ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว ต่อการเพิ่มปริมาณยอดและการชักนำให้ออกรากของนกคุ้มไฟในสภาพปลอดเชื้อ

Effects of Growth Regulators and Temporary Immersion Bioreactor System on Shoot Multiplication and Root Induction of *Anoectochilus burmanicus* Cultured *In Vitro*

อริสรา ติ๊บปะละวงศ์[1] และปวีณา ภูมิสุทธาผล[1*]

Arissara Tibpalawong[1] and Paweena Pumisutapon[1*]

Received: September 15, 2022
Revised: December 21, 2022
Accepted: December 21, 2022

Abstract: *Anoectochilus burmanicus* is the terrestrial orchid with uniquely beautiful leaves and has been used for medicinal purposes. Nowadays, more and more *A. burmanicus* plants are being taken out of the forest. Therefore, there is a high risk of extinction. In this research, an effective method for micropropagation of *A. burmanicus* was developed. For shoot multiplication, single node explants were cultured on semi-solid ½ MS medium supplemented with BAP or TDZ (0.25, 0.50 and 1.00 mg/L) for 12 weeks. It was showed that adding 0.50 mg/L TDZ resulting in the highest average number of shoots at 3.1 shoots per explants. In addition, shoot multiplication was compared in semi-solid medium and the twin-flasks temporary immersion bioreactor (TIB) by testing feeding every 6 and 12 h for 5 and 10 min each time. After 12 weeks of cultivation, it was found that the TIB system could increase number of shoots and shoot length more than semi-solid medium. By feeding liquid medium every 12 h for 5 min each time, this gave the highest average number of shoots and average shoot length at 4.8 shoots per explants and 4.73 cm, respectively. For *in vitro* rooting, shoot explants were cultured with ½ MS medium without auxin or with 0.25, 0.50 and 1.00 mg/L IAA, and grown on semi-solid medium or in TIB system for 12 weeks. Result shown that cultivation in TIB system led to more growth in various aspects than the semi-solid medium. Plants grown in TIB system with medium containing 1.00 mg/L IAA showed the highest number of roots, root length, shoot height, number of leaves, leaf area and shoot fresh weight at 3.1 roots per shoot, 5.70 cm, 5.58 cm, 2.9 leaves per shoot, 595.80 mm², 1384.78 mg and 99.89 mg, respectively. After that, *in vitro* rooted plants were transplanted and acclimatized in clear plastic cups filled with peat moss for 4 weeks. It was found that all treatments had high survival rates and were not statistically different, with an average of 80-100%.

Keywords: *Anoectochilus burmanicus*, in vitro propagation, auxin, cytokinin, temporary immersion bioreactor

---

[1] หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

[1] Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, 50290

*Corresponding author: paweena.pumisutapon@gmail.com

บทคัดย่อ: นกคุ้มไฟ (*Anoectochilus burmanicus*) เป็นกล้วยไม้ดินที่มีใบสวยงามโดดเด่นเป็นเอกลักษณ์ และมีการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านสมุนไพร ในปัจจุบันนกคุ้มไฟถูกเก็บออกมาจากป่าเป็นจำนวนมากขึ้น จึงมีโอกาสเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์สูง ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์นกคุ้มไฟในสภาพปลอดเชื้อ โดยในการเพิ่มปริมาณยอดได้นำชิ้นส่วนข้อเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½ MS ที่เติม BAP หรือ TDZ (0.25, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์ ผลปรากฏว่า การเติม TDZ ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด คือ 3.1 ยอดต่อชิ้นส่วน นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณยอดในอาหารกึ่งแข็งและไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว (temporary immersion bioreactor: TIB) แบบขวดแฝด โดยทดสอบการให้อาหารทุก 6 และ 12 ชั่วโมง ครั้งละ 5 และ 10 นาที เมื่อเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงในระบบ TIB สามารถเพิ่มจำนวนยอดและความยาวยอดได้มากกว่าอาหารกึ่งแข็ง โดยการให้อาหารเหลวทุก 12 ชั่วโมง ครั้งละ 5 นาที มีจำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด คือ 4.8 ยอดต่อชิ้นส่วน และ 4.73 เซนติเมตร ตามลำดับ ในการชักนำให้ยอดออกรากได้นำชิ้นส่วนยอดมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร ½ MS ที่ไม่เติมออกซิน หรือเติม IAA ความเข้มข้น 0.25, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งเปรียบเทียบกับระบบ TIB เมื่อเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงในระบบ TIB ทำให้มีการเจริญเติบโตด้านต่าง ๆ มากกว่าอาหารกึ่งแข็ง โดยการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB ด้วยอาหารที่เติม IAA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนราก ความยาวราก ความสูงต้น จำนวนใบ พื้นที่ใบ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นสูงที่สุด คือ 3.1 รากต่อต้น, 5.70 เซนติเมตร, 5.58 เซนติเมตร, 2.9 ใบต่อต้น, 595.80 ตารางมิลลิเมตร, 1384.78 มิลลิกรัม และ 99.89 มิลลิกรัม ตามลำดับ หลังจากนั้นนำต้นนกคุ้มไฟที่ออกรากมาย้ายปลูกและปรับสภาพในถ้วยพลาสติกใสบรรจุพีทมอสเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ทุกกรรมวิธีมีอัตราการรอดชีวิตสูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ เฉลี่ยคือ 80-100%

คำสำคัญ: นกคุ้มไฟ การขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ออกซิน ไซโทไคนิน ไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว

คำนำ

นกคุ้มไฟ (*Anoectochilus burmanicus*) เป็นกล้วยไม้ดินเฉพาะถิ่นที่พบอยู่ทางภาคเหนือของประเทศไทยในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และตาก เป็นกล้วยไม้ขนาดเล็ก เจริญบริเวณที่ชื้นแฉะมีซากผุของหิน ใบไม้ทับถม หรือใต้ร่มไม้ กล้วยไม้สกุลนกคุ้ม (*Anoectochilus*) มีลักษณะเด่นเฉพาะ คือ ผิวใบสวยงามคล้ายกำมะหยี่ มีประกายสะท้อนแสงมีหลายเฉดสี เช่น สีเขียวเข้ม สีแดง และสีน้ำตาล เส้นใบยังมีความโดดเด่นมีหลากสี เช่น สีเงิน สีทอง สีทองแดง จึงถูกจัดอยู่ในกลุ่มกล้วยไม้อัญมณี (jewel orchids) (สลิล, 2550) ปัจจุบันปริมาณนกคุ้มไฟในธรรมชาติกำลังลดลงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากการบุกรุกพื้นที่ป่าเพื่อทำการเกษตร อีกทั้งสภาพป่าที่เปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ยังนิยมใช้กล้วยไม้สกุลนกคุ้มในยาจีนแผนโบราณเพื่อใช้รักษาโรคต่างๆ เช่น โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคเกี่ยวกับตับและไต (Du *et al*., 2008; Zhang *et al*., 2010) และใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ (Takatsuki *et al*., 1992) Budluang *et al*. (2016) รายงานว่า สารสกัดจากต้นนกคุ้มไฟมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และต้านการดื้ออินซูลิน จึงสามารถพัฒนาเป็นอาหารเสริมสุขภาพเพื่อป้องกันโรคเรื้อรังต่างๆ จากความต้องการนกคุ้มไฟที่สูงขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์ด้านสมุนไพร จึงทำให้ถูกเก็บออกมาจากป่ามากขึ้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อการอนุรักษ์นกคุ้มไฟในธรรมชาติและมีความเสี่ยงที่จะสูญพันธุ์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นแนวทางที่สามารถนำมาใช้ในการขยายพันธุ์นกคุ้มไฟให้มีปริมาณมากเพียงพอต่อความต้องการ ซึ่งช่วย

ลดปัญหาการนำออกมาจากธรรมชาติ โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง โดยทั่วไปในอาหารเพาะเลี้ยงจะเติมไซโทไคนินเพื่อกระตุ้นการแตกยอดใหม่และการเพิ่มปริมาณยอด และจะเติมออกซินเพื่อชักนำให้ยอดออกราก อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาในกล้วยไม้สกุลนกคุ้มค่อนข้างน้อย เช่น Ket *et al*. (2004) รายงานว่า อาหารกึ่งแข็งสูตร Hyponex ที่เติมไซโทไคนิน TDZ ความเข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่านความเข้มข้น 1.00 กรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้ชิ้นส่วนยอด *A. formosanus* เพิ่มปริมาณยอดได้มากที่สุดถึง 11.1 ยอดต่อชิ้นส่วน Zhang *et al*. (2015) รายงานว่า อาหารกึ่งแข็งสูตร ½ MS ที่เติมออกซิน NAA ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมกล้วยบด 100 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนยอด *A. ruxburghii* ออกรากได้มากที่สุดถึง 93.33% นอกจากนี้ในปัจจุบันมีเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่กำลังได้รับความนิยมมากขึ้น คือ ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว (temporary immersion bioreactor: TIB) ซึ่งสามารถผลิตพืชได้เป็นจำนวนมากและเร่งการเจริญเติบโตของพืชได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบดั้งเดิม (อาหารกึ่งแข็ง) โดยมีการใช้ระบบ TIB ในการขยายพันธุ์พืชหลากหลายชนิดได้ประสบความสำเร็จดี เช่น อ้อย (Snyman *et al*., 2007), หน้าวัว (Martínez-Estrada *et al*., 2019), กล้วย (Uma *et al*., 2021), สับปะรด (Sani *et al*., 2020) และมหาหงส์ (Rodpradit *et al*., 2022) เป็นต้น ส่วนในนกคุ้มไฟยังมีการศึกษาน้อยมาก เช่น อริสราและคณะ (2563) รายงานว่า ระบบ TIB ที่ให้อาหารสูตร VW ทุก 6 ชั่วโมง ครั้งละ 10 นาที ทำให้ชิ้นส่วนยอดนกคุ้มไฟที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโตดีที่สุด

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์นกคุ้มไฟในสภาพปลอดเชื้อ โดยมีการศึกษาในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณยอด ซึ่งเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นไซโทไคนิน ได้แก่ BAP และ TDZ และการทดสอบการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB ที่มีสภาวะการให้อาหารเหลวแตกต่างกันเปรียบเทียบกับอาหารกึ่งแข็ง รวมทั้งศึกษาในขั้นตอนการการชักนำให้ออกราก โดยทดสอบการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่เติม IAA ความเข้มข้นต่างๆ ทั้งในระบบ TIB และอาหารกึ่งแข็ง ข้อมูลการศึกษาที่ได้สามารถนำไปใช้เพื่อการผลิตนกคุ้มไฟปริมาณมากในเชิงการค้าต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมต้นนกคุ้มไฟในสภาพปลอดเชื้อ

ต้นนกคุ้มไฟอายุ 12 สัปดาห์ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์กล้วยไม้และไม้ดอกไม้ประดับ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½ MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ย้ายเปลี่ยนอาหารทุก 12 สัปดาห์ เพื่อเตรียมต้นสำหรับทำการทดลองต่างๆ

ผลของไซโทไคนินต่อการเพิ่มปริมาณยอดบนอาหารกึ่งแข็ง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) เปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของไซโทไคนิน ได้แก่ ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เติม BAP หรือ TDZ ความเข้มข้น 0.25, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร มี 3 ซ้ำต่อกรรมวิธี ใช้ชิ้นส่วนข้อ 5 ชิ้นส่วนต่อซ้ำ นำต้นนกคุ้มไฟเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออายุ 12 สัปดาห์ มาตัดแยกชิ้นส่วนข้อเดี่ยวความยาว 1 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½ MS ที่เติมไซโทไคนินชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ตามแผนการทดลอง บันทึกจำนวนยอด และความยาวยอดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

ผลของสภาวะการให้อาหารต่อการเพิ่มปริมาณยอดในระบบ TIB

วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบวิธีการเพาะเลี้ยงและสภาวะการให้อาหารในระบบ TIB ได้แก่ อาหารกึ่งแข็ง และระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวที่ให้อาหารเหลวทุก 6 หรือ 12 ชั่วโมง ครั้งละ 5 และ 10 นาที มี 3 ซ้ำต่อกรรมวิธี ใช้ชิ้นส่วนข้อ 5 ชิ้นส่วนต่อซ้ำ นำต้นนกคุ้มไฟเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออายุ 12 สัปดาห์ มาตัดแยกชิ้นส่วน ความยาว 1 เซนติเมตร

เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร ½ MS ที่เติม ความเข้มข้น TDZ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารเหลวในระบบ TIB แบบขวดแฝด ตามแผนการทดลอง บันทึกจำนวนยอด และความยาวยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

ผลของระบบเพาะเลี้ยงและระดับความเข้มข้น IAA ต่อการชักนำการออกรากและการรอดชีวิตเมื่อย้ายปลูก

วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบวิธีการเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นของ IAA ได้แก่ อาหารกึ่งแข็งหรือระบบ TIB ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.25, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร มี 3 ซ้ำต่อกรรมวิธี ใช้ชิ้นส่วนยอด 5 ชิ้นส่วนต่อซ้ำ นำต้นนกคุ้มไฟเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออายุ 12 สัปดาห์ มาตัดแยกชิ้นส่วนยอดความยาว 3 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งแข็งหรือระบบ TIB แบบขวดแฝดที่ให้อาหารทุก 12 ชั่วโมง ครั้งละ 5 นาที โดยใช้อาหารสูตร ½ MS ที่เติม IAA ความเข้มข้นต่างๆ ตามแผนการทดลอง บันทึกจำนวนราก ความยาวราก ความสูงต้น จำนวนใบ พื้นที่ใบ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ต่อจากนั้นนำต้นที่ออกรากในกรรมวิธีต่างๆ มาย้ายปลูกและปรับสภาพ มี 10 ซ้ำ (ต้น) ต่อกรรมวิธี โดยล้างรากด้วยน้ำประปาเพื่อกำจัดเศษอาหารที่ติดอยู่ แล้วแช่น้ำยากันรา (เมทาแลกซิล 1.5 กรัมต่อลิตร) เป็นระยะเวลา 20 นาที ปลูกในถ้วยพลาสติกใสขนาด 6 ออนซ์ บรรจุพีทมอสรดน้ำพอชุ่ม ปิดฝาครอบให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 28+2 เซลเซียส ให้แสง LED สีขาว (70 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที) 14 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกอัตราการรอดชีวิตเมื่อย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนกคุ้มไฟในการทดลองต่างๆ ใช้อาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 3 กรัมต่อลิตร (ยกเว้นอาหารเหลว) ควบคุมสภาวะเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25+2 องศาเซลเซียส ให้แสง LED สีขาว (40 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที) 14 ชั่วโมงต่อวัน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลในการทดลองต่างๆ มาหาค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของไซโทไคนินต่อการเพิ่มปริมาณยอดบนอาหารกึ่งแข็ง

จากการศึกษาผลของไซโทไคนินต่อการเพิ่มปริมาณยอดของนกคุ้มไฟที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า มีการแตกยอดใหม่จากชิ้นส่วนข้อและไม่พบการฉ่ำน้ำในทุกกรรมวิธี การไม่เติมไซโทไคนินทำให้เกิดเพียงยอดเดียว มีใบคลี่ชัดเจน และมีการออกราก ส่วนการเติมไซโทไคนินไม่มีการออกราก โดยชิ้นส่วนข้อที่ได้รับ BAP แตกยอดที่มีใบคลี่ ส่วนชิ้นส่วนข้อที่ได้รับ TDZ แตกยอดที่เป็นยอดแหลม ใบยังไม่คลี่ (Figure 1) การเติม TDZ ทำให้มีจำนวนยอดเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เฉลี่ยคือ 2.60-3.10 ยอดต่อชิ้นส่วน เมื่อเปรียบเทียบกับการเติม BAP และการไม่เติมไซไคนิน ซึ่งมีจำนวนยอดน้อยกว่า เฉลี่ย คือ 1.00-1.60 และ 1.00 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ โดยการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดมากที่สุด คือเฉลี่ย 3.1 ยอดต่อชิ้นส่วน (Figure 2A) ในขณะที่ความยาวยอดในแต่ละกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 3.50-3.78 เซนติเมตร (Figure 2B) ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า TDZ สามารถกระตุ้นการเพิ่มปริมาณยอดของนกคุ้มไฟได้ดีกว่า BAP ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาในพืชหลายชนิดที่พบว่า TDZ ทำให้มีการเกิดยอดทวีคูณ (multiple shoots) เป็นจำนวนที่มากกว่า BAP เมื่อเติมในอาหารเพาะเลี้ยงในความเข้มข้นที่เท่ากัน เช่น กล้วย (Lee, 2005) มหาหงส์ (Klaharn *et al*., 2020) หญ้าหวาน (Singh and Dwivedi, 2014) และเผือก (Sama *et al*., 2012) เป็นต้น โดย TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินที่มีกลไกการทำงาน คือ ยับยั้งเอนไซม์ cytokinin oxidase ที่ทำหน้าที่สลายไซโทไคนินธรรมชาติเพื่อรักษาสมดุลของฮอร์โมนภายในพืช เมื่อเอนไซม์ชนิดนี้ถูกทำลายก็จะเพิ่มการสะสมไซโทไคนินในต้นพืช จึงส่งผลให้กระตุ้นการแตกยอดได้มากขึ้น (Guo *et al*., 2011)

Agricultural Science and Management J. 6 (3) : 19-29 (2023)

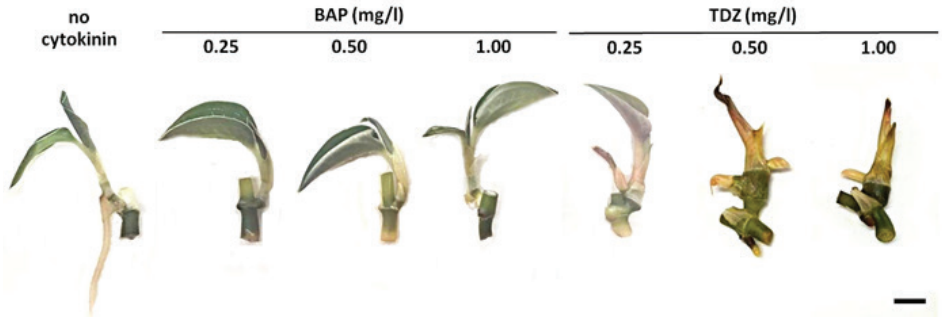

Figure 1 Shoot multiplication of single node explants grown on semi-solid ½ MS medium added with BAP and TDZ at different concentrations for 12 weeks (bar = 1 cm).

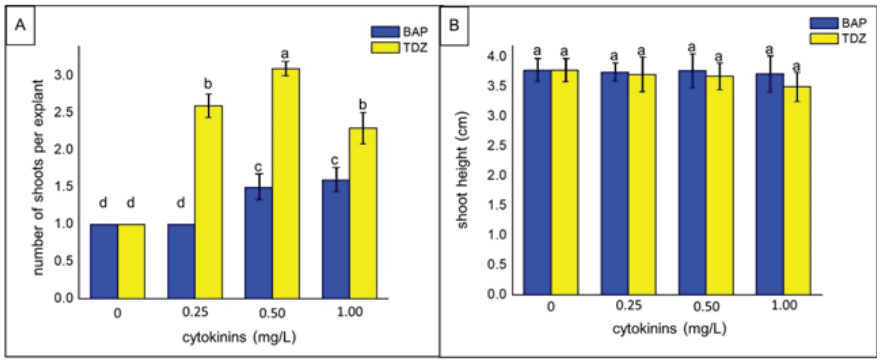

Figure 2 Number of shoots per explants (A) and shoot height (B) after single node explants of *A. burmanicus* were grown on semi-solid ½ MS medium added with BAP and TDZ at different concentrations for 12 weeks. Data represents the mean ± standard error. Different letters denote significant statistical differences (DMRT, $p < 0.05$).

ผลของสภาวะการให้อาหารต่อการเพิ่มปริมาณยอดในระบบ TIB

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อนกคุ้มไฟในระบบ TIB ที่มีสภาวะการให้อาหารที่แตกต่างกันและเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า มีการแตกยอดใหม่จากชิ้นส่วนข้อและไม่พบการฉ่ำน้ำในทุกกรรมวิธี การเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งแตกยอดแหลม ใบยังไม่คลี่ การเพาะเลี้ยงในระบบ TIB แตกยอดแหลมเช่นเดียวกัน แต่ยอดที่แตกก่อนใบเริ่มคลี่ (Figure 3) การเพาะเลี้ยงในระบบ TIB ทุกกรรมวิธีทำให้มีจำนวนยอดและความยาวยอดมากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง ซึ่งการให้อาหารทุก 12 ชั่วโมง ครั้งละ 5 นาที มีจำนวนยอดและความยาวยอดมากที่สุด คือ 4.8 ยอดต่อชิ้นส่วน (Figure 4A) และ 4.73 เซนติเมตร (Figure 4B) ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง (3 ยอดต่อชิ้นส่วน และ 3.54 เซนติเมตร ตามลำดับ) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของอริสรา และคณะ (2563) ที่ศึกษาในนกคุ้มไฟและรายงานวิจัยในพืชชนิดอื่นๆ ซึ่งพบว่า การเพาะเลี้ยงในระบบ TIB ทำให้พืชมีการเพิ่มปริมาณยอดและการเจริญเติบโตที่ดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง เช่น กล้วย (Uma *et al.*, 2021) เบญจมาศ (ไอรดา และปวีณา, 2564) เผือก (Mancilla-Álvarez *et al.*, 2021) และหน้าวัว (Martínez-Estrada *et al.*, 2019) เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIB จะมีการดูดซับสารอาหารจากการแช่ในอาหารเหลวได้อย่างทั่วถึง ในขณะที่ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งจะดูดซับสารอาหารเพียงบริเวณที่สัมผัสกับอาหารเท่านั้น (Teisson and Alvard, 1995)

ในการเปรียบเทียบกรรมวิธีที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIB เมื่อลดความถี่ของการให้อาหารจากทุก 6 ชั่วโมง เป็นทุก 12 ชั่วโมง โดยใช้ระยะเวลาการ

ให้อาหารเท่ากัน พบว่า ส่งผลทำให้จำนวนยอดและความยาวยอดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในขณะที่การเพิ่มระยะเวลาการให้อาหารจากครั้งละ 5 นาที เป็นครั้งละ 10 นาที โดยให้อาหารความถี่เดียวกัน พบว่า ส่งผลทำให้จำนวนยอดและความยาวยอดมีแนวโน้มลดลง สันนิษฐานว่า การเพาะเลี้ยงในระบบ TIB โดยใช้ความถี่และระยะเวลาเวลาการให้อาหารที่เหมาะสมจะกระตุ้นให้ยอดมีการเพิ่มปริมาณและเจริญเติบโตดี โดยในการทดลองนี้พบว่า ระบบ TIB ที่ให้อาหารเหลวทุก 12 ชั่วโมง ครั้งละ 5 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยอดจากชิ้นส่วนข้อของนกคุ้มไฟที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร ½ MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ไม่สอดคล้องกับรายงานของอริสราและคณะ (2563) ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของนกคุ้มไฟด้วยอาหารสูตร VW ในระบบ TIB ที่ให้อาหารเหลวทุก 6 ชั่วโมง ครั้งละ 10 นาที มีความเหมาะสมมากที่สุดในการเพิ่มปริมาณยอด โดยอาจเป็นเพราะการใช้ชิ้นส่วนพืชและสูตรอาหารที่แตกต่างกัน

Figure 3 Shoot multiplication of single node explants grown on semi-solid on and in TIB system with different feeding conditions for 12 weeks (bar = 1 cm).

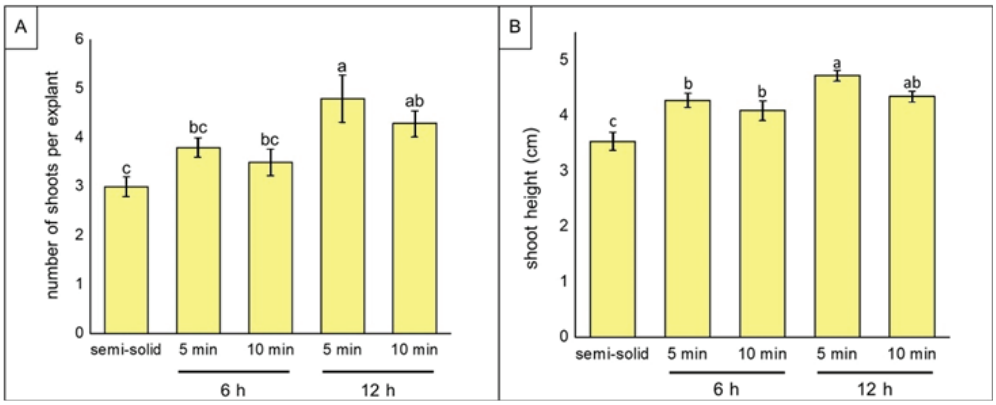

Figure 4 Number of shoots per explants (A) and shoot height (B) after single node explants of *A. burmanicus* were grown on semi-solid medium and in TIB system with different feeding conditions for 12 weeks. Data represents the mean ± standard error. Different letters denote significant statistical differences (DMRT, $p < 0.05$).

ผลของระบบเพาะเลี้ยงและระดับความเข้มข้น IAA ต่อการชักนำการออกรากและการรอดชีวิตเมื่อย้ายปลูก

ในการนำชิ้นส่วนยอดนกคุ้มไฟมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่เติม IAA ระดับความเข้มข้นต่างๆ และเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งและในระบบ TIB ที่ให้อาหารทุก 12 ชั่วโมง ครั้งละ 5 นาที เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า มีการออกรากของชิ้นส่วนยอดและไม่พบการฉ่ำน้ำในทุกกรรมวิธี การไม่เติม IAA หรือเติม IAA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการออกรากค่อนข้างยาว ทั้งการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งหรือในระบบ TIB (Figure 5) โดยการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB ทำให้มีการเจริญเติบโตทุกด้านสูงกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง เมื่อเปรียบเทียบที่ IAA ระดับความเข้มข้นเดียวกัน โดยการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB ที่เติม IAA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนราก ความยาวราก ความสูงต้น จำนวนใบ พื้นที่ใบ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นสูงที่สุด คือ 3.1 รากต่อต้น (Figure 6A) 5.70 เซนติเมตร (Figure 6B) 5.58 เซนติเมตร (Figure 6C) 2.9 ใบต่อต้น (Figure 6D), 595.80 ตารางมิลลิเมตร (Figure 6E) 1384.78 มิลลิกรัม (Figure 6F) และ 99.89 มิลลิกรัม (Figure 6G) ตามลำดับ โดย IAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่มีบทบาทชักนำให้เกิดรากพิเศษ (adventitious roots) ของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยในพืชหลายชนิดที่พบว่า การเติม IAA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมที่สุดในการชักนำให้ชิ้นส่วนยอดเกิดรากพิเศษในพืชชนิดต่างๆ เช่น ฤาษีผสม (Sharma *et al*., 1991) มะนาว (Al-Khayri and Al-Bahrany, 2001) และ *Citrus jambhiri* (Devi *et al*., 2021) เป็นต้น นอกจากนี้การที่นกคุ้มไฟที่ชักนำให้ออกรากในระบบ TIB มีการเจริญเติบโตทั้งในส่วนของยอดและรากที่ดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง ซึ่งจะส่งผลดีต่อการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตเมื่อนำออกไปย้ายปลูกในสภาพโรงเรือน

เมื่อนำต้นนกคุ้มไฟที่ออกรากในสภาพปลอดเชื้อจากกรรมวิธีต่างๆ มาย้ายปลูกและปรับสภาพเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ต้นที่ชักนำให้ออกรากในระบบ TIB มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าต้นที่ชักนำให้ออกรากบนอาหารกึ่งแข็งเมื่อเปรียบเทียบที่ IAA ระดับความเข้มข้นเท่ากัน ทั้งนี้อัตราการรอดชีวิตในทุกกรรมวิธีค่อนข้างสูงและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เฉลี่ยคือ 80-100% (Figure 6H)

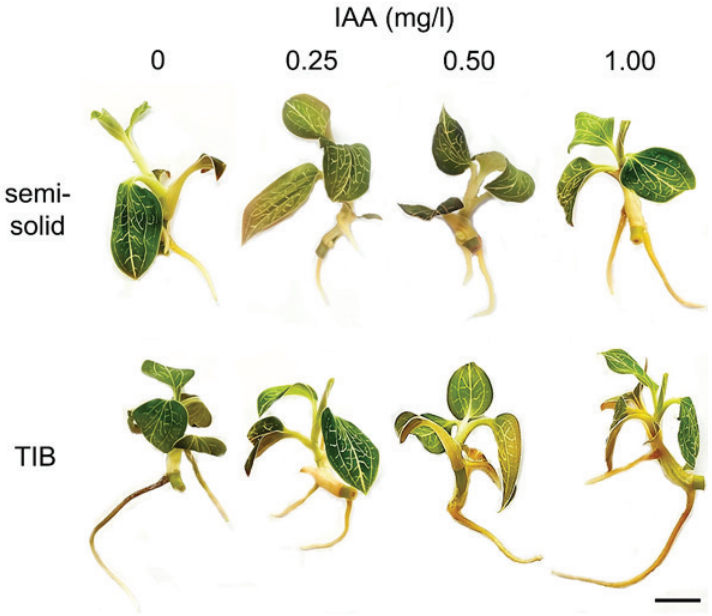

Figure 5 Root induction of *A. burmanicus* shoots cultured on ½ MS medium supplemented with IAA at different concentrations on semi-solid medium and in TIB system for 12 weeks (bar = 1 cm).

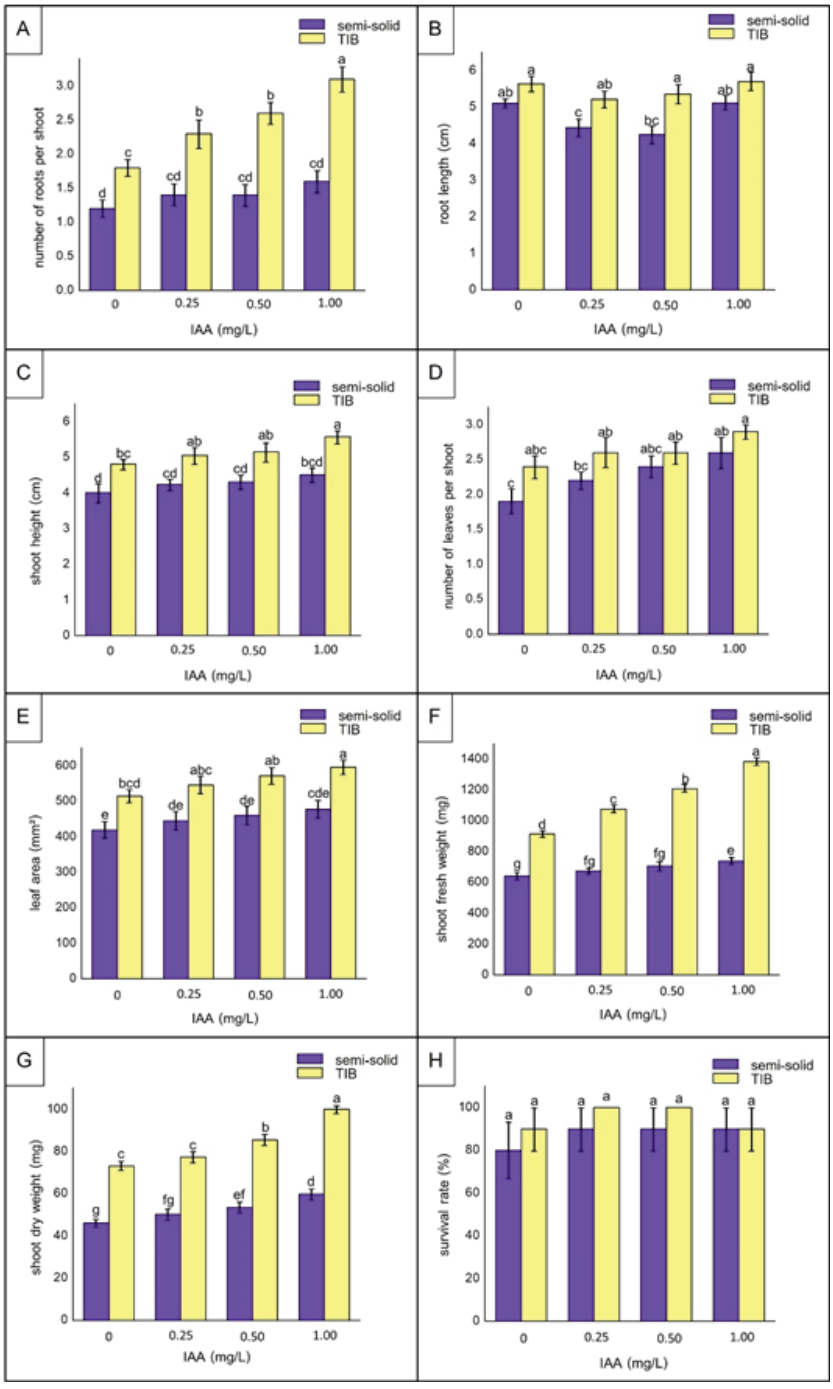

Figure 6 Number of roots per shoot (A), root length (B), shoot height (C), number of leaves per shoot (D), leaf area (E), fresh weight (F) and dry weight (G) of *A. burmanicus* shoots cultured on ½ MS medium supplemented with IAA at different concentrations on semi-solid medium and in TIB system for 12 weeks. Survival rates of *in vitro* rooted plants were recorded when transplanted and acclimatized for 4 weeks (H). Data represent the mean ± standard error. Different letters denote statistically significant differences (DMRT, $p < 0.05$).

สรุป

ในการเพิ่มปริมาณยอดนกคุ้มไฟจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อพบว่า การเติม TDZ ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร ½ MS มีความเหมาะสมมากที่สุด โดยการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB ให้ผลดีกว่าอาหารกึ่งแข็ง ซึ่งมีสภาวะการให้อาหารที่เหมาะสมที่สุด คือ ทุก 12 ชั่วโมง ครั้งละ 5 นาที ส่วนการชักนำให้นกคุ้มไฟออกรากจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดพบว่า การเพาะเลี้ยงในระบบ TIB โดยใช้อาหารสูตร ½ MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมมากที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สนับสนุนทุนวิจัย และศูนย์กล้วยไม้และไม้ดอกไม้ประดับที่เอื้อเฟื้อต้นนกคุ้มไฟในสภาพปลอดเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

สลิล สิทธิสัจจธรรม. 2550. กล้วยไม้ป่าเมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 4. บ้านและสวน, กรุงเทพมหานคร. 495 หน้า.

อริสรา ติ๊บปะละวงศ์ ทิพย์สุดา ตั้งตระกูล เยาวนิตย์ ธาราฉาย และปวีณา ภูมิสุทธาผล. 2563. การเจริญเติบโตของนกคุ้มไฟที่เพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวภายใต้การให้แสง LED. หน้า 113-120. *ใน*: การประชุมวิชาการระดับชาติ สาขาพืชและเทคโนโลยีชีวภาพ ครั้งที่ 17. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

ไอรดา ถิ่นศรี และปวีณา ภูมิสุทธาผล. 2564. ผลของอาหารเพาะเลี้ยง benzylaminopurine และระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวต่อการเจริญเติบโตของเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารวิชาการ มทร.สุวรรณภูมิ 9(1): 14-23.

Al-Khayri, J.M. and A.M. Al-Bahrany. 2001. *In vitro* micropropagation of *Citrus aurantifolia* (lime). *Current Science* 81(9): 1242-1246.

Budluang, P., P. Pitchakarn, P. Ting, P. Temviriyanukul, A. Wongnoppawich and A. Imsumran. 2016. Anti-inflammatory and anti-insulin resistance activities of aqueous extract from *Anoectochilus burmannicus*. Food Science & Nutrition 5: 486–496, doi: 10.1002/fsn3.416.

Devi, T.R., M. Dasgupta, M.R. Sahoo, P.C. Kole and N. Prakash. 2021. High efficient de novo root-to-shoot organogenesis in *Citrus jambhiri* Lush: Gene expression, genetic stability and virus indexing. PLOS ONE 16(2): e0246971, doi: 10.1371/journal.pone.0246971.

Du, X. M., N. Irino, N. Furusho, H.S. Jun and Y.H. Shoyama. 2008. Pharmacologically active compounds in the *Anoectochilus* and *Goodyera* species. Journal of Natural Medicines 62(2): 132-148, doi: 10.1007/s11418-007-0169-0.

Guo, B., B.H. Abbasi, A. Zeb, L.L. Xu and Y.H. Wei. 2011. Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. African Journal of Biotechnology 10(45): 8984-9000, doi: 10.5897/AJB11.636.

Ket, N.V., E.J. Hahn, S.Y. Park, D. Chakrabarty and K.Y. Paek. 2004. Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. Biologia Plantarum 48(3): 339-344.

Klaharn, P., P. Pumisutapon, K. Songnun and S. Rodpradit. 2020. Effects of BA and TDZ for *in vitro* shoot multiplication of three *Hedychium* species. Acta Horticulturae 1298: 353-358, doi: 10.17660/ActaHortic.2020.1298.49.

Lee, S.W. 2005. Thidiazuron in the improvement of banana micropropagation. Acta Horticulturae 692: 67-74, doi: 10.17660/ActaHortic.2005.692.7

Mancilla-Álvarez, E., J.A. Pérez-Sato, R. Núñez-Pastrana, J.L. Spinoso-Castillo and J.J. Bello-Bello. 2021. Comparison of different semi-automated bioreactors for i*n vitro* propagation of taro (Colocasia esculenta L. Schott). Plants 10(5): 1010, doi: 10.3390/plants10051010.

Martínez-Estrada, E., B. Islas-Luna, J.A. Pérez-Sato and J.J. Bello-Bello. 2019. Temporary immersion improves *in vitro* multiplication and acclimatization of *Anthurium andreanum* Lind. Scientia Horticulturae 249: 185-191, doi: 10.1016/j.scienta.2019.01.053.

Rodpradit, S., P. Klaharn and P. Pumisutapon. 2022. Shoot multiplication of three Hedychium species via immersion temporary bioreactor. Acta Horticulturae 1339: 167-171, doi: 10.17660/ActaHortic.2022.1339.22.

Sama, A.E., H.G. Hughes, M.S. Abbas and M.A. Shahba. 2012. An efficient *in vitro* propagation protocol of cocoyam [*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott]. The Scientific World Journal 2012(8): 346595, doi: 10.1100/2012/346595.

Sani, L.A., I.S. Usman, A.U. Nasir and M.M. Abdulmalik. 2020. Micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L. var. Smooth Cayenne) in temporary immersion bioreactor system (TIPS). Bayero Journal of Pure and Applied Sciences 12(2): 207-209, doi: 10.4314/bajopas.v12i2.29.

Sharma, N., K.P.S. Chandel and V.K. Srivastava. 1991. *In vitro* propagation of *Coleus forskohlii* Briq., a threatened medicinal plant. Plant Cell Reports 10(2): 67-70.

Singh, P. and P. Dwivedi. 2014. Two-stage culture procedure using thidiazuron for efficient micropropagation of *Stevia rebaudiana*, an anti-diabetic medicinal herb. 3 Biotech 4(4): 431-437, doi: 10.1007/s13205-013-0172-y.

Snyman, S.J., G.M. Meyer, J.R. Richards, S. Ramgareeb, M. Banasiak and B. Huckett. 2007. Use of the temporary immersion RITA® bioreactor system for micropropagation of sugarcane. South African Journal of Botany 2(73): 336-337, doi: 10.1016/J.SAJB.2007.02.185.

Takatsuki, S., J.D. Wang, T. Narui and T. Okuyama. 1992. Studies on the components of crude drug Kim Soan Lian. Journal of Japanese Botany 67(2): 121-123.

Teisson, C. and D. Alvard. 1995. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary immersion. pp. 105-110. *In*: M. Terzi, R. Cella and A. Falavigna. (Eds). Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, volume 22. Springer, Dordrecht.

Uma, S., R. Karthic, S. Kalpana, S. Backiyarani and M.S. Saraswathi. 2021. A novel temporary immersion bioreactor system for large scale multiplication of banana (Rasthali AAB-Silk). Scientific Reports 11(1): 20371, doi: 10.1038/s41598-021-99923-4.

Zhang, A., H. Wang, Q. Shao, M. Xua, W. Zhang and M. Li. 2015. Large scale *in vitro* propagation of *Anoectochilus roxburghii* for commercial application: pharmaceutically important and ornamental plant. Industrial Crops and Products 70: 158–162, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.03.032.

Zhang, F., L.V. Yali, H. Dong and S. Guo. 2010. Analysis of genetic stability through intersimple sequence repeats molecular markers in micropropagated plantlets of *Anoectochilus formosanus* HAYATA, a medicinal plant. Biological and Pharmaceutical Bulletin 33(3): 384- 388, doi: 10.1248/bpb.33.384.