

การเพิ่มศักยภาพในการผลิตพรรณไม้น้ำ หญ้าทะเล และสาหร่ายทะเล ด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ
**The Productivity Improvement of Aquatic Plants, Sea Grasses and Seaweeds for Commercial Scale
 via Biotechnology**

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2555 จำนวนเงิน 1,495,000 บาท
 ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ สิงหาคม 2555 ถึง กรกฎาคม 2556

คณะผู้วิจัย

ศาส์กัญญ์ พรรณศิริ¹ กาญจนรี พงษ์ณวิ² ชัยรี แก้วสุริยจิต^{3,4} รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ⁵ จันทนา ไพรบูรณ์^{3,4}
 สหภาพ ดอกแก้ว⁵

¹ ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
 โทรศัพท์ 0 2942 8740 ต่อ 306

² สถาบันวิจัยสัตวันน้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง กรุงเทพฯ 10900
 โทรศัพท์ 0 2558 0180

³ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0 2942 8701

⁴ หน่วยปฏิบัติการแปลงกักต้อนและพืชน้ำประยุกต์ หน่วยวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพและสิ่งแวดล้อมทางน้ำ
 สถาบันวิจัยขั้นสูงทางอาหารและการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

⁵ ศูนย์วิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีปลาสวยงามและพรรณไม้น้ำประดับ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
 10900 โทรศัพท์ 0 2942 8365 ต่อ 16

บทคัดย่อ

การวิจัยและพัฒนาการขยายพันธุ์เฟิร์นน้ำ หญ้าทะเล และสาหร่ายทะเลเชิงปริมาณโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ได้ต้นอ่อนที่คุณภาพ จะเป็นการตอบสนองความต้องการของตลาดในประเทศลดการเก็บต้นพันธุ์จากธรรมชาติ ลดการนำเข้า และยังสามารถส่งออกไปยังต่างประเทศได้

การขยายพันธุ์เฟิร์นน้ำรากดำใบใหญ่ *Bolbitis heteroclita* (Presl) Ching ex. C. Chr. ทำได้โดยนำชิ้นส่วนใบอ่อนในสภาพปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 3% วุ้น 0.7% และผงถ่าน (activated charcoal) 0.1% โดยมี 6-Benzyladenine (BA) หรือ kinetin ระดับความเข้มข้น 0, 2, 4, 8 และ 16 μM ร่วมกับ Naphthaleneacetic acid (NAA) หรือ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 4 μM ควบคุมอุณหภูมิในห้องปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง/วันเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ จากนั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนใบอ่อนบนอาหารสังเคราะห์ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรที่เหมาะสมในโรงเรือนที่ใช้ระบบทำความเย็นแบบระเหยน้ำ (evaporative cooling

system) และใช้แสงธรรมชาติระดับความเข้มแสงต่างกันคือ 500, 1000, 1500, 2000 และ 2500 ลักซ์ เลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ เพื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการ

ผลการศึกษาพบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต BA, kinetin, NAA และ 2,4-D มีผลต่อการชักนำให้เกิดยอด และใบอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยอาหารสังเคราะห์สูตรที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด และใบได้แก่อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ดัดแปลงที่มี BA 2 μM และ 2,4-D 1 μM สามารถชักนำให้เกิดยอด ใบ และรากได้มากที่สุด โดยมีจำนวนยอดที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 6.87 ± 1.27 ยอด/ชิ้น มีจำนวนรากเฉลี่ย 6.93 ± 2.12 ราก/ชิ้น และมีจำนวนใบใหม่ที่เกิดขึ้นเฉลี่ย 10.53 ± 2.41 ใบ/ชิ้น เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากดำใบใหญ่ในโรงเรือนที่ใช้ระบบ evaporative cooling system และใช้แสงธรรมชาติพบว่าระดับความเข้มของแสงที่เหมาะสมมีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอด ราก และใบคือ 2500 ลักซ์ มีจำนวนยอดเฉลี่ย 6.48 ± 1.62 ยอด/ชิ้น มีจำนวนใบเฉลี่ย 8.63 ± 2.54 ใบ/ชิ้น และมีจำนวนรากเฉลี่ย 9.85 ± 2.79 ราก/ชิ้น เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องเลี้ยงขนาด 50 ตารางเมตร ซึ่งมีการควบคุมอุณหภูมิโดยใช้เครื่องปรับอากาศ และให้แสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ มีค่าไฟฟ้า 67,234.21 บาท/ปี ในขณะที่โรงเรือนขนาดพื้นที่เท่ากัน ที่ใช้ evaporative cooling system และให้แสงธรรมชาติสามารถลดค่าไฟฟ้าลงได้เหลือเพียง 7,291.59 บาท/ปี

การพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเล การเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเล การผลิตหินเทียมและหินเป็น เพื่อนำไปใช้ในธุรกิจตู้ปลาทะเล จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าทะเล พบว่า หญ้าทะเลชนิด *Enhalus acoroides* และ *Thalassia hemprichii* เป็นหญ้าทะเลที่มีศักยภาพในการนำไปใช้เลี้ยงในตู้ปลาทะเลในอนาคต วิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขึ้นกับชนิดหญ้าทะเลและชนิดของเนื้อเยื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง เมล็ดหญ้าทะเลชนิด *Enhalus acoroides* สามารถเจริญได้ภายใต้สภาพปลอดเชื้อและสามารถเจริญได้ดีในตู้เลี้ยงปลา หญ้าทะเล *Thalassia hemprichii* ใช้เมล็ด และส่วนยอดหรือข้อของลำต้นใต้ดินมาใช้ในการเพาะเลี้ยง ขึ้นเนื้อเยื่อส่วนยอดและส่วนข้อของลำต้นใต้ดินสามารถเจริญเพิ่มจำนวนยอดได้เป็นต้นอ่อน 3 ต้น ในสภาพปลอดเชื้อ แต่ยังไม่สามารถรอดชีวิตเมื่อนำลงเลี้ยงในตู้เลี้ยงปลา

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเล การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อสาหร่ายทะเลทำได้โดยใช้ส่วนผสมของยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ร่วมกับการใช้ Germanium Dioxide ในระยะเวลาที่เหมาะสม เทคนิคการฟุ้งแห้งสามารถกระตุ้นให้สาหร่ายสกุล *Sargassum* และ *Neogoniolithon* ปล่อยไข่และสปอร์ได้

วิธีการผลิตหินเทียมที่ดีที่สุด คือการใช้ดินสิงห์บุรีผสมกับแกลบเป็นวัสดุหลัก บั่นขึ้นรูปแล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 1,000 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และปล่อยให้อุณหภูมิลดลงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยจะต้องนำหินเทียมที่ผลิตได้แช่น้ำอัตราส่วน หินเทียม 1 กิโลกรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันเป็นเวลา 4 วัน ก่อนนำไปใช้ผลิตหินเป็นต่อไป

คำสำคัญ: เฟิร์นน้ำรากดำใบใหญ่, หญ้าทะเล, สาหร่ายทะเล, เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, สารควบคุมการเจริญเติบโต, ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, โรงเรือนระบบทำความเย็นแบบระเหยน้ำ, หินเทียม, หินเป็น

Abstract

Research and development of mass propagation techniques of water ferns, sea grasses and seaweeds was done to obtain higher quality and quantity due to the increasing demand in the country. This will help reduce imports, increase exports, and eliminate the need to continue collecting these plants from the wild.

Micropropagation of *Bolbitis heteroclita* (Presl) Ching ex. C. Chr. was done by culturing *in vitro* young leaves for 10 weeks on semi-solid modified MS medium containing 3% sucrose, 0.7 % agar and 0.1% activated charcoal supplemented with 0, 2, 4, 8 and 16 μM BA or kinetin in combination with 0, 1, 2 and 4 μM NAA or 2,4-D under fluorescent light, 12/12 dark/light cycle at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. As a comparison to the air-conditioned laboratory conditions, young leaves were also cultured for 10 weeks on semi-solid modified MS medium supplemented with appropriate PGRs in a greenhouse with an evaporative cooling system under natural light of 500, 1000, 1500, 2000 and 2500 lux to evaluate the effects on shoot and leaves multiplication.

The results indicated that the effects of plant growth regulators, BA, kinetin, NAA and 2,4-D on inducing shoots and leaves were statistically significant ($p < 0.05$). The appropriate medium for inducing shoots and leaves was semi-solid modified MS medium supplemented with 2 μM BA in combination with 1 μM 2,4-D. The average number of shoots, roots and leaves were 6.87 ± 1.27 shoots/piece, 10.53 ± 2.41 leaves/piece, and 6.93 ± 2.12 roots/piece, respectively, after culturing for 10 weeks. Natural light intensity of 2500 lux was appropriate to promote shoots and leaves multiplication. The average number of shoots, roots and leaves were 6.48 ± 1.62 shoots/piece, 8.63 ± 2.54 leaves/piece, and 9.85 ± 2.79 roots/piece, respectively, after culturing in the greenhouse with evaporative cooling system for 10 weeks. Tissue culture in a 50 square-meters culture room with air conditioning and fluorescent lamps has electricity cost of 67,234.21 Baht/year, while the same size greenhouse with evaporative cooling system using natural light has electricity cost of 7,291.59 Baht/year.

Another research was to develop tissue culture techniques for sea grasses, and algal culture, and the techniques for artificial rock and living rock production. In sea grass tissue culture, *Enhalus acoroides* and *Thalassia hemprichii* showed good potential for use in marine aquariums in the future. The most appropriate methodology for tissue culture depended on the sea grass species and the tissue type. The seed of *E. acoroides* could grow in axenic culture and grew well in aquarium; while, the seed, rhizome and rhizome tip were used in *T. hemprichii* culture. One piece of rhizome tip and rhizome of *T. hemprichii* could be induced to three in axenic culture. However, the plantlets could not survive in an aquarium.

In the algal culture study, surface sterilization was achieved with a mixture of antibiotics and Germanium Dioxide under an appropriate period. The desiccation technique was successful for stimulating ovule and spore releasing in *Sargassum* and *Neogoniolithon*.

The best technique for artificial rock production was to use a mixture of Sing Buri soil and rice husk as the basic material. The mixed soil was molded and baked at 1,000 °C for 30 minutes and cooled down for 24 hrs. Before using it as a living rock, it was necessary to leave the artificial rock under water (1 kg artificial rock/ 20 l) which was daily rinsed off for four days.

Key words: *Bolbitis heteroclita*, sea grass, seaweed, tissue culture, algal culture, plant growth regulators, culture room, greenhouse with evaporative cooling system, artificial rock, living rock