การใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์ในการเพิ่มผลผลิตพรรณไม้น้ำไส้ปลาไหลของไทยเพื่อการอนุรักษ์

Temporary immersion bioreactor for micropropagation of *Barclaya longifolia* Wall. (1827) for conservation

มณีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ[1] นงนุช เลาหะวิสุทธิ์[2] สมเกียรติ สีสนอง[2] ชนิกานต์ เชษฐสิงห์[3] และวรางคณา กาซัม[3]

Maneerat Wangwibulkit[1] Nongnuch Laohavisuti[2] Somkiat Seesanong[2] Chanikarn Chadthasing[3] and Warangkana Kasam[3]

[1]ราชการบริหารส่วนกลาง กรมประมง กรุงเทพมหานคร 10900

[2]คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

[3]กองวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง กรุงเทพมหานคร 10900

[1]Central Administration Office, Department of Fisheries, Bangkok, 10900

[2]Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520

[3]Inland Fisheries Research and Development Division, Department of Fisheries, Bangkok, 10900

Corresponding author: maneeraw@fisheries.go.th

บทคัดย่อ

ไส้ปลาไหล *Barclaya longifolia* Wall. (1827) เป็นพรรณไม้น้ำพื้นเมืองของไทยที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ปัจจุบันปริมาณของพรรณไม้น้ำชนิดนี้ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว จนเริ่มหายากและใกล้สูญพันธุ์ ดังนั้นการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบไบโอรีแอคเตอร์เป็นทางเลือกใหม่ในการอนุรักษ์ไส้ปลาไหล โดยทำการศึกษาความถี่ในการให้อาหาร (3, 6, 12 ครั้ง/วัน) ในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวเปรียบเทียบกับระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบดั้งเดิม (ชุดควบคุม) เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไส้ปลาไหลในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวโดยให้อาหาร 6 ครั้ง/วัน ครั้งละ 5 นาที สามารถชักนำให้มีการเพิ่มจำนวนหัวย่อย (13.00±0.15 หัว/ชิ้นเนื้อเยื่อ) และจำนวนใบ (34.00±2.29 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ) มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยอัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนหัวย่อยคิดเป็น 77.35 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าระบบไบโอรีแอคเตอร์มีประสิทธิภาพ สามารถเร่งให้เนื้อเยื่อของไส้ปลาไหลเกิดการชักนำให้มีจำนวนเซลล์เร็วขึ้น เพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ได้มากกว่าระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบดั้งเดิม ซึ่งจะเป็นแนวทางในการอนุรักษ์พรรณไม้น้ำไทยชนิดอื่นต่อไป

คำสำคัญ: ระบบไบโอรีแอคเตอร์ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไส้ปลาไหล

Abstract

Barclaya longifolia Wall. (1827) is an indigenous aquatic plant of Thailand which is rare species, so temporary immersion system (TIB) is an alternative tool for *ex situ* conservation. The experiment was conducted to find out the optimum immersion feeding frequency times (3, 6, 12 times a day) compared with traditional systems of tissue culture. After 6 weeks the result showed that the immersion frequency of 6 times a day feeding provided the highest bulblet number, 13.00±0.15 bulblets/explant and 34.00±2.29 leaves/explant ($P<0.05$). The bulblet number increased to 77.35% compared with control. This study had been found that TIB could increase bulblets of *B. longifolia* better than traditional culture and TIB will be the way to conserve other Thai indigenous aquatic plant in the future.

Keywords: Temporary immersion bioreactor, Tissue culture, *Barclaya longifolia*

คำนำ

พรรณไม้น้ำจัดเป็นทรัพยากรประมงชนิดหนึ่งที่เป็นประโยชน์ต่อระบบนิเวศในน้ำ โดยเป็นที่อยู่อาศัย แหล่งสืบพันธุ์วางไข่ และเป็นอาหารของสัตว์น้ำ พรรณไม้น้ำบางชนิดมีประโยชน์มากมาย ทั้งเป็นอาหาร ยาสมุนไพรรักษาโรค นอกจากนี้บางชนิดยังมีความสวยงาม ทำให้กลายเป็นพรรณไม้น้ำพื้นเมืองที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เป็นที่ต้องการของตลาด โดยนำมาใช้จัดตู้ปลาหรือตู้พรรณไม้น้ำ ในปัจจุบันธุรกิจพรรณไม้น้ำขยายตัวไปมากขึ้น พรรณไม้น้ำส่วนใหญ่ที่นิยมประดับตู้ปลามีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศเขตร้อน ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่เป็นแหล่งกำเนิดของพรรณไม้น้ำที่นิยมหลายชนิด เนื่องจากภูมิประเทศ ภูมิอากาศ และทรัพยากรธรรมชาติค่อนข้างอุดมสมบูรณ์ ทำให้พรรณไม้น้ำสามารถแพร่พันธุ์ได้ดี พรรณไม้น้ำพื้นเมืองของไทยที่สำคัญทางเศรษฐกิจนั้นมีอยู่หลายชนิด โดยเฉพาะต้นไส้ปลาไหล *Barclaya longifolia* Wall (1827) เป็นชนิดที่ต้องการของตลาดต่างประเทศมากกว่า 20 ประเทศ เช่น ประเทศฮังการี เยอรมนี และสหรัฐอเมริกา เป็นต้น ซึ่งจากข้อมูลของกรมวิชาการเกษตร พบว่าใน พ.ศ. 2561 ประเทศไทยมีมูลค่าการส่งออกพรรณไม้น้ำชนิด Barclaya อยู่ในอันดับ 32 ของพรรณไม้น้ำที่ส่งออกทั้งหมด (เฉพาะที่มีใบรับรองสุขอนามัยพืช) แต่มีมูลค่าการส่งออกของไส้ปลาไหลยังน้อยกว่า 1 แสนบาท เนื่องจากส่วนใหญ่ใช้ต้นพันธุ์ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งธรรมชาติซึ่งมีน้อยมาก เพราะไส้ปลาไหลเป็นพรรณไม้น้ำหายากที่ถูกขึ้นบัญชีเป็นพืชใกล้สูญพันธุ์ของโลก (IUCN Red List) ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2011 (Bignoli, 2011) มีสาเหตุมาจากการถูกบุกรุกเก็บรวบรวมต้นพันธุ์มากเกินกำลังการผลิตของธรรมชาติ แหล่งที่อยู่อาศัยของไส้ปลาไหลถูกทำลายโดยการขุดลอกแหล่งน้ำและเปลี่ยนพื้นที่เป็นที่ปลูกไม้ผลแทน ส่งผลให้ต้นไส้ปลาไหลลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว จนแทบไม่พบไส้ปลาไหลในธรรมชาติอีก นอกจากนี้การนำต้นไส้ปลาไหลมาขยายพันธุ์นอกถิ่นที่อยู่อาศัยนั้นยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร การผลิตต้นไส้ปลาไหลโดยการเพาะเลี้ยงเชิงการค้าจึงไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด

ระบบไบโอรีแอคเตอร์ (temporary immersion bioreactor: TIB) เป็นระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวที่มีการทำงานแบบอัตโนมัติ (Berthouly and Etienne, 2005) ได้รับการพัฒนาขึ้นมาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยมีระบบการแลกเปลี่ยนอากาศที่ดี ลดการขาดออกซิเจนในพืช ลดการสะสมคาร์บอนไดออกไซด์และเอธิลีน สามารถเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ได้มาก เพราะเนื้อเยื่อพืชสามารถพัฒนาเป็นยอด เป็นหัวขนาดเล็ก หรือเป็นต้นอ่อนจากเซลล์ร่างกาย (somatic embryogenesis) ได้มากกว่าการเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารเหลวที่ใช้ปกติ (Etienne and Berthouly, 2002) ในเวลาที่เท่ากัน TIB ช่วยลดขั้นตอนและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น การตัดเนื้อเยื่อ การเตรียมอาหาร การเปลี่ยนถ่ายอาหาร การเตรียมภาชนะและอุปกรณ์ การล้างทำความสะอาด (Alvard *et al*., 1993) ทำให้การใช้แรงงานลดลง อีกทั้งยังลดพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้ลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออีกด้วย ดังนั้นปัจจุบันมีการนำ TIB มาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำหลายชนิด เช่น อนูเบียส *Anubias nana* (Saiphattana, 2010) และอเมซอน *Echinodorus* sp. (Muensumran, 2012) เป็นต้น

ดังนั้นการนำ TIB เข้ามาใช้ในการเพาะขยายพันธุ์ไส้ปลาไหล น่าจะช่วยในการเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ได้มากในระยะเวลาที่สั้นกว่าระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบดั้งเดิม และทำให้พรรณไม้น้ำเจริญเติบโตได้เร็วกว่า ทั้งยังช่วยลดต้นทุนการผลิต เพื่อนำไปสู่การพัฒนาการผลิตไส้ปลาไหลในเชิงพาณิชย์ให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ตลอดจนลดการเก็บรวบรวมจากแหล่งธรรมชาติ ทำให้ไส้ปลาไหลเป็นทรัพยากรประมงที่มีคุณค่าของไทยตลอดไป

อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมพรรณไม้น้ำที่ใช้ในการทดลอง

นำชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มต้นของไส้ปลาไหล *Barclaya longifolia* Wall (1827) ส่วนหัวย่อย (bulblets) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (Wangwibulkit and Kasam, 2006) ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 8 ออนซ์ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิห้อง 25±2 องศาเซลเซียส ได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ ย้ายเลี้ยงทุก 60 วัน เพื่อเพิ่มปริมาณหัวย่อยไส้ปลาไหลให้เพียงพอ ในการใช้เป็นชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการทดลองต่อไป

การเตรียมระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว และอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ

ในการทดลองนี้ใช้อาหารเหลวสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ในระบบอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบดั้งเดิม และระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวแบบขวดแฝด โดยอาหารกับเนื้อเยื่อไส้ปลาไหลแยกกันออกเป็น 2 ส่วน แต่ละส่วนประกอบด้วยภาชนะขนาด 200 มิลลิลิตร ที่มีท่อซิลิโคนเชื่อมอยู่เพื่อให้มีการดันอาหารไป-กลับ ด้วยแรงลมจากปั๊มลม พร้อมชุดกรองอากาศขนาด 0.2 ไมครอน เติมอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในภาชนะใส่อาหาร แล้วบรรจุชุดการเลี้ยงแบบขวดแฝดในถุงพลาสติกทนร้อนเพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นอกจากนี้ยังประกอบด้วยเครื่องอัดอากาศ (air pump) หลอดยูวี และเครื่องตั้งเวลา (timer) สำหรับระบบ (Figure 1)

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) ในระบบ TIB ใช้ความถี่ในการให้อาหาร 3 ระดับ คือ 3, 6 และ 12 ครั้งต่อวัน ระยะเวลาที่ให้อาหาร 5 นาทีต่อครั้ง แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีจำนวนเนื้อเยื่อเริ่มต้น 6 ชิ้นต่อปริมาณอาหาร 100 มิลลิลิตร การกำหนดความถี่ในการให้อาหารนั้น ดัดแปลงมาจากวิธีของ Saiphattana (2010) และ Muensumran (2012) ที่เป็นการศึกษาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพรรณไม้น้ำในระบบไบโอรีแอคเตอร์ ส่วนชุดควบคุมทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไส้ปลาไหล 6 ชิ้น ในระบบอาหารเหลวปกติ ปริมาณอาหาร 100 มิลลิลิตร ในภาชนะขนาด 200 มิลลิลิตร

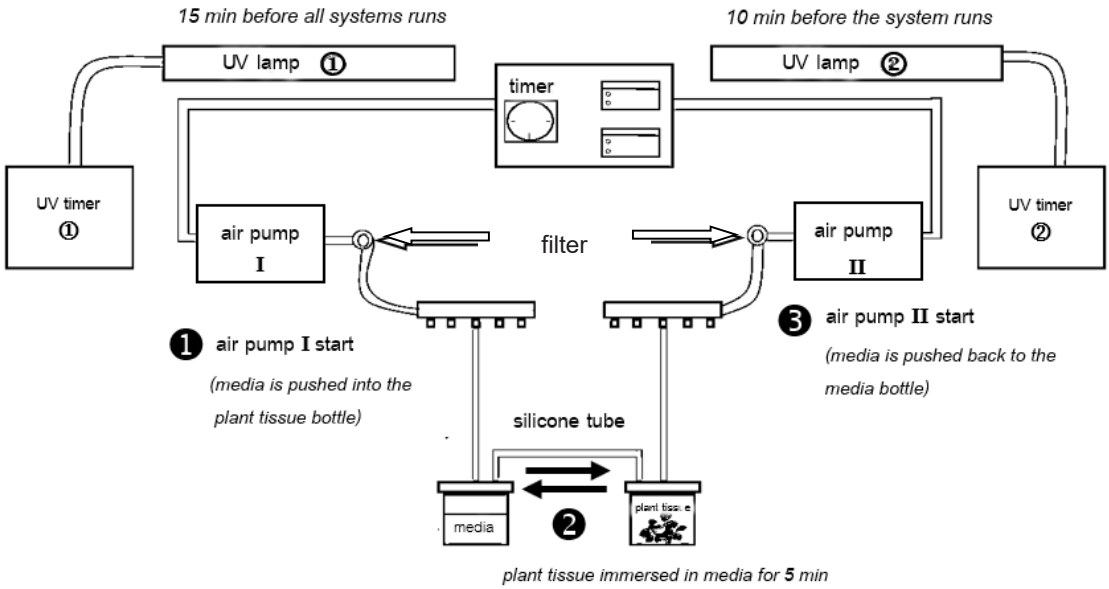

Figure 1 Temporary immersion bioreactor system (TIB)

สภาวะการเพาะเลี้ยง

ชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไส้ปลาไหลทั้งระบบ TIB และระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบดั้งเดิม เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ โดยได้รับแสง 12 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 12 ชั่วโมง ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกจำนวนหัวย่อย/ชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของทรงพุ่ม/ชิ้นเนื้อเยื่อ น้ำหนัก/ชิ้นเนื้อเยื่อ และคำนวณดัชนีการเจริญเติบโต (Growth index, GI) ในทุกชุดการทดลอง พร้อมกับบันทึกภาพเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่เวลา 6 สัปดาห์ แล้วนำข้อมูลทั้งหมดไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS version 14.0 for windows

$$\text{Growth index (GI)} = \frac{\text{Final wet weight-Initial wet weight}}{\text{Initial wet weight}}$$

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไส้ปลาไหลในระบบ TIB ที่มีความถี่ในการให้อาหารต่าง ๆ กัน โดยมีชุดควบคุมเป็นระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบดั้งเดิม พบว่าชุดควบคุมมีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น (0.99±0.03 กรัม) ขนาดทรงพุ่ม (2.76±0.18 เซนติเมตร) และดัชนีการเจริญเติบโต (5.82±0.20) สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (Table 1) เนื่องมาจากการเจริญเติบโตของไส้ปลาไหลในชุดควบคุมมีสภาวะการเลี้ยงภายในขวดคงที่ ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อไม่ได้รับผลกระทบจากแรงดันลมในระบบ TIB ทำให้เนื้อเยื่อมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องจนเป็นต้นที่สมบูรณ์ ทั้งขนาดหัวย่อย ขนาดใบ จึงส่งผลต่อขนาดทรงพุ่ม และน้ำหนักที่เพิ่มมากขึ้นกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ (Figure 2) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของเซลล์พืชในระยะแรกนั้น ต้องพิจารณาการเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้อเยื่อเป็นลำดับแรกก่อน ดังนั้นเนื้อเยื่อไส้ปลาไหลของชุดควบคุมยังมีจำนวนเซลล์น้อยกว่าไส้ปลาไหลที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIB โดยระบบ TIB ที่ให้อาหาร 6 ครั้งต่อวัน เป็นความถี่ที่เหมาะสมที่สุด สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อไส้ปลาไหลเกิดหัวย่อยเฉลี่ยสูงสุด 13.00±0.15 หัว/ชิ้นเนื้อเยื่อ (Figure 3) และจำนวนใบเฉลี่ย 34.00±2.29 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ (Figure 4c) มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Table 1)

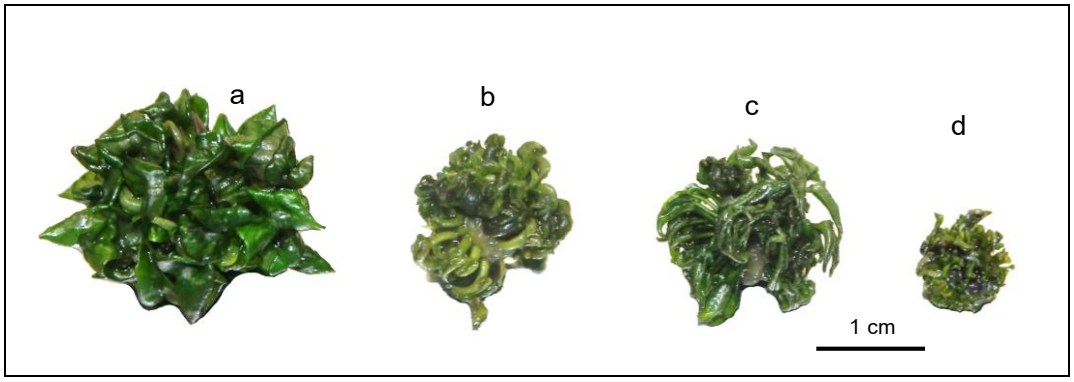

Figure 2 Shrub diameter of *Barclaya longifolia* in (a) control in traditional systems (b) temporary immersion bioreactor (TIB) 3 times a day (c) TIB 6 times a day and (d) TIB 12 times a day

สำหรับการชักนำให้เกิดหัวย่อยในชุดควบคุมพบว่ามีจำนวนหัวย่อยเกิดขึ้นเฉลี่ยเพียง 7.33±0.17 หัว/ชิ้นเนื้อเยื่อ ซึ่งจำนวนหัวย่อยเกิดขึ้นน้อยกว่าเนื้อเยื่อไส้ปลาไหลที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIB ที่ให้อาหาร 6 ครั้งต่อวัน โดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนหัวย่อยคิดเป็น 77.35 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และหัวย่อยเหล่านี้สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ต่อไป ส่วนชุดการทดลองที่ให้อาหาร 12 ครั้งต่อวัน ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่ได้รับอาหารจำนวนครั้งมากที่สุด พบว่าความถี่และแรงดันในการให้อาหารแต่ละครั้งทำให้เนื้อเยื่อของไส้ปลาไหลบางส่วนบอบช้ำและได้รับความเสียหาย เนื้อเยื่อบางชิ้นส่วนไม่สามารถพัฒนาเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ได้ (Figure 4d) การได้รับอาหารในปริมาณที่มากเกินไปถึง 12 ครั้งต่อวัน ส่งผลให้อัตราการเกิดหัวย่อยลดลง สอดคล้องกับรายงานของ Zhao *et al.* (2009) ที่รายงานว่าปัจจัยหนึ่งที่สำคัญและส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชใน TIB นั้น คือความถี่ในการให้อาหาร ซึ่งพืชแต่ละชนิดมีความต้องการปริมาณอาหารไม่

เท่ากัน หากพืชชนิดนั้น ๆ ที่เพาะเลี้ยงใน TIB ได้รับปริมาณอาหารมากเกินไป อาจทำให้อัตราการเกิดต้นลดลงได้

อย่างไรก็ตามผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าระบบ TIB สามารถชักนำและกระตุ้นให้เนื้อเยื่อไส้ปลาไหลให้พัฒนาไปเป็นหัวย่อยได้มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยความถี่ในการให้อาหาร 6 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 5 นาที ได้ผลดีที่สุด สามารถชักนำให้เกิดหัวย่อยได้ 13.0 หัว/ชิ้นเนื้อเยื่อ แตกต่างจากการทดลองของ Saiphattana (2010) ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำอนูเบียส *Anubias nana* ในระบบ TIB ที่มีการให้อาหาร 2 และ 4 ครั้งต่อวันครั้งละ 5 นาที พบว่าการให้อาหาร 4 ครั้งต่อวัน ให้ผลดีที่สุด มีจำนวนต้นต่อชิ้นเนื้อเยื่อ 8.3 ต้น ส่วนการทดลองของ Muensumran (2012) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออเมซอน *Echinodorus* sp. ในระบบ TIB ที่มีการให้อาหาร 2 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 5 นาที เปรียบเทียบกับระบบการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB มีจำนวนต้นต่อกอมากที่สุด 6.3 ต้น จะเห็นได้ว่าอนูเบียสและอเมซอนเป็นพรรณไม้น้ำชายน้ำ (marginal plants) ที่มักจะขึ้นตามชายน้ำ ริมตลิ่ง หรือหนองน้ำที่ท่วมขังตื้น ๆ (Sripen, 1987) ซึ่งแตกต่างจากต้นไส้ปลาไหลที่เป็นพรรณไม้น้ำโผล่เหนือน้ำ (emerged plants) โดยมีรากและลำต้นเจริญอยู่พื้นดินใต้น้ำ ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไส้ปลาไหลในระบบ TIB โดยใช้ความถี่ในการให้อาหารมากถึง 6 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 5 นาที จึงให้ผลดีกว่า เนื่องจากเนื้อเยื่อได้รับอาหารใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติของต้นไส้ปลาไหล ที่รากและลำต้นอยู่ใต้น้ำ ซึ่งสามารถดูดซึมอาหารได้ตลอดเวลา

Table 1 Effect of feeding frequency per day on growth of *Barclaya longifolia* in temporary immersion bioreactor compared to control at 6 weeks

Feeding frequency per day	Bulblets per explant	Leaves per explant	Shrub diameter per explant (cm)	Wet weight per explant (g)	Growth index
control	7.33±0.17^{c}	28.11±1.73^{a}	2.76±0.18^{a}	0.99±0.03^{a}	5.82±0.20^{a}
3	9.93±0.69^{b}	20.80±1.68^{b}	1.09±0.14^{b}	0.30±0.02^{b}	1.75±0.10^{b}
6	13.00±0.15^{a}	34.00±2.29^{a}	1.39±0.14^{b}	0.32±0.03^{b}	1.90±0.16^{b}
12	1.13±0.57^{d}	5.67±2.83^{c}	0.47±0.24^{c}	0.06±0.03^{c}	0.33±0.17^{c}

Different letters in column are different significantly ($P<0.05$).

Figure 3 Bulblets of *Barclaya longifolia* from TIB feeding 6 times daily for 6 weeks.

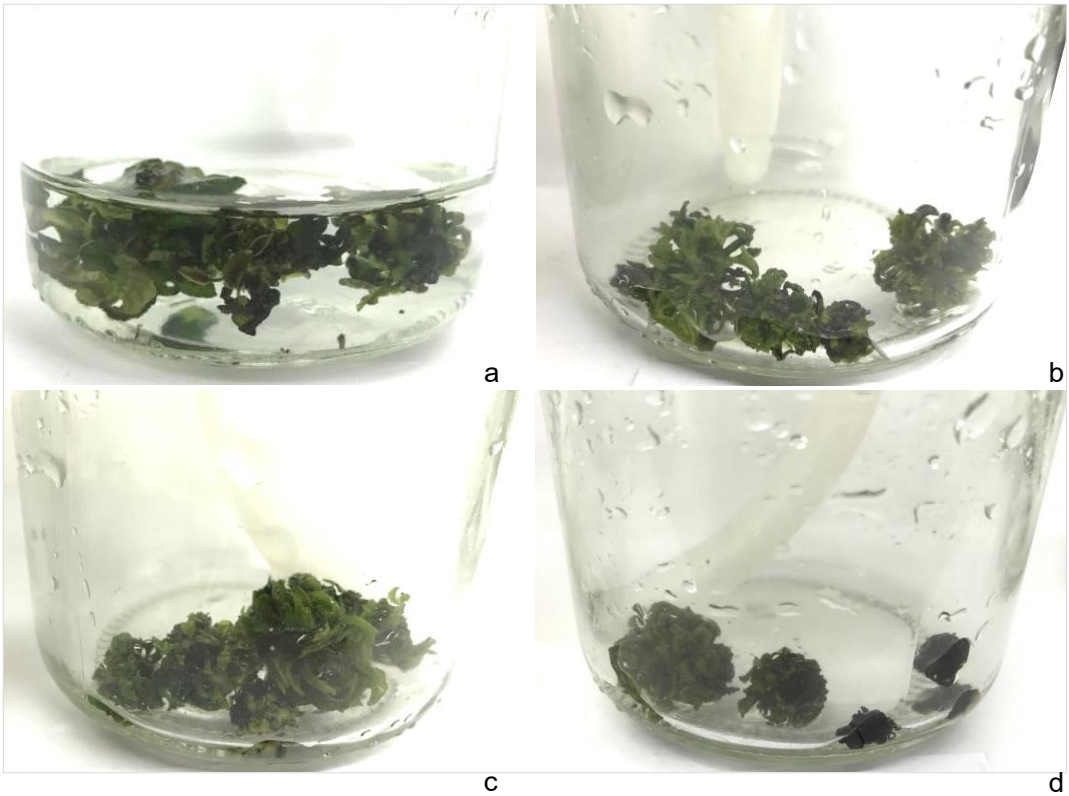

Figure 4 Tissue culture of *Barclaya longifolia* in (a) control in traditional systems (b) temporary immersion bioreactor (TIB) 3 times a day (c) TIB 6 times a day and (d) TIB 12 times a day

นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดลองของ Te-chato *et al*. (2017) ที่ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระจูด *Lepironia articulate* ด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบเติมอากาศ (air bubble bioreactor) โดยการถ่ายอากาศเข้าไปในขวดเพาะเลี้ยงที่มีอาหารและเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงรวมกัน เป็นเวลา 10 นาที ใน 3 ช่วงเวลา คือ 4, 8 และ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าทุก 4 ชั่วโมง ที่มีการเติมอากาศ หรือเป็นการเติมอากาศ 6 ครั้งต่อวัน

ให้ผลการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 18.20 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ และความสูงของยอดเฉลี่ย 10.28 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากรูปแบบการเพาะเลี้ยงไส้ปลาไหลในการทดลองนี้ เนื่องจากระบบการเพาะเลี้ยงไส้ปลาไหลเป็นระบบที่อาหารและเนื้อเยื่อแยกภาชนะกัน (fed-batch) ส่วนกระจูดเพาะเลี้ยงในระบบที่อาหารกับเนื้อเยื่ออยู่ในภาชนะเดียวกัน (batch) ดังนั้นรูปแบบของการใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์จะส่งผลต่อผลผลิตพืชที่แตกต่างกันออกไป (Sajc *et al*., 2000; Zobayeda *et al*., 2004) ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์ให้ประสบความสำเร็จนั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับรูปแบบหรือระบบการเลี้ยงแล้ว ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพรรณไม้น้ำในระบบ เช่น ความถี่ในการให้อาหาร พืชแต่ละชนิดมีความต้องการปริมาณอาหารไม่เท่ากัน ความถี่ในการให้อาหารที่เพียงพอและเหมาะสมจะทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อเจริญพัฒนาได้ดี แต่หากพืชที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIB ได้รับความถี่ในการให้อาหารบ่อยทำให้ได้รับปริมาณอาหารมากเกินไป อาจทำให้อัตราการเกิดต้นลดลงได้ (Zhao *et al*., 2009) และปริมาตรในการให้อากาศที่เหมาะสม มีความจำเป็นในพืชแต่ละชนิด ต้องมีการปรับระบบการให้อากาศ และแรงดันอากาศในการเลี้ยงอย่างเหมาะสม จากรายงานของ Sajc *et al*. (2000) พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวนั้นหากขาดอากาศจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นพืชขนาดเล็ก นอกจากนี้ความหนาแน่นของต้นพันธุ์เริ่มต้นมีผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาต้นพืชในระบบ TIB เช่นกัน (Thanh *et al*., 2014)

สรุปผลการศึกษา

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำไส้ปลาไหลใน TIB ที่มีความถี่ในการให้อาหาร 6 ครั้งต่อวัน เป็นความถี่ในการให้อาหารที่เหมาะสมที่สุด สามารถชักนำให้เกิดหัวย่อยเฉลี่ยสูงสุด (13.00±0.15 หัว/ชิ้นเนื้อเยื่อ) และจำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด (34.00±2.29 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ) นอกจากนี้การนำ TIB มาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำนั้น สามารถช่วยลดต้นทุนการผลิต อีกทั้งเพิ่มความรวดเร็วและลดขั้นตอนในการเพาะขยายพันธุ์ จึงเป็นเทคนิคทางเลือกที่ดีในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำไทยชนิดอื่น ๆ เพื่อการอนุรักษ์ต่อไป อย่างไรก็ดี TIB มีความเสี่ยงในการเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้ง่าย หากจัดการระบบการเลี้ยงไม่ดีพอ นอกจากนี้พืชแต่ละชนิดมีความต้องการปริมาณอาหารไม่เท่ากัน จึงจำเป็นต้องศึกษาลักษณะของพืชแต่ละชนิดก่อนการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะแตกต่างกับระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบปกติ

เอกสารอ้างอิง

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

Berthouly, M. and Etienne, H. 2005. Temporary Immersion System: A new concept. pp. 165-196. cited in Hvoslef–Eide, A.K. and Preil, W. (eds.) Liquid culture system for in vitro plant propagation. Dordrecht: Springer.

Etienne, H. and Berthouly, M. 2002. Temporary immersion system in plant micropropagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture 69(3): 215-231.

Juffe Bignoli, D. 2011. *Barclaya longifolia*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T194024A8877322. [Online] Available from http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-1.RLTS.T194024A8877322.en [2018, August 13].

Muensumran, W. 2012. Micropropagation of *Echinodorus* sp. by Temporary Immersion Bioreactor. Master of Science in Biotechnology, Maejo University, Changmai. 76 p. [in-Thai]

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.

Saiphattana, P. 2010. Micropropagation of *Anubias nana* Engler in Temporary Immersion Bioreactor System. Master of Science in Fisheries Technology, Maejo University. Changmai. 92 p. [in-Thai]

Siripen, S. 1987. Aquatic Plant. Department of Botany, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok. 233 p.

Sajc, L., Grubisic, D. and Novakovic, G.V. 2000. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. Biochemical Engineering Journal 4: 89–99.

Te-chato, S., Yuso, A. And Domyoas, P. 2017. Proliferation of *Lepironia articulate* from culturing shoots by air bubble bioreactor. Princess of Naradhiwas University Journal 9(2): 83-88. [in Thai]

Thanh, N.T., Murthy, H.N. and Paek, K.Y. 2014. Optimization of ginseng cell culture in airlift bioreactors and developing the large-scale production system. Industrial Crops and Product 60: 343-348.

Wangwibulkit, M. and Kasam, W. 2006. Micropropagation of *Barclaya longifolia* (Wallich, 1827). *In* Proceeding the Conference on Fisheries Development Center, July 25-27 2006, Department of Fisheries, Bangkok. pp. 417-428. [in Thai]

Zhao, Y., Sun, W., Wang, Y., Saxena, P.K. and Liu, C.Z. 2009. Improved mass multiplication of *Rhodiola crenulata* shoots using temporary immersion bioreactor with forced ventilation. Applied Biochemistry Biotechnology 166: 1480-1490.

Zobayeda, S.M.A., Murcha, S.J., Rupasingheb, H.P.V. and Saxena, P.K. 2004. In vitro production and chemical characterization of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem'). Plant Science 166: 333–340.