุกรม

นพมณี โทปุญญานนท์ ปวีณา นามเจริญ วิภาดา ทองทักษิณ สุปัน ไม้ดัดจันทร์ รังสิมา อัมพวัน ทิพย์สุดา ปุกมณี และพรศักดิ์ บุญมณี. 2548. การพัฒนาระบบการผลิตต้นปทุมมาต้นทุนต่ำด้วยการใช้ไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว. รายงานการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ 88 หน้า.

บริษัทไพฑูรย์สะพลี จำกัด. 2559. คู่มือการใช้งาน PTS Bioreactor PTS01.

ประภาพร ฉันทานุมัติ และยุพิน กสินเกษมพงษ์. 2551. การผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้าจากวิธี Somatic Embryogenesis ในระบบ Temporary Immersion Bioreactor. บทคัดย่อหน้า 338. *ใน : เอกสารประกอบการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 7.*

ประภาพร ฉันทานุมัติ อรทัย ธนัญชัย ยุพิน กสินเกษมพงษ์ และสุเมธ อ่องเภา. 2558. บทคัดย่อหน้า 7. *ใน : เอกสารประกอบการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 14.*

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. โอ.เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์. 158 หน้า.

ยุพิน กสินเกษมพงษ์ ประภาพร ฉันทานุมัติ และดวงพร อมัติรัตนะ. 2553. การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้าโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบ TIB. บทคัดย่อหน้า 22 *ใน : เอกสารประกอบการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 9.*

ยุพิน กสินเกษมพงษ์ และประภาพร ฉันทานุมัติ. 2554. เอกสารประกอบการฝึกอบรมการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยเทคนิค Somatic Embryogensis (ใช้พืชกาแฟเป็นพืชต้นแบบ). ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. 42 หน้า.

รัฐบาลไทย. 2555. ครม.ไฟเขียวเปิดตลาดหอมหัวใหญ่ มันฝรั่ง 3 ปี ตามข้อผูกพัน WTO เกษตรฯ ศึกษาผลกระทบยันไม่กระทบเกษตรกรผู้ผลิตในประเทศ กลับส่งผลดีต่ออุตสาหกรรมอาหารของประเทศ. สำนักเลขาธิการนายกรัฐมนตรี ทำเนียบรัฐบาล. เข้าถึงได้จาก เว็บไซต์: http://www.thaigov.go.th/th/news-ministry/2012-08-15-09-40-18. วันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2556.

วิวัฒน์ ภาณุอำไพ นาตยา ดำอำไพ ชัชชัย สุนทรสวัสดิ์ และสมาน ภักดี. 2540. การผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์หน้าวัว. หน้า 109 – 117. *ใน : รายงานการประชุมวิชาการไม้ดอกไม้ประดับแห่งชาติครั้งที่ 3.* สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่. 2557. การผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งคุณภาพ. เอกสารวิชาการ สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. 69 หน้า.

สนอง จรินทร วิวัฒน์ ภาณุอำไพ สมพงษ์ คูตระกูล และมานพ หาญเทวี. 2551. การทดสอบพันธุ์มันฝรั่งแปรรูปในการปลูกฤดูฝน. หน้า 272-285. *ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2543-2550.* ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ กรมวิชาการเกษตร.

อรทัย วงค์เมธา. 2557. ยกร่างแผนยุทธศาสตร์งานวิจัยและพัฒนามันฝรั่ง ปี พ.ศ. 2559-2563. ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. 17 หน้า.

Aitken-Christe, J. and H.E. Davies. 1988. Development of a semi-automated micropropagation system. Acta Hort. 230: 81 -87.

Aitken-Christe, J. and C. Jones. 1987. Towards automation: radiate pine shoot hedges *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 8: 185-196.

Akita, M. and S. Takayama. 1994. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. Plant Cell Rep. 13: 184-187.

.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 and Organs Culture 32: 55-60.

Berthouly, M., M. Dufour, D. Alvard, C. Carasco, L. Alemana and C. Teisson. 1995. Coffee micropropagation in liquid medium using the temporary immersion technique. Pages 514-519. *In: 16th International Scientific Colloquium on Coffee, Kyoto, Japan.* ASIC Publishers. Vevey, Switzerland.

Berthouly, M. and H. Etienne. 2005. Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. p. 165-195. *In : A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (eds.), Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation.* Springer, Netherlands.

Chantanumat, P. 2005. Mass propagation of elite Robusta clones via somatic embryogenesis: transfer of the temporary immersion in liquid media technique from NRC-TOURS to the Department of Agriculture (Thailand). 51 pp.

Ducos, J.P., P. Chantanumat, P. Vuong, C. Lambot and V. Petiard. 2007. Mass propagation of Robusta clones: disposable plastic bags for pre- germination of somatic embryos by temporary immersion. Acta Hort. 764: 33-40.

Ducos, J.P., C. Lambot and V. Petiard. 2007. Bioreactor for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. Inter. J. Plant Dev. Biol. 1: 1-12.

Escalant, J-V. C. Teisson and F. Cote. 1994. Amplifed somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro* Cell. Dev. Biol. 30: 181-186.

Escalona, M., J.C. Lorenzo, B. Gonzalez, M. Daquinta, J.L. Gonzalez, Y. Desjardins and C.G. Borroto. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropragation in temporary immersion systems. Plant Cell Rep. 18: 743-748.

Escalona, M., G. Samson, C. Borrota and Y. Desjardins. 2003. Physiological of effect of temporary immersion bioreactors on microprapagation pineapple plantlets. *In Vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant. 39: 651-656.

Etienne, H. M. Lartaud, N. Michux-Ferriere, M.P. Carron, M. Berthouly and C. Teisson. 1997. Improvement of somatic embryogensis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) using thetemporary immersion technique. *In Vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant. 33: 81-87.

Etienne-Barry, D., B. Bertrand, N. Vasquez and H. Etienne. 1999. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. Plant Cell Rep. 19: 111-117.

Florez, Sergio L. 2015. Improving plant propagation through the manipulation of the genetic and physical environment. Electronic and Dissertation of The Graduate School section of the eTD database. Penn. State. May 04, 2015.

Harris, R.E. and E.B. Mason. 1982. Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid media. Can. J. Plant Sci. 63: 311-316

Krueger, S., C. Robacker and W. Simonton. 1991. Culture of Amelanchier x grandiflora in a programmable micropropagation apparatus. Plant Cell, Tissue and Organs Culture. 12: 243-261.

Lorenzo, J.C., B.L. Gonzalez, M. Escalona, C. Teisson, P. Espinosa and C. Borroto. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. Plant Cell, Tissue and Organs Culture 54: 197-200.

Mujib, A., M. Ali, and I.T. Dipti. 2014. Somatic embryo mediated mass production of *Catharanthus roseus* in culture vessel (bioreactor) – A comparative study. Saudi J. Biol. Sci. 21: 442-449.

Piao, X.C., D. Chakrabarty, E.J. Hahn and K.Y. Paek. 2003. A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. Current Science 84: 1129-1132.

Simmonton, W., C. Robacker and S. Kruger. 1991. A programmable micropropagaion apparatus using cycled medium. Plant Cell, Tissue and Organs Culture. 27: 211-218.

Teisson, C. and D. Alvard. 1995. A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary immersion. p. 105-110. In: Terzi M et al. (eds.). Current Issurs in Plant Molecular and Cellular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Tisserat, B. and C.E. Vandercook. 1985. Development of an automated plant culture system. Plant Cell, Tissue and Organs Culture. 5: 107-117.

Tokuhara, K and M. Mii. 1993. Micropropagation of Phalaenopsis and Doritaenopsis by culturing shoot tips of flower stalk buds. Plant Cell Rep 13: 7-11

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาแฟระยะต่างๆ

	Callogenesis	Maintenance			Multiplication	Production			Pregermination	
code NRC-T	*23A*	*23A*	*23G*	*23G+CH*	*23*	*23MS*	*23MSBAP0*	*23MS/2BAP0*	*DES1G4*	*DES2G4*
macroelements	Yasuda(1)	Yasuda	Yasuda	Yasuda	Yasuda	MS (2)	MS	MS X 0.5	MS X 0.5	MS X 0.5
KNO3 mg/l	475.00	475.00	475.00	475.00	475.00	1900.00	1900.00	950.00	950.00	950.00
NH4NO3 mg/l	412.00	412.00	412.00	412.00	412.00	1650.00	1650.00	825.00	825.00	825.00
MgSO4 7 H2O mg/l	92.00	92.00	92.00	92.00	92.00	370.00	370.00	185.00	185.00	185.00
CaCL2 2 H20 mg/l	110.00	110.00	110.00	110.00	110.00	440.00	440.00	220.00	220.00	220.00
KH2PO4 2 H20 mg/l	85.00	85.00	85.00	85.00	85.00	170.00	170.00	85.00	85.00	85.00
FeS04 7H20 mg/l	27.80	27.80	27.80	27.80	27.80	27.80	27.80	13.90	13.90	13.90
Na2 EDTA 2 H20 mg/l	37.30	37.30	37.30	37.30	37.30	37.30	37.30	18.65	18.65	18.65
microelements	Yasuda	Yasuda	Yasuda	Yasuda	Yasuda	MS	MS	MS X 0.5	MS X 0.5	MS X 0.5
CuSO4 5 H2O mg/l	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.025	0.025	0.013	0.013	0.013
MnSO4 1 H20 mg/l	6.800	6.800	6.800	6.800	6.800	16.900	16.900	8.450	8.450	8.450
KI mg/l	–	–	–	–	–	0.830	0.830	0.415	0.415	0.415
Na2MoO4 2 H2O mg/l	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.250	0.250	0.125	0.125	0.125
ZnSO4 7 H2O mg/l	4.300	4.300	4.300	4.300	4.300	10.600	10.600	5.300	5.300	5.300
H3BO3 mg/l	3.100	3.100	3.100	3.100	3.100	6.200	6.200	3.100	3.100	3.100
CoCL2 6 H2O mg/l	–	–	–	–	–	0.025	0.025	0.0125	0.0125	0.0125

		Callogenesis	Maintenance			Multiplication	Production			Pregermination	
code NRC-T		*23A*	*23A*	*23G*	*23G+CH*	*23*	*23MS*	*23MSBAP0*	*23MS/2BAP0*	*DES1G4*	*DES2G4*
vitamines		Gamborg	Gamborg	Gamborg	Gamborg	Gamborg	Gamborg	Gamborg	Gamborg	Morel(1)	Morel(1)
inositol	*mg/l*	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
nicotinic acid	*mg/l*	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	mg/l	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
thiamine HCl	*mg/l*	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	1.00	1.00
pantothenic acid	*mg/l*	–	–	–	–	–	–	–	–	1.00	1.00
biotine	*mg/l*	–	–	–	–	–	–	–	–	0.01	0.01
BAP	*mg/l*	1.125	1.125	1.125	1.125	1.125	1.125	–	–	0.112	–
sucrose	*g/l*	30 to 60,00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	10.00	10.00
charcoal	*g/l*	–	–	–	0.50	–	–	–	–	–	–
agar	*g/l*	8.00	8.00	–	–	–	–	–	–	–	–
gelrite	*g/l*	–	–	4.00	4.00	–	–	–	–	4.00	4.00
Ph		5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6_5,8	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8

ที่มา 1.Yasuda *et al.*, 1985

2.Murashige & Skoog, 1962

(1) Gamborg vitamine can also be used

ภาคผนวก 2 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร NDM (Tokuhara and Mii, 1993) สำหรับกล้วยไม้สกุลแวนด้า

Macro elements	มก./ลิตร
NH_4NO_3	480
KNO_3	200
$Ca(NO_3)$ $2H_2O$	470
KCl	150
$MgSO_4$ $7H_2O$	250
KH_2PO_4	550
Micro elements	**มก./ลิตร**
$MnSO_4$ $4H_2O$	3
$ZnSO_4$ $7H_2O$	0.5
H_3BO_3	0.5
$CaSO_4$ $5H_2O$	0.025
Na_2MoO_4 $2H_2O$	0.025
$CoCl_2$ $6H_2O$	0.025
Conc.H_2SO_4	0.5
Organic compounds	**มก./ลิตร**
Myo-Inosital	100
Niacin	1.0
Pyridoxin hydrochloride	1.0
Thianine hydrochloride	1.0
Calcium pantothenate	1.0
Adenine	1.0
L-Cystein	1.0
d-Biotin, cryst	0.1
Fe-EDTA	42

ภาคผนวก 3 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดปลอดโรคเหี่ยว (23MS) และหน้าวัว (kio.5) ปริมาณต่อลิตร

สารเคมี	23MS	Kio.5	หน่วย
NH_4NO_3	1650	1650	มิลลิกรัม
KNO_32H_2O	1900	1900	มิลลิกรัม
$CaCl_22H_2O$	440	440	มิลลิกรัม
$MgSO_47H_2O$	370	370	มิลลิกรัม
KH_2PO_4	170	170	มิลลิกรัม
H_3BO_3	6.2	6.2	มิลลิกรัม
$CoCl_26H_2O$	0.025	0.025	มิลลิกรัม
$Na_2MoO_42H_2O$	0.25	0.25	มิลลิกรัม
KI	0.83	0.83	มิลลิกรัม
$ZnSO_47H_2O$	10.6	0.86	มิลลิกรัม
$MnSO_47H_2O$	16.9	0.69	มิลลิกรัม
$CuSO_45H_2O$	0.025	0.025	มิลลิกรัม
Na_2EDTA	37.3	37.3	มิลลิกรัม
$FeSO_47H_2O$	27.8	27.8	มิลลิกรัม
Glycine	-	2	มิลลิกรัม
Nicotinic acid	1	0.5	มิลลิกรัม
Pyridoxine	1	0.5	มิลลิกรัม
Thiamine	10	0.1	มิลลิกรัม
Myo-inositol	100	100	มิลลิกรัม
BAP	0.5	0.5	มิลลิกรัม
NAA	0.5	-	มิลลิกรัม
น้ำตาล	30	30	กรัม
pH	5.7	5.7	กรัม

ภาคผนวก 4 ตัวอย่างพืชที่ขยายพันธุ์โดยการใช้ ระบ TIBs ของบริษัท ไพฑูรย์สะพลี จำกัด

ชนิดพืช		ชิ้นส่วน	สูตรอาหารที่ใช้	ระยะเวลาการให้อาหาร (วัน)
กล้วยไม้ (Orchid)	*Phalaenopsis* spp.	young plant	MS + BA 2 ppm	2 นาที / 3 ครั้ง
บุก (Konjac)	*Amorphophallus* sp.	callus	MS + BA 1 ppm	2 นาที / 2 ครั้ง
อ้อย (Sugar cane)	*Saccharum officinarum* L.	young plant	MS + BA 1 ppm	2 นาที / 2 ครั้ง
ขิง (Ginger)	*Zingiber officinale* Roscoe.	young plant	MS + BA 1 ppm	2 นาที / 2 ครั้ง
ขมิ้นชัน (Turmeric)	*Curcuma longa* L.	young plant	MS + BA 1 ppm	2 นาที / 2 ครั้ง
หงส์เหิน (Globba)	*Globba winitii* C.H.Wright	young plant	MS + BA 1 ppm	2 นาที / 2 ครั้ง
กล้วยน้ำว้ากาบขาว (Namwa Kap Khao)	*Musa (AAB)* 'Namwa Kap Khao"	young plant	MS + BA 1 ppm	2 นาที / 2 ครั้ง
กล้วยหอมทอง (Gros Michel)	*Musa* (AAA group) 'Kluai Hom thong'	young plant	MS + BA 1 ppm	2 นาที / 2 ครั้ง
สับปะรด (Pineapple)	*Ananas comosus* (Linn.) Merr.	young plant	MS + BA 1 ppm	2 นาที / 2 ครั้ง

คณะผู้จัดทำ

นายสมบัติ ตงเต้า	ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยพืชสวน
นายสนอง จรินทร	ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย
นายทวีศักดิ์ แสงอุดม	ผู้อำนวยการกลุ่มวิชาการ สถาบันวิจัยพืชสวน
นางจิดาภา สุภาผล	ผู้อำนวยการกลุ่มบริหารโครงการวิจัย สถาบันวิจัยพืชสวน
นางสาวยุพิน กสินเกษมพงษ์	หัวหน้างานไม้ดอกไม้ประดับ สถาบันวิจัยพืชสวน
นางสุภาภรณ์ สาชาติ	สถาบันวิจัยพืชสวน
นางสาวประภาพร ฉันทานุมัติ	ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร
นายพฤกษ์ คงสวัสดิ์	ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ
นางสาวอรทัย วงศ์เมธา	ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่
นายสุเมธ อ่องเภา	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรลำปาง
นางสาวอัมพิกา ปุนนจิต	สถาบันวิจัยพืชสวน
นายอำนวย อรรถลังรอง	สถาบันวิจัยพืชสวน
นายสัจจะ ประสงค์ทรัพย์	สถาบันวิจัยพืชสวน
นางรัชนี ฉัตรบรรยงค์	สถาบันวิจัยพืชสวน
นางปาริชาติ พจนศิลป์	สถาบันวิจัยพืชสวน
นางสาววรางคณา มากกำไร	สถาบันวิจัยพืชสวน
นางสาวรุ้งลาวัลย์ อินต๊ะวงค์	สถาบันวิจัยพืชสวน
นางสาวศศิมา พยุยงค์	สถาบันวิจัยพืชสวน
นางสาวนิศามณี ดิฐมาตย์	สถาบันวิจัยพืชสวน

ผู้จัดพิมพ์

สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทร. 0 2579 0583 โทรสาร 0 2940 6497
E-mail : rhort2515@gmail.com

พิมพ์ที่

การันตี 165/212 ถนนบ้านกล้วย-ไทรน้อย เขตบางบัวทอง นนทบุรี 11110
โทร. 02 982 8035

กรมวิชาการเกษตร