โครงการวิจัย

ปีงบประมาณ 2566

ศูนย์ขยายพันธุ์พืชที่ 10 จังหวัดอุดรธานี กองขยายพันธุ์พืช

1. **ชื่อโครงการ** การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยหอมทองด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดคู่ ไบโอรีแอคเตอร์sue culture of Banana *cv.Hom thong* Using Bioreactor System with Twin Flasks

2. **ผู้รับผิดชอบโครงการ**

(ชื่อ-สกุล)	(คุณวุฒิ)	(ตำแหน่ง)	(หน่วยงาน)
หัวหน้าโครงการ			
นางสุมลฑา คำโฮง	วทบ.(ทรัพยากรเกษตรชีวภาพ)	นวส.ชำนาญการ	ศขพ.10 จ.อุดรธานี
ผู้ร่วมโครงการ			
นางสาวสิรภัทร อันไชยศรี	วทม.(ส่งเสริมและพัฒนาการเกษตร)	นวส.ชำนาญการ	ศขพ.10 จ.อุดรธานี
นายรุ่งอรุณ สุ่มแก้ว	วทม.(วนศาสตร์)	นวส.ปฏิบัติการ	ศขพ.10 จ.อุดรธานี
นางสาวสาริณี บุตรดาวงศ์	วทม.(การประมง)	นวส.ชำนาญการ	ศขพ.10 จ.อุดรธานี
นายอภิเดช เกติยะ	วทบ.(เกษตรศาสตร์)	นวส.ปฏิบัติการ	ศขพ.10 จ.อุดรธานี
นายวิชัย จูมภูบาง	กษบ.(การจัดการการเกษตร)	นวส.	ศขพ.10 จ.อุดรธานี
นายทินกร พละกุล	ปวส.(อิเล็กทรอนิกส์อุตสาหกรรม)	นายช่างไฟฟ้า	ศขพ.10 จ.อุดรธานี
นางสาวจิรยา คำเมืองคุณ	นักศึกษาชั้นปีที่ 4 สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร		
ที่ปรึกษาโครงการ			
นายสำลี พลขันธ์	ทษบ. (โคนมและโคเนื้อ)	นวส.ชำนาญการพิเศษ	ศขพ.10 จ.อุดรธานี

3. **ความสำคัญและที่มาของปัญหา**

กล้วยถือเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยในปัจจุบัน ไม่ว่าจะเป็นกล้วยไข่ กล้วยน้ำว้ากล้วยแปรรูป รวมไปถึงกล้วยหอมทอง เป็นต้น โดยกล้วยที่สามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศไทยได้เป็นจำนวนมาก ก็คือกล้วยหอมทอง และกล้วยหอมทองถือเป็นเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการส่งออก เนื่องจากเป็นไม้ผลที่สามารถปลูกได้ทั่วทุกภาคและทุกฤดูในประเทศไทย ผลผลิตที่ปลอดภัยไร้สารเคมีและสารพิษตกค้างเป็นที่ต้องการของตลาด ทั้งตลาดในประเทศและต่างประเทศ ดังนั้นเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยหอมทองและผู้ประกอบการจะต้องผลิตกล้วยหอมทองให้ได้ปริมาณและคุณภาพตรงตามที่ตลาดต้องการ เพราะฉะนั้นจำเป็นต้องใช้ความรู้ ประสบการณ์ และเทคโนโลยีที่ถูกต้องเหมาะสมเข้ามาช่วยในการผลิต จึงจะสามารถแข่งขันในตลาดโลกได้ เพราะตลาดนั้นเติบโตขึ้นทุกปี ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งการบริโภคภายในประเทศ และการส่งออกที่สร้างรายได้ให้กับประเทศ จึงทำให้กล้วยหอมทองมีแนวโน้มการขยายตัวและมีความต้องการที่เพิ่มขึ้น (อานันท์พิมพ์, 2562)

จากความสำคัญของกล้วยหอมทองดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ความต้องการผลผลิตกล้วยมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ทั้งตลาดภายในประเทศและตลาดส่งออก โดยเฉพาะตลาดส่งออกต้องผลิตให้ได้ผลผลิตที่มีปริมาณสม่ำเสมอตามที่ผู้ซื้อต้องการ จึงต้องใช้ต้นพันธุ์ที่เจริญเติบโตสม่ำเสมอ สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ปริมาณมาก ๆ ในเวลาเดียวกัน ซึ่งเดิมเกษตรกรจะปลูกกล้วยโดยใช้หน่อ แต่เป็นวิธีการที่ต้องใช้พื้นที่ และแม่พันธุ์จำนวนมาก ตลอดจนระยะเวลานานในการขยายพันธุ์แต่ได้หน่อพันธุ์น้อยต้นที่ปลูกมีการเจริญเติบโตไม่สม่ำเสมอ และไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้พร้อมกัน นอกจากนี้ยังมีปัญหาการผลิตกล้วยหอมทองเพื่อการส่งออกอีกหลายประการ โดยเฉพาะประเด็นเรื่องโรคที่แฝงอยู่ในหน่อกล้วย ซึ่งสามารถแพร่กระจายในพื้นที่เพาะปลูก ทำให้ต้นพันธุ์กล้วยเสียหายอย่างมากส่งผลให้ขาดแคลนหน่อพันธุ์ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ ดังนั้นจึงต้องอาศัยการผลิตต้นพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งมีการเจริญเติบโตสม่ำเสมอ และเก็บเกี่ยวผลผลิตได้พร้อมกัน โดยต้นพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังเป็นต้นพันธุ์ที่สะอาด ปราศจากโรคและแมลง เหมาะกับสถานการณ์ที่สภาพภูมิอากาศแปรปรวนทำให้โรคและแมลงศัตรูพืชระบาดรุนแรงขึ้น นอกจากนี้การผลิตต้นพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังสามารถผลิตได้จำนวนมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว และเป็นต้นพันธุ์ที่มีคุณสมบัติและลักษณะทุกประการเหมือนกับแม่พันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกและทดสอบแล้วว่ามีการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตสูง และมีความสม่ำเสมอ ทำให้ได้ผลตอบแทนคุ้มกับการลงทุน (รุ่งอรุณ, 2550)

ปัจจุบันการขยายพันธุ์พืชด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชด้วยระบบอาหารกึ่งแข็ง ซึ่งใช้ระยะเวลาและบุคลากรที่มีความชำนาญในการปฏิบัติงานในขั้นตอนการตัดแยกและเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณยอด และขั้นตอนการชักนำการออกรากทำให้มีต้นทุนสูงประมาณ 40 - 60 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด และแนวโน้มการเปลี่ยนงานของบุคลากรที่มีความชำนาญ เนื่องจากสภาพร่างกายและอายุที่มากขึ้น ประกอบกับต้นทุนของค่าวัสดุที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงก็สูงขึ้นทุกปี ดังนั้นหากมีการพัฒนาปรับปรุงระบบการเพาะเลี้ยง เพื่อเสริมและเพิ่มประสิทธิภาพให้กับบุคลากรและหน่วยงาน โดยระบบการเพาะเลี้ยงที่ได้รับความสนใจนำมาศึกษาทดลองและปรับใช้คือ ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว (Temporary Immersion Bioreactor System) เป็นระบบที่รวมข้อดี ของระบบการเลี้ยงทั้งแบบอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลวเข้าด้วยกันทำให้ต้นพืชมีความสมบูรณ์ และสามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้ปริมาณมากในเวลาที่สั้นลงกว่าระบบที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ทำให้ในหลายประเทศได้นำระบบนี้ไปใช้ในการผลิตต้นพืชที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจทำให้มีการพัฒนารูปแบบในการผลิต และการใช้แรงงานแตกต่างไปจากเดิม ได้แก่ประเทศคิวบานำระบบนี้ไปใช้ในการผลิตต้นสับปะรด (Escalona *et al*., 1999) ประเทศฝรั่งเศสนำมาใช้ในการผลิตต้นกาแฟ (Etienne and Berthouly, 2002) เป็นต้น สำหรับประเทศไทยเริ่มมีการนำระบบไบโอรีแอคเตอร์ จมชั่วคราวมาใช้ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น กล๊อกซีเนีย บุกไข่ และปทุมมา พบว่าได้ผลดีเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ข้างต้น (ยุพา และวิเศษลักษณ์, ๒๕๔๓ ; ยุพาและคณะ, ๒๕๔๕ ; นพมณี และคณะ, ๒๕๔๘) นอกจากนี้ยังมีข้อดีอีกหลายประการเช่น การปฏิบัติงานในส่วนของการเปลี่ยนถ่ายอาหารสามารถทำได้สะดวกและรวดเร็ว การทำความสะอาดภาชนะที่ใช้แล้วทำได้ง่าย ศูนย์ขยายพันธุ์พืชที่ 10

จังหวัดอุดรธานี เห็นความสำคัญในประเด็นดังกล่าวข้างต้นจึงได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงกล้วยหอมทองด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดคู่ในห้องปฏิบัติ เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานโดยพัฒนาต่อยอดจากทักษะและองค์ความรู้ที่มีอยู่เดิม สำหรับการพัฒนาต่อยอดการผลิตต้นกล้ากล้วยหอมทองในเชิงอุตสาหกรรม และประยุกต์ใช้กับพืชชนิดอื่น ๆ ที่มีศักยภาพในการปลูกเชิงเศรษฐกิจในประเทศต่อไป

4. คำถามวิจัย

ระบบเพาะเลี้ยงต่างชนิดกันมีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกล้วยหอมทองอย่างไร

5. สมมติฐานการวิจัย

H_0 : การเติบโตเฉลี่ยของเนื้อเยื่อกล้วยหอมทองในทุกระบบเพาะเลี้ยงไม่แตกต่างกัน

H_1 : การเติบโตเฉลี่ยของเนื้อเยื่อกล้วยหอมทองในระบบเพาะเลี้ยงแตกต่างกันอย่างน้อย 2 กลุ่ม

6. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

6.1 เพื่อหากระบวนงานที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยหอมทองในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดคู่

6.2 เพื่อเปรียบเทียบต้นทุนที่ใช้ในการตัดขยายเพิ่มจำนวนต้นกล้วยหอมทองจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบไบโอรีแอคเตอร์กับการขยายเพิ่มปริมาณในอาหารกึ่งแข็ง

7. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

7.1 ได้กระบวนการทำงานที่สามารถผลิตขยายต้นพันธุ์กล้วยหอมทองได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้นและเพียงพอกับความต้องการของตลาด และสามารถแก้ไขปัญหาขาดแคลนต้นพันธุ์กล้วยหอมทองพันธุ์ดีของเกษตรกรในพื้นที่ได้

7.2 ทราบต้นทุนในกระบวนการตัดขยายเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์กล้วยหอมทองด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบไบโอรีแอคเตอร์กับการขยายเพิ่มปริมาณในอาหารกึ่งแข็ง สำหรับเป็นข้อมูลด้านต้นทุนการผลิตให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องและเกษตรกรที่สนใจ

8. การตรวจเอกสารและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

8.1 ลักษณะทั่วไปของกล้วย

กล้วยเป็นพืชในสกุล Musa อยู่ในวงศ์ Musaceae มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ลักษณะสัณฐานของกล้วย คือ ลำต้นแท้ของกล้วยมีลักษณะเป็นหัวอยู่ใต้ดิน (corm) ส่วนที่เห็นเหมือนลำต้นเหนือดินนั้นเป็นลำต้นเทียม เพราะเป็นส่วนของกาบใบที่อัดแน่น ในกล้วยเกือบทุกชนิดการเจริญของหน่อ(sucker) จะอยู่ขนานกับพื้นดินและแทงขึ้นสู่อากาศซึ่งจะมองเห็นได้อย่างชัดเจน เมื่อมีการแทงหน่อมากขึ้น เราเรียกว่าการแตกกอ ในกล้วยส่วนใหญ่มีการแตกกอถี่และแน่นแต่บางชนิด มีการแตกกอห่างหรือกระจาย เช่น กล้วยหก และกล้วยบัวสีส้ม ส่วนหัวหรือลำต้นแท้ของกล้วยจะมีตาข้างเจริญอยู่ทางด้านข้างตานี้จะอยู่ระหว่างกึ่งกลางของฐานใบ และมีฐานกาบใบห่อหุ้มอยู่ดังนั้นจึงสังเกตไม่ค่อยเห็น

ในช่วงแรกของการเจริญของตาจะเห็นตาเป็นรูปห้าเหลี่ยม และเมื่อมีการเจริญขึ้น รูปร่างของตาจะค่อย ๆ ขยายกลายเป็นสี่เหลี่ยม ตาเหล่านี้จะเกิดรอบ ๆ ต้น เมื่อมีการเจริญเติบโตจะมีการแทงหน่อตั้งขึ้นและมีการเจริญอย่างรวดเร็ว ดอกออกเป็นช่อ ส่วนในช่อดอกมีกลุ่มของดอกย่อยเป็นกลุ่ม ๆ ระหว่างกลุ่มของช่อดอกย่อยแต่ละช่อจะมีกลีบประดับ หรือที่เรียกว่า กาบปลี มีรูปร่างคล้ายท้องเรือ ดอกที่อยู่ล่างสุดหรืออยู่ที่โคนเป็นช่อดอกเพศเมีย ส่วนตอนบนเป็นดอกตัวผู้และอาจมีหรือไม่มีดอกกระเทยอยู่ระหว่างกลางเป็นส่วนแบ่งของดอกตัวเมียและดอกตัวผู้ การติดผลขึ้นอยู่กับจำนวนของกลุ่มดอกที่อยู่โคนหรือด้านล่างของช่อดอกปกติมีการติดผล 5 - 15 หวี ผลของกล้วยมีรูปร่างหลายแบบแตกต่างกันตามสายพันธุ์และปลายผลมีลักษณะต่างกันด้วย (เบญจมาศ, 2545)

กล้วยหอมที่ปลูกเชิงพาณิชย์ในประเทศไทยมีอยู่ 2 ชนิด คือ กล้วยหอมทอง และกล้วยหอมเขียว ซึ่งมี ลักษณะผลคล้ายกัน และขนาดใกล้เคียงกัน แต่จะแตกต่างกันที่ลักษณะของลำต้นและกล้วยหอมเขียวจะสุก รับประทานได้ในขณะที่ผลยังเขียว ส่วนกล้วยหอมทองจะเริ่มสุก และรับประทานได้เมื่อผลเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองพื้นที่การผลิตกล้วยหอมที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดปทุมธานี เพชรบุรี ชุมพร อุดรธานี หนองคาย และสระบุรี นอกจากนี้ยังมีแหล่งปลูกอื่น ๆ อีก ได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี นนทบุรี พระนครศรีอยุธยา และเชียงใหม่ จึงเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีศักยภาพทั้งการผลิตเพื่อการจำหน่ายภายในประเทศและเพื่อการส่งออก เนื่องจากราคาจำหน่ายเป็นราคาที่ทั้งชาวสวนและผู้บริโภคยอมรับได้ จากการประมาณการต้นทุนการผลิตไว้ที่ 22,000 - 25,000 บาทต่อไร่ โดย 1 ไร่ จะปลูกกล้วยได้ 350 - 400 ต้น น้ำหนักกล้วยต่อเครือ 10 - 15 กิโลกรัม ราคารับซื้อ 15 บาทต่อกิโลกรัม จะมีรายได้เครือละ 180 - 200 บาท รายได้ต่อไร่จะอยู่ที่ 50,000 - 60,000 บาท

8.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยหอม

กล้วยหอมทอง *[Musa (AAA* group) "Kluai Hom Thong" กลุ่มย่อย Gros Michel) ชื่ออื่น ๆ กล้วยหอม ชื่อสามัญ Hom Thong Banana] (เบญจมาศ, 2545) มีลำต้นเทียมสูง 2.5 - 3.5 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 15 เซนติเมตร กาบลำต้นด้านนอกมีประดำเล็กน้อย ด้านในสีเขียวอ่อน และมีเส้น สีชมพู ก้านใบมีร่องค่อนข้างกว้างและมีปีก เส้นกลางใบสีเขียว ก้านช่อดอกมีขน ใบประดับรูปไข่ค่อนข้างกว้างและมีปีกเส้นกลางใบสีเขียว ก้านช่อดอกมีขน ใบประดับรูปไข่ค่อนข้างยาว ปลายแหลม ด้านบนมีสีแดงอมม่วง มีไข ด้านล่างสีแดงซีดครือหนึ่งมี 4 - 6 หวี หวีหนึ่งมี 12 - 16 ผล ผลใหญ่ กว้าง 3 - 4 เซนติเมตร ปลายผลมีจุกเห็นชัด เปลือกบาง เมื่อสุกเปลือกจะเป็นสีเหลืองทองแต่ที่ปลายจุกจะเปลี่ยนสีภายหลัง เนื้อมีสีครีม - ส้มอ่อน ๆ มีน้ำหนักมาก เปลือกบาง กลิ่นหอม เนื้อสีเหลืองเข้มน่ารับประทาน รสชาติหวาน อุดมด้วยน้ำตาลซูโครส ฟรุคโทส กลูโคส

ในปัจจุบันการผลิตกล้วยเพื่อให้มีคุณภาพดี โดยสามารถควบคุมการผลิตให้มีประสิทธิภาพได้นั้นจำเป็นต้องเลือกใช้ต้นพันธุ์ต้านทานโรค ซึ่งจะทำได้ด้วยการสร้างพันธุ์ใหม่จากการกลายพันธุ์ การใช้พันธุวิศวกรรม การปรับปรุงพันธุ์ แต่การสร้างพันธุ์ต้านทานโรคนี้ผู้ดำเนินการส่วนใหญ่เป็นหน่วยงานภาครัฐ และระยะเวลาในการสร้างพันธุ์ใหม่จะใช้เวลานานมาก เกษตรกรผู้ปลูกจึงนิยมใช้ต้นปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาทำ meristem culture แล้วเพิ่มปริมาณต้นปลอดโรค (Helliot et al., 2003) เนื่องจาก

การปลูกในเชิงพาณิชย์ต้องใช้ต้นกล้าเป็นจำนวนมากต้นกล้าจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถปลูกและให้ผลิต พร้อมหรือใกล้เคียงกัน ทำให้สามารถวางแผนการผลิตได้ง่าย จึงมีผู้ปลูกจำนวนมากให้ความสนใจหันมาใช้ต้นกล้าจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพิ่มมากขึ้น

8.3 การขยายพันธุ์กล้วย

(เบญจมาศ, 2545) กล่าวถึงการขยายพันธุ์กล้วยซึ่งเป็นพืชยืนต้นที่มีอายุหลายฤดู มีลำต้นอยู่ใต้ดินที่เรียกว่า หัว (corm) หรือ เหง้า (rhizome) ว่ามีหลายวิธีขึ้นกับวัตถุประสงค์ในการใช้ประโยชน์ได้แก่

8.3.1. การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด กล้วยส่วนใหญ่ไม่มีเมล็ด เพราะผลสามารถเกิดขึ้นได้โดยไม่ต้องผสมพันธุ์ซึ่งเรียกว่า parthenocarpy แต่มีกล้วยบางชนิดมีเมล็ดเป็นจำนวนมาก เช่น กล้วยป่า กล้วยตานีและกล้วยน้ำว้าเมล็ดกล้วยเป็นเมล็ดที่มีเปลือกแข็งสีดำ การเพาะมักประสบปัญหา เพราะเมล็ดมีเปลือกหนานั่นเองจึงทำให้เมล็ดงอกช้า ถ้าเพาะเมล็ดปกติจะใช้เวลา 26 - 28 วัน ในการงอกดังนั้นเพื่อให้การงอกเร็วขึ้นจึงควรทำให้เปลือกของเมล็ดบางลง โดยแช่ในกรดซัลฟูริกที่เข้มข้นนาน 15 นาที (ไม่ควรแช่ในกรด ซัลฟูริกนานเกิน 30 นาที เพราะจะทำให้เมล็ดตาย) หรือการฝนเมล็ดโดยใช้เครื่องผสมดิน แต่ด้วยวิธีใดก็ตามควรจะคัดเมล็ดให้ได้เมล็ดที่ดีเสียก่อน กล่าวคือเมล็ดนั้นควรมาจากผลที่แก่เต็มที่และสุก เมล็ดจะมีน้ำหนักดีและเต่งเมื่อนำมาเพาะจะทำให้เมล็ดนั้นมีการงอกดี วัสดุที่ใช้เพาะเมล็ดนั้นควรเป็นดินผสมที่อุ้มความชื้นได้ดีและเพาะที่อุณหภูมิประมาณ 35 องศาเซลเซียส จะทำให้เมล็ดงอกดีขึ้นกว่าปกติ เมล็ดจะงอกตั้งแต่ 1 เดือนขึ้นไปและงอกได้หมดภายใน 4 เดือนดังนั้นการขยายพันธุ์กล้วยโดยใช้เมล็ดจึงไม่เป็นที่นิยม เว้นแต่มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยซึ่งต้องนำพันธุ์ต่าง ๆ มาผสมกันให้ได้พันธุ์ใหม่ ๆ ที่ดี เมื่อได้เมล็ดจึงนำเมล็ดนั้นมาเพาะ แต่เนื่องจากการเพาะใช้เวลานานและเมล็ดมีความงอกไม่ดี จึงควร แคะเอาเอ็มบริโอออกมาเพาะโดยวิธีการที่เรียกว่าเอ็มบริโอคัลเจอร์ (embryo culture) ซึ่งคล้ายกับการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของกล้วยไม้โดยเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นพิเศษในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าด้วยวิธีนี้เมล็ดสามารถงอกได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการงอกเป็นต้นอ่อนแล้วจึงทำการย้ายปลูกลงดินต่อไป

8.3.2. การขยายพันธุ์โดยการใช้หน่อเป็นวิธีที่นิยมขยายพันธุ์กันโดยทั่วไปเพราะปกติตามสวนกล้วยมีหน่อกล้วยมากอยู่แล้วเพียงแต่ขุดหน่อที่แตกออกมาจากต้นแม่มาปลูกใหม่ก็ใช้ได้ วิธีการขุดหน่อหรือแยกหน่อออกจากต้นแม่ขึ้นมานั้นพยายามตัดหน่ออ่อนให้ชิดกับเหง้าของต้นแม่และพยายามอย่าให้ต้นแม่กระทบกระเทือน ถ้าจำนวนหน่อที่ได้ไม่เพียงพอ จำเป็นต้องขุดลำต้นหรือเหง้าของต้นแม่ขึ้นมาและผ่าออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยให้แต่ละชิ้นมีตาที่พร้อมที่จะแตกเป็นต้นใหม่ จากนั้นฝังชิ้นส่วนเหล่านี้ในทรายลึกประมาณ 30 เซนติเมตร ตาที่อยู่บนชิ้นส่วนเหล่านี้จะแตกเจริญเป็นต้นใหม่และพร้อมที่จะนำไปปลูกได้เมื่อมีขนาดที่พอดี ถ้าชิ้นส่วนนั้นมีขนาดใหญ่อาจใช้ปลูกได้เลยและวางส่วนที่เป็นตาให้ไปทางเดียวกัน สำหรับหน่อที่เกิดจากต้นแม่มี 3 ชนิดคือ

8.3.2.1. หน่ออ่อน (peeper) คือหน่อที่เกิดจากต้นแม่แต่มีขนาดเล็กยังมีส่วนต่าง ๆ ไม่ครบ อ่อนแอไม่เหมาะในการนำไปปลูก

8.3.2.2. หน่อใบแคบ (sword suckers) เป็นหน่อที่เกิดจากลำต้นแม่ หน่อมีขนาดใหญ่ มีอาหารสะสมมาก ใบของหน่อชนิดนี้ยังไม่คลี่ เป็นหน่อที่ดีเหมาะในการนำไปปลูกเพราะจะให้ต้นที่แข็งแรงและให้ผลผลิตดี

8.3.2.3. หน่อใบกว้าง (water sucker) เป็นหน่อที่เกิดจากต้นที่เก็บเกี่ยวผลผลิตแล้วหรือจากต้นที่ตัดทิ้งแล้ว หรือจากหน่อใบแคบ หน่อพวกนี้แม้จะมีขนาดเล็กแต่ใบจะคลี่แผ่กว้างไม่เหมาะในการนำไปปลูก และถ้าพบอยู่ติดกับต้นแม่ควรจะทำลายเสีย หน่อชนิดนี้มีอาหารสะสมในหน่อน้อย ถ้านำหน่อชนิดนี้ไปปลูกจะได้ต้นที่อ่อนแอ และผลมีขนาดเล็ก

8.3.2.4 การขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การขยายพันธุ์กล้วยด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้เริ่มมาตั้งแต่ปี พ.ศ.2517 โดย L.A.Berg และ M.Bustamante โดยใช้ชิ้นส่วนที่อยู่บริเวณปลายยอดของลำต้นการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกล้วย มีวัตถุประสงค์ใหญ่ ๆ 2 ประการคือ

1) เพื่อเพิ่มจำนวนต้นให้ได้มากในเวลาอันรวดเร็ว

2) เพื่อให้ได้ต้นที่สะอาด ปราศจากโรค และแมลง ซึ่งหากขยายพันธุ์ด้วยการใช้หน่ออาจมีเชื้อโรคหรือไข่ของแมลงติดมาได้

8.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย

ในระยะเริ่มต้นการนำหน่อกล้วยมาขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมักเกิดปัญหาในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวของชิ้นส่วนเริ่มต้น เนื่องจากส่วนยอดของหน่อกล้วยซึ่งเป็นจุดกำเนิดของการพัฒนาเป็นต้นอยู่ใกล้บริเวณพื้นดินและสัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์โดยตรงจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บริเวณผิวของชิ้นส่วนเริ่มต้น โดย Titov et al. (2006) รายงานการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาดอกกล้วยโดยใช้ $HgCl_2$ 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 6 นาทีพบว่ามีประสิทธิภาพในการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวตาดอกกล้วยได้ 100 เปอร์เซ็นต์ สารเคมีที่นิยมนำมาใช้ฟอกฆ่าเชื้ออีกชนิดหนึ่งคือ คลอร็อกซ์ (clorox) ซึ่งเป็นชื่อทางการค้ามีส่วนประกอบของสารฆ่าเชื้อที่สำคัญคือ NaClO (sodium hypochlorite) ความเข้มข้นประมาณ 5.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถฆ่าหรือยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และมีประสิทธิภาพ ในการฆ่าเชื้อได้ดี ให้เปอร์เซ็นต์ความปลอดภัยสูง สามารถหาซื้อได้ง่าย ราคาถูก วิธีใช้ง่ายจึงมีการนำมาใช้ในงานวิจัยอย่างแพร่หลายเช่น การศึกษาของ จุลภาค และคณะ (2533) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยหอมพันธุ์ Grand Nain โดยนำปลายยอดของกล้วยขนาด 1 ลูกบาศก์นิ้ว มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตัดแบ่งตามความยาวออกเป็น 4 ส่วนเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog. 1962) ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ และ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเนื้อเยื่อมีการเพิ่มขนาดภายใน 2 เดือน เมื่อนำชิ้นส่วนที่ได้มาตัดแบ่งออกเป็น 2 ส่วนตามความยาวและย้ายลงเลี้ยงบนอาหารใหม่ พบว่าภายในเวลา 1 เดือน สามารถเพิ่มปริมาณได้ 2.44 ต้นต่อจำนวนหน่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยง 1 หน่อ

สำหรับระยะการเพิ่มปริมาณมักหาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการที่จะเพิ่มปริมาณต้น และนอกจากนี้ยังขึ้นกับสายพันธุ์กล้วยที่แตกต่างกันได้ ส่วนใหญ่สารควบคุมการเจริญเติบโต BA และความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดต้นใหม่มากที่สุด Al-Amin et al. (2009)

ศึกษาการเพิ่มปริมาณกล้วยหอมด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ กันจากการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต benzylaminopurine (BAP) ที่ความเข้มข้น 0.0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.0, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า BAP ให้จำนวนยอดที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10, 20, และ 30 วัน คือ 0.75, 2.75, และ 6.25 ยอดตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอกล้วยตามรายงานของ Uma et al. (2010) ซึ่งได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอและพัฒนาเป็นต้นกล้วย พบว่าเอ็มบริโอที่มีการเจริญเติบโต 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ IAA สามารถเกิดเป็นต้นได้ แต่เอ็มบริโอที่มีการพัฒนาได้ 100 เปอร์เซ็นต์ กลับสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ในอาหารสูตรที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ส่วนสายพันธุ์กล้วยมีผลต่อการขยายเพิ่มปริมาณด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามการศึกษาของ Bhosale et al. (2011) ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดของพันธุ์กล้วยที่ต่างกัน 3 ชนิดคือ ‘Shrimanti’, ‘Ardhapuzi’ และ‘Basrai’ โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ที่ระดับความเข้มข้น 3, 5, 7 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำมาตัดถ่ายเนื้อเยื่อ ทุก ๆ 30 วัน ปรากฏว่า ที่ระดับความเข้มข้นของ BAP ที่ 7 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลต่อการเพิ่มปริมาณยอดดของกล้วยดีที่สุด แต่จำนวนยอดที่ได้แตกต่างกันตามสายพันธุ์ คือกล้วยพันธุ์ ‘Ardhapuzi’ 6.2 ยอด รองลงมาคือ กล้วยพันธุ์ ‘Basrai’ 4.5 ยอด

แต่อย่างไรก็ตาม ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการกลายพันธุ์ของกล้วยได้ จึงควรใช้ในปริมาณที่เหมาะสม หากมากเกินไปอาจส่งผลต่อการกลายพันธุ์ของกล้วย นอกจากนี้รอบการตัดถ่ายเนื้อเยื่อก็มีความสำคัญเช่นเดียวกันดังเช่นรายงานของ Sahijram et al. (2003) ซึ่งพบความผิดปกติของกล้วย มี 2 ลักษณะ คือ ผิดปกติในระดับ DNA และลักษณะสัณฐานภายนอก ความผิดปกติที่แสดงออกภายนอกแสดงออกมาจากโครโมโซม โดยความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกล้วยในระยะการเพิ่มปริมาณเป็นผลมาจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในปริมาณที่เข้มข้นมากเกินไป จึงควรหลีกเลี่ยงการตัดถ่ายเนื้อเยื่อเกินกว่า 8 รอบ

8.5 ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว (Temporary Immersion Bioreactor)

ในหลายทศวรรษที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในระบบอาหารกึ่งแข็งเป็นเทคโนโลยีชีวภาพในการขยายพันธุ์พืชแบบปลอดเชื้อที่ได้รับความนิยม เนื่องจากสามารผลิตต้นพันธุ์ปริมาณมากได้ในเวลาที่รวดเร็ว มีลักษณะทางพันธุกรรมตรงตามพันธุ์ ปราศจากโรค และให้ผลผลิตสูง แต่เทคโนโลยีการผลิตพืชด้วยระบบนี้ก็ยังมีข้อจำกัดหลายประการ เช่นมีต้นทุนการผลิตสูง เพราะต้องใช้ภาชนะสำหรับเลี้ยงที่มีขนาดเล็กเป็นจำนวนมาก เนื่องจากการเพิ่มปริมาณยอดเป็นการเพิ่มปริมาณ ทางด้านข้าง ในขั้นตอนนี้จำเป็นต้องใช้แรงงานจำนวนมากตัดถ่ายต้นที่เพิ่มขึ้นลงในอาหารใหม่ทุก ๆ 4-6 สัปดาห์ เพราะเนื้อเยื่อมีการเติบโตและพัฒนาอย่างต่อเนื่อง พืชจึงใช้ธาตุอาหารในขวดเก่าหมด นอกจากนี้ยังเกิดจากความหนาแน่นของจำนวนต้นที่เพิ่มขึ้น ซึ่งความช้าหรือเร็วในการเปลี่ยนถ่ายอาหารนี้ถูกจำกัดโดยขนาดของภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงนั่นเอง (Maene and Debergh, 1985; Chu, 1995) ต้นทุนการผลิตที่สูงนี้

นับเป็นปัจจัยสำคัญในการจำกัดการใช้วิธีการดังกล่าวในเชิงการค้า และเหมาะสมเฉพาะการขยายพันธุ์พืชที่มีมูลค่าต่อหน่วยสูง เช่น ไม้ดอก ไม้ประดับ และไม้ผลที่ได้รับการคัดเลือกแล้ว (Simonton *et al.*, 1991) โดยทั่วไปค่าแรงถือเป็นต้นทุนการผลิตประมาณ 40 - 60 เปอร์เซ็นต์ของต้นทุนทั้งหมด ในการตัดเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อซึ่งถือเป็นขั้นตอนที่มีต้นทุนการผลิตที่สูงที่สุดของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Chu, 1995) แม้ว่าต้นทุนค่าแรงจะถือเป็นส่วนหลักของงานและของระบบการเพาะเลี้ยงทั้งหมดแล้ว ยังต้องนับรวมถึงต้นทุนในการทำความสะอาด การเตรียมอาหาร และการเรียงขวดเพาะเลี้ยงจำนวนมาก (Maene and Debergh, 1985) นอกจากนี้ต้นทุนหลักยังมาจากการสูญเสียกล้าไม้ด้วยอาการฉ่ำน้ำของต้นและราก (hyperhydricity) และระหว่างการนำต้นกล้าไม้ออกปลูกสู่สภาพแวดล้อมภายนอกด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีการใช้ระบบการเพาะเลี้ยงนี้ในวงจำกัดของพืชการค้าเพียงไม่กี่ชนิด จึงมีความพยายามสร้างระบบเพาะเลี้ยงที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชตลอดการพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ที่มีขั้นตอนการทำงานที่เป็นอัตโนมัติมากขึ้น

การใช้ระบบอาหารเหลวจึงเป็นแนวคิดที่ถูกนำมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อช่วยลดต้นทุนการผลิตในด้านแรงงานคน เนื่องจากการใช้อาหารเหลวสามารถปฏิบัติงานได้ง่ายกว่าอาหารกึ่งแข็ง ทั้งในด้านการเปลี่ยนอาหารและการล้างภาชนะเพาะเลี้ยงอีกทั้งสามารถลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเนื่องจากมีการเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณได้มากและรวดเร็วกว่าระบบอาหารกึ่งแข็ง รวมถึงลดการใช้วัสดุสิ้นเปลือง เช่น วุ้นซึ่งเป็นวัตถุตัวเติมที่แพงที่สุดของต้นทุนอาหาร สามารถปรับเปลี่ยนขนาดภาชนะเพาะเลี้ยงให้มีขนาดใหญ่ขึ้นได้ นอกจากนี้ยังทำให้การทำงานเป็นอัตโนมัติมากขึ้นเพราะสามารถนำระบบอุปกรณ์ เครื่องหมุนหรือกวน และระบบลมมาใช้ในการให้สารละลายอาหารกับชิ้นส่วนพืช ส่งผลให้การผลิตมีประสิทธิภาพ มั่นคง สม่ำเสมอ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของบุคลากร และทำให้ต้นทุนรวมของการผลิตลดลง (Aitken-Christie, 1995) แต่ก็ยังไม่สามารถใช้ได้กับพืชทุกชนิด ที่ผ่านมาประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมักถูกจำกัดโดยปัญหาด้านเทคนิค เช่นการเกิดภาวะขาดอากาศ อาการฉ่ำน้ำและการเสียรูปร่างของเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยง รวมทั้งต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์จำนวนมาก

เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้น จึงมีการพัฒนาระบบการเลี้ยงแบบใหม่ คือการเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์ (Bioreactor) หรือถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งเดิมนิยมใช้กันในอุตสาหกรรมหมัก (Fermenter) สำหรับผลิตโปรตีนเซลล์เดียว การเพิ่มปริมาณสิ่งมีชีวิตพวกจุลินทรีย์ต่าง ๆ ให้มากขึ้นในเวลาอันรวดเร็ว และการผลิตสารทุติยภูมิ (Siebel, 1992; Glick and Pasternak, 1998) มาปรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ระยะแรกได้นำระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพมาดัดแปลงเป็นถังเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยมีเป้าหมายเพื่อให้สามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้มากในระยะเวลาที่สั้นลงและมีต้นทุนต่ำ แต่ถังเพาะเลี้ยงที่ดัดแปลงมาจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพนั้นยังไม่สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้อย่างเหมาะสม เนื่องจากไม่ได้คำนึงถึงความจำเป็นขั้นพื้นฐานของเซลล์พืช ที่มีความอ่อนไหวต่อแรงกดด้านข้างแรงเหวี่ยง แรงเฉือน การทำลายโครงสร้างด้านกายภาพ ตลอดจนความเสียหายจากเครื่องจักร และการเกิดฟองในระหว่างการให้อากาศในถังเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สภาพแวดล้อมต่าง ๆ จึงยังไม่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ (Teisson et al., 1996)

นักวิจัยทั้งภาครัฐและเอกชนได้นำความรู้พื้นฐานของระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาพัฒนาระบบภาชนะเพาะเลี้ยงที่มีแตกต่างกันออกไปและพัฒนาการใช้อาหารเหลวที่มีระบบการทำงานเป็นอัตโนมัติที่สามารถนำไปใช้ในการขยายพันธุ์พืชในระดับอุตสาหกรรมได้ (Debergh, 1988; Etienne and Berthouly, 2002) มีการศึกษาและพัฒนาภาชนะรวมถึงเทคนิคการขยายพันธุ์ที่ความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชหลายแบบที่มีความแตกต่างไปจากระบบอาหารกึ่งแข็ง (Maene and Debergh, 1985; ไบโอรีแอคเตอร์serat and Vandercook, 1985; Simoton et al., 1991; Berthouly and Etienne , 1999) โดยหลักการที่ไม่ต้องการให้พืชได้รับอาหารอย่างต่อเนื่อง หรือไม่จมในอาหารเหลวตลอดเวลา กล่าวคือมีการให้อาหารตามระยะเวลาที่ได้กำหนดไว้ เช่น ให้อาหารเป็นระยะเวลา 1 นาที 1 ครั้งต่อวัน, 3 นาที 5 ครั้งต่อวัน หรือ 10 นาที 4 ครั้งต่อวัน เป็นต้น ซึ่งการได้รับอาหารของพืชในลักษณะเช่นนี้เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของต้นพืช สามารถเพิ่มมวลของเนื้อเยื่อเจริญต่าง ๆ อีกทั้งยังสามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้เป็นจำนวนมาก

8.5.1 ข้อดีของระบบไบโอรีแอคเตอร์

8.5.1.1 พืชได้รับสารละลายอาหารอย่างทั่วถึงทุกส่วนของพืช และในการได้รับสารละลายอาหารในแต่ละครั้งจะเกิดฟิล์มบางๆล้อมรอบชิ้นส่วนพืชไว้ ช่วยป้องกันการแห้งของชิ้นส่วนพืชที่ทำการเพาะเลี้ยง

8.5.1.2 มีการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จากการกรองอากาศด้วยแผ่นกรองเชื้อ

8.5.1.3 ลดการสะสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซเอทธิลีน เนื่องจากเป็นระบบเปิดทำให้อัตราการเพิ่มปริมาณต้นมากขึ้น

8.5.1.4 ลดการขาดอากาศของพืช เนื่องจากมีการเติมอากาศเข้าไปในระบบเพาะเลี้ยงหรือขวดโดยผ่านแผ่นกรองเชื้อให้แก่พืช

8.5.1.5 สามารถเปลี่ยนอาหารใหม่ได้ง่าย โดยไม่ต้องเปลี่ยนขวดชิ้นส่วนพืชใหม่

8.5.1.6 ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย เนื่องจากขวดมีขนาดไม่ใหญ่มากนัก แต่ให้ปริมาณต้นเป็นจำนวนมากต่อขวดดังตาราง 1 (Takayama and Akita, 2005)

8.5.1.7 ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวช่วยปรับปรุงคุณภาพของพืช โดยเฉพาะลดการฉ่ำน้ำโดยการปรับระยะเวลาและความถี่ในการให้สารละลายอาหารที่เหมาะสม (Etienne and Berthouly, 2002)

8.5.1.8 ลดต้นทุนการผลิตในการจ้างแรงงานที่จะต้องถ่ายเนื้อเยื่อลงอาหารใหม่ หรือที่เรียกว่า Subculture จากรายงานผลการศึกษาของ Escalona *et al.* (1999) ในการขยายพันธุ์อ้อย โดยการใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระบบอาหารกึ่งแข็ง พบว่าสามารถลดต้นทุนได้ 46 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Lorenzo *et al.* (1998) ได้ศึกษาการเพิ่มปริมาณต้นสับปะรดในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว ทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตได้ 20 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 1 การเปรียบเทียบการใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์กับระบบอาหารกึ่งแข็ง ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Spathiphyllum*

รายละเอียด	ระบบไบโอรีแอคเตอร์	ระบบอาหารกึ่งแข็ง
ปริมาตรขวด (มิลลิลิตร)	201	500
ปริมาตรอาหาร (ลิตรต่อภาชนะ)	16.61	100
จำนวนภาชนะ	6	1000
จำนวนชิ้นส่วนตั้งต้น	96	150

ที่มา : Takayama and Akita (2005)

8.6 การใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์เพื่อการขยายพันธุ์พืช

การใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์ สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในต่างประเทศได้มีการศึกษา และรายงานผลการศึกษาเกี่ยวกับพืชเกษตรและป่าไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจกว่า 30 ฉบับ เช่น การผลิตหัวพันธุ์ขนาดเล็กของมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) (Jimenez *et al.*, 1999; Teisson and Alvard, 1999) มันเทศ (*Dioscorea* spp.) (Jova *et al.*, 2005) การเกิดยอดของกล้วย (*Musa acuminata*) (Alvard *et al.*, 1993; Roels *et al.*, 2005) กล้วยไม้ (*Potinera* spp.) (Tisserat and Vandercook, 1985) เบอร์รี่ (*Amelanchier grandiflora*) (Kruege *ret al.*, 1991) สน (*Pinus radiata*) Aitken-Christie and Jone (1987) สับปะรด (*Ananas comosus* (L.)) (Escalona *et al.*, 1999; González *et al.*, 2005) สตรอเบอร์รี่ (*Fragaria ananassa*) (Hanhineva *et al.*, 2005) ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus* spp.) (McAlister *et al.*, 2005) องุ่น (*Vitis vinifera*) (Harris and Mason, 1983) อ้อย (*Saccharum* spp.) (Lorenzo *et al.*, 1998; Lorenzo *et al.*, 2001) แอปเปิล (Zhu *et al.*, 2005) แอสเทอร์ (*Callistephus hortensis*) (Tisserat and Vandercook, 1985) calabash tree (*Crescetia cujete*) (Murch *et al.*, 2004) cow tree (*Mltragyna inermis*) (Tisserat and Vandercook, 1985) การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอของกาแฟ (*Coffea arabica*) (Berthouly *et al.*, 1999; Etienne, 1997; Etienne *et al.*, 1999) กล้วย (*Musa* spp.) (Escalant *et al.*, 1994) ชา (*Camellia sinensis* (L.)) (Akula *et al.*, 2000) ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) (Etienne *et al.*, 1997) ส้ม (*Citrus deliciosa*) (Cabassaon *et al.*, 1997) อินทผาลัม (*Phenix dactylifera*) (Tisserat and Vandercook, 1985) การผลิตสารทุติยภูมิจากพืชของสับปะรด (*Ananas comosus* (L.)) (Pérez *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2004) *Hypericum perforatum* L. cv. 'New Stem' (Zobayed *et al.*, 2004) พืชดัดแปลงพันธุกรรมของสับปะรด (*Ananas comosus* (L.), (Espinosa *et al.*, 2002)

และการศึกษาผลของกระบวนการทางสรีระต่อต้นพืช ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) (Martre *et al.*, 2001) สับปะรด (*Ananas comosus* (L.), (Escalona *et al.*, 2003) ดังรายละเอียดในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การขยายพันธุ์พืชด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ ในพืชชนิดต่างๆ

ชนิดพืช	การศึกษา	ระบบ	เวลาให้อาหาร	อัตราการเพิ่มยอดเทียบกับอาหารแข็ง	เอกสารอ้างอิง
<u>ผัก สมุนไพรและผลไม้</u>					
Vitis vinifera (องุ่น)	การเกิดยอด	TRM	30 วินาทีทุกๆ 30 วินาที	ยอดมากกว่า 7 เท่า ความยาวยอดและการเกิดรากเกิดได้ดีกว่า	Harris and Mason (1983)
Callistephus hortensis (Aster)	การเกิดยอด	APCS	12 ชั่วโมง	มวลชีวภาพของยอดมากกว่า 2 เท่า	Tisserat and Vandercook (1985)
Musa acuminata (กล้วย)	การเกิดยอด	RITA®	20 นาทีทุก ๆ 2ชั่วโมง	ยอด > 2.5 เท่า และการสะสมน้ำหนักแห้งมากกว่า 2-5 เท่า	Alvard *et al.* (1993)
Triploid banana and plantain (*Musa* spp.)	การเกิดและพัฒนาเป็นต้นอ่อนจากเซลล์ร่างกาย	RITA®	1 นาทีทุกๆ 6 ชั่วโมง	ต้นอ่อนมากกว่า 3 เท่า	Escalant *et al.* (1994)
Hypericum perforatum L. cv. 'New Stem' (St. John's wort)	ผลิตเอนไซม์ (Protease)	RITA®	5 นาทีทุกๆ 3 ชั่วโมง	จำนวนต้นและปริมาณคลอโรฟิลล์ a, b มากกว่า แต่ปริมาณสารน้อยกว่าการเลี้ยงในอาหารแข็ง	Zobayed *et al.* (2004)
Musa spp. (กล้วย, *Musa* AAB)	การเกิดยอด	-	4 นาทีทุกๆ 3 ชั่วโมง	ต้นอ่อนมากกว่า13 เท่า ใน 28 วัน	Roels *et al.* (2005)

ตารางที่ 2 การขยายพันธุ์พืชด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ ในพืชชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

ชนิดพืช	การศึกษา	ระบบ	เวลาให้อาหาร	อัตราการเพิ่มยอดเทียบกับอาหารแข็ง	เอกสารอ้างอิง
<u>พืชเศรษฐกิจ</u>					
Fragaria x ananassa (สตรอเบอร์รี่)	การเกิดยอด	RITA®	5 นาทีทุกๆ 4 ชั่วโมง	ไม่แตกต่างกัน แต่เวลาที่ใช้ในการปฏิบัติงานลดลง 50%	Hanhineva *et al.* (2005)
Potinera spp. (กล้วยไม้)	การกิดยอด	APCS	5 นาทีทุกๆ 12 ชั่วโมง	น้ำหนักสดของยอดมากกว่า 4 เท่า	Tisserat and Vandercook (1985)
Coffea arabica (กาแฟ)	การเกิดและพัฒนาเป็นต้นอ่อนจากเซลล์ร่างกาย	RITA®	1 นาทีทุก 24 ชั่วโมง	จำนวนต้นอ่อนมากกว่า 2 เท่า 90% พัฒนาเป็นต้นอ่อนระยะ Torpedo (ในอาหารเหลว มี 30%)	Etienne *et al.* (1997)
Saccharum spp. (อ้อย)	การเกิดยอด	TWF	2 นาทีทุกๆ 9 ชั่วโมง	จำนวนยอดมากกว่า 2 เท่า ลดต้นทุนการผลิตได้ประมาณ 46 %	Lorenzo *et al.* (1998)
Solanum tuberosum (มันฝรั่ง)	การเกิดหัว	TWF	-	ประมาณ 2.6 (1). ความยาวของยอดเพิ่มขึ้น 3 เท่า (2) จำนวนข้อปล้อง/ชิ้น	Jimenez *et al.* (1999)

ตารางที่ 2 การขยายพันธุ์พืชด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ ในพืชชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

ชนิดพืช	การศึกษา	ระบบ	เวลาให้อาหาร	อัตราการเพิ่มยอดเทียบกับอาหารแข็ง	เอกสารอ้างอิง
Coffea arabica *Coffea canephora* (กาแฟ)	การเกิดและพัฒนาเป็นต้นอ่อนจากเซลล์ร่างกาย	RITA®	15 นาทีทุก 6 ชั่วโมง 1นาทีทุก 6 ชั่วโมง	จำนวนยอดมากกว่า 2 เท่า	Berthouly *et al.* (1999)
Coffea arabica (กาแฟ)	การเกิดและพัฒนาเป็นต้นอ่อนจากเซลล์ร่างกาย	RITA®	1 นาทีทุกๆ 12 ชั่วโมง (พัฒนาเป็นต้นอ่อน) 5 นาทีทุกๆ12 ชั่วโมง (พัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์)	1. 90% พัฒนาเป็นต้นอ่อนระยะ Torpedo (ในอาหารเหลว มี 30%) 2. 75% เป็นต้นกล้าสมบูรณ์เมื่อหว่านลงวัสดุปลูกโดยตรงในสภาพธรรมชาติ	Etienne *et al.* (1999)
Camellia sinensis (L.) (ชา)	การเกิดและพัฒนาเป็นต้นอ่อนจากเซลล์ร่างกาย	RITA®	1 นาทีทุกๆ6 ชั่วโมง	น้ำหนักสดมากกว่า 2 เท่า ให้จำนวนต้นสมบูรณ์ > 6 เท่า	Akula *et al.* (2000)
Solanum tuberosum (มันฝรั่ง)	การเกิดหัว	RITA®	-	ประมาณ 4 30-60 % น้ำหนักสดหัวคือ 0.5 กรัม 10-40 % น้ำหนักสดหัว > 0.8 กรัม	Teisson and Alvard (1999)

ตารางที่ 2 การขยายพันธุ์พืชด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ ในพืชชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

ชนิดพืช	การศึกษา	ระบบ	เวลาให้อาหาร	อัตราการเพิ่มยอดเทียบกับอาหารแข็ง	เอกสารอ้างอิง
Ananas comosus (L.) (สับปะรด)	การเกิดยอด	TWF	2 นาทีทุก 3 ชั่วโมง.	จำนวนยอด > 3 เท่า (อาหารเหลว) > 4 เท่า (อาหารแข็ง)	Escalona *et al.* (1999)
Saccharum spp. (อ้อย)	การเจริญเติบโตในแปลง	TWF	2 นาทีทุกๆ 9 ชั่วโมง	การเจริญเติบโตและผลผลิตไม่แตกต่างกันแต่ลดต้นทุนของกล้าที่ใช้ได้	Lorenzo *et al.* (2001)
Saccharum spp. (อ้อย)	การเกิดยอด	TWF	2 นาทีทุกๆ 9 ชั่วโมง	การเกิดยอดใหม่เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยง 30 วัน แต่ลดลงเมื่อเลี้ยง 31- 40 วัน	Lorenzo *et al.* (2001)
Ananas comosus (L.) (สับปะรด)	Transgenic plant	TWF	-	ชักนำให้เป็นต้นสมบูรณ์ได้ 6.6 %	Espinosa *et al.* (2002)
Ananas comosus (L.) (สับปะรด)	ผลของกระบวนการทางด้านสรีระต่อต้นพืช	TWF	2 นาทีทุก 3 ชั่วโมง	การนำธาตุอาหารและการสังเคราะห์ด้วยแสงเกิดได้ดีกว่า ทำให้มีปริมาณน้ำตาลมวลชีวภาพและพื้นที่ใบมากกว่า	Escalona *et al.* (2003)
Ananas comosus (L.) (สับปะรด)	ผลิตเอนไซม์ (Protease)	TWF	2 นาทีทุก 3 ชั่วโมง	พบการปล่อย Protease ลงในอาหารในช่วงที่เลี้ยงในอาหารยืดยอด (GA 2.8 uM และ BA 2.2 uM)	Perez *et al.* (2004)

ตารางที่ 2 การขยายพันธุ์พืชด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ ในพืชชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

ชนิดพืช	การศึกษา	ระบบ	เวลาให้อาหาร	อัตราการเพิ่มยอดเทียบกับอาหารแข็ง	เอกสารอ้างอิง
Ananas comosus (L.) (สับปะรด)	ผลิตเอนไซม์ (Protease)	TWF	2 นาทีทุก 3 ชั่วโมง	น้ำตาลซูโครส 262.8 m*M* ในอาหารสูตรMS ที่มี thiamine 0.3 m*M* และไม่เติมinositol คือสูตรที่ให้ปริมาณสารมากที่สุด	Perez *et al.* (2004)
Ananas comosus (L.) (สับปะรด)	การเกิดยอด	TWF	2 นาทีทุก 3 ชั่วโมง	การเพิ่มของมวลชีวภาพ พื้นที่ใบของตา ปริมาณคลอโรฟิลล์ มากกว่า และลดต้นทุนการผลิต	González *et al.* (2005)
Dioscorea spp. (มันเทศ)	การเกิดหัว	TWF	10 นาทีทุก 6 ชั่วโมง	จำนวนและมีน้ำหนักหัวมากกว่า สามารถนำไปปลูกได้โดยไม่ต้องปรับสภาพ/เก็บรักษาได้ยาวนาน	Jova *et al.* (2005)
<u>ไม้ยืนต้น</u>					
Phenix dactylifera (อินทผาลัม)	การเกิดและพัฒนาเป็นต้นอ่อนจากเซลล์ร่างกาย	APCS	5 นาที ทุกๆ12 ชั่วโมง	น้ำหนักสดของแคลลัส > 3.2 เท่า	Tisserat and Vandercook (1985)

ตารางที่ 2 การขยายพันธุ์พืชด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ ในพืชชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

ชนิดพืช	การศึกษา	ระบบ	เวลาให้อาหาร	อัตราการเพิ่มยอดเทียบกับอาหารแข็ง	เอกสารอ้างอิง
Mitragyna inermis (cow tree)	การเกิดยอด	APCS	5 นาทีทุก 12 ชั่วโมง	น้ำหนักสดของยอดมากกว่า 1.8 เท่า	Tisserat and Vandercook (1985)
Pinus radiata (สน)	การเกิดยอด	RITA®	4 ชั่วโมงทุก 3 วัน	น้ำหนักสดของยอดมากกว่า 1.2 เท่า และคุณภาพดีกว่า 2 เท่า	Aitken-Christie and Jones (1987)
Amelanchierxgrandiflora princess Diana' (serviceberry)	การเกิดยอด	Simomton (1991)	5 นาทีทุก 30 และ 60 นาที	จำนวนยอดมากกว่า 2.6 เท่า น้ำหนักและความยาวยอดมาก กว่า 2.1 และ 1.2 เท่าตามลำดับ	Krueger *et al.* (1991)
Hevea brasiliensis (ยางพารา)	การเกิดและพัฒนาเป็นต้นอ่อนจากเซลล์ร่างกาย	RITA®	1 นาทีทุกๆ 12 ชั่วโมง	1.ต้นอ่อนเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน 2.ต้นอ่อนที่ผิดปกติลดลง 50 %	Etienne *et al.* (1997)
Citrus deliciosa (ส้ม)	การเกิดและพัฒนาเป็นต้นอ่อนจากเซลล์ร่างกาย	RITA®	1 นาทีทุกๆ 4 ชั่วโมง	ช่วยพัฒนาการเกิดอวัยวะต่างๆ ขึ้นพร้อมกัน	Cabassaon *et al.* (1997)
Crescentia cujete (Calabash tree)	การเกิดยอด	RITA®	3 นาทีทุกๆ 3 ชั่วโมง	การเพิ่มของมวลชีวภาพ จำนวนใบ ความยาวของยอด คุณภาพของสาร	Murh *al.* (2004)

ตารางที่ 2 การขยายพันธุ์พืชด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ ในพืชชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

ชนิดพืช	การศึกษา	ระบบ	เวลาให้อาหาร	อัตราการเพิ่มยอดเทียบกับอาหารแข็ง	เอกสารอ้างอิง
Hevea brasiliensis (ยางพารา)	ผลของกระบวนการทางด้านสรีระต่อแคลลัส	RITA®	1 นาที ทุกๆ 1, 12 และ24 ชั่วโมงต่อวัน	1.ช่วงเวลาการให้อาหารมีผลต่ออัตราการเติดโตสสัมพัทธ์ 2. เอนไซม์ Superoxidase และ Lipid peroxidase เพิ่มขึ้นในช่วงได้อาหาร	Martre *et al.* (2001)
Malus domestica Borkh. (แอปเปิล)	การเกิดยอด	RITA®	16 ครั้งต่อวัน 8 ครั้งต่อวัน	1.ให้อัตราการเพิ่มยอดสูงสุด 2. ให้ความยาวยอดมากที่สุด การออกราก 90 %	Zhu *et al.* (2005)
Eucalyptus spp. (ยูคาลิปตัส)	การเกิดยอด	RITA®	30 วินาทีทุก 10 นาที	ประมาณ 2 เท่า โดยใช้เวลาเพียงครึ่งหนึ่งของเวลาที่ใช้ในอาหารแข็ง	McAlister *et al.* (2005)

หมายเหตุ

RITA® = Recipient for Automation Temporary Immersion System

TRM = Tilting and rocker machines

APCS = Automated plant culture System

TWF = Twin Flasks System

8.7 ระบบไบโอรีแอคเตอร์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ระบบไบโอรีแอคเตอร์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายระบบ แต่ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว หรือ Temporary Immersion Bioreactor ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 แบบคือ

8.7.1 ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวที่มีภาชนะแบบ 2 ชั้น

8.7.2 ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดคู่หรือขวดแฝด

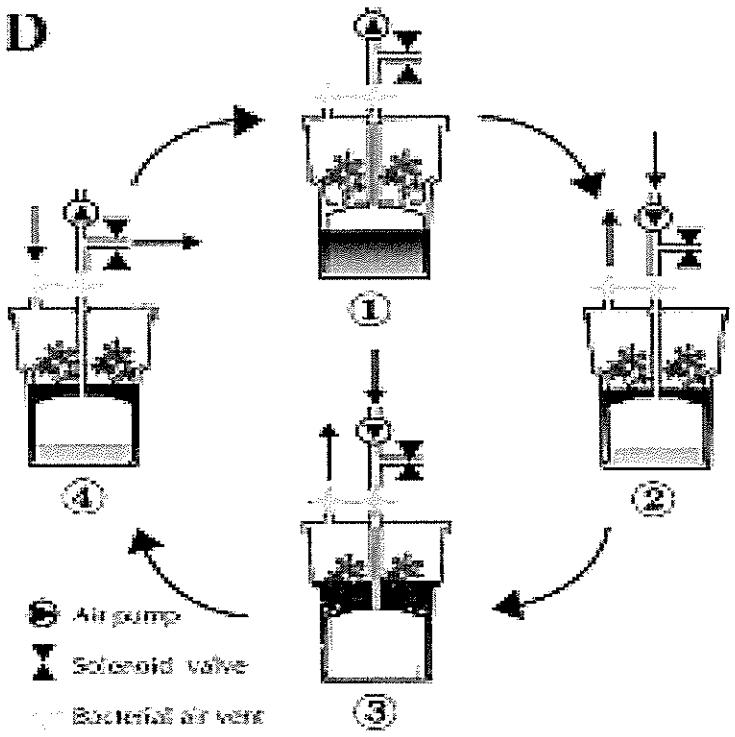
จุดมุ่งหมายหลักของการพัฒนาระบบนี้คือ ใช้งานง่าย สะดวกต่อการปฏิบัติงาน เช่น การเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่สามารถทำได้รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องเคลื่อนย้ายชิ้นส่วนพืชจากภาชนะเดิม จึงต้องลดความซับซ้อนของระบบเพาะเลี้ยง รวมถึงการประกอบชิ้นส่วนต่าง ๆ ที่ไม่ยุ่งยาก นำไปสู่การพัฒนาระบบไบโอรีแอคเตอร์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบจมชั่วคราวโดยใช้แรงดันลมเป็นตัวผลักดันการไหลของอาหารเหลว

8.7.1. ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวที่มีภาชนะแบบ 2 ชั้น (Temporary Immersion Bioreactor with Two Layer Flasks)

สำหรับหลักการทำงานของทั้งสองระบบคล้ายกัน โดยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบภาชนะ 2 ชั้น จะแบ่งภาชนะออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนบนเป็นที่สำหรับใส่ชิ้นส่วนพืช และส่วนล่างสำหรับใส่อาหารเหลวทั้งสองส่วนเชื่อมกันด้วยท่อเพื่อให้สารละลายอาหารสามารถไหลขึ้นไปเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อยู่ด้านบนได้ โดยอาศัยแรงดันลมจากปั๊มลม และสารละลายอาหารไหลกลับด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก ในส่วนของระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดคู่หรือขวดแฝด มีการแยกขวดเพาะเลี้ยงออกจากกันเป็น 2 ขวด คือ ขวดที่ใส่สารละลายอาหาร และขวดที่ใส่ชิ้นเนื้อเยื่อพืช ขวดทั้งสองเชื่อมต่อกันด้วยท่อเพื่อให้สารละลายอาหารสามารถไหลไปเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชที่อยู่อีกขวดหนึ่งได้ อาหารจะถูกดันไปเลี้ยงพืชและถูกดันให้ไหลกลับโดยอาศัยแรงดันจากปั๊มลมเพียงอย่างเดียว สำหรับอากาศที่เข้า - ออกระบบไบโอรีแอคเตอร์ทั้งสองแบบจะถูกกรองด้วยแผ่นกรองอากาศ ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร ซึ่งทำหน้าที่กรองเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ไม่ให้เข้าไปปนเปื้อนในระบบ และการเปิด - ปิดที่ดันอาหารไปมาควบคุมด้วยโซลินอยด์วาล์ว ที่ถูกควบคุมด้วยตัวควบคุมเวลาอีกชั้นหนึ่ง (Teisson *et al.*, 1996) ในระบบนี้ควรทำการเปลี่ยนอาหารทุก 4-6 สัปดาห์ ซึ่งการเปลี่ยนอาหารสามารถทำได้ง่าย และรวดเร็วโดยไม่ต้องเปลี่ยนขวดชิ้นส่วนพืชใหม่

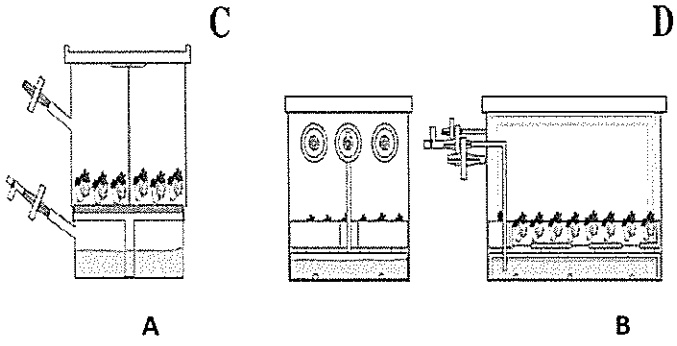
Alvard *et al.* (1993) ได้ออกแบบชุดเพาะเลี้ยงระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว แบบ 2 ชั้น (Two Layer Flasks)ที่เรียกว่า RITA system โดยใช้แรงดันลมเป็นตัวผลักดันอาหารขึ้นไปเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อยู่ด้านบน (ภาพ 1) ชุดเพาะเลี้ยงมีขนาดภาชนะ 1 ลิตร ภายในภาชนะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนบนเป็นที่สำหรับใส่ชิ้นส่วนพืช และส่วนล่างสำหรับใส่อาหารเหลวทั้งสองส่วนเชื่อมกันด้วยท่อเพื่อให้สารละลายอาหารสามารถไหลขึ้นไปเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อยู่ด้านบนได้ โดยอาศัยแรงดันลมจากปั๊มลมด้วยการแทนที่ของอากาศเข้าไปดันให้สารละลายอาหารไหลตามท่อและช่องด้านข้างภาชนะจากด้านล่าง

ขึ้นไปท่วมชิ้นส่วนพืชที่อยู่ด้านบนโดยพืชได้สัมผัสกับอาหารเหลวและฟองอากาศผสมมาด้วย ตลอดเวลาที่มีการให้แรงดันลม อากาศส่วนเกินจะไหลออกทางด้านบนผ่านแผ่นกรองอากาศ จึงทำให้มีการแลกเปลี่ยนอากาศภายในชุดเพาะเลี้ยง และอาศัยแรงโน้มถ่วงของโลกทำให้สารละลายอาหารไหลกลับสู่ภาชนะด้านล่าง



ภาพ ๑ ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบ 2 ชั้น RITA system (ดัดแปลง : Alvard *et al.*, 1993)

สำหรับชุดเพาะเลี้ยงที่มีหลักการทำงานเช่นเดียวกันกับระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบ 2 ชั้น RITA system ได้แก่ PLANTIMA และ PLANTFORM bioreactor ซึ่งได้รับการพัฒนาโดยบริษัท A-Tech Bioscientific Co., Ltd. และบริษัท Sweden&TC propagation Ltd. ตามลำดับ (ภาพ 2)

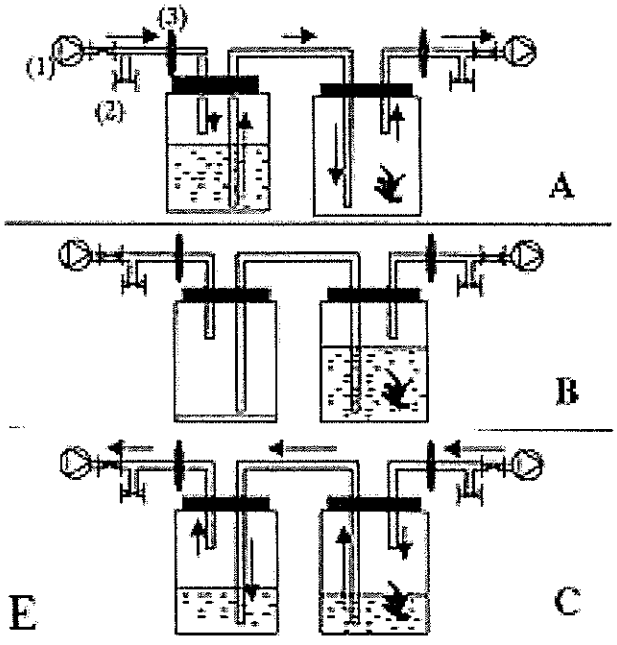


ภาพ 2 ระบบไบโอรีแอคเตอรจมชวคราวแบบ 2 ชั้น PLANTIMA (A)และ PLANTFORM bioreactor (B) (ที่มา : Vasil G. *et al.* 2014)

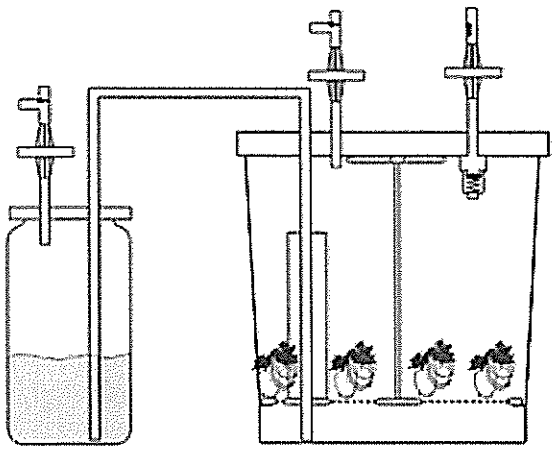
8.7.2. ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดคู่หรือขวดแฝด (Temporary Immersion Bioreactor with Twin Flasks system)

Escalona *et al.* (1999) ได้พัฒนาชุดเพาะเลี้ยงระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว แบบขวดคู่หรือขวดแฝด (Twin Flasks system) ซึ่งปัจจุบันมีการผลิตจำหน่ายเชิงการค้าและรู้จักกันในชื่อ BIT มีหลักการทำงานเช่นเดียวกับแบบ 2 ชั้นแต่แยกส่วนของภาชนะเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและภาชนะใส่สารละลายอาหารออกจากกันเป็น 2 ขวด ทำการเชื่อมต่อขวดทั้ง 2 ด้วยสายยางซิลิโคน และเชื่อมต่อกับระบบลมทั้งขวดเพาะเลี้ยงและขวดใส่สารละลายอาหาร อาศัยระบบลมมาใช้ในการให้สารละลายอาหารกับชิ้นส่วนพืชด้วยการแทนที่อาหารด้วยอากาศดันให้สารละลายอาหารไหลจากขวดใส่อาหารไปตามท่อเชื่อมเข้าท่วมชิ้นส่วนพืชในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ ระบบลมที่เชื่อมกับขวดบรรจุอาหารจะหยุดทำงาน และระบบลมที่เชื่อมกับขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะทำงาน ทำให้สารละลายอาหารถูกผลักดันกลับคืนสู่ขวดบรรจุอาหารจนหมด (ภาพ 3)

สำหรับชุดเพาะเลี้ยงที่มีหลักการทำงานเช่นเดียวกันกับระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดคู่หรือขวดแฝด ได้แก่ Bioreactor RALM ซึ่งได้รับการพัฒนาโดย บริษัท RALM Industria e Comércio ltda., Brazil. (ภาพ 4)



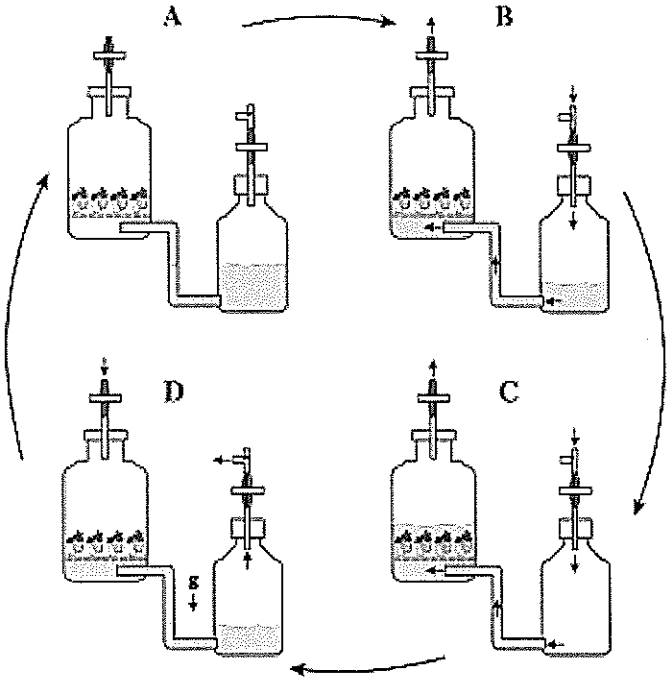
ภาพ 3 ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดคู่ (ดัดแปลง : Escalona *et al.* ,1999)
(1) ปั๊มลม (2) โซลินอยด์วาล์ว (3) แผ่นกรองอากาศ



ภาพ 4 ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบ Bioreactor RALM (ที่มา : Vasil G. *et al*. 2014)

ต่อมาในปี ค.ศ. 2007 Ducos *et al*. ได้พัฒนาชุดเพาะเลี้ยง Ebb and Flow โดยขยายขนาดของภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อให้ใหญ่ขึ้น และอาศัยแรงโน้มถ่วงของโลกมาทำให้สารละลายอาหารไหลจากภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อกลับไปสู่ภาชนะบรรจุอาหาร ระบบนี้ประกอบด้วยภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อที่ทำจากพลาสติกหรือแก้ว สามารถขยายขนาดภาชนะได้ถึง 10 ลิตร หรือภาชนะที่มีพื้นที่ขนาด 1,260 ตารางเซนติเมตร ส่วนภาชนะบรรจุอาหารสามารถเลือกเพิ่มหรือลดขนาดที่เหมาะสมกับภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อ เพื่อให้มีปริมาณอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้อย่างเพียงพอ ภาชนะทั้งสองนี้เชื่อมต่อกันด้วยสายยางซิลิโคน โดยมีข้อต่อเพื่อให้สะดวกในการเปลี่ยนภาชนะบรรจุอาหาร

ระบบนี้มีการทำงานโดยปั๊มลมผ่านตัวกรองอากาศเข้าสู่ถังบรรจุสารละลายอาหาร ที่วางอยู่ในระดับต่ำกว่าภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อพืช แรงดันอากาศจะดันให้สารละลายอาหารไหลขึ้นไปตามท่อสายยางซิลิโคนเข้าท่วมชิ้นเนื้อเยื่อพืชที่อยู่ในภาชนะบรรจุที่อยู่สูงกว่า การให้ชิ้นเนื้อเยื่อพืชได้อาหารโดยแช่อยู่ในสารละลายอาหารตามระยะเวลาที่ต้องการ เมื่อครบกำหนดเวลาที่ตั้งไว้ปั๊มลมจะหยุดทำงาน ทำให้สารละลายอาหารทั้งหมดไหลลงสู่ถังหรือภาชนะบรรจุอาหาร และจะทำงานวนเวียนซ้ำ ๆ จนพืชเจริญเติบโตตามที่ต้องการ (Ducos *et al*. , 2007) ข้อดีของระบบนี้คือ สามารถเพิ่มจำนวน และขนาดของภาชนะบรรจุเนื้อเยื่อและสารละลายอาหาร รวมทั้งยังสามารถใช้งานได้สะดวก (ภาพ 5)



ภาพ 5 ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว Ebb and Flow (Ducos a *et al.* ,2007)

สำหรับประเทศไทยงานวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์เพื่อการขยายพันธุ์พืชในประเทศไทยมีอยู่น้อย เริ่มจากการศึกษาของ ยุพา และวิเศษลักษณ์ (2543) เพาะเลี้ยงยอดกล็อกซีเนียในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ระบบ Temporary immersion ให้อาหารเป็นเวลา 1 นาที และ 15 นาที ทุก 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง พบว่าสภาพการเลี้ยงที่สามารถเพิ่มปริมาณยอดได้สูงสุดที่เวลา 60 วัน คือ ระบบ Temporary immersion ซึ่งให้จำนวนยอดมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งประมาณ 6 เท่า ระบบนี้จึงเป็นเทคนิคที่น่าศึกษาและปรับใช้เพื่อลดต้นทุนการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ยุพาและคณะ (2545) เพาะเลี้ยงบุกไข่โดยนำยอดบุกไข่ขนาด 0.5 - 1 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยง 4 วิธี ได้แก่ การเลี้ยงด้วยอาหารเหลวระบบ Temporary immersion อาหารเหลวบนเครื่องเขย่า อาหารเหลวที่มีแผ่นพยุง และอาหารกึ่งแข็งเป็นเวลา 25 วัน พบว่าจำนวนยอดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ยอดที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบ Temporary immersion มีลักษณะสมบูรณ์ที่สุด ในขณะที่พืชในอาหารเหลวมีลักษณะฉ่ำน้ำ ไม่สามารถพัฒนาตายอดจำนวนมากให้กลายเป็นยอดที่สมบูรณ์ได้ ส่วนชิ้นส่วนยอดที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งมีลักษณะสมบูรณ์แต่มีจำนวนยอดต่ำที่สุดคือ 5.28 ยอด

นพมณี และคณะ (2548) ศึกษาระยะเวลาและจำนวนครั้งในการได้รับอาหารของระบบ TIB ต่อการเพิ่มปริมาณต้นจิ๋วของปทุมมาลูกผสม “CW 06” โดยกำหนดระยะเวลาและจำนวนครั้งในการ

ได้รับอาหารแตกต่างกัน 4 แบบคือ ได้รับอาหาร 1 นาที 2 ครั้งต่อวัน, 1 นาที 6 ครั้งต่อวัน, 15 นาที 2 ครั้งต่อวัน และ15 นาที 6 ครั้งต่อวัน เปรียบเทียบกับอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลว เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าการให้อาหาร 1 นาที 6 ครั้งต่อวันให้จำนวนต้นต่อขวดสูงสุดคือ 1,516.67 ต้นต่อขวด ส่วนการให้อาหาร 15 นาที 6 ครั้งต่อวันให้จำนวนต้น 792.67 ต้นต่อขวด

พรศักดิ์ (2550) ได้พัฒนาระบบการผลิตต้นพันธุ์ปทุมมาโดยใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดแฝด โดยชุดภาชนะและอุปกรณ์เพาะเลี้ยงปรับปรุงและติดตั้งโดยใช้อุปกรณ์ที่มีในประเทศขนาดขวดเพาะเลี้ยง 700 มิลลิลิตร (ภาพ 3) มีหลักการทำงานเช่นเดียวกับระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวที่มีภาชนะแบบขวดคู่ ที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น พบว่าปริมาตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงปทุมมาในระยะ 30 วัน คือ 300 มิลลิลิตร การได้รับอาหาร 1 - 15 นาที 6 ครั้งต่อวัน สามารถเพิ่มจำนวนต้นจิ๋วได้ 25.5 เท่าจากเริ่มต้น ในขณะที่ในอาหารกึ่งแข็ง และอาหารเหลวมีการเพิ่มปริมาณต้นจิ๋วได้ 9.5 และ 1.75 เท่าตามลำดับ หลังจากนำออกปลูกพบว่าต้นที่ได้จากระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดแฝดมีเปอร์เซ็นต์รอดมากถึง 95 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตดี เร็วและสามารถปรับสภาพเข้ากับสภาพแวดล้อมภายนอกได้เร็วกว่าต้นที่ได้จากอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลว

8.8 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของระบบไบโอรีแอคเตอร์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

8.8.1. ความถี่และช่วงเวลาในการให้สารละลายอาหาร

ประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยระบบ TIB ขึ้นกับความถี่และช่วงเวลาในการให้สารละลายอาหาร เนื่องจากเป็นปัจจัยที่ควบคุมการได้รับออกซิเจน และอาหารจากการสัมผัสกันของชิ้นส่วนพืชกับสารละลายอาหาร ซึ่งที่ผ่านมาการผสมผสานกันลักษณะนี้ไม่เคยเกิดขึ้นกับการเพาะเลี้ยงด้วยระบบอาหารเหลว

การเพาะเลี้ยงด้วยระบบ TIB พบว่าความถี่และช่วงเวลาในการให้สารละลายอาหารนั้น มีความสำคัญต่อระบบการเพาะเลี้ยงเพาะเป็นปัจจัยที่กำหนดการได้รับสารละลายอาหารและควบคุมไม่ให้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชผิดปกติเมื่อเลี้ยงด้วยสารละลายอาหารต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลานาน เช่น การเกิดอาการฉ่ำน้ำของชิ้นส่วนพืช ที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบันได้มีการนำระบบนี้มาประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์พืชชนิดต่าง ๆ โดยความถี่และช่วงเวลาที่เหมาะสมมีความจำเพาะกับระบบและพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเช่น

Etienne *et al.* (1997) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันฝรั่ง กาแฟอาราบิกา (C. Arabica) ยางพารา (H. brasilliensis) พบว่าการให้สารละลายอาหารด้วยความถี่ 6 ชั่วโมงต่อครั้ง โดยช่วงเวลาการให้สารละลายอาหารนานครั้งละ 1 ชั่วโมงมีความเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดหัวของมันฝรั่ง ในขณะที่การให้สารละลายอาหารด้วยความถี่ 12 ชั่วโมงต่อครั้ง และมีช่วงการให้อาหารสั้น ๆ นานครั้งละ 1 นาที เหมาะสมต่อการกระตุ้นการเกิดและพัฒนาเป็นต้นอ่อนของเซลล์ร่างกายของกาแฟ และยางพารา

เช่นเดียวกับการศึกษาของ Harris and Mason (1983) ซึ่งพบว่าการใช้ความถี่และช่วงเวลาในการให้อาหารสั้น ๆ (ให้สารละลายอาหารด้วยความถี่ทุก ๆ 30 วินาที นานครั้งละ 30 วินาที) เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดยอดองุ่น

Krueger et al. (1991) แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของความถี่และช่วงเวลาในการให้สารละลายอาหารสำหรับการเพิ่มปริมาณยอดของเซอร์วิกเบอร์รี่ โดยพบว่าเมื่อให้สารละลายอาหารด้วยความถี่ 30 นาที ช่วงเวลาการให้อาหาร 5 นาทีต่อครั้ง สามารถเพิ่มปริมาณของยอดได้มากแต่ยอดที่ได้มีอาการฉ่ำน้ำ ส่วนการให้สารละลายอาหารด้วยความถี่ 60 นาที โดยยังใช้ช่วงเวลาการให้สารละลายอาหารเท่าเดิม ไม่พบอาการนี้ แต่การเพิ่มปริมาณของยอดน้อยลง ดังนั้นผู้วิจัยจึงเสนอว่าควรใช้ความถี่และช่วงเวลาในการให้อาหารครั้งแรกในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณยอด และใช้ความถี่และช่วงเวลาการให้สารละลายอาหารครั้งสุดท้ายเพื่อให้ยอดมีคุณภาพเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากพบว่าหลังการปรับสภาพการเลี้ยงโดยใช้ความถี่และช่วงเวลาการให้สารละลายอาหารครั้งสุดท้าย ยอดที่มีอาการฉ่ำน้ำจะกลับคืนสู่สภาพปกติซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ต่อไป

8.8.2. ปริมาณของสารละลายอาหาร

การใช้ปริมาณอาหารต่อชุดหรือขวดเพาะเลี้ยงต้องสร้างประโยชน์ให้กับระบบ TIB ให้มากที่สุด โดยเฉพาะระบบTIB แบบขวดสองชั้น และแบบขวดคู่เนื่องจากเป็นระบบที่ไม่มีการปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างของสารละลายอาหารในขณะเพาะเลี้ยง

Lorenzo *et al.* (1998) พบว่าปริมาณอาหาร 50 มิลลิลิตรต่อขวดทำให้ยอดของอ้อย (*Saccharum spp.*) เพิ่มมากที่สุด เมื่อเลี้ยงด้วยระบบ TIB แบบขวดคู่ โดยเพิ่มจาก 8.3 ยอด เป็น 23.9 ยอดในเวลา 30 วัน และไม่กระทบต่อความยาวของยอด แต่การใช้ปริมาณอาหารที่มากกว่านี้ทำให้การเพิ่มปริมาณของยอดอ้อยลดลง เพราะสารเคมีที่พืชสร้างขึ้นมาภายนอกเซลล์ซึ่งกระตุ้นการสร้างยอดถูกทำให้เจือจางเนื่องจากปริมาณอาหารที่ใช้มากเกินไป

Escalona et al. (1999) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดด้วยระบบ TIB แบบขวดคู่ โดยใช้ปริมาณอาหาร 200 มิลลิลิตรต่อขวดสามารถเพิ่มปริมาณยอดได้มากที่สุด แต่การใช้ปริมาณอาหารที่มากกว่านี้ทำให้อัตราการเพิ่มปริมาณยอดลดลง

8.8.3.จำนวนยอดหรือชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น

จำนวนยอดหรือชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบไบโอรีแอคเตอร์เพื่อเพิ่มปริมาณและคุณภาพของต้นพืช Piao et al. (2003) ศึกษาการเพิ่มจำนวนต้นมันฝรั่งในระยะชักนำให้เกิดต้น โดยใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นแตกต่างกัน คือ 20, 40, 50, 60 และ 80 ชิ้น ในระบบ TIB ขนาด 10 ลิตรที่มีตะแกรงรองชิ้นส่วนพืช ให้อาหาร 60 นาที จำนวน 12 ครั้งต่อวัน หลังจาก

เพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์พบว่าการใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้น 50 ชิ้นมีผลต่อการเพิ่มปริมาณต้นสูงสุดถึง 14 ชิ้นส่วนต่อต้น ในขณะที่ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่มากและน้อยกว่าเพียงเล็กน้อย คือ 40 และ 60 ชิ้นมีปริมาณชิ้นส่วนเพิ่มขึ้น 11.3 และ11.5 ชิ้นส่วนต่อต้นตามลำดับ ส่วนการใช้ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่มากหรือน้อยเกินไป คือ 80 และ 20 ชิ้นส่วน มีการเพิ่มจำนวนต้นต่ำสุด คือ 10 และ 9.4 ต้นตามลำดับ

McAlister *et al.* (2005) รายงานว่าการใช้ชิ้นส่วนยอดเริ่มต้นมีผลต่อความถี่ และช่วงเวลา ในการให้สารละลายอาหารของการขยายพันธุ์ยูคาลิปตัสด้วยระบบ TIB แบบขวดสองชั้น โดยการใช้จำนวนยอดเริ่มต้น 50 ยอดให้อัตราการเพิ่มปริมาณยอดสูงที่สุดทุกความถี่ของการให้สารละลายอาหาร สำหรับการใช้จำนวนยอดเริ่มต้น 50 ยอดร่วมกับการให้สารละลายอาหารครั้งละ 30 วินาที ด้วยความถี่ 10 และ 20 นาทีให้อัตราการเพิ่มปริมาณยอดมากกว่าการใช้จำนวนยอดเริ่มต้น 100 และ 150 ยอด ทั้งนี้เนื่องจากการใช้จำนวนยอดเริ่มต้นต่อขวดมากทำให้ความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารในสารละลายอาหารหมดลงด้วยอัตราที่เร็วกว่าการใช้จำนวนยอดเริ่มต้นน้อยกว่า

8.8.4 ปริมาตรหรือขนาดภาชนะ

ปริมาตรหรือขนาดภาชนะที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบ TIB มีขนาดใหญ่กว่าภาชนะที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลวโดยภาชนะของระบบฯมีขนาดตั้งแต่ 1จนถึง 50 ลิตร และสามารถปรับเปลี่ยนขนาดให้เหมาะสมกับระบบได้ Krueger et al. (1991) ทำการเพิ่มปริมาณยอดของเซอร์วิกเบอร์รี่ โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงในภาชนะที่มีขนาดใหญ่ 7 ลิตร ประสิทธิภาพการขยายพันธุ์ดีกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยภาชนะขนาด 140 มิลลิลิตร เพราะภาชนะที่มีขนาดใหญ่กว่าสามารถลดความหนาแน่นของต้นพืชในภาชนะและส่งเสริมการยืดยาวของพืชที่เพาะเลี้ยง

8.8.5.การให้อากาศและการระบายอากาศ มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชเห็นได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารกึ่งแข็งที่เจริญเติบโตช้าเนื่องจากอากาศไม่เพียงพอ โดยพืชจะเจริญเติบโตดีขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเพาะเลี้ยงในระบบ TIB (Alvard *et al.*, 1993) ซึ่งการเลี้ยงในระบบนี้อากาศจากปั๊มลมที่ทำหน้าที่ผลักดันอาหารไปสู่ขวดเพาะเลี้ยงส่งผลดีต่อการเจริญของพืช (Tiesson *et al.*, 1994)

9. นิยามศัพท์

9.1 “ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว: Temporary Immersion Bioreactor (TIB)” คือระบบเพาะเลี้ยงแบบกึ่งอัตโนมัติที่มีการให้อาหารเหลวในการเพาะเลี้ยงเป็นช่วงเวลาโดยมีหลักการที่ไม่ต้องการให้พืชได้รับอาหารอย่างต่อเนื่อง หรือไม่จมในอาหารเหลวตลอดเวลา กล่าวคือมีการให้อาหารตามระยะเวลาที่ได้กำหนดไว้ เช่น ให้อาหารเป็นระยะเวลา 1 นาที 1 ครั้งต่อวัน, 3 นาที 5 ครั้งต่อวัน หรือ 10 นาที 4 ครั้งต่อวัน เป็นต้น ซึ่งการได้รับอาหารของพืชในลักษณะเช่นนี้เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของต้นพืช สามารถเพิ่มมวลของเนื้อเยื่อเจริญต่าง ๆ อีกทั้งยังสามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้เป็นจำนวนมาก

9.2 “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: plant ไบโอรีแอคเตอร์sue culture, plant micropropagation” คือการนำส่วนหนึ่งส่วนใดของพืชไม่ว่าจะเป็นอวัยวะ (organ) เนื้อเยื่อ (ไบโอรีแอคเตอร์sue) เซลล์ (cell) หรือโปรโตพลาส (protoplast) มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ในสภาพที่ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ภายใต้สภาพแวดล้อมที่สามารถควบคุมได้ เช่น แสง อุณหภูมิ และความชื้น เพื่อให้ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโต และสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้

9.3 กล้วยหอมทอง (Banana *cv.Hom thong*) คือพืชล้มลุกในวงศ์ Musaceae มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นไม้ผลเขตร้อนที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของไทย โดยการศึกษานี้เน้นเฉพาะกล้วยหอมทอง ชื่อสามัญ : Gros Michel ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Musa (AAA* group) “Kluai Hom Thong” กลุ่มย่อย Gros Michel ซึ่งผลมีเปลือกบาง กลิ่นหอม เนื้อสีเหลืองเข้ม น่ารับประทาน รสชาติหวาน อุดมด้วยน้ำตาลซูโครส ฟรุคโทส และกลูโคส ลักษณะภายนอกแต่ละผลเรียงตัวกันในแต่ละหวีอย่างสวยงาม สีผิวเมื่อสุกจะเปลี่ยนจากสีเขียวเข้มเป็นสีเหลืองทองให้ผู้บริโภค สังเกตได้ง่าย

9.4 ทรีทเมนต์คอมบิเนชั่น (Treatment combination) คือ การนำแต่ระระดับของแต่ละปัจจัยในการวิจัยมารวมกันในการวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial experiments)

10. ระเบียบวิธีการวิจัย

10.1 ศึกษาจำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้นร่วมกับปริมาณอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยหอมทองในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดคู่เปรียบเทียบกับอาหารกึ่งแข็ง

10.1.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ปัจจัยที่ศึกษาได้แก่

ปัจจัยที่ 1 จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้น 5, 10, 15 และ 20 ชิ้น

ปัจจัยที่ 2 ปริมาณอาหาร 250, 300, 350 และ 400 มิลลิลิตร

รวมทั้งสิ้น 4*4 = 16 ทรีทเมนต์คอมบิเนชั่น (Treatment combination) จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชุด ดังนี้

Treatment 0 เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง (control)

Treatment 1 จำนวนชิ้นพืช 5 ชิ้น/ขวด ปริมาณอาหาร 250 มิลลิลิตรต่อขวด

Treatment 2 จำนวนชิ้นพืช 5 ชิ้น/ขวด ปริมาณอาหาร 300 มิลลิลิตรต่อขวด

Treatment 3 จำนวนชิ้นพืช 5 ชิ้น/ขวด ปริมาณอาหาร 350 มิลลิลิตรต่อขวด

Treatment 4 จำนวนชิ้นพืช 5 ชิ้น/ขวด ปริมาณอาหาร 400 มิลลิลิตรต่อขวด

Treatment 5 จำนวนชิ้นพืช 10 ชิ้น/ขวด ปริมาณอาหาร 250 มิลลิลิตรต่อขวด

Treatment 6 จำนวนชิ้นพืช 10 ชิ้น/ขวด ปริมาณอาหาร 300 มิลลิลิตรต่อขวด

Treatment 7 จำนวนชิ้นพืช 10 ชิ้น/ขวด ปริมาณอาหาร 350 มิลลิลิตรต่อขวด

Treatment 8 จำนวนชิ้นพืช 10 ชิ้น/ขวด ปริมาณอาหาร 400 มิลลิลิตรต่อขวด

Treatment 9 จำนวนชิ้นพืช 15 ชิ้น/ขวด ปริมาณอาหาร 250 มิลลิลิตรต่อขวด

Treatment 10 จำนวนชิ้นพืช 15 ชิ้น/ขวด ปริมาณอาหาร 300 มิลลิลิตรต่อขวด

Treatment 11 จำนวนชิ้นพืช 15 ชิ้น/ขวด ปริมาณอาหาร 350 มิลลิลิตรต่อขวด

Treatment 12 จำนวนชิ้นพืช 15 ชิ้น/ขวด ปริมาณอาหาร 400 มิลลิลิตรต่อขวด

Treatment 13 จำนวนชิ้นพืช 20 ชิ้น/ขวด ปริมาณอาหาร 250 มิลลิลิตรต่อขวด

Treatment 14 จำนวนชิ้นพืช 20 ชิ้น/ขวด ปริมาณอาหาร 300 มิลลิลิตรต่อขวด

Treatment 15 จำนวนชิ้นพืช 20 ชิ้น/ขวด ปริมาณอาหาร 350 มิลลิลิตรต่อขวด

Treatment 16 จำนวนชิ้นพืช 20 ชิ้น/ขวด ปริมาณอาหาร 400 มิลลิลิตรต่อขวด

10.1.2 การเตรียมชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยหอมทอง

10.1.2.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืช นำต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 1 เดือน มาทำการทดลอง ซึ่งขนาดต้นต้องใกล้เคียงกันคือมีความสูงของต้น 5 เซนติเมตร ความกว้างของต้น 1 เซนติเมตร นำมาตัดราก และใบออก โดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมวุ้น (Agar) 9 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.6 อาหารที่เตรียมนี้บรรจุลงในขวดแก้ว ขนาด 700 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ ๑๒๑ องศาเซลเซียส ความดัน ๑๕ ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา ๒๐ นาที และดำเนินการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยหอมทอง ตามทรีทเมนต์คอมบิเนชั่น ดังแผนการทดลองข้างต้น

10.1.2.2 นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยหอมทองไปวางเลี้ยงในสภาพได้รับแสง ๑๖ ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง ๓,๐๐๐ ลักซ์ อุณหภูมิ ๒๕ ± ๒ องศา ดำเนินการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยหอมทองในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดคู่ให้อาหาร 3 ครั้งต่อวัน ระยะเวลาในการให้สารละลายอาหารนานครั้งละ 10 นาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา ๓ สัปดาห์ สังเกตการพัฒนาและการเจริญเติบโต โดยทำการบันทึกลักษณะของยอดจำนวนยอดหรือหน่อ และความสูงของต้นพันธุ์กล้วยหอมทอง

10.2 ศึกษาจำนวนครั้งและระยะเวลาในการให้อาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยหอมทองในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดคู่

10.2.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ปัจจัยที่ศึกษาได้แก่

ปัจจัยที่ 1 จำนวนครั้งในการให้สารละลายอาหารวันละ 3, 6 และ 9 ครั้งต่อวัน

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการให้สารละลายอาหารนานครั้งละ 5, 10 และ 15 นาที

รวมทั้งสิ้น 3*3 = 9 ทรีทเมนต์คอมบิเนชั่น จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชุด ดังนี้

Treatment 0 เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง (control)

Treatment 1 จำนวนครั้งการให้อาหาร 3 ครั้ง/วัน ระยะเวลานาน 5 นาทีต่อครั้ง

Treatment 2 จำนวนครั้งการให้อาหาร 3 ครั้ง/วัน ระยะเวลานาน 10 นาทีต่อครั้ง

Treatment 3 จำนวนครั้งการให้อาหาร 3 ครั้ง/วัน ระยะเวลานาน 15 นาทีต่อครั้ง

Treatment 4 จำนวนครั้งการให้อาหาร 6 ครั้ง/วัน ระยะเวลานาน 5 นาทีต่อครั้ง

Treatment 5 จำนวนครั้งการให้อาหาร 6 ครั้ง/วัน ระยะเวลานาน 10 นาทีต่อครั้ง

Treatment 6 จำนวนครั้งการให้อาหาร 6 ครั้ง/วัน ระยะเวลานาน 15 นาทีต่อครั้ง

Treatment 7 จำนวนครั้งการให้อาหาร 9 ครั้ง/วัน ระยะเวลานาน 5 นาทีต่อครั้ง

Treatment 8 จำนวนครั้งการให้อาหาร 9 ครั้ง/วัน ระยะเวลานาน 10 นาทีต่อครั้ง

Treatment 9 จำนวนครั้งการให้อาหาร 9 ครั้ง/วัน ระยะเวลานาน 15 นาทีต่อครั้ง

10.2.2 การเตรียมชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยหอมทอง

10.2.2.1 การเตรียมชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกล้วยหอมทองโดยนำต้นที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลา 1 เดือน มาทำการทดลอง ซึ่งต้นต้องมีขนาดที่ใกล้เคียงกันสูง 5 เซนติเมตร ความกว้างของต้น 1 เซนติเมตร นำมาตัดราก และใบออก โดยเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมวุ้น (Agar) 9 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.6 อาหารที่เตรียมนี้บรรจุลงในขวดแก้ว ขนาด 700 มิลลิลิตร จำนวน 300 มิลลิลิตรต่อขวด ทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ ๑๒๑ องศาเซลเซียส ความดัน ๑๕ ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา ๒๐ นาที

10.2.2.2 นำขวดเพาะเลี้ยงไปวางเลี้ยงในสภาพได้รับแสง ๑๖ ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง ๓,๐๐๐ ลักซ์ อุณหภูมิ ๒๕ ± ๒ องศา การเพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดคู่ ดำเนินการเพาะเลี้ยงตามทรีทเมนต์คอมบิเนชั่น ดังแผนการทดลองข้างต้น ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา ๓ สัปดาห์ สังเกตการพัฒนาและการเจริญเติบโต โดยทำการบันทึกลักษณะของยอดจำนวนยอดหรือหน่อและความสูงของต้นพันธุ์กล้วยหอมทอง

10.3 ศึกษาต้นทุนที่ใช้ในการตัดขยายเพิ่มจำนวนกล้วยหอมทองในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดคู่ได้แก่

10.3.1 ค่าแรงงานต่อต้น

10.3.2 อุปกรณ์และสารเคมีต่อต้น

10.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำข้อมูลที่บันทึกได้มาทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรมทางสถิติที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ค่าเฉลี่ย เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

11. ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัย เรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยหอมทองด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดคู่ มีขอบเขตการวิจัยดังนี้

11.1 ขอบเขตด้านเนื้อหา การศึกษาวิจัยครั้งนี้ดำเนินการศึกษาจำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้นร่วมกับปริมาณอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยหอมทองวดคู่ และศึกษาหาจำนวนครั้งและระยะเวลาของการให้อาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยหอมทองในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว

แบบขวดคู่ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณยอด และศึกษาต้นทุนที่ใช้ในการตัดขยายเพิ่มจำนวนกล้วยหอมทองในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดคู่

11.2 ขอบเขตด้านพื้นที่ การศึกษาวิจัยครั้งนี้ดำเนินการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยหอมทองด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดคู่ ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ศูนย์ขยายพันธุ์พืชที่ 10 จังหวัดอุดรธานี

12. ระยะเวลาการวิจัย

1 ปี (ตุลาคม 2565 - กันยายน 2566)

13. งบประมาณ

ไม่มี

14. แผนการดำเนินงาน

กิจกรรม/ขั้นตอน	แผนการปฏิบัติงาน											
	ต.ค.-65	พ.ย.-65	ธ.ค.-65	ม.ค.-66	ก.พ.-66	มี.ค.-66	เม.ย.-66	พ.ค.-66	มิ.ย.-66	ก.ค.-66	ส.ค.-66	ก.ย.-66
1. ศึกษารวบรวมข้อมูลและเขียนโครงการฯ	←	—	→									
2. เตรียมตัวอย่างกล้วยหอมทอง				←	—	→						
3. การทดลองที่ 1 ศึกษาจำนวนชิ้นร่วมกับปริมาณอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยหอมทอง ในระบบ ไบโอรีแอคเตอร์						←	—	→				
4. การทดลองที่ ๒ ศึกษาจำนวนครั้งและระยะเวลาในการให้อาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยหอมทอง ในระบบไบโอรีแอคเตอร์								←	—	→		
5. ประมวลผลข้อมูล วิเคราะห์และแปรผลข้อมูล									←	—	→	
6. จัดทำรายงาน และจัดพิมพ์รูปเล่มรายงาน										←	—	→

15. เอกสารอ้างอิง

จุลภาค คุ้นวงศ์, กวิศร์ วานิชกุล และกัลยาณี อรรถฉัตร. 2533. การเติบโตและการเพิ่มปริมาณต้นของกล้วยหอมพันธุ์ Grand Nain ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารวิชาการเกษตร, 8 (2), หน้า 2-9.สืบค้น 10 ธันวาคม 2565. จากhttps://hectortarr.arda.or.th/api/uploaded_file/AD25XXC9gJVFnv7d89Chc

นพมณี โทปุญญานนท์, นรวรา ชัยเลิส และพรศักดิ์ บุญมณี. 2548. การศึกษาระยะเวลาและจำนวนครั้งในการได้รับอาหารของไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดแฝดในการเพิ่มปริมาณต้นจิ๋วปทุมมาลูกผสม CW06 ใน การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 5, หน้า 111-114.

เบญจมาศ ศิลาน้อย. 2545. กล้วย. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรศักดิ์ บุญมณี. 2550. การพัฒนาระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวต้นทุนต่ำเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปทุมมา. วิทยานิพนธ์. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 81 น.

ยุพา มงคลสุข และวิเศษลักษณ์ พงษ์จันทร์. 2543. การขยายพันธุ์กล็อกซิเนีย (*Sinningia speciosa*) โดยระบบ Temporary immersion ใน การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. กรุงเทพฯ หน้า 387- 390.

ยุพา มงคลสุขวราพร วีระพลากร และพัชราวดี วัฒนวิกย์กิจ. 2545. การเพิ่มปริมาณยอดบุกไข่ด้วยระบบ Temporary immersion ใน การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40. กรุงเทพฯ. หน้า 194 - 198.

รุ่งอรุณ สุ่มแก้ว. 2550. การผลิตกล้ายูคาลิปตัส คามาลดูเลนซีสด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยระบบ Temporary Immersion แบบขวดคู่. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อานันท์พิมพ์ โตบารมีกุล. 2562. ปัจจัยที่มีผลต่ออุปสงค์การส่งออกกล้วยหอมทองจากประเทศไทยไปยังประเทศญี่ปุ่น. การค้นคว้าอิสระปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Al-Amin, M.,D, Karin, M.R., Rhman, S. & Mamun, A. 2009. In vitro micropropagation banana. Bangladesh Jurnal of Agricultural Research, 34(4), 645-659.

Alvard, D., F. Cote and C. Teisson. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of Temporary immersion of explants. Plant Cell, Tissue Organ Culture. 32 : 55-60.

Berthouly, M. and H. Etienne. 1999. Somatic embryogenesis of coffee. *In*: Jain, S.M., P.K. Gupta and R.J. Newton (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. pp. 259-288. Kluwer Academic Publischers, Dordrecht, The Natherlands.

Chu, I. 1995. Economic analysis of automated micropropagation. *In*: Aitken-Christie, T. Kozai and M.A.L. Smith. (eds) Automation and environmental control in plant Tissue culture. pp. 19-27. Kluwer Academic Publischers, Dordrecht, The Natherlands.

Debergh, P.C. 1988. Improving mass propagation of in vitro plantlets. *In*: Kozai, T. (eds) Horticulture in High Technology Era. pp. 45-57. Internatinal Symposium on High Technology in Protected cultivation. Tokyo, Japan. N.P.:n.p.

Ducos, JP., G. Labbe, C. Lambot and V. Pétiard. 2007. Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clone. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 43: 652-659.

Escalona, M., J. C. Lorenzo, B. González, M. Daquinta, J. L. González, Y. Deajardins and C. G. Borroto. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in Temporary immersion systems. Plant Cell Reports. 18: 743-748.

Etienne, H. and M. Berthouly. 2002. Temporary immersion system in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue Organ Culture 69 : 215-231.

Etienne, H., M. Lartaud, N. Michaux – Ferriere, M. P. Carron, M. Berthouly and C. Teisson. 1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea Brasiliensis* (MÜLL. ARG.) using the Temporary immersion technique. *In vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant. 33: 81-87.

Glick, B.R. and J.J. Pasternak. 1998. Moleccular biotechnology. Principles and application of Recombination DNA. (2nd ed.) ASM Press. Washington DC. 760 p.

Helliot, B., Swennen, R., Poumay, Y., Frison, E., Lepoivre, P. & Panis, B. 2003. Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa spp.*) highly proliferating meristem. Plant Cell Reports, 21, 690-698.

Kane, M.E., E. Gilman and T. Sheehan. 1990. Micropropagationof aquatic plant Cryptocoryne lucens. Horti Sci. 25 (6): 687-689.

Krueger, S., C. Robacker and W. Simonton. 1991. Culture of an anchier x grandiflora in a programmable micropropagation. Plant Cell, Tissue Organ Culture. 27(1) : 219-226.

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

Maene, L. and P. Debergh. 1985. Liquid Medium Additions to Established Tissue Culture to Improve Elongation and Rooting *In Vitro*. Plant Cell, Tissue Organ Culture. 5: 23-33.

McAlister, B., J. Finnie., Watt. M.P. and Blakeway. 2005. Use of the Temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi Forest (SA). Plant Cell, Tissue Organ Culture. 81 : 347-358.

Piao, X.C., D. Chkrabarty, E.J. Hahn and K.Y. Paek. 2003. A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. Current Science. 84(8) : 1129-1132.

Podwyszynska, M. 1992. *In vitro* Propagation of *Aglaonema sp*. Folia. Hort. 4: 104-114.

Sahijram, S., Jayar, S. & Bollama, K. T. 2003. Analyzing somaclonal variation in micropropagated banana (*Musa spp*.). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 39(359), 551-555.

Siebel, M.A. 1992. Batch reactors. *In*: Jenkins, R.O., C.K. Leach and G. Mijnbeek (eds) Bioreactor Design and Product Yield. pp. 103-107. Butterworth-Heinemann, Oxford.

Simonton, W., C. Robacker and S. Krueger. 1991. A programmable micropropagation apparatus using cycled medium. Plant Cell, Tissue Organ Culture. 27: 211-218.

Takayama, S. and M. Akita. 2005. Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plant. *In*: Hvoslef-Eide, A. K. and W. Preil (eds) Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. pp. 61-78. Springer, Printed in the Netherland.

Teisson C., D. Alvard, B. Berthouly, F. Cote, J. Escalant, H. Etienne and M. Lartaud. 1996. Simple apparatus to perform plant Tissue culture by Temporary immersion. Acta Horticultureae. 440: 521 – 526.

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

Titov, S., Salik, K. B., Ajoy, Sadrul, M. D. A. & Sarder, N. U. 2006. Control of Phenolic compound secretion and effect of growth reguretors for organ formation from *Musa spp*. Cv. Kanthali floral bud explant. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 2(3), 97-104.

Uma, S., Lakshmi, M. S., Saraswathi, S., Akbar, A. & Mustaffa, M. M. 2010. Embryo rescue and plant regeneration in banan (*Musa spp*.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 105, 105-111.

Vasil, G., A. Schumann, a. Pavlov and T. Bley. 2014. Temporary immersion system in plant biotechnology. Engineering in Life Sciences. 14: 607-621.

(ลงชื่อ).....ผู้รับผิดชอบโครงการ

(นางสุมลฑา คำโฮง)

(ลงชื่อ).....ผู้บังคับบัญชาเบื้องต้น

(นายสำลี พลขันธ์)

ความเห็นของคณะทำงานวิจัยส่งเสริมการเกษตร กอง/สำนัก/เขต

.....

.....

.....

(ลงชื่อ).....ประธาน

(.....)

(ลงชื่อ).....ผู้รับผิดชอบโครงการ

(นางสุมลฑา คำโฮง)

(ลงชื่อ).....ผู้บังคับบัญชาเบื้องต้น

(นายสำลี พลขันธ์)

ความเห็นของคณะทำงานวิจัยส่งเสริมการเกษตร กอง/สำนัก/เขต .....

.....

.....

(ลงชื่อ).....ประธาน

(นายนิพิจ พินิจผล)

ผู้อำนวยการกลุ่มขยายพันธุ์พืช