

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวต่อการเพิ่มปริมาณต้นเอื้องคำในสภาพปลอดเชื้อ[†]

ปวีณา ภูมิสุธาผล* และ ทิพย์สุตา ตั้งตระกูล

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอละแม จังหวัดเชียงใหม่ 86170

*อีเมล: paweena.pumisutapon@gmail.com

บทคัดย่อ

เอื้องคำ (*Dendrobium chrysotoxum*) เป็นกล้วยไม้ที่มีความสวยงามและมีคุณประโยชน์ทางด้านสมุนไพร ซึ่งปัจจุบันมีความต้องการเพิ่มขึ้นเพื่อการแปรรูป แต่ปริมาณเอื้องคำที่ได้จากการเจริญตามสภาพธรรมชาติและการเพาะปลูกยังไม่เพียงพอ และยังมีปัญหาการลักลอบเก็บจากป่า งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการขยายพันธุ์เอื้องคำในสภาพปลอดเชื้อในระยะเพิ่มปริมาณต้น โดยในการทดสอบผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้นำชิ้นส่วนยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเติม 1-naphthaleneacetic acid (NAA), 6-benzyladenine (BA), kinetin (KIN) และ thidiazuron (TDZ) เพียงชนิดเดียว หรือเติม NAA ร่วมกับ BA, KIN หรือ TDZ ตามความเข้มข้นที่กำหนด หลังเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ ผลปรากฏว่า การเติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการเพิ่มปริมาณต้น โดยทำให้มีจำนวนต้นและจำนวนใบมากที่สุด คือ 4.53 ต้นต่อชิ้นส่วน และ 3.40 ใบต่อต้น ตามลำดับ และยังทำให้ได้ต้นที่ค่อนข้างสูง คือ 4.14 เซนติเมตร นอกจากนี้ในการทดสอบผลของระบบเพาะเลี้ยงได้นำชิ้นส่วนยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งหรือในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว (temporary immersion bioreactor: TIB) ที่ให้อาหารเหลวทุก 6 และ 12 ชั่วโมง ครั้งละ 5 และ 10 นาที โดยใช้อาหารสูตร ½ MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ ผลปรากฏว่า ชิ้นส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIB ทุกกรรมวิธีสามารถเพิ่มปริมาณต้นและมีการเจริญเติบโตในด้านต่าง ๆ สูงกว่าชิ้นส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง โดยการให้อาหารเหลวทุก 6 ชั่วโมง ครั้งละ 10 นาที เป็นสภาวะการให้อาหารที่เหมาะสมในระบบ TIB ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณต้นและทำให้มีความสูงต้น จำนวนใบ จำนวนราก และความยาวรากมากที่สุด คือ 6.67 ต้นต่อชิ้นส่วน, 5.10 เซนติเมตร, 4.20 ใบต่อต้น, 3.60 รากต่อต้น และ 0.96 เซนติเมตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: เอื้องคำ, การเพิ่มปริมาณต้น, ออกซิน, ไซโตไคนิน, ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว

Abstract

Dendrobium chrysotoxum is a beautiful orchid with medicinal benefits. While there is an increasing demand for industrial processing, the number of orchids obtained from natural sources and cultivation is insufficient. Further, there have been issues of wild orchid smuggling from forests. This research aimed to study the factors related to the propagation of *D. chrysotoxum* under sterile conditions during the shoot multiplication stage. To investigate the influences of growth regulators, we cultured the shoot explants on the ½ MS semi-solid medium without the growth regulator, with the addition of the individual regulators, including 1-naphthaleneacetic acid (NAA), 6-benzyladenine (BA), kinetin (KIN), and thidiazuron (TDZ), or with NAA combined with BA, KIN, or TDZ at the specified concentrations. After 8 weeks of culturing, we found the addition of 0.1 mg/L NAA and 1 mg/L BA best suited for shoot multiplication. This treatment resulted in the highest number of shoots (4.53 shoots per explant) and leaves (3.40 leaves per explant), and the resultant shoots were relatively tall (4.14 centimeters on average). To explore the effects of the culturing system, we cultured the shoot explants either on the semi-solid medium or in a temporary immersion bioreactor (TIB) with liquid feeding every 6 and 12 h, for 5 and 10 min each time, using ½ MS medium with 0.1 mg/L NAA and 1 mg/L BA supplementation. After 8 weeks of culturing, we found all TIB-dependent growth conditions to perform better than the semi-solid medium-dependent counterparts. Specifically, the 10-min liquid feeding for every 6 h was the optimum feeding condition for the TIB system. There, we were able to achieve the maximum number of new shoots (6.67 shoots/explant) with the greatest heights (5.10

[†]การประชุมวิชาการและการนำเสนอผลงาน ชมรมคณะปฏิบัติการงานวิชาการ อพ.สธ. ครั้งที่ 10 (ระหว่างวันที่ 20 - 22 กันยายน 2565 ณ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์)

cm on average), new leaves (4.20 leaves per explant), and new roots (3.60 roots per explant) with the greatest root length (0.96 cm on average).

Keywords: *Dendrobium chrysotoxum*, Shoot multiplication, Auxin, Cytokinin, Temporary immersion bioreactor system

บทนำ

กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทยในด้านไม้ประดับ นอกจากนี้กล้วยไม้หลายชนิดยังมีความสำคัญในด้านสมุนไพรซึ่งสร้างคุณประโยชน์ทางการแพทย์ได้ กล้วยไม้ที่สนใจศึกษา คือ เอื้องคำ (*D. chrysotoxum*) หรือ ‘Golden orchid’ มีดอกช่อสีเหลืองสว่างสวยงาม ประกอบด้วยดอกเป็นจำนวนมากกว่า 20 ดอกขึ้นไป กลิ่นของดอกเอื้องคำยังมีความหอมหวานเหมือนน้ำผึ้งปนกลิ่นฉิวส้ม (มูลนิธิกล้วยไม้ไทย, 2559) ในด้านสมุนไพรเอื้องคำมีสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งผิวหนัง มะเร็งตับ และมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Wang et al., 2016) ด้านอนุเภสัชศาสตร์ ด้านเบาหวาน (Zhao et al., 2007) และด้านการอักเสบ (Gong et al., 2014) ปัจจุบันปริมาณกล้วยไม้เอื้องคำในสภาพธรรมชาติของประเทศไทยกำลังลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการบุกรุกป่าเพื่อทำพื้นที่การเกษตร ทำให้สภาพป่าเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ความต้องการพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีการเก็บพืชสมุนไพรจากป่าเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงส่งผลกระทบต่อการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชในแหล่งธรรมชาติ

เป็นที่ทราบกันดีว่าเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพิ่มการผลิตพันธุ์พืชให้เพียงพอต่อความต้องการ ซึ่งช่วยลดปัญหาการลักลอบนำพืชออกมาจากแหล่งธรรมชาติ ดังนั้นจึงเป็นแนวทางที่สำคัญอีกแนวทางหนึ่งสำหรับการขยายพันธุ์เอื้องคำให้ได้ปริมาณมากอย่างรวดเร็ว โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากต่อการขยายพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ มีรายงานว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้บ่อยที่สุดในการขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) คือ ไซโตไคนิน BA และออกซิน NAA ซึ่งมีทั้งการใช้เดี่ยวหรือใช้ร่วมกัน (Da Silva et al., 2015) นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยระบบ TIB ซึ่งสามารถเพิ่มการผลิตพันธุ์และเร่งการเจริญเติบโตของพืชได้เหนือกว่าการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิม (อาหารกึ่งแข็ง) โดยมีการศึกษาประสบความสำเร็จในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด แต่มีรายงานการศึกษาค่อนข้างน้อยในกล้วยไม้สกุลหวาย เช่น การเพาะเลี้ยงเอื้องคำก๊ว (*D. nobile*) ในระบบ TIB เพื่อขยายพันธุ์ให้ได้ต้นจำนวนมาก (Zhang et al., 2019) นอกจากนี้ยังไม่พบรายงานวิจัยเกี่ยวกับการขยายพันธุ์เอื้องคำด้วยระบบ TIB

งานวิจัยมุ่งเน้นศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์เอื้องคำในระยะเวลาเพิ่มปริมาณต้น โดยทดสอบผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและกลุ่มไซโตไคนิน และเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งและในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว ผลการศึกษาที่ได้สามารถใช้เป็นแนวทางการผลิตพันธุ์กล้วยไม้เอื้องคำในปริมาณมากระดับอุตสาหกรรม เพื่อส่งเสริมการปลูกสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ต่าง ๆ และลดการลักลอบเก็บจากแหล่งธรรมชาติต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณต้นเอื้องคำ

ทดสอบผลของการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยง โดยใช้กลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA (0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) และกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA (1 มิลลิกรัมต่อลิตร), KIN (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ TDZ (0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) มีกรรมวิธีต่าง ๆ ได้แก่ ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (กลุ่มควบคุม) เติม NAA, BA, KIN และ TDZ เพียงชนิดเดียว และเติม NAA ร่วมกับ BA, KIN หรือ TDZ รวมทั้งสิ้น 8 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ข้ำ ข้ำละ 10 ชิ้นส่วนยอด นำต้นเอื้องคำเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาตัดแต่งให้ได้ชิ้นส่วนยอดความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร 1/2 MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ ตามแผนการทดลอง

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของระบบเพาะเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณต้นเอื้องคำ

เปรียบเทียบผลของระบบเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน วางแผนการทดลองแบบ CRD มีกรรมวิธีต่าง ๆ ได้แก่ อาหารกึ่งแข็ง (กลุ่มควบคุม) ระบบ TIB แบบขวดแบนที่ให้อาหารเหลวทุก 6 และ 12 ชั่วโมง ครั้งละ 5 และ 10 นาที รวมทั้งสิ้น 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ข้ำ ข้ำละ 10 ชิ้นส่วนยอด นำต้นเอื้องคำเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาตัดแต่งให้ได้ชิ้นส่วนยอดความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 โดยเพาะเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารเหลวในระบบ TIB ตามแผนการทดลอง

ในแต่ละการทดลองใช้ปริมาตรอาหาร 300 มิลลิตรต่อขวดเพาะเลี้ยงขนาด 700 มิลลิตร เก็บพืชที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงแอลอีดี (LED) สีขาว ความเข้มแสง 40 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นระยะเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนยอดต่อชิ้นส่วน ความสูงต้น จำนวนใบต่อต้น จำนวนรากต่อต้น และความยาวราก

นำข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

ผลและอภิปรายผล

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพิ่มปริมาณต้นเอื้องคำ

จากการนำชิ้นส่วนยอดเอื้องคำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมหรือเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ แสดงผลดังตารางที่ 1 และภาพที่ 1 โดยในด้านการเพิ่มปริมาณต้น พบว่า การเติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณต้นได้มากที่สุด คือ 4.53 ต้นต่อชิ้นส่วน (ภาพที่ 1(F)) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่นๆ ส่วนการไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณต้นได้น้อยที่สุดเพียง 1.60 ต้นต่อชิ้นส่วน (ภาพที่ 1(A)) ในด้านความสูงต้น พบว่าการไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทำให้มีความสูงต้นมากที่สุด คือ 4.21 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติจากการเติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีความสูงต้นใกล้เคียงกัน คือ 4.14 เซนติเมตร ในด้านจำนวนใบ พบว่า การเติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังทำให้มีจำนวนใบสูงที่สุดอีกด้วย คือ 3.40 ใบต่อต้น ในขณะที่การไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทำให้มีจำนวนใบน้อยที่สุด คือ 2.67 ใบต่อต้น ในด้านจำนวนรากและความยาวราก พบว่า การเติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้เกิดรากเป็นจำนวนมากที่สุด คือ 5.57 รากต่อต้น (ภาพที่ 1(E)) และการไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทำให้มีความยาวรากมากที่สุด คือ 2.89 เซนติเมตร (ภาพที่ 1(A)) ส่วนการเติม TDZ 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มีการเกิดรากเป็นจำนวนน้อยที่สุดและมีความยาวรากสั้นที่สุดเพียง 0.27 รากต่อต้น และ 0.17 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 1(D))

นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่า การเติมไซโตไคนิน BA, KIN หรือ TDZ ร่วมกับออกซิน NAA กระตุ้นการเพิ่มปริมาณต้น ความสูงต้น และจำนวนใบได้ดียิ่งขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมไซโตไคนินชนิดเดียวกันเพียงอย่างเดียวในอาหารเพาะเลี้ยง โดยการเติม BA ร่วมกับ NAA จะให้ผลดีกว่าต่อการเพิ่มปริมาณและการเจริญเติบโตของต้นเอื้องคำเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมไซโตไคนินชนิดอื่น ๆ ร่วมกับ NAA ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยในกล้วยไม้สกุลหวายหลายชนิดที่รายงานถึงความเหมาะสมของการใช้ BA ร่วมกับ NAA ในการเพิ่มปริมาณต้น เช่น เอื้องแวมยูรา (*D. fimbriatum*) (Huang et al., 2008), เอื้องสายม่านพระอินทร์ (*D. devonianum*) (Li et al., 2011) และ *D. officinale* (Song et al., 2013) เป็นต้น โดยทั่วไปในระยะเวลาการเพิ่มปริมาณต้นในสภาพปลอดเชื้อนิยมเติมไซโตไคนินเพื่อกระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชแตกยอดเพิ่มขึ้น โดยอาจไม่จำเป็นต้องเติมออกซินร่วมด้วย แต่ในการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การเติมออกซิน NAA ในระดับความเข้มข้นต่ำ (0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ช่วยกระตุ้นให้ชิ้นส่วนยอดเอื้องคำเกิดราก ซึ่งรากที่เกิดขึ้นอาจส่งผลดีโดยทำให้มีการดูดซึมสารอาหารได้ดียิ่งขึ้น จากผลการทดลองที่ได้เมื่อพิจารณาถึงผลต่อการเพิ่มปริมาณต้น สามารถกล่าวได้ว่า การเติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมที่สุดต่อการเพิ่มปริมาณต้นจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดเอื้องคำ ทั้งในด้านจำนวนต้นที่เพิ่มขึ้นและการเจริญเติบโตของต้นในด้านความสูงต้นและจำนวนใบ ดังนั้นจึงใช้อาหารที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการทดลองถัดไป

ตารางที่ 1 การเพิ่มปริมาณต้นและการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนยอดเอื้องคำเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต	จำนวนต้นต่อชิ้นส่วน	ความสูงต้น (เซนติเมตร)	จำนวนใบต่อต้น	จำนวนรากต่อต้น	ความยาวราก (เซนติเมตร)
ไม่เติม	1.60 ^e	4.21 ^a	2.67 ^b	4.21 ^{bc}	2.89 ^a
NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	2.27 ^{de}	3.46 ^{bc}	2.73 ^b	5.57 ^a	1.17 ^b
BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	3.60 ^b	3.87 ^{ab}	3.13 ^{ab}	2.20 ^e	0.58 ^{cde}
KIN 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร	2.27 ^{de}	2.78 ^d	2.73 ^b	3.40 ^{cd}	0.88 ^{bc}
TDZ 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร	2.47 ^d	3.27 ^c	2.93 ^{ab}	0.27 ^f	0.17 ^e
NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	4.53 ^a	4.14 ^a	3.40 ^a	3.07 ^{de}	0.75 ^{bcd}
NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร + KIN 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร	2.60 ^{cd}	3.21 ^c	2.87 ^b	4.79 ^{ab}	1.01 ^b
NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร + TDZ 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร	3.33 ^{bc}	3.75 ^{ab}	3.00 ^{ab}	0.40 ^f	0.44 ^{de}

หมายเหตุ: เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT อักษรที่เหมือนกัน หมายถึง ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 1 การเพิ่มปริมาณต้นของชิ้นส่วนยอดเอื้องคำเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (A), เติมน้ำ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (B), KIN 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (C), TDZ 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร (D), NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (E), NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (F), NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KIN 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (G) และ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.125 มิลลิกรัมต่อลิตร (D) หลังเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ (bar = 1 เซนติเมตร)

ผลของระบบเพาะเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณต้นเอื้องคำ

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดเอื้องคำด้วยอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งและในระบบ TIB ที่ให้อาหารเหลวในความถี่และระยะเวลาต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ แสดงผลดังตารางที่ 2 พบว่า การเพาะเลี้ยงในระบบ TIB สามารถเพิ่มปริมาณต้นและกระตุ้นการเจริญเติบโตในด้านต่าง ๆ ได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง โดยการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB ที่ให้อาหารเหลวทุก 6 ชั่วโมง ครั้งละ 10 นาที สามารถเพิ่มปริมาณต้นได้มากที่สุด คือ 6.67 ต้นต่อชิ้นส่วน และทำให้มีความสูงต้น จำนวนใบ จำนวนราก และความยาวรากมากที่สุด คือ 5.10 เซนติเมตร, 4.20 ใบต่อต้น, 3.60 รากต่อต้น และ 0.96 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งเพิ่มปริมาณต้นได้น้อยที่สุด คือ 4.47 ต้นต่อชิ้นส่วน และทำให้มีความสูงต้น จำนวนใบ จำนวนราก และความยาวรากน้อยที่สุด คือ 4.15 เซนติเมตร, 3.27 ใบต่อต้น, 3.00 รากต่อต้น และ 0.70 เซนติเมตร ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงในระบบ TIB สามารถกระตุ้นการเพิ่มปริมาณและการเจริญเติบโตของต้นเอื้องคำได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง สอดคล้องกับรายงานในพืชหลากหลายชนิด เช่น สตรอว์เบอร์รี (Camargo et al., 2019), กล้วย (Uma et al., 2021), คาร์เนชั่น (Ahmadian et al., 2017) และเอื้องคำกิว (*D. nobile*) (Zhang et al., 2019) เป็นต้น ซึ่งพบว่า การเพาะเลี้ยงในระบบ TIB ทำให้พืชมีอัตราการเพิ่มปริมาณและการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง สันนิษฐานว่า การเพาะเลี้ยงในระบบ TIB ทำให้มีการดูดซึมสารอาหารได้อย่างทั่วถึงในระหว่างที่ชิ้นส่วนพืชแช่อยู่ในอาหารเหลว จึงเร่งการเจริญเติบโตและการเพิ่มปริมาณได้ดียิ่งขึ้น ในขณะที่การเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งชิ้นส่วนพืชดูดซึมสารอาหารได้น้อยกว่า เนื่องจากสัมผัสกับอาหารเพียงบริเวณส่วนฐานเท่านั้น จึงมีการเจริญเติบโตและการเพิ่มปริมาณที่น้อยกว่า (Teisson and Alvard, 1995)

เมื่อเปรียบเทียบผลของการให้อาหารเหลวในระบบ TIB ด้วยความถี่และระยะเวลาที่แตกต่างกัน พบว่า การให้อาหารเหลวด้วยความถี่ที่เพิ่มขึ้นจากทุก 12 ชั่วโมง เป็นทุก 6 ชั่วโมง รวมทั้งการให้อาหารเหลวที่ความถี่เดียวกันด้วยระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นจากครั้งละ 5 นาที เป็นครั้งละ 10 นาที ทำให้มีแนวโน้มของการเพิ่มปริมาณต้นและการเจริญเติบโตของต้นเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นจึงทำให้การให้อาหารเหลวทุก 6 ชั่วโมง ครั้งละ 10 นาที มีความเหมาะสมที่สุดในการเพิ่มปริมาณต้นเอื้องคำ สันนิษฐานว่า การใช้สภาวะการให้อาหารเหลวที่เหมาะสมในระบบ TIB จะช่วยส่งเสริมการเพิ่มปริมาณและการเจริญเติบโตของต้นเอื้องคำได้ดียิ่งขึ้น

ตารางที่ 2 การเพิ่มปริมาณต้นและการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนยอดเอื้องคำเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งและในระบบ TIB ที่มีสภาวะการให้อาหารเหลวต่าง ๆ หลังเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์

ระบบเพาะเลี้ยง	จำนวนต้นต่อชิ้นส่วน	ความสูงต้น (เซนติเมตร)	จำนวนใบต่อต้น	จำนวนรากต่อต้น	ความยาวราก (เซนติเมตร)
อาหารกึ่งแข็ง	4.27 ^c	4.15 ^c	3.27 ^b	3.00 ^a	0.70 ^b
TIB ให้อาหารเหลวทุก 6 ชั่วโมงครั้งละ 5 นาที่	6.07 ^{ab}	4.82 ^{ab}	3.93 ^{ab}	3.40 ^a	0.90 ^{ab}
TIB ให้อาหารเหลวทุก 6 ชั่วโมงครั้งละ 10 นาที่	6.87 ^a	5.10 ^a	4.20 ^a	3.60 ^a	0.96 ^a
TIB ให้อาหารเหลวทุก 12 ชั่วโมงครั้งละ 5 นาที่	5.73 ^b	4.37 ^{bc}	3.67 ^{ab}	3.33 ^a	0.87 ^{ab}
TIB ให้อาหารเหลวทุก 12 ชั่วโมงครั้งละ 10 นาที่	5.93 ^b	4.59 ^{abc}	3.80 ^{ab}	3.53 ^a	0.90 ^{ab}

หมายเหตุ: เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT อักษรที่เหมือนกัน หมายถึง ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

สรุปผล

ในการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณต้นเอื้องคำในสภาพปลอดเชื้อ คือ การนำชิ้นส่วนยอดมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงในระบบ TIB ที่มีการให้อาหารเหลวทุก 6 ชั่วโมง ครั้งละ 5 นาที่

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเอื้องคำในระบบ TIB ในการนำไปใช้จริงควรพิจารณาถึงต้นทุนเครื่องมือและอุปกรณ์ระบบ TIB ซึ่งการลงทุนครั้งแรกจะสูงกว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบดั้งเดิม (อาหารกึ่งแข็ง) และเหมาะสมกับหน่วยงานเอกชนที่มีงบลงทุน นอกจากนี้มีประเด็นที่น่าสนใจศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต คือ การกระตุ้นให้เอื้องคำออกดอกอย่างสม่ำเสมอ เนื่องจากส่วนของดอกเอื้องคำเป็นผลผลิตนำไปใช้ประโยชน์ต่าง ๆ แต่ยังพบปัญหาการออกดอกไม่สม่ำเสมอหรือไม่ออกดอกเมื่อออกปลูก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สนับสนุนงบประมาณวิจัยในครั้งนี้

บรรณานุกรม

- มูลนิธิกล้วยไม้ไทย. (2559). *ชีวิตงามกล้วยไม้ไทย*. เชียงใหม่: โรงพิมพ์แสงศิลป์.
- Ahmadian, M., Babaei, A., Shokri, S., & Hessami, S. (2017). Micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in liquid medium by temporary immersion bioreactor in comparison with solid culture. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 309-315.
- Camargo, S. S., Rufato, L., Magro, M., & Souza, A. L. K. D. (2019). Temporary immersion biorreactors: Efficient technique for the propagation of the 'Pirincque' strawberry. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41(1), e-102.
- Da Silva, J. A. T., Cardoso, J. C., Dobránszki, J., & Zeng, S. (2015). Dendrobium micropropagation: A review. *Plant Cell Reports*, 34, 671-704.
- Gong, C. Y., Yu, Z. Y., Lu, B., Yang, L., Sheng, Y. C., Fan, Y. M., Ji, L. L., & Wang, Z. T. (2014). Ethanol extract of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl ameliorates diabetic retinopathy and its mechanism. *Vascular Pharmacology*, 62(3), 134-142.
- Huang, W. C., Yin, L. Q., Hu, Y. H., Wang, X. Q., Zhao, X. F., & Li, X. F. (2008). *In vitro* rapid propagation of *Dendrobium fimbriatum*. *Journal of Shanghai Jiaotong University*, 26, 584-587.
- Li, S. L., Bai, Y. B., Cao, Y., Li, Z. S., Geng, X. Y., Wang, Y. Q., & Wu, R. (2011). Study on rapid propagation of stem segments of *Dendrobium devonianum*. *Subtropical Plant Science*, 40, 50-52.

- Song, S., Xu, Y., Wang, B. Z., Liu, Y. D., Qin, H. Y., & Ma, W. H. (2013). Different media on the tissue culture of *dendrobium officinale*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 29(13), 133-139.
- Teisson, C. & Alvard, D. (1995). *A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: Temporary immersion* (pp. 105-110). In Terzi, M., Cella, R. & Falavigna, A. (Eds.). *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Uma, S., Karthic, R., Kalpana, S., Backiyarani, S., & Saraswathi, M. S. (2021). A novel temporary immersion bioreactor system for large scale multiplication of banana (Rasthali AAB-Silk). *Scientific Reports*, 11, 20371.
- Wang, H., Zhang, T., Sun, W., Wang, Z., Zuo, D., Zhou, Z., Li, S., Xu, J., Yin, F., Hua, Y., & Cai, Z. (2016). Erianin induces G2/M-phase arrest, apoptosis, and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo. *Cell Death & Disease*, 7, e2247.
- Zhang, B., Niu, Z., Li, C., Hou, Z., Xue, Q., Liu, W., & Ding, X. (2022). Improving large-scale biomass and total alkaloid production of *Dendrobium nobile* Lindl. using a temporary immersion bioreactor system and MeJA elicitation. *Plant Methods*, 18, 10.
- Zhang, B., Niu, Z., Zhou, A., Zhang, D., Xue, Q., Liu, W., Chen, J., Shen, J., & Ding, X. (2019). Micropropagation of *Dendrobium nobile* Lindl. plantlets by temporary immersion bioreactor. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 13(3), 395-400.
- Zhao, Y., Son, Y. O., Kim, S. S., Jang, Y. S., & Lee, J. C. (2007). Antioxidant and antihyperglycemic activity of polysaccharide isolated from *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40(5), 670-677.