1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาสับปะรด

2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสับปะรด

กิจกรรม : การจัดการการผลิตสับปะรดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการจัดการโรคเหี่ยว

3. ชื่อการทดลอง : เปรียบเทียบเทคนิค suspension culture และ temporary immersion ในการขยายพันธุ์สับปะรด

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : ชยานิจ ดิษฐบรรจง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : กษิดิศ ดิษฐบรรจง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

: ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. **บทคัดย่อ**

ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณยอดอ่อนสับปะรดในอาหารเหลว (suspension culture) และระบบ temporary immersion bioreacter (TIB) โดยดำเนินการในสับปะรด 2 พันธุ์ พบว่าสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียสามารถเพิ่มปริมาณยอดอ่อนสูงสุด 22.4 เท่า ในอาหารเหลว MS ที่ประกอบด้วย BA 3 μM พันธุ์เพชรบุรีสามารถเพิ่มปริมาณยอดอ่อนได้ 18-19เท่า ในอาหารเหลว MS ที่ประกอบด้วย BA 3 -6 μM ร่วมกับNAA 2 μM ภายในเวลา 8สัปดาห์ โดยที่ยอดอ่อนที่เกิดขึ้นทั้งหมดไม่มีการพัฒนาเป็นราก ต้องชักนำให้เกิดราก บนอาหารแข็ง MS ที่เติม IBA 2-6 μM ส่วนการเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดอ่อนในระบบ TIB ในระยะเวลาที่เท่ากันสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย สามารถเพิ่มจำนวนยอดรวมสูงสุด 18.2 เท่าเมื่อใช้อาหาร MS เติม BA 3 μM ในขณะที่พันธุ์เพชรบุรีสามารถเพิ่มจำนวนยอดรวมได้ 16.4-15.6 เท่า เมื่อได้รับอาหาร MS ที่มี BA 3 และ 6 μM ร่วมกับ NAA 2 μM ตามลำดับ โดยมีระยะเวลาให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช 6-8 ครั้ง ต่อวัน ครั้งละ 1 นาที จะให้ผลต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวมสูงสุด ในขณะที่การเลี้ยงบนอาหารแข็งจะเพิ่มปริมาณได้เพียง 3 -4 เท่า

เมื่อเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณยอดรวมในอาหารเหลว และระบบ TIB จำนวนยอดรวมที่เกิดจากการเลี้ยงในอาหารเหลวจะมากกว่าในระบบ TIB เล็กน้อย เนื่องจากชิ้นส่วนของสับปะรด จะสัมผัสกับสารอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตอยู่ตลอดเวลา ทำให้ดูดซึมอาหารได้ดีกว่าซึ่งส่งผลให้จำนวนยอดรวมเพิ่มสูงสุด แต่การเลี้ยงในอาหารเหลวไม่มีการพัฒนาของราก ต้องนำไปชักนำให้เกิดรากก่อนลงปลูก และยังต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารทุก 2-3 สัปดาห์ ทำให้สิ้นเปลืองแรงงาน ในขณะที่การเลี้ยงในระบบ TIB ถึงแม้ว่าจะให้ปริมาณยอดรวมได้น้อยกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวเพียงเล็กน้อย แต่ไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารเลยตลอด 8 สัปดาห์ และนอกจากนี้ยังพบการพัฒนาของรากเกิดขึ้นบ้าง ซึ่งสามารถนำออก acclimatize ในสภาพโรงเรือนได้เลยและมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 89-90 % เหมาะสำหรับการนำไปขยายผลเพื่อการขยายพันธุ์ปริมาณมากๆ

6. คำนำ

สับปะรด (*Ananas comosus* (L.) Merr.) เป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ในเขตร้อนชื้น นอกจากบริโภคสดแล้ว ยังสามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ส่งเป็นสินค้าออก มีมูลค่ากว่าหมื่นล้านบาทในแต่ละปี ตามปกติขยายพันธุ์ด้วย vegetative part โดยใช้การแยกหน่อ ตะเกียง หรือจุก ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้เป็นวิธีที่ง่ายและนิยมใช้ แต่มีข้อเสียคือ มีอัตราการขยายเพิ่มปริมาณค่อนข้างต่ำ ไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ครั้งละมากๆ ไม่เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร จึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงการเพิ่มปริมาณเพื่อการขยายพันธุ์ โดยใช้วิธีการเพาะเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งมีศักยภาพมากกว่าการขยายพันธุ์ตามปกติ สามารถผลิตพืชได้จำนวนมากในระยะเวลาสั้น ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์และลดต้นทุน จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ ในช่วงเวลาที่ผ่านมา ได้มีรายงานการนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ขยายพันธุ์สับปะรด Zuraida et.al,2011 รายงานถึงความสำเร็จในการขยายพันธุ์สับปะรดในปริมาณมากในระบบอาหารเหลว ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณได้มากกว่าอาหารแข็ง แต่ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค Temporary Immersion Bioreactor มาใช้ในการขยายพันธุ์พืชหลายชนิดในปริมาณมาก เช่น กล้วย กาแฟ ซึ่งมีอัตราเพิ่มปริมาณยอดได้มากกว่าการเลี้ยงในอาหารแข็ง 5-10 เท่า และมีข้อดีคือ ชิ้นส่วนพืชไม่มีอาการฉ่ำน้ำ ประหยัดเวลาและแรงงานไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารบ่อยๆ เมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของการขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณยอดรวมของสับปะรดในระบบ Temporary Immersion Bioreactor เปรียบเทียบกับการขยายพันธุ์ในระบบอาหารเหลว

7. วิธีดำเนินการ

7.1 วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ

นำส่วนขยายพันธุ์ของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย และพันธุ์เพชรบุรี ได้แก่ หน่ออ่อนที่มีความสูงประมาณ 1 ฟุต จากศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี มาทำการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อ เนื่องจากหน่ออ่อนที่นำมาเพาะเลี้ยงนำมาจากแปลงปลูกมีการปนเปื้อนตามธรรมชาติสูงมาก มีวิธีการดังนี้

1. ลอกส่วนของใบออกจนสังเกตเห็นส่วนของตาและยอดยอด ล้างให้สะอาดในน้ำไหล
2. ทำการฟอกฆ่าเชื้อ 2 วิธี ดังนี้

วิธีที่1 ฟอกด้วยคลอร็อกเข้มข้น 15 % และ tween -20 นาน 15 นาที แล้วฟอกอีกครั้งด้วยคลอร็อกเข้มข้น 5 % และ tween -20 นาน 10 นาที (สถาบันวิจัยพืชสวน ,2546)

วิธีที่ 2 ฟอกด้วยคลอร็อกเข้มข้น 15 % และ tween -20 นาน 15 นาที ต่อจากนั้นนำมาแช่ใน cefotaxime 250 มิลลิกรัม ต่อลิตร และ สารเคมีสำหรับกำจัดเชื้อรา amphotheracin B เข้มข้น 1 : 500 เท่า นาน 2 ชั่วโมง

7.2 การพัฒนาเป็นยอดอ่อน

นำชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกทั้ง 2 วิธี ผ่าเป็น 4 ส่วน แล้วนำเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิด microshoot บนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 5 µM (Drew,1980) เพื่อให้พัฒนาเป็นยอดอ่อน และนำยอดอ่อนที่ได้ไปศึกษาการขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณต่อไป

7.3 ศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดอ่อนในอาหารแข็ง

นำยอดอ่อนของสับปะรดทั้ง 2 พันธุ์ ที่พัฒนามาจากการเลี้ยง บนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 5-10 µM (จากข้อ 2) มาศึกษาการเพิ่มปริมาณบนอาหารแข็ง โดยนำยอดที่มีความสูง 3-4 ซม. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0-20 ร่วมกับ NAA 0 ,2และ 4 น้ำตาลซูโครส 3 % gelright 6% วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 4 ซ้ำ แต่ละกรรมวิธี (treatment) มีชิ้นส่วนพืช 16 ชิ้น (8 ยอด) ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม IRRISTAT ประกอบด้วย 15 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 อาหาร S1 MS + BA 0 µM + NAA 0 µM
กรรมวิธีที่ 2 อาหาร S2 MS + BA 5 µM + NAA 0 µM
กรรมวิธีที่ 3 อาหาร S3 MS + BA 10 µM + NAA 0 µM
กรรมวิธีที่ 4 อาหาร S4 MS + BA 15 µM + NAA 0 µM
กรรมวิธีที่ 5 อาหาร S5 MS + BA 20 µM + NAA 0 µM
กรรมวิธีที่ 6 อาหาร S6 MS + BA 0 µM + NAA 2 µM
กรรมวิธีที่ 7 อาหาร S7 MS + BA 5 µM + NAA 2 µM
กรรมวิธีที่ 8 อาหาร S8 MS + BA 10 µM + NAA 2 µM
กรรมวิธีที่ 9 อาหาร S9 MS + BA 15 µM + NAA 2 µM
กรรมวิธีที่ 10 อาหาร S10 MS + BA 20 µM + NAA 2 µM
กรรมวิธีที่ 11 อาหาร S11 MS + BA 0 µM + NAA 4 µM
กรรมวิธีที่ 12 อาหาร S12 MS + BA 5 µM + NAA 4 µM
กรรมวิธีที่ 13 อาหาร S13 MS + BA 10 µM + NAA 4 µM
กรรมวิธีที่ 14 อาหาร S14 MS + BA 15 µM + NAA 4 µM
กรรมวิธีที่ 15 อาหาร S15 MS + BA 20 µM + NAA 4 µM

7.4 การเพิ่มปริมาณยอดอ่อนในอาหารเหลว

นำ microshoot ขนาดสูงประมาณ 2 -3 ซม. ที่เกิดจากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ไปเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 3 % pH 5.7 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตได้แก่ BA หรือ kinetin ร่วมกับ NAA เพื่อศึกษาผลตอบสนองระหว่าง สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่ม cytokinin 2 ชนิดคือ BA และ kinetin กับสารในกลุ่ม auxin ได้แก่ NAA โดยทำการทดลองในอาหาร 2 ชุด เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 4 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลอง (treatment) มีชิ้นส่วนพืช 16 ชิ้น (8 ยอด) ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม IRRISTAT

บันทึกผล : จำนวนยอดที่เพิ่มขึ้น ต่อ 1 ยอดภายใน 8 สัปดาห์

ชุดที่1 ใช้อาหาร MS ที่เติม combination ของ BA 0, 3 ,6 และ9 µM และ NAA 0, 2 และ 4 µM วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 อาหาร A1 ประกอบด้วยอาหาร MS +BA 0 µM + NAA 0 µM
กรรมวิธีที่ 2 อาหาร A2 ประกอบด้วยอาหาร MS +BA 3 µM + NAA 0 µM
กรรมวิธีที่ 3 อาหาร A3 ประกอบด้วยอาหาร MS +BA 6 µM + NAA 0 µM
กรรมวิธีที่ 4 อาหาร A4 ประกอบด้วยอาหาร MS +BA 9 µM + NAA 0 µM
กรรมวิธีที่ 5 อาหาร A5 ประกอบด้วยอาหาร MS +BA 3 µM + NAA 2 µM
กรรมวิธีที่ 6 อาหาร A6 ประกอบด้วยอาหาร MS +BA 6 µM + NAA 2 µM
กรรมวิธีที่ 7 อาหาร A7 ประกอบด้วยอาหาร MS +BA 9 µM + NAA 2 µM
กรรมวิธีที่ 8 อาหาร A8 ประกอบด้วยอาหาร MS +BA 3 µM + NAA 4 µM
กรรมวิธีที่ 9 อาหาร A9 ประกอบด้วยอาหาร MS +BA 6 µM + NAA 4 µM
กรรมวิธีที่ 10 อาหาร A10 ประกอบด้วยอาหาร MS +BA 9 µM + NAA 4 µM

ชุดที่2 ใช้อาหาร MS ที่เติม combination ของ kinetin 0, 3 ,6 และ 9 µM และ NAA 0, 2. และ 4 µM วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 อาหาร A1 ประกอบด้วยอาหาร MS + Kn 0 µM + NAA 0 µM
กรรมวิธีที่ 2 อาหาร A2 ประกอบด้วยอาหาร MS + Kn 3 µM + NAA 0 µM
กรรมวิธีที่ 3 อาหาร A3 ประกอบด้วยอาหาร MS + Kn 6 µM + NAA 0 µM
กรรมวิธีที่ 4 อาหาร A4 ประกอบด้วยอาหาร MS + Kn 9 µM + NAA 0 µM
กรรมวิธีที่ 5 อาหาร A5 ประกอบด้วยอาหาร MS + Kn 3 µM + NAA 2 µM
กรรมวิธีที่ 6 อาหาร A6 ประกอบด้วยอาหาร MS + Kn 6 µM + NAA 2 µM
กรรมวิธีที่ 7 อาหาร A7 ประกอบด้วยอาหาร MS + Kn 9 µM + NAA 2 µM
กรรมวิธีที่ 8 อาหาร A8 ประกอบด้วยอาหาร MS + Kn 3 µM + NAA 4 µM
กรรมวิธีที่ 9 อาหาร A9 ประกอบด้วยอาหาร MS + Kn 6 µM + NAA 4 µM
กรรมวิธีที่ 10 อาหาร A10 ประกอบด้วยอาหาร MS + Kn 9 µM + NAA 4 µM

7.5. การเพิ่มปริมาณยอดอ่อนในระบบ TIB

7.5.1 จัดตั้งระบบ TIB

7.5.2 ศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดรวม (micro shoot)ในระบบ TIB โดยใช้สูตรอาหารจากผลที่ดีที่สุดของการทดลองในอาหารเหลว ได้แก่ อาหาร MS เติม BA ความเข้มข้น 3 และ 6 µM และ BA ที่มีส่วนผสมของ NAA 2 µM โดยนำ microshoot ของสัปปะรดพันธุ์เพชรบุรี ขนาดสูงประมาณ 1 -2 ซม. ไปทำการทดลอง โดย microshoot 1 ยอด แบ่งเป็น 2 ส่วน นำไปทดลองเลี้ยงในระบบ TIB โดยใช้อาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการ

เจริญเติบโต ดังกล่าวข้างต้น ให้อาหารสัมผัสเนื้อเยื่อพืช วันละ 6 ครั้ง ๆ ละ1นาที เลี้ยงในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมง และไม่เปลี่ยนอาหารเลย วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 3 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลอง (treatment) มีชิ้นส่วนพืช 12 ชิ้น (6 ยอด)

บันทึกผล : จำนวนยอดที่เพิ่มขึ้น ต่อ 1 ยอด และความสูงของยอด หลังจากเลี้ยงในระบบ TIB นาน 8 สัปดาห์ กรรมวิธีประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 อาหาร MS + BA 3 μM

กรรมวิธีที่ 2 อาหาร MS + BA 6 μM

กรรมวิธีที่ 3 อาหาร MS + BA 3 μM + NAA 2 μM

กรรมวิธีที่ 4 อาหาร MS + BA 3 μM + NAA 2 μM

7.5.3 ศึกษาจำนวนครั้ง /วัน ที่อาหารสัมผัสเนื้อเยื่อพืช ต่อการเพิ่มปริมาณในระบบ TIB โดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด จากการทดลองในข้อ 7.5.2 ให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วน 2-8 ครั้งต่อวัน ครั้งละ 1 นาที ปริมาณอาหารที่ใช้ 150 ml. วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 3 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลอง (treatment) มีชิ้นส่วนพืช 12 ชิ้น (6 ยอด) บันทึกจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้น ต่อ 1 ยอด และความสูงของยอด หลังจากเลี้ยงในระบบ TIB นาน 8 สัปดาห์กรรมวิธีประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช 2 ครั้ง /วัน

กรรมวิธีที่ 2 อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช 4 ครั้ง /วัน

กรรมวิธีที่ 3 อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช 6 ครั้ง /วัน

กรรมวิธีที่ 4 อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช 8 ครั้ง /วัน

7.6 การชักนำให้เกิดราก

นำ microshoot ของสับปะรดพันธุ์เพชรบุรี และปัตตาเวีย ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 4 ระดับ คือ 0, 2 , 4 และ 6 μM น้ำตาล 3 % ปรับ pH 5.7 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 4 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลอง (treatment) มีชิ้นส่วนพืช 16 ยอด บันทึก อัตราการเกิดราก จำนวนราก และความยาวราก หลังเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ

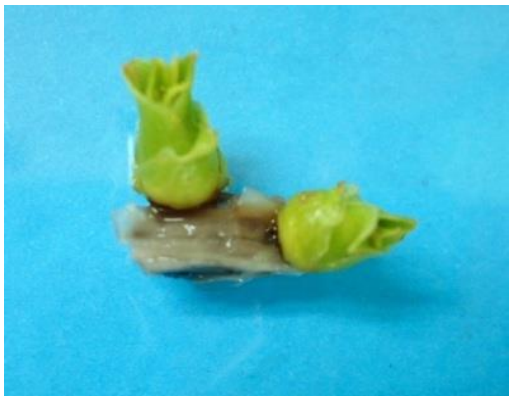
ผลการศึกษาการปนเปื้อนด้วยการฟอกฆ่าเชื้อ 2 วิธี ในพันธุ์ปัตตาเวีย และเพชรบุรี ภายหลังการเลี้ยง 2 สัปดาห์ บนอาหาร MS ที่เติม BA 5 μM ในสับปะรด 1 หน่อแบ่งเป็น 4 ส่วน(ชิ้น) เก็บข้อมูลการปนเปื้อนพันธุ์ละ 100 ชิ้น พบว่า วิธีการที่1 มีการปนเปื้อนของชิ้นส่วน สูงถึง 97- 100 % (ตารางที่1) โดยเป็นการปนปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ส่วนวิธีการที่ 2 มีการปนเปื้อนโดยรวม 48 -55 % เป็นการปนเปื้อนจากเชื้อราเป็นส่วนใหญ่

ตารางที่1 ผลของวิธีการฟอกฆ่าเชื้อต่ออัตราการปนเปื้อนในสับปะรด

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ	อัตราการปนเปื้อนจากราและแบคทีเรีย (%)	
	พันธุ์ปัตตาเวีย	พันธุ์เพชรบุรี
1. ฟอก 2 ครั้งด้วยคลอรอกซ์ 15 % และทวีน 20%	97	100
2. คลอร็อก 15 % และ tween -20 นาน 15 นาที ต่อจากนั้นนำมาแช่ใน cefotaxime 250 มิลลิกรัม ต่อลิตร และ สารเคมีสำหรับกำจัดเชื้อรา amphotheracin B เข้มข้น 1 : 500 เท่า นาน 2 ชั่วโมง	55	48

8.2 การพัฒนาเป็นยอดอ่อน

เมื่อนำชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย และเพชรบุรี เลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 5 µM เพื่อชักนำให้เกิด microshoot พบว่าหลังจากเลี้ยงนาน 3 -4 สัปดาห์ มีการพัฒนาโดยเริ่มแตก microshoot ออกมาจากตาข้าง เลี้ยงต่อไปอีก 4-6 สัปดาห์จนมีขนาดประมาณ 1 ซม ต่อจากนั้นนำมาแบ่งเป็น 4 ส่วน แล้วนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหารเดิม จนได้ยอดอ่อนที่มีปริมาณมากพอสำหรับศึกษาเพิ่มปริมาณในขั้นต่อไป



ภาพที่ 1. การพัฒนาของ Microshoot จากตาข้างของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์

8.3 การเพิ่มปริมาณยอดอ่อนในอาหารแข็ง

นำยอดอ่อนของสับปะรดทั้ง 2 พันธุ์ อายุ 4 เดือนที่พัฒนามาจากการเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 5 µM มาศึกษาการเพิ่มปริมาณบนอาหารแข็ง โดยนำยอดมาผ่ากลางตามยาวแบ่งเป็น 2 ส่วน แล้ว เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มี BA อย่างเดียว หรือ BA ร่วมกับ NAA น้ำตาลซูโครส 3 % gelright 0.3 %(v/w) พบว่าภายใน 2-3 สัปดาห์ มีการพัฒนาโดยเริ่มแตก microshoot ออกมาจากตาข้าง

หลังจากใช้เวลาเพิ่มปริมาณบนอาหารแข็งนาน 2 เดือน นับจำนวน microshoot ที่มีความสูงมากกว่า 1 ซม. พบว่าในสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย สามารถปริมาณ microshoot เพิ่มขึ้นสูงสุด 4.5 - 4.7 ยอด เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มี BA 5 และ 10 µM อย่างเดียวโดยไม่เติม NAA ส่วนการเลี้ยงบนอาหารที่มีส่วนประกอบของ BA 5 และ 10 µM ร่วมกับ NAA 2 µM ให้ปริมาณ microshoot 4.2- 4.3 ยอดแต่เมื่อเพิ่มปริมาณ NAA สูงขึ้นเป็น 4 µM โดยมี BA หรือมี BA 5-20 µM เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง ปริมาณ microshoot ที่เกิดขึ้นลดลง แสดงให้เห็น NAA ในปริมาณที่สูงขึ้น จะมีผลให้ ปริมาณ microshoot ที่เกิดลดน้อยลงด้วย สำหรับสับปะรดพันธุ์เพชรบุรี ให้ปริมาณ microshoot สูงสุด 3.5 - 3.7 ยอด บนอาหารที่มีส่วนประกอบของ BA 5 และ 10 µM ร่วมกับ NAA 2 µM ในขณะที่การเลี้ยงบนอาหารที่มี BA 5 – 10 µM เพียงอย่างเดียวให้ปริมาณ microshoot เพียง 2.7-2.8 ยอดเท่านั้น แสดงให้เห็นถึงผลของ NAA ในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดยอดของสับปะรดพันธุ์เพชรบุรี (ตาราง 2)

จากผลการทดลองเพิ่มปริมาณ microshoot บนอาหารแข็ง สับปะรดทั้ง 2 ชนิด มีการตอบสนองของสารควบคุมการเจริญเติบโต ในกลุ่มของ Auxin และ Cytokinin ที่ต่างกัน พันธุ์ปัตตาเวียเกิด microshoot สูงสุด บนอาหารที่มี BA 5 และ10 µM เพียงอย่างเดียว ในขณะ การเติม NAA 2 µM ให้ผลดีในพันธุ์เพชรบุรี ในพืชหลายชนิด เช่นสน (*Ficus Benjamina* vars.Natasja and starlight) และ Maspine pineapple (Zuraida et.al, 2011) การใช้ BA ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Cytokinin เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดตาข้างและเจริญเติบโตเป็นยอดอ่อนขนาดเล็กได้ในปริมาณมากแต่ต้องอยู่ในปริมาณที่เหมาะสมและไม่สูงเกินไป(Appelgren, 1985) อย่างไรก็ตามการเติม NAA ปริมาณไม่มาก ร่วมกับ BA ก็มีความจำเป็นในการชักนำให้เกิดตายอดและเพิ่มปริมาณในสับปะรดพันธุ์เพชรบุรี ทั้งนี้ขึ้นกับ genotype specific

ภาพที่ 2 การพัฒนา microshoot ของสับปะรดปัตตาเวีย บนอาหารแข็ง MS ที่มี BA 5 µM

ตารางที่2. ผลของ BA และNAA ต่อการเพิ่มปริมาณ microshoot บนอาหารแข็ง MSของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย และเพชรบุรี

Media	พันธุ์ปัตตาเวีย microshoot/shoot	พันธุ์เพชรบุรี microshoot/shoot
S1 : MS + BA 0 µM + NAA 0 µM	1.3 cd	1.1 d
S2 : MS + BA 5 µM + NAA 0 µM	4.5 a	2.7 bc
S3 : MS + BA 10 µM + NAA 0 µM	4.7 a	2.8 b
S4 : MS + BA 15 µM + NAA 0 µM	3.3 b	2.3 c
S5 : MS + BA 20 µM + NAA 0 µM	3.1 b	1.4 d
S6 : MS + BA 0 µM + NAA 2 µM	1.2 d	0.9 d
S7 : MS + BA 5 µM + NAA 2 µM	4.3 a	3.7 a
S8 : MS + BA 10 µM + NAA 2 µM	4.2 a	3.5 a
S9 : MS + BA 15 µM + NAA 2 µM	3.4 b	2.7 bc
S10: MS + BA 20µM + NAA 2 µM	2.9 b	2.8 b
S11: MS + BA 0 µM + NAA 4 µM	1.1 d	1.2 d
S12: MS + BA 5 µM + NAA 4 µM	3.1 b	1.8 cd
S13: MS + BA 10 µM + NAA 4 µM	2.9 b	1.9 c
S14: MS + BA 15 µM + NAA 4 µM	2.1 c	1.9 c
S15: MS + BA 20 µM + NAA 4 µM	1.8 cd	1.7 cd
% CV	32.2	29.7

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

3. การเพิ่มปริมาณยอดอ่อนในอาหารเหลว

จากการนำ microshoot ขนาดสูงประมาณ 3 -4 ซม. ที่เกิดจากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ไปเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตได้แก่ BA หรือ kinetin ร่วมกับ NAA เพื่อศึกษาผลตอบสนองระหว่าง สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่ม cytokinin 2 ชนิดคือ BA และ kinetin กับสารในกลุ่ม auxin ได้แก่ NAA โดยทำการทดลองในอาหาร 2 ชุด ทำการบันทึกจำนวนยอดที่มีขนาดสูงมากกว่า 1 ซม. หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวนาน 6 สัปดาห์ พบว่าสับปะรดทั้ง 2พันธุ์มีการตอบสนองต่อ BA มากกว่า kinetin

ตารางที่ 3. ผลของ BA และ NAA ต่อการเติบโตเพิ่มปริมาณยอดในอาหารเหลว

Media 1	พันธุ์ปัตตาเวีย	พันธุ์เพชรบุรี
	microshoot/shoot	microshoot/shoot
A 1 : MS	2.6 d	2.0 e
A 2 : MS+BA 3 µM	22.4 a	6.3 d
A 3 : MS+BA 6 µM	16.0 ab	11.7 bc
A 4 : MS+BA 9 µM	8.3 c	14.7 bc
A 5 : MS+BA 3 µM + NAA 2 µM	18.4 ab	19.3 a
A 6 : MS+BA 6 µM + NAA 2 µM	15.7 b	18.0 a
A 7 : MS+BA 9 µM + NAA 2 µM	11.7 b	13.3 b
A 8 : MS+BA 3 µM + NAA 4 µM	8.7 c	11.7 bc
A 9 : MS+BA 6 µM + NAA 4 µM	6.0 c	13.7 b
A 10 : MS+BA 9 µM + NAA 4 µM	6.3 c	10.3 c
cv %	31.2	27.7

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 4. ผลของ KN และ NAA ต่อการเติบโตเพิ่มปริมาณยอดในอาหารเหลว

Media 2	พันธุ์ปัตตาเวีย	พันธุ์เพชรบุรี
	microshoot/shoot	microshoot/shoot
B 1 : MS	3.0 d	3.3 c
B 2 : MS + KN 3 µM	10.0 ab	5.7 c
B 3 : MS + KN 6 µM	10.3 ab	6.3 c
B 4 : MS + KN 9 µM	13.7 a	5.3 c
B 5 : MS + KN 3 µM + NAA 2 µM	4.3 d	11.0 b
B 6 : MS + KN 6 µM + NAA 2 µM	8.3 bc	9.7 b
B 7 : MS + KN 9 µM + NAA 2 µm	8.7 bc	15.7 a
B 8 : MS + KN 3 µM + NAA 4 µM	5.3 c	9.3 b
B 9 : MS + KN 6 µM + NAA 4 µM	6.3 c	10.7 b
B 10 : MS +KN 9 µM + NAA 4 µM	6.0 c	10.3 b
cv %	30.1	31.2

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

2 week 4 week 8 week

ภาพที่ 3. การเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณยอด ของสับปะรดปัตตาเวียที่เลี้ยงในอาหารเหลว MS เติม BA 3 µM หลังจากเลี้ยงนาน 2 4 และ 8 สัปดาห์

ภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์แรก ชิ้นส่วนของ microshoot มีการพัฒนาเกิด adventitious bud จำนวนมาก และพัฒนาเป็นยอดขนาดเล็กๆ และเมื่อเลี้ยงต่อไปจนถึงสัปดาห์ที่ 8 ยอดอ่อนจะเติบโตเพิ่มความสูง ทำการบันทึกจำนวนยอดที่มีความสูงมากกว่า 1 ซม. ที่เพิ่มขึ้น อาหารชุดที่ 1 ซึ่งมีส่วนประกอบ ของ BAและ NAA สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียสามารถเพิ่มปริมาณยอดอ่อนสูงสุด 22.4 ยอด ในอาหารเหลว MS ที่ประกอบด้วย BA 3 µM พันธุ์เพชรบุรีสามารถเพิ่มปริมาณยอดอ่อนได้ 19.3 และ 18.0 ยอด ในอาหารเหลว MS ที่ประกอบด้วย BA 3 µM+ NAA 2 µM และ อาหารเหลว MS ที่ประกอบด้วย BA 6 µM+ NAA 2 µM โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ(ตารางที 3) และนอกจากนี้ยังมียอดที่มีขนาดเล็กกว่า 1 ซม อีกจำนวนมาก

ส่วนการเลี้ยงสับปะรดทั้ง 2 พันธุ์ในอาหารชุดที่ 2 ซึ่งมีส่วนประกอบ ของ kinetin และ NAA พบว่า พันธุ์ปัตตาเวียเพิ่มปริมาณยอดได้สูงสุดเพียง 13.7 ยอด ในอาหารเหลว MS ที่มี KN 9 µM และพันธุ์เพชรบุรีสามารถเพิ่มปริมาณยอดได้สูงสุด 15.7 ยอด / ในอาหารเหลว MS ที่มี KN 9 µM และ NAA 2 µM (ตารางที่4) จากการเปรียบเทียบอาหารทั้ง 2 ชุด พบว่าสับปะรดทั้ง 2 พันธุ์จะมีการตอบสนองเพิ่มปริมาณยอดรวมสูงสุดในอาหารที่มี BA และ BA ร่วมกับ NAA มากกว่าอาหารที่มี Kinetin ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์ (genotype specific) ในสับปะรดบางพันธุ์สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้มากในอาหารที่มีส่วนประกอบของ kinetin1.5 mg/l และ NAA 0.5 mg/l เช่น สับปะรดพันธุ์ Madhupur ของบังคลาเทศ (Atique Akbar et al.2003)

การเลี้ยงในอาหารเหลว จะสามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้สูงถึง 19.3 – 22.4 ยอด ในขณะที่การเลี้ยงบนอาหารแข็ง เพิ่มปริมาณได้เพียง 3.7- 4.7 ยอดต่อ 1 ยอด ภายในระยะเวลาเท่ากัน อย่างไรก็ตามยอดที่เกิดจากอาหารเหลวจะมีขนาดเล็กกว่าที่เกิดจากอาหารแข็ง สาเหตุที่ชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยงในอาหารเหลวมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่า เป็นผลจากการที่ชิ้นส่วนที่ชักนำ มีพื้นที่ในการได้สัมผัสอาหารได้มากกว่าอาหารแข็ง ทำให้ดูดซึมธาตุอาหารได้มากขึ้น (George and Sherrington,1984 ; Alvard et al., 1993) นอกจากนี้อาหารเหลวจะชะล้างสารประกอบ Phenolic ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตออกจากชิ้นส่วนพืช จึงทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่าอาหารแข็ง (Kyte and Kleyn,1996) อย่างไรก็ตามการเลี้ยงในอาหารเหลวถึงแม้สามารชักนำให้เกิดยอดรวมได้ในปริมาณมาก แต่ยอดที่ได้จะมีลักษณะฉ่ำน้ำยังไม่มีการพัฒนาของราก จำเป็นต้องทำการชักนำให้เกิดรากต่อไป

4. การเพิ่มปริมาณยอดอ่อนในระบบ TIB

4.1 จัดตั้งระบบการเลี้ยงแบบ Temporary immersion Bioreacter

ทำการจัดตั้งระบบ TIB 1 ระบบ เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ ประกอบด้วย

สายอากาศ 1 และ 2 หุน	5 เมตร
Ananlog timer kits	1 ชุด
Solenoid cap	2 ตัว
Air pump	1 ชุด
Cellulose nitrate filter	30 ตัว
Plant and medium vessel	30 ขวด
วาลว์ปรับระดับอากาศ	16 ตัว
Standing	1 ตัว

สายซิลิโคน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12, 8 และ 6 มิลลิเมตร 4 เมตร

ขวดแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 500 ml. 15 คู่

ระบบ Temporary Immersion Bioreactor (TIB) เป็นวีการหนึ่งที่ใช้เลี้ยงต้นอ่อนเพื่อเพิ่มปริมาณในสภาพปลอดเชื้อ เป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวทั้งหมด ระบบการเลี้ยงแบบนี้ประกอบด้วย ขวดใส่พืช (plant vessel) และขวดใส่อาหาร (medium vessel) ซึ่งขวดทั้งสองจะเชื่อมต่อกันทางสายยาง โดยขวดที่ใส่อาหารเหลวจะอยู่ในระดับต่ำกว่า เมื่อต้องการจะให้อาหารชิ้นส่วนพืชจะทำการอัดแรงดันลมผ่านไปทางขวดใส่อาหาร โดยใช้แรงดันอากาศ ตั้งแต่ 1 – 30 นาที ขึ้นกับชนิดพืช และปริมาณอาหาร แรงดันลมจะดันอาหารให้ไหลขึ้นไปยังขวดใส่ชิ้นส่วนพืช โดยในขั้นตอนนี้อากาศที่อยู่ในขวดใส่ชิ้นส่วนพืชจะถ่ายเทออกไปด้วย และเมื่อครบกำหนดเวลาที่ให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช ทำการปิดแรงลม อาหารที่อยู่ในขวดใส่ชิ้นส่วนพืช จะไหลกลับมายังขวดใส่อาหารตามแรงโน้มถ่วง ดังนั้นอาหารจะเคลือบอยู่บนผิวของชิ้นส่วนพืช ซึ่งพืชจะใช้ในการเจริญเติบโตต่อไป

เมื่อจัดตั้งระบบ TIB แล้ว ทำการทดสอบประสิทธิภาพของระบบ โดยใช้หน่ออ่อนของสับปะรดปัตตาเวียและเพชรบุรี พบว่าระบบดังกล่าว สามารถใช้งานได้ดี มีการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียเล็กน้อย

ภาพที่4 ระบบTIB ที่ประกอบด้วยขวดแก้วขนาดความจุ 500 มิลลิลิตร

4.2 ศึกษาการเพิ่มปริมาณ ยอดรวมของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย และเพชรบุรี ในระบบ TIB

การศึกษาครั้งนี้ใช้อาหาร MS ที่มี BA อย่างเดียวเข้มข้น 3 และ 6 µM และอาหารที่มีส่วนประกอบของ BA 3 และ 6 µM และ NAA 2 µM ซึ่งเป็นอาหารสูตรที่ให้ผลดีที่สุดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว และให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช วันละ 6 ครั้ง ๆละ 1 นาที ปริมาณอาหารต่อขวดเท่ากับ 150 มิลลิลิตร

จากการศึกษาหลังการเลี้ยงในระบบ นาน 8 สัปดาห์ พบว่าสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย สามารถเพิ่มจำนวนยอดรวมสูงสุด 18.2 ยอด ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น 1 ยอดเมื่อใช้อาหาร MS + BA 3 µM เพียงอย่างเดียว ในขณะที่พันธุ์เพชรบุรีสามารถเพิ่มจำนวนยอดรวมได้ 16.4 และ 15.6 ยอดเมื่อได้รับอาหาร MS ที่มี BA 3 และ 6 µM ร่วมกับ NAA 2 µM (ตารางที่ 5) และเมื่อศึกษาจำนวนครั้งที่ให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช ต่อ 1 วัน พบว่า ในระบบที่ให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช 8 ครั้งต่อวัน ให้ผลดีที่สุดในสับปะรดทั้ง 2 พันธุ์ โดยมีปริมาณยอดรวมที่เกิดขึ้นเท่ากับ 19 และ 17 ยอดในสับปะรดปัตตาเวีย และ เพชรบุรี ตามลำดับ (ตารางที่ 6) นอกจากนี้การปั้มอาหารเหลวให้สัมผัสชิ้นส่วนพืช ครั้งละ 1 นาที ก็เพียงพอสำหรับ เนื่องจากปริมาณอาหารที่ใช้เพียง 150 มิลลิลิตร

การศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่ามีการพัฒนาของรากเกิดขึ้นจากการเลี้ยงในระบบ TIB (ภาพที่ 5) ในขณะที่การเลี้ยงในอาหารเหลวไม่มีการพัฒนาเป็นราก ถึงแม้ว่าปริมาณยอดรวมที่เกิดขึ้นจะน้อยกว่าเลี้ยงในอาหารเหลว ทั้งนี้เป็นเพราะชิ้นส่วนสับปะรดไม่ได้สัมผัสอาหารตลอดเวลาเหมือนกับการเลี้ยงในอาหารเหลว การเลี้ยงในอาหารเหลวทำให้เกิดการพัฒนาเป็นยอด ของ shoot meristem ตลอดเวลาซึ่งจะไปยับยั้งการพัฒนาของ Root Primodia จึงไม่มีการพัฒนาของรากเกิดขึ้นได้ (Zuraida,*et al*. 2011) นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณยอดรวมในระบบTIB ยังสามารถประหยัดต้นทุนของอาหาร และแรงงานในการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ซึ่งระบบ TIB ไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารเลยเหมาะสมสำหรับการผลิตปริมาณมากในเชิงการค้า

การขยายพันธุ์สับปะรดด้วยระบบ TIB เป็นการรวมข้อดีของการเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลวเข้าด้วยกัน โดยที่ในระบบอาหารแข็ง ชิ้นส่วนพืชจะสัมผัสกับอากาศแต่ไม่สัมผัสอาหารทั้งชิ้นส่วน ส่วนในอาหารเหลวพืชจะสัมผัสอาหารอยู่ตลอดเวลา ไม่สัมผัสอากาศ จึงทำให้เกิดการบวมหรือฉ่ำน้ำ (Smith and Spoomer,1995 ; Aitken *et al*. 1995) ส่วนการขยายพันธุ์ในระบบ TIB วิธีการนี้เป็นการให้อาหารพืชอย่างต่อเนื่อง มีการให้ชิ้นส่วนสัมผัสอาหารอย่างทั่วถึงเป็นเวลา

ข้อดีของการขยายพันธุ์สับปะรดด้วยระบบ TIB สามารถลดแรงงานและเวลาในการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ต้นอ่อนที่ได้จะใช้เวลาในการเจริญเติบโตเร็วกว่าอาหารแข็ง (Etienne and Berthouly, 2002) นอกจากนี้ยังสามารถลดจำนวนขวดและพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง รวมทั้งลดการ Sub –culture อีกด้วย (Chu , 1995) แต่อย่างไรก็ตาม ยังคงมีข้อจำกัด วิธีนี้จะง่ายต่อการปนเปื้อนของเชื้อในระบบ เนื่องจากมีรอยรั่วบริเวณฝาปิด และการเชื่อมต่อสายยางซิลิโคน การดำเนินการจึงต้องใช้ความระมัดระวังเป็นพิเศษ และในพืชแต่ละชนิดจะต้องศึกษาสารอาหาร และช่วงเวลาที่เหมาะสมในการให้อาหาร นอกจากนี้ การปรับระดับความดันอากาศที่จะเข้าสู่ขวดแต่ละขวด ต้องมีความเหมาะสม แรงดันที่สูงเกินไปอาจไปลดประสิทธิภาพ ของ Air filter จะทำให้ปนเปื้อนง่ายขึ้น

ตารางที่5. ผลของ BA และ NAA ต่อจำนวนยอดรวม และความสูงเฉลี่ยของสับปะรด ในระบบ TIB ที่ได้รับ อาหาร 6ครั้ง/วัน

Media composition	ปัตตาเวีย	เพชรบุรี
	No.of microshoots/shoot	No.of microshoots/shoot
1. MS + BA 3 µM	18.2 a	10.3 b
2. MS + BA 6µM	15.3 bc	9.1 b
3. MS + BA 3µM+NAA 2 µM	17.4 ab	16.4 a
4. MS+ BA 6µM+ NAA 2 µM	12.1 c	15.6 a
CV	26.8	29.4

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่6. ผลของจำนวนครั้งที่อาหารสัมผัสชิ้นส่วนสับปะรดต่อการเพิ่มยอดรวม หลังเลี้ยงในระบบTIB นาน8 สัปดาห์ ในอาหาร MS + BA 3µM+NAA 2 µM

Times/day	ปัตตาเวีย	เพชรบุรี
	No.of microshoots/shoot	No.of microshoots/shoot
2	6.4 c	5.8 c
4	12.3 b	10.6 b
6	18.7 a	15.4 ab
8	19.1 a	17.1 a
CV	28.7	29.4

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของสับปะรดเพชรบุรีที่เลี้ยงในระบบ TIB ใช้อาหาร MS เติม BA 3 µM และ NAA 2 µM เวลาที่อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช 8 ครั้ง /วัน หลังจากเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์

4.3 การชักนำให้เกิดราก

จากการเพิ่มปริมาณยอดรวมในอาหารเหลวซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณยอดรวมได้จำนวนมากแต่ไม่พบการพัฒนาของราก จึงต้องนำมาชักนำให้เกิดรากก่อนลงปลูก

ศึกษาการเกิดรากของสับปะรดที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณยอดรวมในอาหารเหลว ในอาหารแข็ง 4 สูตร ได้แก่ MS + IBA ระดับต่างๆ 4 ระดับ คือ 0, 2, 4, 6 µM ระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียออกรากได้ดี 93.7 % ในอาหาร MS ที่มีส่วนประกอบของ IBA 2 และ 4 µM มีจำนวนรากต่อ 1 ยอด ระหว่าง 13.2-13.7 ราก และความยาวราก 7.9-8.1 ซม. โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่สับปะรดพันธุ์เพชรบุรี มีอัตราการเกิดรากสูงสุด100 % และมีจำนวนรากสูงถึง 13.7 ราก เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติม IBA 4 µM ส่วนความยาวรากไม่แตกต่างกันทางสถิติ ระหว่างอาหารที่เติม IBA 4-6 µM (ตารางที่7)

ตารางที่7 ผลของ IBA ต่อการเกิดรากของสับปะรด

Media composition	ปัตตาเวีย			เพชรบุรี		
	% rooting	No.of roots/explant	root length(cm)	% rooting	No.of roots/explant	root lenght(cm)
1. MS + IBA 0 µM	81.2	3.8 c	2.6 c	75	4.6 c	2.8 b
2. MS + IBA 2 µM	93.7	13.7 a	8.1 a	93.7	9.3 b	6.4 ab
3. MS + IBA 4 µM	93.7	13.2 a	7.9 a	100	13.7 a	8.1 a
4. MS + IBA 6 µM	87.5	9.8 b	5.2 ab	93.7	10.1 ab	8..9 a
CV		29.5	27.9		28.6	31.4

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ภาพที่ 6 เปรียบเทียบจำนวนและความยาวราก หลังจากทำการชักนำให้เกิดราก บนอาหาร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้นต่างๆ นาน 6 สัปดาห์

4.4 การนำออกปลูกในสภาพโรงเรือน

เมื่อนำสับปะรดที่เกิดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว และจากระบบ TIB ออกปลูกในสภาพโรงเรือน พบว่าสับปะรดที่ขยายพันธุ์ในระบบ TIB มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 89 .4 - 90.8 % ในพันธุ์ปัตตาเวีย และเพชรบุรีตามลำดับ ในขณะที่สับปะรดที่เกิดจากการเลี้ยงในอาหารเหลว มีอัตราการเลี้ยงรอด 78- 86 % แต่สับปะรดจากทั้งอาหารเหลว และ TIB มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน

ภาพที่ 7. การเจริญเติบโตของสับปะรดพันธุ์เพชรบุรีหลังนำออกปลูกในสภาพโรงเรือน

สรุปผลการทดลอง

1. การเพิ่มปริมาณ microshoot บนอาหารแข็ง สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียและเพชรบุรี มีการตอบสนองของสารควบคุมการเจริญเติบโต ในกลุ่มของ Auxin และ Cytokinin ที่ต่างกัน พันธุ์ปัตตาเวียเกิด microshoot สูงสุด 4.7 เท่า บนอาหาร MSที่มี BA 5 µM เพียงอย่างเดียว ในขณะที่พันธุ์เพชรบุรี เพิ่มได้ 3.7 เท่าบนอาหาร MSที่มี BA 5 µM +NAA 2 µM

2. สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียสามารถเพิ่มปริมาณยอดอ่อนสูงสุด 22.4 เท่าในอาหารเหลว MS ที่ประกอบด้วย BA 3 µM พันธุ์เพชรบุรีสามารถเพิ่มปริมาณยอดอ่อนได้ 18-19เท่า ในอาหารเหลว MS ที่ประกอบด้วย BA 3 -6 µM ร่วมกับNAA 2 µM ภายในเวลา 8 สัปดาห์ โดยที่ยอดอ่อนที่เกิดขึ้นทั้งหมดไม่มีการพัฒนาเป็นราก ต้องชักนำให้เกิดราก บนอาหารแข็ง MS ที่เติม IBA 2-4 µM ในพันธุ์ปัตตาเวีย และ IBA 4-6 µM ในพันธุ์เพชรบุรี

3. จากการศึกษาการเพิ่มปริมาณ ยอดรวมในระบบ TIB ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย สามารถเพิ่มจำนวนยอดรวมสูงสุด 18.2 เท่าเมื่อใช้อาหาร MS เติม BA 3 µM ในขณะที่พันธุ์เพชรบุรีสามารถเพิ่มจำนวนยอดรวมได้ 16.4-15.6 เท่าเมื่อได้รับอาหาร MS ที่มี BA 3 และ 6 µM ร่วมกับ NAA 2 µM

ตามลำดับ นอกจากนี้ระยะเวลาให้อาหารสัมผัสชิ้นส่วนพืช 6-8 ครั้ง ต่อวัน ครั้งละ 1 นาที จะให้ผลต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวมสูงสุด

4. เมื่อเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณยอดรวมบนอาหารแข็ง อาหารเหลว และระบบ TIB พบว่าจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงในอาหารเหลวและในระบบ TIB จะมากกว่าเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง ในระยะเวลาที่เท่ากัน แต่จะให้ยอดที่มีขนาดเล็กกว่าเลี้ยงบนอาหารแข็ง แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงในอาหารเหลวและ TIB พบว่า จำนวนยอดรวมที่เกิดจากการเลี้ยงในอาหารเหลวจะมากกว่าในระบบ TIB เล็กน้อย เนื่องจากชิ้นส่วนของสับปะรด จะสัมผัสกับสารอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตอยู่ตลอดเวลา ทำให้ดูดซึมอาหารได้ดีกว่าซึ่งส่งผลให้จำนวนยอดรวมเพิ่มสูงสุด แต่การเลี้ยงในอาหารเหลวไม่มีการพัฒนาของราก ต้องนำไปชักนำให้เกิดรากก่อนลงปลูก และยังต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารทุก 2-3 สัปดาห์ ทำให้สิ้นเปลืองแรงงาน ในขณะที่การเลี้ยงในระบบ TIB ถึงแม้ว่าจะให้ปริมาณยอดรวมได้น้อยกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวเพียงเล็กน้อย แต่ไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารเลยตลอด 8 สัปดาห์ และนอกจากนี้ยังพบการพัฒนาของรากเกิดขึ้นบ้าง ซึ่งสามารถนำออก acclimatize ในสภาพโรงเรือนได้เลยและมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 89-90 % เหมาะสำหรับการนำไปขยายผลเพื่อการขยายพันธุ์ปริมาณมากๆ

เอกสารอ้างอิง

สถาบันวิจัยพืชสวน. 2546. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน. สถาบันวิจัยพืชสวน มกรมวิชาการเกษตร. 150 หน้า

Aitken-Christie J, Kozai T, Takayama S. 1995**.** Automation in plant tissue culture – General introduction and over view. In : Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp1-18.

Alvard D, Cote F and Teission C.1993. Comparision of methods of liquid medium cultures for banana Micropropagation. Effect of temporary immersions of explants. Plant Cell. Tissues. Organ. Cult. 32:555-560.

Appelgren M. 1985. Effect of supplementary lights to mother plants on adventitious shoot formation in flower peduncle segments of *Begonia x Hiemalis*. Sci. Hortic. Vol25. pp 77-83.

Chu I.1995. Economic analysis of automated micropropagation . In: Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp19-27

Danso KE, Ayeh KO, Oduro V, Amiteye S, Amoatey HM. 2008. Effect of 6-Benzyllaminopurine and Naphthalene Acetic Acid on *in vitro* production of MD2 pineapple planting materials. World. Appi. Sci. J.3(4); 614-619

Drew,R.A. 1980. Pineapple tissue culture unequalled for rapid multiplication. Queensland Agri. Jour. 106, 447-451.1

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

George F and Sherrington PD. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetic limited,pp 284-330

Kyte L and Kleyn J. 1996.Plants from test tubes: An Introduction to micropropagation. Third edition. P 82

Smith MAL and Spoomer LA.1995 . Vessels, gels, liquid media and support systems. In: Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp371-405

Zuraida AR,Nurul Shahnadz AH, Harteeni A, Che Radziah CMZ and Sreeramanan S. 2011. A novel approach for rapid micropropagation of Maspine pineapple (*Ananas comosus* L.) Affican Journal of Biotechnology Vol.10(19), pp. 3859-3866.