การขยายพันธุ์หญ้าหวานโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบแช่ชั่วคราว

Micropropagation of Stevia by Tissue Cultures in a Temporary Immersion System

กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์*

Kittisak Chotikadnachanarong*

ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพพืช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

Center of Excellence in Plant Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University

Received : 13 June 2019

Revised : 22 August 2019

Accepted : 7 October 2019

บทคัดย่อ

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการขยายพันธุ์หญ้าหวานด้วยระบบแช่ชั่วคราว (TIS) ได้แก่ ปัจจัยแรก คือ ความถี่ในการเติมอาหารโดยการนำชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานไปเลี้ยงในระบบ TIS แบบ TIG โดยเติมอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ Kinetin 3 mg/L ครั้งละ 3 นาที ทุก ๆ 3, 4, 6, 8 และ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชุดการทดลองที่เติมอาหารทุก ๆ 3 ชั่วโมง มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 40.8 mg และให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด คือ 3.6 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จากนั้นจึงศึกษาปัจจัยที่สอง คือ ระยะเวลาในการเติมอาหาร โดยเติมอาหารทุก ๆ 3 ชั่วโมง ครั้งละ 1, 3, 5, 7 และ 10 นาทีต่อครั้ง ทุก ๆ 3 ชั่วโมง ทำการเพาะเลี้ยงในระบบ TIG เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชุดการทดลองที่เติมอาหารครั้งละ 3 นาทีจะให้น้ำหนักแห้ง และจำนวนยอดสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ 40.5 mg และ 3.6 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงในระบบ TIG โดยเติมอาหารครั้งละ 3 นาที ทุก ๆ 3 ชั่วโมง กับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าความเร็ว 110 รอบต่อนาที และการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25ºC เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงในระบบ TIG จะทำให้ได้น้ำหนักแห้งเฉลี่ยมากที่สุด คือ 40.5 mg ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและอาหารวุ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในระบบ TIG และอาหารวุ้นให้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ 3.6 และ 3.1 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อตามลำดับ และอาหารเหลวทำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยได้น้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังนั้นการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานในระบบ TIG จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตต้นอ่อนหญ้าหวานในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

คำสำคัญ : หญ้าหวาน, การขยายพันธุ์, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, ระบบแช่ชั่วคราว

***Corresponding author. E-mail** : Kittisak_cho@cmru.ac.th

Abstract

The aim of this study was to evaluate the temporary immersion bioreactor in multiplication of Stevia. The first factor was the immersion frequencies. Nodal explants were fed with liquid MS medium for 3 minutes each 3, 4, 6, 8 and 12 hours. Cultivate for 4 weeks. It was found that the 3 hours immersion frequency had the highest average dry weight of 40.8 mg and the highest average shoot number was 3.6 shoots per explant with statistically significant difference at 0.05. To study effects of immersion time in TIG. Cultures were immersed in medium for 1, 3, 5, 7 and 10 minutes, every 3 hours in TIG for 4 weeks. It was found that the 3 minutes immersion time showed the highest average dry weight and the average number of shoots with significantly difference higher than the other treatments, 40.5 mg and 3.6 shoots per explant respectively. To compared of different *in vitro* micropropagation methods of Stevia. *In vitro* explants were cultured in TIG by 3 hours immersion frequency with a 3 minutes immersion, liquid medium at 110 rpm speed shaker and agar medium in light condition 16 hours per day at 25°C cultured for 4 weeks. The results show that the cultured in the immersion system showed the highest average dry weight 40.5 mg which more than cultured in liquid medium and agar medium with statistically significant difference at 0.05. While, cultivation in TIG and agar medium provides a nonsignificant difference in the average number of 3.6 and 3.1 shoots per explant and liquid medium produced the lowest average number of shoots with statistically significant difference at 0.05. Therefore, the cultivation of stevia explant in TIG which is an alternative to application for the production of stevia at the industrial level.

Keywords : stevia, propagation, plant tissue cultures, temporary immersion system

บทนำ

หญ้าหวาน ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Stevia rebaudiana* Bertoni จัดอยู่ในวงศ์ Astcraceac มีสาร Stevioside เป็นสารให้ความหวาน และมีความหวานมากกว่าน้ำตาลซูโครสประมาณ 300 เท่า นอกจากนี้ยังเป็นสารที่มีแคลอรี่ต่ำมาก เมื่อเทียบกับน้ำตาลทราย (Madan *et al*., 2010) เนื่องจากไม่ถูกย่อยให้เกิดพลังงานในร่างกาย จากคุณสมบัติของสารหวานดังกล่าว ในปัจจุบันมีการนำมาใช้เป็นสารที่ให้ความหวานสำหรับอาหาร และเครื่องดื่มบางประเภท โดยใช้แทนน้ำตาลทรายบางส่วนหรือทั้งหมด ซึ่งเพื่อลดปริมาณแคลอรี่ในอาหาร และเครื่องดื่มสำหรับผู้ที่ต้องการลดความอ้วน หรือผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน ซึ่งไม่สามารถบริโภคน้ำตาลในปริมาณมาก ๆ ได้ และทั้งนี้ปัจจุบันสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) อนุญาตให้นำสารสกัด stevioside มาขึ้นทะเบียนเป็นสารหวานแทนน้ำตาลได้

ประเทศไทยนำหญ้าหวานเข้ามาปลูกกันมากในเขตภาคเหนือได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน พะเยา เนื่องจากหญ้าหวานชอบอากาศค่อนข้างเย็น อุณหภูมิประมาณ 20-26ºC และขึ้นได้ดีเมื่อปลูกในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 600-700 เมตร โดยเกษตรกรจะทำการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด และการปักชำ แต่เนื่องจากพืชชนิดนี้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ (Miyazaki and Wantenabe, 1974) และการปักชำเองก็ถูกจำกัดโดยจำนวนของต้นพันธุ์

อีกทั้งยังต้องใช้เวลานาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการขยายพันธุ์หญ้าหวานให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น และได้ต้นพันธุ์ที่แข็งแรงปราศจากโรค โดย Chotikadachanarong and Dheeranupattana (2013) รายงานการขยายพันธุ์หญ้าหวานโดยารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 3 mg/L เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากที่สุด 9.3 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ถึงแม้ว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารวุ้นจะมีข้อดีคือพืชจะไม่ค่อยเกิดอาการฉ่ำน้ำ แต่ก็มีข้อเสียคือจะต้องเปลี่ยนอาหารใหม่โดยการย้ายจากขวดเก่าไปขวดอาหารใหม่จึงมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนสูง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวก็มีข้อดีที่พืชเจริญเติบโตได้เร็วกว่า แต่ก็มีข้อเสียที่เนื้อเยื่อมักจะเกิดอาการฉ่ำน้ำ (hyperhydricity) เพราะต้องแช่อยู่ในน้ำตลอดเวลา ส่งผลให้ใบ ยอด และระบบรากไม่ดี (Etienne *et al*, 1997) จึงมีการใช้เทคนิคขยายพันธุ์พืชด้วยระบบ Temporary Immersion System (TIS) หรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชระบบแช่ชั่วคราว เพื่อช่วยลดปัญหาการฉ่ำน้ำของพืช และช่วยให้พืชโตเร็ว ซึ่งเทคนิคนี้จะรวมข้อดีของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารวุ้น และอาหารเหลวเข้าด้วยกัน เช่น สามารถเพิ่มปริมาณและคุณภาพของต้นอ่อน ลดระยะเวลาและขั้นตอน ลดต้นทุนแรงงาน และพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง ต้นอ่อนที่ได้จะมีอาการฉ่ำน้ำน้อย

ปัจจุบันพบว่ามีการใช้เทคนิคดังกล่าวเพื่อขยายพันธุ์หญ้าหวาน ดังรายงานของ Ramirez-Mosqueda *et al*. (2016) ซึ่งเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานในระบบแช่ชั่วคราว แบบ RITA® (Recipient for Automated Temporary Immersion) ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 mg/L เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนหญ้าที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น และ RITA® มีจำนวนยอด ความสูงของยอด และจำนวนใบไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่ต้นอ่อนที่ได้จากการเลี้ยงใน RITA® มีลักษณะที่ฉ่ำน้ำ ต้นและใบเป็นสีเหลืองปนน้ำตาล เช่นเดียวกับรายงานของ Alexander & Esyanti (2016) ที่ศึกษาการพาะเลี้ยงหญ้าหวานในระบบ RITA® ร่วมกับการให้แสง LED สีแดง 1 ชั่วโมงในเวลากลางคืน พบว่าต้นที่ได้มีอาการฉ่ำน้ำ และยอดเป็นสีน้ำตาลเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Venutolo & Aguilar (2015) ซึ่งได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงหญ้าหวานเปรียบเทียบระบบแช่ชั่วคราวแบบ RITA® และแบบ BIT (Twin Flasks System) ก็พบว่าทั้ง 2 แบบ พบอาการยอดและใบเป็นสีเหลืองปนน้ำตาล และในระบบ RITA® ยังพบว่าต้นมีอาการฉ่ำน้ำด้วย ดังนั้นทั้งระบบ RIT และ RITA® จึงยังไม่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์หญ้าหวาน ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานในระบบแช่ชั่วคราวแบบ temporary immersion gravity flask bioreactor (TIG) ของบริษัท ของ Paitoon Saplee Co., Ltd ซึ่งมีหลักการทำงานคือใช้ปั๊มดันอาหารเหลวจากขวดด้านล่างขึ้นไปขวดด้านบน และปล่อยให้อาหารไหลกลับลงมาเองตามแรงโน้มถ่วง โดยทั้ง 2 ขวดเชื่อมต่อกันด้วยท่อสแตนเลสเพียงท่อเดียว ดังนั้นไอน้ำจากอาหารจึงระเหยขึ้นมาที่ขวดบรรจุเนื้อเยื่อได้น้อย และในระหว่างที่ดันอาหารขึ้นไปแช่เนื้อเยื่อจะมีการดันอากาศขึ้นไปด้วยตลอดเวลา เนื้อเยื่อจึงได้รับอากาศตลอด จึงน่าจะลดอาหารฉ่ำน้ำของต้นหญ้าหวานได้ และระบบดังกล่าวยังไม่พบว่ามีการศึกษากับหญ้าหวานมาก่อน โดยวัตถุประสงค์ในงานวิจัยนี้คือการศึกษาผลของการเพาะเลี้ยงหญ้าหวานในระบบจุ่มแช่แบบ TIG ร่วมกับปัจจัยต่าง ๆ คือ เวลาในการให้อาหาร และความถี่ในการให้อาหาร ร่วมทั้งเปรียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า และการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น เพื่อเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์หญ้าหวานต่อไป

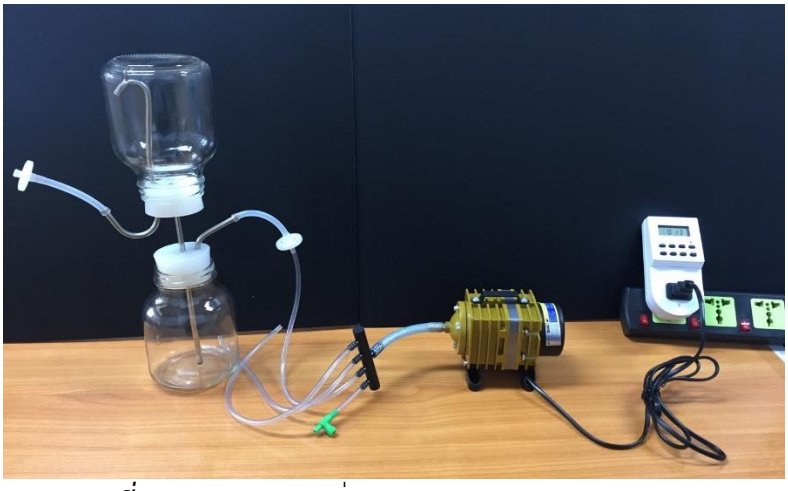
วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมต้นอ่อนหญ้าหวานในสภาพปลอดเชื้อ

นำชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานมาล้างด้วยน้ำยาล้างจาน 1 หยด ผสมน้ำประปา 100 mL ในภาชนะน้ำนิ่ง ขัดด้วยแปรงสีฟัน ล้างโดยเปิดน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 1 นาที ก่อนทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยเมอร์คิวลิกคลอไรด์ (Mercury Chloride; $HgCl_2$) ความเข้มข้น 0.1%(w/v) เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งละ 5 นาที นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมาตัดบริเวณที่ถูกสารฆ่าเชื้อทำลายออก แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม Kinetin ความเข้มข้น 3 mg/L ที่อุณหภูมิ 25±2ºC ในสภาวะให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำต้นอ่อนที่ได้ไปใช้ในการทดลองทั้งหมด

การเตรียมระบบแช่ชั่วคราว

การทดลองทั้งหมดใช้ระบบจุ่มแช่แบบชั่วคราว ของ Paitoon Saplee Co., Ltd ดังภาพที่ 1 ซึ่งเป็นระบบขวดคู่ขนาดขวดละ 500 mL ขวดด้านล่างสำหรับบรรจุอาหาร ขวดด้านบนบรรจุชิ้นส่วนพืช โดยมีท่อเชื่องต่อระหว่างขวดทั้งสอง หลักการทำงานคือใช้ timer ตั้งเวลาในการเปิดปิดปั๊มเพื่อดันอาหารจากขวดล่างขึ้นบน แล้วจึงปล่อยให้อาหารไหลกลับลงมาเองตามแรงโน้มถ่วงโลก ก่อนใช้งานต้องทำการห่อตัวกรองอากาศด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วบรรจุในถุงพลาสติก ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121ºC ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 15 นาที จากนั้นนำไปอบโดยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60ºC เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อกำจัดไอน้ำในแผ่นกรอง และข้อต่อส่วนต่าง ๆ ก่อนนำไปใช้



ภาพที่ 1 ระบบจุ่มแช่แบบชั่วคราว ของ Paitoon Saplee Co., Ltd

การศึกษาผลของความถี่ในการให้อาหารต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนหญ้าหวานในระบบแช่ชั่วคราว

ตัดชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานให้มีความยาวประมาณ 1 cm และชั่งน้ำหนักสดของเนื้อเยื่อทุกชิ้น ก่อนจะนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติม Kinetin 3 mg/L น้ำตาล 30 g/L ปรับ pH เป็น 5.8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อภาชนะ โดยกำหนดความถี่ในการเติมอาหารเหลวแตกต่างกัน 5 ชุดการทดลอง คือ ทุก ๆ 3, 4, 6, 8 และ 12 ชั่วโมง โดยแต่ละครั้งจะทำการเติมอาหารครั้งละ 3 นาที ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้นเนื้อเยื่อ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2ºC ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำเนื้อเยื่อออกมาชั่งน้ำหนักสด และนำไปอบโดยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 3 วัน แล้ว

นำมาชั่งน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ก่อนเริ่มการทดลองได้ตัดชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานความยาวประมาณ 1 cm จำนวน 15 ข้อ นำไปอบแห้งเพื่อวิเคราะห์เป็นน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของชิ้นส่วนเริ่มต้นได้ 18.7 mg

การศึกษาผลของระยะเวลาในการให้อาหารต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนหญ้าหวานในระบบแช่ชั่วคราว

นำชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานมาเลี้ยงในระบบแช่ชั่วคราวโดยใช้อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม Kinetin 3 mg/L และน้ำตาล 30 g/L ปรับ pH เป็น 5.8 ปริมาตร 100 mL ในภาชนะขนาด 500 mL เนื่องจากผลจากการทดลองแรกพบว่าชิ้นส่วนหญ้าหวานภายหลังการเพาะเลี้ยงในระบบ TIG โดยเติมอาหารครั้งละ 3 นาที ทุก ๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนมีน้ำหนักแห้ง และจำนวนยอดมากที่สุด ดังนั้นเพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมอาหารแต่ละครั้งการทดลองนี้จึงกำหนดให้ความถี่ในการเติมอาหารเท่ากัน คือ เติมอาหารทุก ๆ 3 ชั่วโมง และให้อาหารในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน คือ 1, 3, 5, 7 และ 10 นาทีต่อครั้ง ทำการทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ชิ้นเนื้อเยื่อ บันทึกจำนวนยอด ลักษณะของต้นอ่อนที่ได้ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2ºC บันทึกน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของชิ้นส่วนหญ้าหวาน ก่อนและหลังการทดลอง

การศึกษาสถานะของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนหญ้าหวาน

นำชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานมาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ดีที่สุดจากการทดลองก่อนหน้า เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบต่อนาที และการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น (เติมผลวุ้น 7 g/L) ด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 3 mg/L **น้ำตาล** 30 **กรัมต่อลิตร ปรับ** pH **เป็น** 5.8 **ปริมาตร** 100 mL ทำการทดลองชุดการทดลองละ 45 ชิ้นส่วนพืช บันทึกจำนวนยอด ลักษณะของต้นอ่อนที่ได้ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2ºC บันทึกน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของชิ้นส่วนหญ้าหวานก่อนและหลังการทดลอง

วิธีการวิเคราะห์ผล

การทดลองทั้งหมดวางแผนการทดลองแบบ CRD โดยแสดงผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัย

การศึกษาผลของความถี่ในการให้อาหารต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนหญ้าหวานในระบบแช่ชั่วคราว

การนำชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานซึ่งมีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยประมาณ 18.7 mg ไปเลี้ยงในระบบ TIG โดยเติมอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ Kinetin 3 mg/L ครั้งละ 3 นาที ทุก ๆ 3, 4, 6, 8 และ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชุดการทดลองที่เติมอาหารวันละ 8 ครั้ง หรือทุก ๆ 3 ชั่วโมง มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 40.8 mg และให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด คือ 3.6 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังตารางที่ 1 และผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าเพิ่มระยะห่างในการเติมอาหารให้มากขึ้นจะยิ่งทำให้น้ำหนักแห้งเฉลี่ยลดต่ำลง นอกจากนี้ยังพบว่าเกิดแคลลัสได้บริเวณโคนของเนื้อเยื่อ และบริเวณปลายใบ ดังภาพที่ 2

ตารางที่ 1 น้ำหนักแห้งเฉลี่ย และจำนวนยอดเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของหญ้าหวานภายหลังการเพาะเลี้ยงในระบบ TIG โดยให้ความถี่ในการเติมอาหารแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความถี่ในการเติมอาหาร (ชั่วโมง)	น้ำหนักแห้งเฉลี่ย (mg)	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ)
3	40.8±0.0102[a]	3.6±1.2[a]
4	21.8±0.0092[b]	2.7±0.8[b]
6	0.97±0.0007[c]	2.6±0.6[b]
8	0.90±0.0038[c]	2.5±0.5[b]
12	0.61±0.0005[c]	2.5±0.5[b]

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3 ชั่วโมง

4 ชั่วโมง

6 ชั่วโมง

8 ชั่วโมง

12 ชั่วโมง

ภาพที่ 2 ชิ้นส่วนหญ้าหวานภายหลังการเพาะเลี้ยงในระบบ TIG โดยเติมอาหารครั้งละ 3 นาที ทุก ๆ 3, 4, 6, 8 และ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การศึกษาผลของระยะเวลาในการให้อาหารต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนหญ้าหวานในระบบแช่ชั่วคราว

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานในระบบ TIG โดยให้ความถี่ในการเติมอาหารเท่ากัน คือ เติมอาหารทุก ๆ 3 ชั่วโมง แต่ในแต่ละครั้งจะมีการเติมอาหารด้วยช่วงเวลาที่แตกต่างกัน คือ 1, 3, 5, 7 และ 10 นาทีต่อครั้ง ทำการเพาะเลี้ยงในระบบ TIG เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชุดการทดลองที่เติมอาหารครั้งละ 3 นาทีจะให้น้ำหนักแห้ง และจำนวนยอดสูงกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 คือ 40.5 mg และ 3.6 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 ในขณะที่ชุดการทดลองอื่น ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

สำหรับลักษณะของเนื้อเยื่อภายหลังการเพาะเลี้ยงในระบบ TIG เป็นเวลา 4 สัปดาห์นั้น แสดงในภาพ 3 โดยชุดการทดลองที่เติมอาหารครั้งละ 1 นาทีนั้นพบว่าจะมีเพียงการแตกใบใหม่ออกมาบริเวณตาข้าง แต่จะไม่พบการแตกยอดใหม่ออกมาเช่นชุดการทดลองอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าทุกชุดการทดลองเนื้อเยื่อมีการเกิดแคลลัสบริเวณโคน และบริเวณปลายใบใบเป็นสีเขียวออก ลักษณะแผ่นใบหนา

ตารางที่ 2 น้ำหนักแห้งเฉลี่ย และจำนวนยอดเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของหญ้าหวานภายหลังการเพาะเลี้ยงในระบบ TIG โดยเติมอาหารด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ระยะเวลาในการเติมอาหาร	**น้ำหนักแห้งเฉลี่ย** (mg)	**จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ)**
1 นาที/ครั้ง	17.2±0.87^{b}	1.4±0.5^{b}
3 นาที/ครั้ง	40.5±1.08^{a}	3.6±1.2^{a}
5 นาที/ครั้ง	18.0±1.37^{b}	1.8±0.4^{b}
7 นาที/ครั้ง	13.7±1.35^{b}	1.7±1.1^{b}
10 นาที/ครั้ง	21.9±1.40^{b}	1.7±0.7^{b}

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

1 นาที

3 นาที

5 นาที

7 นาที

10 นาที

ภาพที่ 3 หญ้าหวานภายหลังการเพาะเลี้ยงในระบบ TIG โดยเติมอาหารด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกัน ทุก ๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การศึกษาสถานะของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนหญ้าหวาน

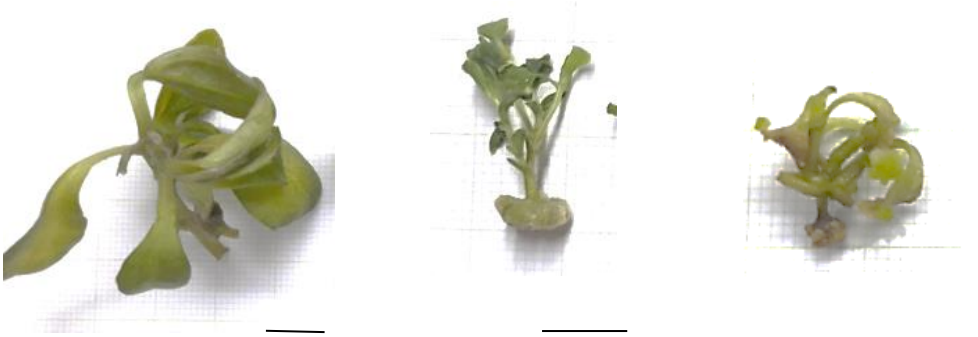
การทดลองที่ 1 และ 2 พบว่าชิ้นส่วนหญ้าหวานภายหลังการเพาะเลี้ยงในระบบ TIG โดยเติมอาหารครั้งละ 3 นาที ทุก ๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนมีน้ำหนักแห้ง และจำนวนยอดมากที่สุด ดังนั้นในการทดลองที่ 3 จึงได้นำชุดการทดลองดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าความเร็ว 110 รอบต่อนาที และการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25°C เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เช่นเดียวกัน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3 โดยการเพาะเลี้ยงในระบบ TIG จะทำให้ได้น้ำหนักแห้งเฉลี่ยมากที่สุด คือ 40.5 mg ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และอาหารวุ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในระบบ TIG และอาหารวุ้นให้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ 3.6 และ 3.1 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อตามลำดับ และอาหารเหลวทำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยได้น้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

สำหรับลักษณะของเนื้อเยื่อแสดงในภาพที่ 4 โดยเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารเหลวจะมีใบขนาดใหญ่ สีเขียวเข้ม และมีอาการฉ่ำน้ำ เมื่อนำไปอบจะเหลือน้ำหนักแห้งเพียงเล็กน้อย ยอดเจริญแบบไม่มีทิศทาง และไม่พบการเกิดแคลลัส สำหรับอาหารวุ้นเนื้อเยื่อจะมีการสร้างแคลลัสบริเวณโคนต้น ยอดอ่อนตั้งตรง ลักษณะยอด และใบแข็งแรง ไม่มีอาการบวมน้ำ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในระบบ TIG เนื้อเยื่อมีลักษณะต้น และใบอวบหนา เกิดแคลลัสบริเวณโคนต้น และปลายใบ ยอดเจริญอย่างมีทิศทาง

ตารางที่ 3 น้ำหนักแห้งเฉลี่ย และจำนวนยอดเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของหญ้าหวานภายหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว อาหารวุ้น และระบบ TIG เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สภาวะการเพาะเลี้ยง	**น้ำหนักแห้งเฉลี่ย** (mg)	**จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ)**
อาหารเหลว	0.0232±0.0150[b]	1.8889±0.5345[b]
อาหารวุ้น	0.0146±0.0062[b]	3.1429±1.6762[a]
ระบบ TIG	0.0405±0.0108[a]	3.6000±1.1832[a]

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันแสดงถึงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



อาหารเหลว **อาหารวุ้น** **ระบบ TIG**

ภาพที่ 4 หญ้าหวานภายหลังการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว อาหารวุ้น และระบบ TIG เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (bar = 1 cm)

วิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความถี่ในการเติมอาหารมากขึ้น น้ำหนักแห้งเฉลี่ยของหญ้าหวานก็จะยิ่งเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในชุดการทดลองที่เติมอาหารทุก ๆ 3 ชั่วโมง ดังนั้นความถี่ในการเติมอาหารจึงมีผลต่อการเจริญเติบโตของหญ้าหวานโดยการเพิ่มความถี่ในการเติมอาหารทำให้พืชจะได้รับสารอาหารมากขึ้นในแต่ละวัน อีกทั้งยังเป็นการชะล้างของเสียที่ชิ้นส่วนพืชปล่องออกมาได้มากขึ้น สอดคล้องกับ Rangsayatorn (2014) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มเอื้องเงินด้วยอาหารเหลวสูตร MS ในระบบแช่ชั่วคราว ผลการทดลองพบว่าเอื้องเงินที่เพาะเลี้ยงในระบบแช่ชั่วคราวที่เติมอาหารเป็นเวลา 5 นาที ทุก ๆ 2 ชั่วโมงเป็นชุดการทดลองที่ใช้ความถี่ในการเติมอาหารมากกว่าชุดการทดลองชุดอื่น ๆ มีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยอัตราการแตกยอดเอื้องเงินที่เพาะในระบบแช่ชั่วคราวเท่ากับ 2.9 นอกจากนี้ยังพบว่าต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในชุดการทดลองดังกล่าวไม่พบว่าเกิดอาการฉ่ำน้ำ แตกต่างจากงานวิจัยของ Ramirez-Mosqueda *et al.* (2016) ซึ่งรายงานว่าการเพาะเลี้ยงหญ้าหวานในระบบแช่ชั่วคราวแบบ RITA® ทำให้ยอดอ่อนของหญ้าหวานเกิดอาการฉ่ำน้ำ โดย Bhatia & Sharma (2015) ได้รายงานว่าสาเหตุหนึ่งของอาการฉ่ำน้ำในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น คือ ความชื้นสัมพัทธ์ในภาชนะเพาะเลี้ยง เนื่องจากระบบแช่ชั่วคราวแบบ RITA® นั้นภาชนะเป็นขวดเดียว และแบ่งเป็นส่วนบนสำหรับบรรจุเนื้อเยื่อและส่วนล่างบรรจุอาหาร การเติมอาหารทำโดยการใช้ปั๊มอัดอากาศไปที่ส่วนล่างเพื่อดันอาหารขึ้นไปแช่เนื้อเยื่อด้านบน ในระหว่างที่ดันอาหารขึ้น

อากาศก็จะถูกดันขึ้นบริเวณรอบ ๆ ภาชนะทำให้ชิ้นส่วนพืชที่อยู่ตรงกลางได้รับอากาศน้อยกว่า และในระหว่างที่ไม่ได้เติมอาหาร อาหารที่อยู่ส่วนล่างจะระเหยขึ้นมาด้านบนได้มากเนื่องจากส่วนบนและล่างนั้นถูกกั้นด้วยตะแกรงพลาสติคเท่านั้น เป็นเหตุให้ความชื้นสัมพัทธ์ในส่วนที่บรรจุเนื้อเยื่อนั้นสูงอยู่ตลอดเวลา ส่งผลให้ยอดเกิดอาการฉ่ำน้ำ แตกต่างจากระบบแช่ชั่วคราวแบบ temporary immersion gravity flask bioreactor (TIG) ซึ่งมีหลักการทำงานคือใช้ปั๊มดันอาหารเหลวจากขวดด้านล่างขึ้นไปขวดด้านบน และปล่อยให้อาหารไหลกลับลงมาเองตามแรงโน้มถ่วง โดยทั้ง 2 ขวดเชื่อมต่อกันด้วยท่อสแตนเลสเพียงท่อเดียว ดังนั้นไอน้ำจากอาหารจึงระเหยขึ้นมาที่ขวดบรรจุเนื้อเยื่อได้น้อย และไม่พบอาการฉ่ำน้ำของเนื้อเยื่อ สอดคล้องกับรายงานของ Venutolo & Aguilar (2015) ที่ศึกษาระบบแช่ชั่วคราวแบบ RITA®และแบบ BIT (Twin Flasks System) ก็พบว่า แบบ RIT ไม่พบอาการฉ่ำน้ำด้วยเช่นกัน เนื่องจากระบบดังกล่าวมีลักษณะเป็นฟลาสก์ 2 ใบ มีท่อส่งอาหารเชื่อมหากันเพียงท่อเดียวเช่นกัน และใช้ปั๊ม 2 เครื่อง ในการดันอาหารไป ดังนั้นในฟลาสก์ที่บรรจุเนื้อเยื่อจึงมีความชื้นสัมพัทธ์น้อยเช่นกัน

นอกจากนี้ยังพบว่ายอดของหญ้าหวานที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในระบบแช่ชั่วคราวแบบ TIG ทุกชุดการทดลองนั้นยอดและใบมีสีเขียว แตกต่างจากงานวิจัยของ Venutolo & Aguilar (2015) ซึ่งรายงานว่าการเพาะเลี้ยงหญ้าหวานในระบบแช่ชั่วคราวแบบ RITA® และแบบ BIT ทั้ง 2 แบบ พบอาการยอดและใบเป็นสีเหลืองปนน้ำตาล ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองดังกล่าวได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของหญ้าหวานในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Benzyladenine (BA) สอดคล้องกับรายงานของ Alexander & Esyanti (2016) ที่ศึกษาผลของ BA และ Kinetin ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวานพบว่าชุดการทดลองที่เติม BA ยอด และใบของหญ้าหวานเกิดเป็นสีเหลืองปนน้ำตาล และตายในที่สุด ในขณะที่การเติม Kinetin ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นทำให้ได้ยอดและใบที่มีสีเขียว เช่นเดียวกับผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้

ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าการเติมอาหารครั้งละ 3 นาที ทุก ๆ 3 ชั่วโมงนั้น จะให้น้ำหนักแห้ง และจำนวนยอดสูงกว่าการเติมอาหารครั้งละ 1, 5, 7 และ 10 นาทีต่อครั้ง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เนื่องจากการเติมอาหารเพียงครั้งละ 1 นาที นั้น อาจจะน้อยเกินไปทำให้พืชดูดซับสารอาหารได้ไม่เพียงพอ ในขณะที่การเติมอาหาร 5, 7 และ 10 นาที นั้น ก็อาจจะทำให้ชิ้นส่วนพืชแช่ในอาหารเหลวนานเกินไปทำให้เนื้อเยื่อขาดออกซิเจนได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามช่วงเวลาที่เหมาะนั้นจะแตกต่างกันตามชนิดของพืช และความถี่ในการเติมอาหารด้วย พืชบางชนิดต้องการเวลาในการเติมอาหารที่น้อย เช่น ต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องคำผักปราบมีรายงานว่าการเติมอาหารครั้งละ 1 นาที จะชักนำให้มีจำนวนยอดได้มากที่สุด (Kongbangkerd, Wongsa & Wannachart, 2012) เช่นเดียวกับต้นกล้ายูคาลิปตัสซึ่งมีรายงานว่าการเติมอาหารครั้งละ 1 นาที สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงที่สุด 4.97 เท่า (Sumkaew *et al*., 2010) ในขณะที่พืชบางชนิดก็ต้องการระยะเวลาในการเติมอาหารที่นานกว่า เช่น ยอดของกล็อกซีเนียมีรายงานว่าการให้อาหารเป็นเวลา 15 นาที ทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 วัน สามารถผลิตจำนวนยอดได้มากที่สุดด้วยอัตราการเพิ่มปริมาณยอดประมาณ 6 เท่า (Mongkolsook & Pongchan, 2000) และ โปรโตคอร์มเอื้องเงินที่เพาะเลี้ยงในระบบแช่ชั่วคราวที่เติมอาหารเป็นเวลา 5 นาที ทุกๆ 2 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยอัตราการแตกยอดเอื้องเงินที่เพาะในระบบจมชั่วคราวเท่ากับ 2.9 (Rangsayatorn, 2014) สำหรับลักษณะของเนื้อเยื่อภายหลังการเพาะเลี้ยงในระบบ TIG โดยเติมอาหารครั้งละ 3, 5, 7 และ 10 นาที ทุก ๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์นั้น เกิดแคลลัสบริเวณโคน และบริเวณปลายใบ และลักษณะแผ่นใบหนา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความถี่ และระยะเวลาในการเติมอาหารจะมีผลต่อการตอบสนองทางสัณฐานของชิ้นเนื้อเยื่อหญ้าหวานเช่นเดียวกับที่พบในการทดลองของ Ramirez-Mosqueda *et al*. (2016)

การเปรียบเทียบสภาวะในการเพาะเลี้ยง 3 แบบ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น อาหารเหลว และ ระบบ TIG พบว่า การเพาะเลี้ยงในระบบ TIG ให้น้ำหนักแห้งเฉลี่ยมากที่สุด สำหรับลักษณะของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารเหลวจะมีใบขนาดใหญ่ สีเขียวเข้ม และบวมน้ำ เนื่องจากแช่ในอาหารเหลวตลอดเวลาเนื้อเยื่อจึงมีลักษณะบวมน้ำเมื่อนำไปอบจะเหลือน้ำหนักแห้งเพียงเล็กน้อย ยอดเจริญแบบไม่มีทิศทางเนื่องจากโดนการเขย่าตลอดเวลา และไม่พบการเกิดแคลลัส สำหรับอาหารวุ้นเนื้อเยื่อจะมีการสร้างแคลลัสบริเวณโคนต้น เนื่องจากเป็นบริเวณที่สัมผัสกับอาหารโดยตรง ยอดอ่อนตั้งตรง ลักษณะยอด และใบแข็งแรง ไม่มีอาการบวมน้ำ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในระบบ TIG เนื้อเยื่อมีลักษณะต้น และใบอวบหนา เกิดแคลลัสบริเวณโคนต้น และปลายใบ ยอดเจริญอย่างมีทิศทาง ทั้งนี้เนื่องจากระบบ TIG นั้นรวมเอาข้อดีของอาหารวุ้น และอาหารเหลวเข้าไว้ด้วยกันคือ การใช้อาหารเหลวซึ่งพืชสามารถดูดซับไปใช้ได้ง่ายแทนอาหารวุ้น และค่อยๆ เติมอาหารเหลวลงไปในขวดเนื้อเยื่อเป็นช่วงเวลาสั้นๆ แล้วจึงปล่อยอาหารออกจากขวดเนื้อเยื่อจึงทำให้เนื้อเยื่อได้รับอาหารอย่างทั่วถึงทุกส่วน แต่ไม่มีอาการฉ่ำน้ำเช่นการเลี้ยงในอาหารเหลวตลอดเวลา นอกจากนี้เนื้อเยื่อยังได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอเช่นเดียวกับการเลี้ยงบนอาหารวุ้น ต้นอ่อนจึงมีความแข็งแรงเช่นเดียวกับการเลี้ยงบนอาหารวุ้น และเจริญเติบโตไวเหมือนกับการเลี้ยงในอาหารเหลว เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Vives *et al.* (2017) ซึ่งเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวานบนอาหารวุ้น อาหารเหลว และระบบ TIS ของ BIT® เป็นเวลา 21 วัน พบว่าระบบ TIS ของ BIT® ให้น้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เช่นเดียวกัน ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในระบบ TIG และอาหารวุ้นให้จำนวนยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ 3.6000 และ 3.1429 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อตามลำดับ และอาหารเหลวทำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยได้น้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เช่นเดียวกับ Mongkolsook & Pongchan (2000) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงยอดกล๊อกซีเนียในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพอาหารเหลวโดยระบบแช่ชั่วคราว 15 นาทีทุก ๆ 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น พบว่าการเพาะเลี้ยงโดยระบบแช่ชั่วคราว เป็นเวลา 60 วัน สามารถผลิตจำนวนยอดได้มากที่สุดด้วยอัตราการเพิ่มปริมาณยอดประมาณ 6 เท่า

ดังนั้นการเพาะเลี้ยงหญ้าหวานในระบบ TIG จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนที่แข็งแรง ทั้งยังเป็นวิธีที่ทำได้สะดวก และรวดเร็วเนื่องจากการเปลี่ยนอาหารทำได้ง่าย เพียงแค่เตรียมอาหารใหม่นำไปถ่ายในขวดเดิมได้เลย เพราะฉะนั้นจึงลดขั้นตอนการ Subculture และลดโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อน ลดค่าใช้จ่ายในส่วนของค่าแรง ลดพื้นที่ในห้องเพาะเลี้ยง (Culture Room) ลดต้นทุนสำหรับการเตรียมอาหารวุ้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

สรุปผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนขอของหญ้าหวานในระบบ TIG โดยการเติมอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 3 mg/L น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 5.7 ครั้งละ 3 นาที ทุกๆ 3 ชั่วโมง โดยนำไปเลี้ยงในสภาวะให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25ºC จะสามารถชักนำให้ได้น้ำหนักแห้งมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และบนอาหารวุ้น นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวอีกด้วย โดยไม่พบอาการฉ่ำน้ำอีกด้วย การเพาะเลี้ยงด้วยระบบ TIG จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตต้นอ่อนหญ้าหวานในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนการวิจัย จากมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ งบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 โดยการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ที่สนับสนุนในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Alexander V. & Esyanti R. (2016). Stimulation of stevioside accumulation on *Stevia rebaudiana* (Bertoni) shoot culture induced with red LED light in TIS RITA® bioreactor system. *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Biotechnology and Bioengineering*, *10*(12), 803-808.

Bhatia S. & Sharma K. (2015). Technical glitches in micropropagation. *In Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. (pp. 393-404). Elsevier Incorporated.

Chotikadachanarong K. & Dheeranupattana S. (2013). Micropropagation and acclimatization of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *16*(7), 887-890.

Etienne, H., Lartaud, M., Michaux-Ferriere, N., Carron, M. P., Berthouly, M. & Teisson, C. (1997). Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* using the temporary immersion technique. *In Vitro Cellular and Developmental Biology of Plant*, *33*, 81-87.

Kongbangkerd, A., Wongsa, T. & Wannachart, S. (2012). Factors affecting growth and development of in vitro young shoot culture of *Dendrobium ochreatum* Lindl. in a temporary immersion system. *Thai Journal of Botany*, *4*(Special Issue), 159-168. (In Thai)

Madan, S., Ahmad, S., Singh, G. N., Kohli, K., Kumar, Y., Singh, R. & Garg, M. (2010) *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni-A review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, *1*, 267-286.

Miyazaki, Y. & Wantenabe, H. (1974). Studies on the cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni; on the propagation of the plant (English abstr.). *Japanese Journal of Tropical Agriculture*, *17*, 154 – 157.

Mongkolsook, Y. & Pongchan, W. (2000). Gloxinia (*Sinningia speciosa*) micropropagation by using temporary immersion technique. In *Proceedings of the 38th Kasetsart University Annual Conference: Plants, Agricultural Extension and Communication.* (pp:387-390). Kasetsart University. (in Thai)

Ramirez- Mosqueda. M. A., Iglesias-Andreu, L. G., Ramirez-Madero, G. & Hernandez-Rincon, E. U. (2016) . Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. in temporary immersion systems and evaluation of genetic fidelity. *South African Journal of Botany*, *106,* 238-243.

Rangsayatorn, N. (2014). Micropropagation of *Dendrobium draconis* Rchb.f. by using temporary immersion system. In *Proceedings of 51st Kasetsart University Annual Conference: Plants.* (pp:312-318). Kasetsart University. (in Thai)

Sumkaew, R., Pankaew, Y., Puangchit, L., Siripatanadilok, S. & Kokkatiem, S. (2010) In vitro seedling of *Eucalyptus camaldulensis Dehnh*. using temporary immersion system with twin flasks. In *Proceedings of 48st Kasetsart University Annual Conference: Plants.* (pp:514-522). Kasetsart University. (in Thai)

Venutolo, S. A. & Aguilar, T. S. (2015). Mass micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in temporary immersion systems. *Cultivos Tropicales*, *36*(3), 50-57.

Vives, K., Andujar, I., Lorenzo, J. C. & Concepcion, O. (2017). Comparison of different in vitro micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion bioreactor (BIT®). *Plant Cell*, *Tissue and Organ Culture*, *131*, 195-199.