สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

# การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสาหร่ายสีแดง *Gracilaria fishii*

# Tissue Culture of Marine Red Alga, *Gracilaria fishii*

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์
ธิดารัตน์ น้อยรักษา
จิตรา ตีระเมธี
กิติธร สรรพานิช
จารุนันท์ ประทุมยศ

เริ่มบริการ
17 มิ.ย. 2559

27 ส.ค. 2552
249307
AS. 66555543

ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2538

# การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสาหร่ายสีแดง *Gracilaria fishii*

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์*
ธิดารัตน์ น้อยรักษา*
จิตรา ตีระเมธี*
กิติธร สรรพานิช*
จารุนันท์ ประทุมยศ*

## บทคัดย่อ

สาหร่าย *Gracilaria fishii* ที่ใช้ในการศึกษาจะถูกนำมาตัดเป็นท่อน ๆขนาดประมาณ 1 เซ็นติเมตร แล้วนำมาเลี้ยงในอาหาร PES ในสภาพปลอดเชื้อ (axenic culture) โดยให้แสง สว่าง : มืด 16: 8 ความเข้มแสง 25-27.6 μE. $m^{-2}.s^{-1}$ ที่อุณหภูมิ 28-30 °C เพื่อศึกษาศักยภาพของการเจริญ (regeneration) และสภาพทั่วไปของท่อนสาหร่าย รวมทั้งการศึกษาความเป็นไปได้ของการเติม $N^6$-benzyladenine (BA) และ napthylacetic acid (NAA) ต่อการเพิ่มศักยภาพของการงอก (regeneration) ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ด้วยการเติมสารละลายผสมของสารแอนติไบโอติก( สเตรปโตมัยซินซัลเฟต 0.02% คานามัยซิน 0.01 % และ อีรีโธรมัยซิน 0.02 %) เมื่อนำท่อนสาหร่ายไปเพาะเลี้ยงในอาหาร PES ที่มีความเข้มข้น 3 เท่าจากสูตรปกติ และมีการเติม BA 0.1 % ท่อนสาหร่ายสามารถแตกหน่อภายในสามวัน และสามารถสร้างแขนงเล็ก ๆจำนวนมาก ภายใน 14-18 วัน และภายใต้การเพาะเลี้ยงในสภาพนี้ท่อนสาหร่ายมีเปอร์เซ็นต์การงอก (regeneration) มากถึง 97 % ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหาร PES ความเข้มข้น 2 เท่า และมี BA 0.1 % ให้เปอร์เซ็นต์การงอก 89 % อย่างไรก็ตาม ท่อนสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร PES สูตรความเข้มข้น 2 เท่า และ 3 เท่า ที่ไม่มีการเติม BA ยังคงให้เปอร์เซ็นต์การงอกที่ค่อนข้างสูง คือ 72 % ในขณะที่การเติม BA ในเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำ และการเติม NAA ไม่มีผลต่อการงอกและการเจริญของกิ่งแขนงในการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร PES สูตรปกติ

* สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง จ. ชลบุรี 20131

# Tissue Culture of the Red Alga *Gracilaria fishii*

Rattanaporn Srivibool*

Thidarat Noiraksa*

Jitra Teeramaethee*

Kitithorn Sanpanich*

## Abstract

The 1-cm segments of *Gracilaria fishii* were grown in PES medium at 28-30 °C, 25-27.6 μE. $m^{-2}.s^{-1}$, 16 : 8 h L : D under axenic conditions to examine their regeneration potential and characteristics, and the possible effects of $N^6$-benzyladenine (BA) and napthylacetic acid (NAA). Under axenic conditions by using antibiotic mixture (0.02% Streptomycin sulfate, 0.01% Kanamycin and 0.02 % Erythromycin) in 3x PES medium with 0.1% BA ; the algal segments developed buds within three days and developed profusely branchlets 3-10 mm long within 14-18 days. With this same conditions the algal segments produced 97 per cent regeneration while grown in 2x PES medium with 0.1 % BA they produced 89 per cent. Anyway, the algal segments grown in 2x PES and 3x PES medium without BA still produced rather many branchlets of 72 per cent regeneration while low concentrations of BA and all concentrations of NAA adding in the medium had not much effect on the mode of regeneration and growth when grown in PES normal concentration.

* Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi. 20131

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| สารบัญตาราง | (2) |
| สารบัญภาพ | (3) |
| บทนำ | 1 |
| การสำรวจเอกสาร | 2 |
| อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ | 6 |
| ผลการวิจัย | 8 |
| วิจารณ์ผลการทดลอง | 16 |
| สรุปผลและข้อเสนอแนะ | 19 |
| เอกสารอ้างอิง | 20 |

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ของการศึกษาเพื่อให้ได้ Axenic culture ของ *Gracilaria fishii* | 8 |
| 2 | การศึกษาการเจริญ (Regeneration) ของสาหร่าย *Gracilaria fishii* ในอาหารสูตรต่าง ๆ (จากหลอดไฟ daylight) | 9 |
| 3 | การศึกษาการเจริญ (Regeneration) ของ *Gracilaria fishii* ในอาหาร PES ที่มี BA 0.01 % | 11 |
| 4 | การศึกษาการเจริญ (Regeneration) ของ *Gracilaria fishii* ในอาหาร PES ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆกัน และมีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ BA | 12 |
| 5 | การศึกษาการเจริญ (Regeneration) ของ *Gracilaria fishii* เปรียบเทียบกับการเจริญของ *G. lemaneiformis* และ *G. salicornia* | 14 |

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | สาหร่าย *Gracilaria fishii* หรือ *G. verucosa* ที่นำมาศึกษาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีลักษณะ ทัลลัสตรง มีสีม่วงแดงซีด ถึงสีชมพู มีความสูงประมาณ 30-50 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร มีแขนงเล็ก ๆจำนวนมากโดยรอบทัลลัส | 2 |
| 2 | การงอกแขนงเล็ก ๆของสาหร่าย *Gracilaria fishii* ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหาร PES ความเข้มข้นปกติ โดยไม่มีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ BA มีทั้งการแตก กิ่งแขนงจากด้านข้างและมีการเจริญจากรอยตัด ซึ่งในภาพนี้สาหร่ายบางท่อนเนื้อเยื่อที่เจริญจากรอยตัดมีการเจริญแตกเป็นสองแขนงเล็ก ๆ ออกจากรอยตัดเดียวกัน | 10 |
| 3 | การงอกแขนงเล็ก ๆของสาหร่าย *Gracilaria fishii* ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหาร PES ความเข้มข้นปกติ ที่มีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ BA 0.01 % ท่อนสาหร่ายบางท่อนมีการแตกแขนงหลายแขนงจากรอยตัดเดียวกัน และถ้าเป็นปลายแขนงเล็ก ๆที่ไม่ได้ตัดปลายออกก็จะมีการเจริญต่อไปยาวมากขึ้น แต่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กลง | 10 |
| 4 | ท่อนสาหร่ายที่มีการงอกแขนงใหม่ ๆจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร PES ที่มีความเข้มข้น 2 เท่าจากสูตรเดิม (ซ้าย)ไม่มีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ในอาหาร (ขวา)เติม BA 0.1 % และ (ล่าง)เติม BA 0.01 % | 13 |
| 5 | ท่อนสาหร่ายที่มีการงอกแขนงใหม่ ๆจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร PES ที่มีความเข้มข้น 3 เท่าจากสูตรเดิม (ซ้าย)ไม่มีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ในอาหาร (ขวา)เติม BA 0.1 % และ (ล่าง)เติม BA 0.01 % | 13 |

# บทนำ

สาหร่ายทะเล (macroalgae หรือ seaweeds) นับเป็นทรัพยากรทางทะเลที่มีคุณค่ามหาศาลในฐานะเป็นผู้ผลิตที่มีอยู่เป็นปริมาณมากกระจายอยู่ทั่วทั้งพื้นผิวน้ำ กินอาณาบริเวณกว้างขวางมากที่สุดแห่งหนึ่งในโลก มีประโยชน์ทั้งต่อมนุษย์ในแง่ของอาหาร และการนำสารประกอบที่มีค่าหลายชนิดที่สาหร่ายทะเลสร้างขึ้นมาใช้ประโยชน์ในชีวิตประจำวัน และมีประโยชน์ต่อสัตว์ทะเลนานาชนิดในแง่ของการทำหน้าที่สร้างอาหาร รวมทั้งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยที่สำคัญในระบบนิเวศทางทะเล ในช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมา นักวิทยาศาสตร์ได้ตระหนักถึงความสามารถในการผลิต สารประกอบที่สำคัญจากหร่ายสีแดง (Red algae) และสาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae) รวมทั้งการผลิตพลังงาน (energy production) ให้แก่ท้องทะเลในขณะเดียวกันด้วย

ที่ผนังเซลล์ของสาหร่ายสีแดงโดยธรรมชาติแล้วมีการสร้างสารที่เป็นประโยชน์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารพวกไฟโคคอลลอยด์(phycocolloid) เช่น วุ้น(Agar) และคาร์ราจีแนน (carrageenan)สาหร่ายในสกุล *Gracilaria* fishii เป็นสาหร่ายสีแดงสกุลหนึ่งที่มีวุ้น (Agar) คุณภาพดี และจะต้องนำมาเป็นวัตถุดิบที่สำคัญชนิดหนึ่งร่วมกับสาหร่ายสีแดงสกุลอื่น ๆ ในการผลิตวุ้นในทางอุตสาหกรรม แต่ในประเทศไทยพบสาหร่ายสกุลนี้ไม่มากนักจากรายงานของนันทวัน และคณะ (2534) ซึ่งได้สำรวจการแพร่กระจายของสาหร่ายสีแดงตามบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของอ่าวไทย พบสาหร่ายสีแดงสกุลต่าง ๆ มากถึง 42 ชนิด แต่ก็ไม่ได้รายงานว่าพบ *Gracilaria fishii* แต่อย่างใด ส่วนมากแล้วจะพบ *Centroceras clavulatum*, *C. minutum*, *Ceramium byssoideum*, *Laurencia* และ *Gracilaria* spp. นับว่าสาหร่าย *Gracilaria fishii* ค่อนข้างเป็นสาหร่ายที่หายากตามบริเวณชายฝั่งของอ่าวไทย

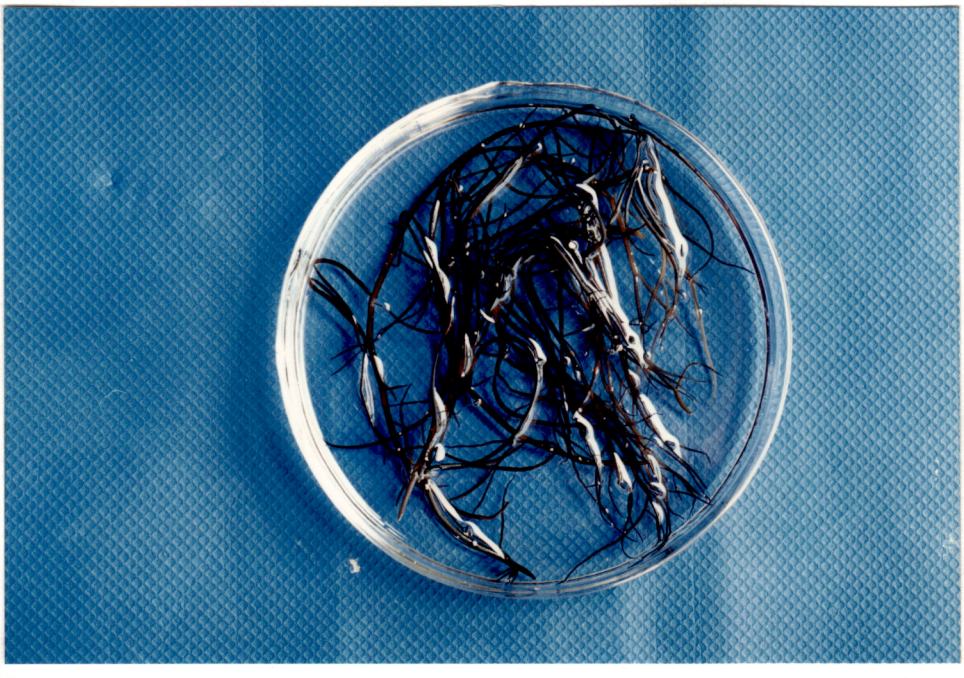
การวิจัยเพื่อทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสาหร่าย *Gracilaria fishii* นี้จะเป็นประโยชน์ก้าวแรกในทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านสาหร่ายขนาดใหญ่ของประเทศไทยอันจะนำมาซึ่งผลผลิตปริมาณมากในระยะเวลาไม่มากนัก เพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตวุ้น (Agar) ที่ใช้ทำอาหารรวมทั้งวุ้น (Bacto Agar) สำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ในอนาคตขึ้นภายในประเทศ โดยไม่ต้องนำเข้าผลิตภัณฑ์เหล่านี้อีกต่อไป

การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสาหร่าย *Gracilaria fishii* ในห้องปฏิบัติการโดยเปรียบเทียบกับการเจริญ(Regeneration) ของสาหร่ายในการเลี้ยงด้วยสูตรอาหารต่าง ๆ และศึกษาเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงที่ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูง

## การสำรวจเอกสาร

### ชีววิทยาทั่วไปของสาหร่ายสีแดง *Gracilaria fishii*

*Gracilaria fishii* หรือ *Gracilaria verucosa* (Huds.)Papenf เป็นสาหร่ายสีแดงในครอบครัว Gracilariaceae ในอันดับ Gigartinales มีลักษณะของทัลลัสที่แข็งแรง อวบน้ำ สูงประมาณ 1-5 เดซิเมตร กิ่งแขนงมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-3.0 มิลลิเมตร ซึ่งอาจแตกแบบไม่เป็นระเบียบ (irregular) หรือแบบสลับ (alternate) ปลายทัลลัสและแขนงมีขนาดที่เรียวเล็กลง เซลล์ตรงกลางมีผนังบาง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 180-300 (อาจถึง 480) ไมโครเมตร ชั้นคอร์เทกซ์มีเซลล์ 3-4 ชั้น โดยชั้นนอกสุดประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-12 ไมโครเมตร ส่วนเซลล์ชั้นในมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-30 ไมโครเมตร เซลล์บริเวณผิวนอกประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนจำนวนมาก เตตราสปอร์แรงเจียม (tetrasporangium) มีความยาว 30-33 ไมโครเมตร คริสโตคาร์ป (crystocarp) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 230 ไมโครเมตร ส่วนสเปอร์มาเทีย (spermatia) อยู่ในร่องที่มีความลึก 45-75 ไมโครเมตร ในธรรมชาติพบอยู่ตามบริเวณแหล่งหญ้าทะเลโดยเกาะติดกับเปลือกหอย (Dawes,1974)



ภาพที่ 1 สาหร่าย *Gracilaria fishii* หรือ *Gracilaria verucosa* มีลักษณะทัลลัสตรง สีแดงซีดถึงสีชมพู มีความสูงประมาณ 30-50 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร มีแขนงเล็ก ๆสั้น ๆจำนวนมากโดยรอบทัลลัส

**การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสาหร่ายสีแดง**

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสาหร่ายนั้นต่างจากการเพาะเลี้ยงโดยทั่วไปตรงที่ ต้องเลี้ยงแบบ Axenic culture เนื่องจากในสาหร่ายขนาดใหญ่ (sea weeds) นั้นจะมีจุลินทรีย์จำนวนมากเกาะตามเมือก (mucilage) ที่ผิวของลำต้นและกิ่งแขนง อันจะเป็นสาเหตุให้เกิดการปนเปื้อนได้เมื่อนำมาเลี้ยงในจานอาหารเป็นเวลานาน (Nakanishi, 1992) และวิธีการฆ่าเชื้อพื้นผิวนอกของชิ้นส่วนท่อนสาหร่ายก่อนนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร จะต้องใช้วิธีการฆ่าเชื้อเฉพาะแบคทีเรีย รวมทั้งสิ่งปนเปื้อนที่เกาะตามผิวรอบนอกของต้นสาหร่ายโดยไม่ทำอันตรายต่อเซลสาหร่ายในขณะเดียวกัน

จากรายงานการวิจัยของ Liu Xue - Wu และ Margaret E. Gordon (1987) ซึ่งได้รายงานเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเซลล์ของ *Pterocladia* และ *Porphyra* โดยก่อนที่จะนำไปเลี้ยงบนอาหารเขาได้นำเอาชิ้นส่วนของสาหร่ายจุ่มลงในสารละลาย Betadine 1% เป็นเวลา 5 นาที นำมาล้างในน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อ แล้วจึงนำมาเลี้ยงในอาหาร PES ที่ฆ่าเชื้อแล้ว และมี เพนิซิลลิน จี 0.1% สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต 0.2% คานามัยซิน 0.1% และนีโอมัยซิน 0.02% (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 22 $\pm$ 2°C 135 $\mu E.m^{-2} s^{-1}$ และให้แสงวันละ 16 ชั่วโมง(16 : 8 แสง : มืด) ภายในเวลา 4 วัน พบว่าชิ้นส่วนของท่อนสาหร่ายเริ่มมีตา (buds) ซึ่งแตกออกมาจากชั้นของคอร์เทกซ์ และมีเส้นขนเล็ก ๆ ที่เกิดจากเซลล์เรียงตัวเป็นแถว (uniseriate) 1 แถวเกิดขึ้นบริเวณที่มีตา และบริเวณผิวหน้าตัดของท่อนสาหร่ายที่ตัดออกมาจากต้นเดิม ตาบางตาก็สามารถสร้างรากเล็ก ๆ (haptera) และเมื่อถึง 25 วัน ท่อนสาหร่ายที่ตัดออกมานี้สามารถเจริญจนเหมือนต้นสาหร่ายตามปกติ มีแกนกลาง (Axis) ยาวประมาณ 12 - 15 มิลลิเมตร และเมื่อเลี้ยงต่อไปถึงวันที่ 40 - 50 ท่อนสาหร่ายแต่ละท่อน จะมีรูปร่างลักษณะเดียวกันกับสาหร่ายต้นปกติทุกประการยกเว้น ที่ไม่มีส่วนของ holdfast เท่านั้น และที่สำคัญที่สุดชิ้นส่วนของท่อนสาหร่ายที่อยู่บริเวณปลายยอดจะงอกตาได้ดีกว่าชิ้นส่วนที่ตัดจากปริมาณโคนต้น

**การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสาหร่ายใน Axenic Culture**

ในปัจจุบันที่ได้เริ่มมีการนำเอาเทคนิคใหม่ ๆการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและพันธุวิศวกรรม มาใช้กับสาหร่าย ก็เพื่อวัตุประสงค์ในการปรับปรุงยีน และสายพันธุ์ รวมทั้งเพื่อเป็นการเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณมาก ๆ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาจรวมถึง การเกิดแคลลัส การงอกใหม่(regeneration) และการเพาะเลี้ยงเซลล์ ( suspension cell culture) (Saga และ Sanbonsuga, 1988)

ความจริงแล้ว ภาวะที่ปราศจากเชื้อไม่จำเป็นเท่าใดนัก สำหรับเซลล์ที่สังเคราะห์แสงเองได้ แต่เนื่องจากต้องใช้ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน ดังนั้น axenic culture จึงเป็นสิ่งที่จำเป็น ไม่เช่นนั้นก็จะมีเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ เจริญปกคลุมเนื้อเยื่อที่ต้องการเลี้ยง และรบกวนถึงการเจริญเติบโตของชิ้นเนื้อเยื่อไปเสียก่อนที่การทดลองจะสิ้นสุดลง

สำหรับการทดลอง Axenic culture ของ Druehl และ Hsiao (1969) ได้ทดลองกระทำในสาหร่ายสีน้ำตาลในอันดับ Laminariales ได้แก่ *Nereocystis luetkeana* , *Laminaria saccharina* , *Costaria costata* และ *Alaria marginata* โดยใช้สารละลายแอนติไบโอติกผสมของเพนิซิลลิน จี 622.5 มิลลิกรัม สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต 250.0

มิลลิกรัม และคลอแรมเฟนิคอล 100 มิลลิกรัม โดยใช้ความเข้มข้น 1 เท่า และ 5 เท่า ในน้ำทะเล 1 ลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตามด้วยการแช่ NaOCl 1% 20 นาที โดยใช้สูตรอาหารดัดแปลงจาก ASP 2 โดยไม่เติมซิลิเกท และเติม $Na_2MoO_4$ $2H_2O$ 0.126 มก. KI 6.5 μg KBr 9.7 mg $NaHCO_3$ 19.2 มิลลิกรัม และ IAA 10 ไมโครกรัม / น้ำ 100 มิลลิกรัม แทน ผลการทดลองพบว่า เปอร์เซ็นต์การงอกของ meiospores เกิดขึ้นประมาณ 82 - 95% โดยงอกเป็นต้น gametophytes ที่แตกกิ่งแขนงจำนวนมาก ส่วนต้น sporophyte จะเกิดขึ้นในระยะเวลา 4 - 5 สัปดาห์

จากรายงานของ Garcia-Reina และคณะ (1988) ให้ทดลองเลี้ยงสาหร่ายสีแดง 3 ชนิด คือ *Gelidium versicolor*, *Gracilaria ferox* และ *Laurencia* sp. ใน axenic culture ชนิดต่าง ๆ ทั้งการใช้คลื่นเสียง (ultrasonic) และสารผสมแอนติไบโอติก ประกอบกันรวมทั้งหมด 13 ชุดการทดลอง ปรากฏว่ายังพบว่ามีแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่หลายการทดลอง มีเพียง 2 การทดลอง ที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และเอ็นโดไฟท์ได้ แต่ถึงกระนั้นก็ยังพบว่า หลังจากทดลองเลี้ยงได้ 30 วัน *Gelidium versicolor* ( apical segments) ประมาณ 90-95 % ยังคงมีสภาพดีและมีตาใหม่ ๆ เกิดขึ้นทั่วทั้งท่อนสาหร่าย และเมื่อเทียบกับ *Gracilaria ferox* กับ *Laurencia* sp. แล้ว *Gelidium versicolor* มีศักยภาพในการ regeneration ได้สูงที่สุด ทัลลัสที่เกิดขึ้นใหม่ก็เริ่มตั้งตรงและมีการสังเคราะห์แสงเห็นได้ชัดเจน

**การสร้างแคลลัส และการเจริญของโครงสร้างที่คล้ายแคลลัส**

แคลลัส (Callus) คือกลุ่มก้อนของเนื้อเยื่อที่ไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปเป็นโครงสร้างของอวัยวะ ก้อนแคลลัสบางชนิดอาจจะอ่อนนุ่ม บางชนิดอาจค่อนข้างแข็งแต่ทั้งสองประเภทเป็นก้อนเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นจากเซลล์ที่ไม่สามารถมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นโครงสร้างของอวัยวะ หรืออาจจะเรียกได้ว่าเป็นแบบหนึ่งของการเจริญที่ผิดไปจากปกติของต้นพืช (สาหร่าย)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสาหร่ายนั้นไม่ว่าจะเป็นในสาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta) สาหร่ายสีน้ำตาล (Phaeophyta) หรือสาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) สามารถสังเกตพบแคลลัสขึ้นได้เสมอในระหว่างการศึกษาเพาะเลี้ยง จากรายงานของ Polne-Fuller และ Gibor (1987) ซึ่งได้ศึกษาการกระตุ้นให้เกิดแคลลัส และการเจริญของแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสาหร่ายสีเขียว สีน้ำตาล และสีแดงหลายชนิด เช่น *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva angusta*, *Porphyra perforata*, *Smithora naiadum*, *Macrocystis pyrifera*, *Egregia menziesii*, *Sargassum muticum*, *Pelvetia fastigiata*, *Cystoseira osmundacea*, *Gracilaria papenfussii*, *Gelidium nudifrons*, *Gelidium robustum* และ *Gigartina exasperata* โดยตัดสาหร่ายที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นท่อนขนาด 2 - 5 มิลลิเมตร เลี้ยงใน PES medium บน 1.5% bacto-agar (Dijco) ที่ 18°C 60 $\mu E.m^{-2}.S^{-1}$ ให้แสงวันละ 12 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 2 - 14 สัปดาห์ โดยไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยงสำหรับการเลี้ยงเพื่อกระตุ้นให้สร้างแคลลัส

แคลลัสของสาหร่ายที่กำลังเจริญจะถูกถ่ายลงในอาหารเหลว หรืออาหารแข็ง เดือนละ 1 ครั้ง แล้วนำไปบดให้ละเอียด เพื่อแยกให้ได้เซลล์เดี่ยว ๆ โดยใช้คลื่นแสง หรือเครื่อง Homogenizer ส่วนเซลล์ที่ได้ จะนำมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว หรืออาหารแข็ง (agar medium)

สำหรับแคลลัสของสาหร่ายสีแดง Polne-Fuller และ Gibor (1987) รายงานผลว่าสามารถเกิดแคลลัสได้ในความถี่ (frequencies) ที่ต่ำมาก ประมาณ 0.1 - 3% โดยสาหร่ายที่เลี้ยงจนสร้างแคลลัสได้ ได้แก่ *Gracilaria papenfussii*, *Gelidium robustum*, *Gelidium nudifrons*, *Gigartina exasperata*, *Prionitis lanceolata*, *Eucheuma*

*uncinatum* และ *E. alvarezii* โดยแคลลัสเหล่านี้จะมีสีชมพูอ่อน หรือสีออกชมพูปนสีทราย และเกิดมาจากเนื้อเยื่อจากชั้นคอร์เทกซ์ และส่วนใหญ่แล้วแคลลัสเหล่านี้เจริญช้ามาก ต้องการความเข้มแสงต่ำ และไม่ต้องการอาหารที่มีแร่ธาตุมากเท่าใดนัก หากจะเก็บรักษาแคลลัสไว้ และยังคงมีชีวิตอยู่ สามารถเก็บได้บนผิววุ้น ที่อุณหภูมิ 18°C ให้แสง 10 - 20 $\mu E.m^{-2}.S^{-1}$ จะสามารถเก็บได้นานกว่า 3 ปี หลังจากเก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน จะมีแคลลัสประมาณ 70 - 90% ที่ยังคงความสามารถในการงอกใหม่ (regeneration) ได้

## เทคโนโลยีชีวภาพในสาหร่ายสีแดง

เทคโนโลยีชีวภาพในระดับเซลล์เพิ่มจะเริ่มเข้ามีบทบาทสำคัญในสาขาวิชาสาหร่ายในช่วงต้นทศวรรษ 1980 เป็นต้นมานี้ และดูเหมือนจะยิ่งทวีความสำคัญต่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย (seaweed) ในอนาคต ซึ่งเทคนิคหลักของเทคโนโลยีชีววภาพระดับเซลล์ในสาหร่ายขนาดใหญ่นี้ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แคลลัส เซลล์ และการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

Garcia-Reina และคณะ (1991) ได้รายงานถึง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสาหร่าย *Gelidium nudifrons* Gardner และ *G. robustum* (Gardner) Hollenberg & Abbott ด้วยการตัดเป็นท่อนขนาดเล็ก ยึดติดด้วยเกลียวเชือกเพื่อเลี้ยงให้ได้ปริมาณมาก ๆ ซึ่งก็สามารถทำได้ประสบการสำเร็จ เช่นเดียวกันในประเทศจีน ซึ่ง Luqin และคณะได้ใช้วิธีเดียวกันนี้ในสาหร่าย *Gelidium pacificum* Okamura และพบว่า สาหร่ายซึ่งได้ถูกตัดเป็นท่อนสั้น ๆ นั้นสามารถสร้าง ไรซอยด์เป็นจำนวนมาก และขณะเดียวกันก็สามารถงอก ( regenerate )แขนงขนาดเล็ก ๆ ได้ด้วย

ในการขยายจำนวน หรือเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อให้ได้ผลผลิตมาก ๆ ในทางอุตสาหกรรมนั้น ยิ่งจะต้องใช้วิธีลดขนาดท่อนสาหร่ายลงให้เหลือเพียง somatic cells เป็นเซลล์ตั้งต้นสำหรับการเพาะเลี้ยง ซึ่งต้องใช้เอ็นไซม์ย่อยทัลลัสของสาหร่ายเพื่อให้ได้ somatic cells เดี่ยว ๆ จำนวนมาก แล้วนำไปโรย (inoculate) บนเส้นเชือกอีกทีหนึ่ง เพื่อให้เซลล์สาหร่ายเจริญขึ้นมาเป็นต้นใหม่

ในการแยกให้ได้ somatic cell นั้น กระทำได้ง่ายโดยนำทัลลัส หรือแคลลัสมาย่อยด้วยเอ็นไซม์และผนังเซลจะถูกสร้างขึ้นใหม่โดย protoplasts (หรือ spheroplasts) หรือไม่ก็โดยการบดทัลลัส หรือแคลลัสให้ละเอียดหรืออาจนำไปแช่แข็งหรืออาจใช้วิธีทั้งนำไปบด และใช้เอ็นไซม์ย่อยด้วยในขณะเดียวกัน

การทำ protoplast และทำให้มีการ regenerate เป็นสาหร่ายทั้งต้น สามารถกระทำได้เป็นผลสำเร็จ ทั้งในสาหร่ายสีเขียว (Chlarophyta) สาหร่ายสีน้ำตาล (Phaeophyta) และสาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) ซึ่งในกลุ่มสาหร่ายสีแดงนี้กระทำได้สำเร็จแล้วส่วนใหญ่ ได้แก่ สาหร่ายในสกุล *Chondrus*, *Gracilaria*, *Palmaria* และ *Porphyra* นอกจากนี้เทคนิคการทำ protoplast นี้ยังสามารถสร้างลูกผสมของสาหร่าย 2 ชนิดได้ด้วย ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่ในอนาคตอาจมีการผลิต aqarophytic corn จากนั้นทำ protoplart fusian ของสาหร่าย *Gelidium* กับ ข้าวโพด (*Zea mays*) หรือสามารถสร้าง agarageenan โดยการทำ protoplast fusion ของสาหร่าย *Gelidium* กับ *Eucheuma* (Garcia-Reina และคณะ, 1991)

## อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

งานวิจัยเรื่องนี้เริ่มจากการสำรวจแหล่งที่อยู่อาศัยของสาหร่าย *Gracilaria fishii* บริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก ตั้งแต่จังหวัดชลบุรี ระยอง จันทบุรี และจังหวัดตราด ซึ่งสำรวจรวมถึงเกาะช้าง และเกาะเล็ก ๆที่รายรอบเกาะช้าง ด้วย *Gracilaria fishii* ค่อนข้างเป็นสาหร่ายที่หายากในแถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก ไม่เหมือนสาหร่ายสีแดงใน สกุลอื่น เช่น *Laurencia, Eucheuma* หรือ *Hypnea* อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างสาหร่าย *Gracilaria fishii* ที่นำมาทดลอง ทั้งหมด ไม่ใช่ตัวอย่างสาหร่ายจากธรรมชาติ แต่เป็นสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงเพื่อการศึกษาในบ่อดิน

### ขั้นตอนและวิธีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสาหร่าย *Gracilaria fishii*

1. นำตัวอย่างสาหร่ายที่จะศึกษามาเลี้ยงในน้ำทะเลสะอาดในห้องปฏิบัติการ ก่อนทดลอง 2-3 วัน ใช้ภู่กันขน อ่อนทำความสะอาดผิวนอก เพื่อขจัดสาหร่ายขนาดเล็กที่เกาะตามบริเวณผิวนอกออกให้หมด แล้วจึงนำมา ล้างด้วยน้ำทะเลที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้มีดผ่าตัดที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดท่อนสาหร่ายให้เป็นท่อนเล็ก ๆขนาดความยาว 1 เซ็นติเมตร
2. ศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพื่อให้ได้ Axenic culture โดยนำท่อนสาหร่ายมาฆ่าเชื้อบริเวณผิวนอกด้วยสาร ละลายแอนติไบโอติกผสม ABmix1 และ ABmix2 ซึ่ง ABmix1 ประกอบด้วย เพนิซิลลิน จี 622.5 มก. สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต 250 มก. และคลอแรมเฟนิคอล 100 มก. ต่อน้ำทะเลที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ลิตร (Druehl และ Hsiao,1969) ในความเข้มข้น 1 เท่า 5 เท่า และ 10 เท่า ของส่วนผสมของสารแอนติไบโอติก โดยแช่ท่อนสาหร่ายเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และตลอดคืน ก่อนวางท่อนสาหร่ายลงในอาหาร PES* (Provasoli,1968) ที่ใช้เลี้ยง ส่วนสารละลาย แอนติไบโอติกผสม Abmix2 ประกอบด้วย สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต 0.02 % คานามัยซิน 0.01 % และอีรีโธรมัยซิน 0.02 % โดยแช่ท่อนสาหร่ายลงในสารผสมแอนติ ไบโอติก เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และตลอดทั้งคืน โดยเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่ไม่แช่สารละลาย แอนติไบโอติก แต่ใช้วิธีฉายแสงอุลตราไวโอเลต โดยใช้ท่อนสาหร่ายจำนวน 100 ท่อนในแต่ละชุดการทดลอง
3. ศึกษาการเจริญ (regeneration) ของท่อนสาหร่ายในอาหาร PES ที่มีความเข้มข้นของวุ้น (agar) ต่าง ๆกัน 3 ระดับความเข้มข้น คือความเข้มข้นของวุ้น 0.125 % 0.25 % และ 0.5 % ร่วมกับความเข้มข้นของ อาหาร PES 4 ระดับ คือ 0.5 เท่า 1 เท่า 1.5 เท่า และ 2 เท่า โดยใช้สาหร่ายจำนวน 20 ท่อน ในแต่ละ ชุดการทดลอง และให้แสงจากหลอดไฟ 3 ชนิด คือ หลอดไฟ daylight หลอดไฟ Gro-lux และหลอดไฟ cool white ความเข้มของแสง 25- 27.6 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ เปรียบเทียบกับการเลี้ยงภายใต้แสงธรรมชาติ (ในร่ม)

---

*PES 100 ml ประกอบด้วย $NaNO_3$ 350 mg, Na-glycero PO 50 mg, Fe-EDTA 2.5 mg, PII metals 25 ml, (PII metals 1 ml ประกอบด้วย $Na_2$-EDTA 1mg, $FeCl_2$ 0.01 mg, $H_3BO_3$ 0.2 mg, $MnCl_2$ 0.04 mg, $ZnCl_2$ 0.005 mg, $CoCl_2$ 0.001 mg ) Vitamin B 12 10 μg, Thiamine 0.5mg, Biotin 5 μg, Tris 500 mg, น้ำกลั่น 100ml pH 7.6

เมื่อจะใช้ เติม PES 2 ml ลงในน้ำทะเลที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 100 ml

| ความเข้มข้นของ PES x | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 |
|---|---|---|---|---|
| % agar 0.125 | A | B | C | D |
| % agar 0.25 | E | F | G | H |
| % agar 0.50 | 2 | 1 | C | D |

หมายเหตุ การทดลองชุด A คือ อาหาร PES ที่มีความเข้มข้น 0.5 เท่า และมีวุ้น 0.125 %

4. ศึกษาการเจริญ (regeneration) ของท่อนสาหร่าย ในอาหาร PES ที่มีฮอร์โมนสังเคราะห์ $N^6$ -Benzyladenine (BA) และ 1- Napthylacetic acid (NAA) ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆกัน ตั้งแต่ 0.1% 0.01% 0.001 % 0.005 และ 0.0001 % ใช้แสงจากหลอดไฟ daylight และใช้สาหร่ายจำนวน 100 ท่อน ต่อการทดลอง 1 ชุด
5. ศึกษาการเจริญ (regeneration) ของท่อนสาหร่าย *Gracilaria* ชนิดอื่น ๆ เช่น *G. lemaneiformis* และ *G. salicornia* โดยเลี้ยงด้วยอาหาร PES ในความเข้มข้น 2 เท่า และ 3 เท่า ความ เข้มของแสง 25- 27.6 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงประมาณ 28-30 °C และใช้สาหร่ายจำนวน 100 ท่อน ต่อการทดลอง 1 ชุด
6. การสังเกตผลการทดลองแต่ละชุด ใช้ทั้งการสังเกตด้วยตาเปล่า และการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope)
7. บันทึก และวิเคราะห์ผลการทดลอง และเขียนรายงาน

## ผลการวิจัย

### การศึกษาเพื่อให้ได้ Axenic Culture

จากการนำท่อนสาหร่าย *Gracilaria fishii* มาแช่ในสารละลายผสมแอนติไบโอติก AB mix 1 ซึ่งประกอบด้วย เพนิซิลลิน จี 622.5 มก. สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต 250 มก. และคลอแรมเฟนิคอล 100 มก. ต่อน้ำทะเลที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ลิตร ในความเข้มข้น 1x 5x และ 10x เท่า และ AB mix 2 ซึ่งประกอบด้วยสเตรปโตไมซินซัลเฟต คานามัยซิน และอีรีโธรไมซิน 0.02% 0.01% และ 0.02% ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการนำท่อนสาหร่ายมาผ่านแสงอุลตราไวโอเลต โดยไม่ใช้สารแอนติไบโอติก โดยให้แสง daylight ขนาดความเข้มแสง 25- 27.6 $\mu E\ m^{-2}.\ s^{-1}$ ใช้เวลาให้แสงสว่าง : มืด เท่ากับ 16 : 8 อุณหภูมิระหว่าง 28 – 30 °C (ตารางที่1)

**ตารางที่ 1** ของการศึกษาเพื่อให้ได้ Axenic culture ของ *Gracilaria fishii*

| | Treatment | | % contamination (bacteria & fungi) | หมายเหตุ |
|---|---|---|---|---|
| 1 | UV 1 hr. | | 100 | จำนวนท่อนสาหร่ายที่ใช้ในแต่ละ treatment = 100 ท่อน |
| 2 | UV 2 hr. | | 46 | |
| 3 | 1 x AB mix 1 | overnight | 0.8 | |
| 4 | 5 x AB mix 1 | overnight | 0 | |
| 5 | 5 x AB mix 1 | 1 hr. | 0 | |
| 6 | 10 x AB mix 1 | 1 hr. | 7.5 | |
| 7 | 1 x AB mix 2 | 1 hr. | 17 | |
| 8 | 1 x AB mix 2 | 2 hr. | 0 | |
| 9 | 1 x AB mix 2 | overnight | 0 | |

ผลการศึกษาพบว่าการนำท่อนสาหร่ายมาแช่ในสารละลายผสมของสารแอนติไบโอติก AB mix 2 ให้ผลการฆ่าเชื้อบริเวณผิวนอกของท่อนสาหร่ายได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ AB mix 1 หรือการฆ่าเชื้อด้วยแสงอุลตราไวโอเลต จากการฆ่าเชื้อผิวนอกของท่อนสาหร่ายด้วย ABmix 2 โดยใช้เวลาแช่ท่อนสาหร่าย 2 ชั่วโมง ก็สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราบริเวณผิวนอกได้หมด ในขณะที่สารละลาย ABmix 1 ต้องใช้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นถึง 5 เท่า โดยใช้เวลาในการแช่ 1 ชั่วโมง จึงจะสามารถฆ่าเชื้อบริเวณผิวท่อนสาหร่ายได้หมด ส่วนการฆ่าเชื้อด้วยแสงอุลตราไวโอเลต พบว่าใช้เวลาในการฉายแสงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก็ยังมีการปนเปื้อนแบคทีเรียและราได้ถึง 46 %

**การศึกษาการเจริญ** (Regeneration) **ของสาหร่าย** *Gracilaria fishii* **ในอาหารสูตรต่าง ๆ**

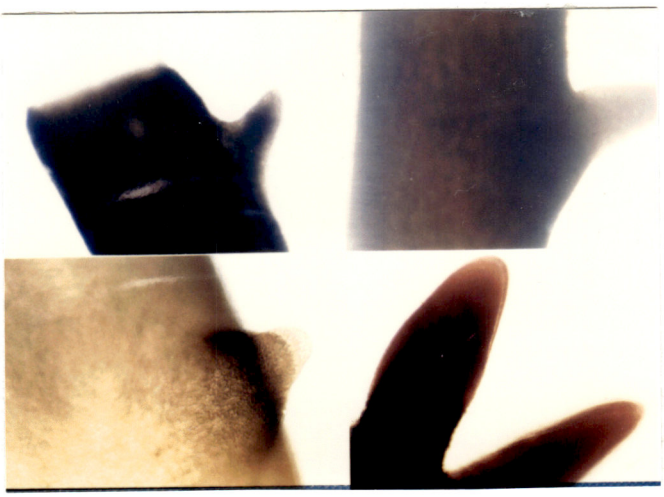
นำท่อนสาหร่ายที่ฆ่าเชื้อผิวนอกด้วย AB mix 2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มาเพาะเลี้ยงในอาหาร PES ที่มีความเข้มข้นของวุ้น (Agar) 0.125% 0.25% 0.5% ร่วมกับความเข้มข้นของสารอาหาร PES 0.5x 1x 1.5x และ 2x เท่า ให้แสงสว่างจากหลอดไฟ 3 ชนิดคือ หลอดไฟ daylight หลอดไฟ Gro-lux และหลอดไฟ Cool White โดยมีระยะเวลาให้แสงสว่าง : มืด เท่ากับ 16 : 8 ขนาดความเข้มแสง 25- 27.6 $\mu E\ m^{-2}\ .\ s^{-1}$ อุณหภูมิระหว่าง 28 – 30 °C ให้ผลการศึกษาดังตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** การศึกษาการเจริญ (Regeneration) ของสาหร่าย *Gracilaria fishii* ในอาหารสูตรต่าง ๆ (จากหลอด daylight)

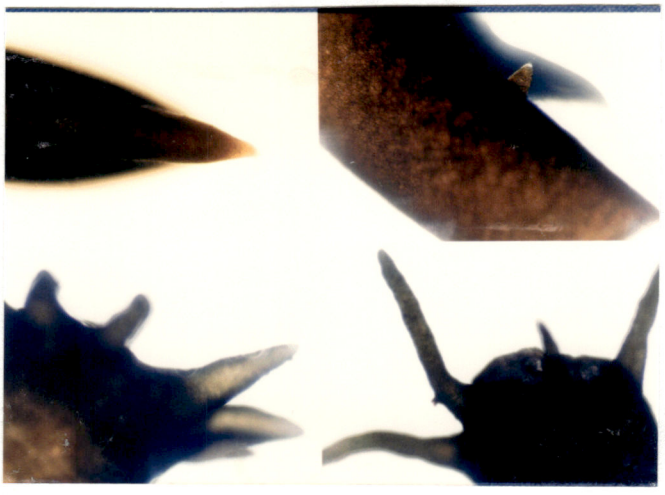
| | Medium | | physical change at $d_o$ | | Alive (%) | Regeneration (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | % pale | % greenish | | |
| A | 0.5 x PES, | 0.125% agar | - | 100 | 70 | 25 |
| B | 1 x PES, | 0.125% agar | 5 | 95 | 50 | 20 |
| C | 1.5 x PES, | 0.125% agar | 15 | 85 | 25 | 5 |
| D | 2 x PES, | 0.125% agar | 20 | 80 | 15 | - |
| E | 0.5 x PES, | 0.25% agar | 15 | 85 | 40 | - |
| F | 1 x PES, | 0.25% agar | 10 | 90 | 55 | - |
| G | 1.5 x PES, | 0.25% agar | 35 | 65 | 30 | - |
| H | 2 x PES, | 0.25% agar | 40 | 60 | 5 | - |
| I | 0.5 x PES, | 0.5% agar | 15 | 85 | - | - |
| J | 1 x PES, | 0.5% agar | 10 | 90 | - | - |
| K | 1.5 x PES, | 0.5% agar | 20 | 80 | 5 | - |
| L | 2 x PES, | 0.5% agar | - | 100 | 5 | - |

หมายเหตุ การทดลองใช้หลอดไฟ Gro-lux และหลอดไฟ Cool White ไม่มีท่อนสาหร่ายที่ยังมีชีวิตให้อ่านผลได้หลังจากการทดลองผ่านไป 1 สัปดาห์ นอกจากนี้จากการทดลองเลี้ยงภายใต้แสงธรรมชาติ pigment ในเซลล์สาหร่ายจะค่อย ๆ หายไป จนท่อนสาหร่ายขาวซีดภายในไม่ถึง 7 วัน

จากผลการทดลองนี้ พบว่า ในอาหารที่มีแร่ธาตุน้อย คืออาหาร PES ที่มีความเข้มข้น 0.5 เท่า และมีปริมาณวุ้นที่น้อย ทำให้สาหร่ายมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายสูง และมีเปอร์เซ็นต์การงอก (regeneration) ที่สูงกว่า ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแร่ธาตุสูง และมีปริมาณวุ้นสูง แต่อย่างไรก็ตามในการเลี้ยง ที่ความเข้มข้นของสูตรอาหาร PES เป็น 2 เท่า และมีปริมาณวุ้น 0.5 % พบว่าสาหร่ายไม่มีอาการซีดเลย



ภาพที่ 2 การงอกแขนงเล็ก ๆจากท่อนสาหร่าย *Gracilaria fishii* ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในอาหาร PES ความเข้มข้น 1 เท่า โดยไม่มีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ BA มีทั้งการแตกแขนงจากด้านข้าง และการแตกแขนงจากรอยตัด ซึ่งในภาพนี้ เนื้อเยื่อที่เจริญจากรอยตัดมีการเจริญแตกออกเป็น 2 แขนงจากรอยตัดเดียวกัน



**ภาพที่ 3** การงอกแขนงเล็ก ๆจากท่อนสาหร่าย *Gracilaria fishii* ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในอาหาร PES ความเข้มข้น 1 เท่า ที่มีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ BA 0.1% ท่อนสาหร่ายบางท่อนมีการ แตกแขนง หลายแขนงจากรอยตัดเดียวกัน และถ้าเป็นปลายแขนงเล็ก ๆที่ไม่ได้ตัดปลายออกก็จะมีการเจริญต่อไปยาวมากขึ้น แต่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กลง

**การศึกษาการเจริญ (Regeneration) ของสาหร่าย *Gracilaria fishii* ในอาหาร PES ที่มีฮอร์โมนสังเคราะห์**

หลังจากนำท่อนสาหร่ายที่แช่ในสารละลายแอนติไบโอติก AB mix 2 และนำท่อนสาหร่ายมาเลี้ยงในอาหาร PES ที่มีฮอร์โมน $N^6$- Benzyladenine (BA) และฮอร์โมน 1- Napthylacetic acid (NAA) ให้ผลดังตารางที่ 3 โดยพบว่าการเพิ่มฮอร์โมนสังเคราะห์ BA ในปริมาณ 0.01 % ลงในอาหารจะทำให้ *G. fishii* มีเปอร์เซ็นต์การงอกดีขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการทดลองแช่ท่อนสาหร่ายในสารละลายแอนติไบโอติกก่อนเลี้ยง 1 ชั่วโมง หรือแช่ ทิ้งไว้ข้ามคืน และไม่สามารถบอกได้ว่า การแช่ท่อนสาหร่ายในสารละลายแอนติไบโอติกข้ามคืนจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสภาพของเนื้อเยื่อภายหลังการทดลอง (10 วัน) ที่น้อยกว่าการแช่ท่อนสาหร่ายใน สารละลายแอนติไบโอติกก่อนเลี้ยงที่เวลา 1 ชั่วโมง หรือ 2 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากผลที่พบในการทดลองนี้ การแช่ท่อนสาหร่ายในสารละลายแอนติไบโอติกที่เวลา 1 หรือ 2 ชั่วโมง ก็สามารถทำให้ท่อนสาหร่ายซีด ไม่มี pigment หรือสภาพเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีเขียวได้มากไม่แตกต่างกับการแช่ท่อนสาหร่ายในสารละลายแอนติไบโอติกข้ามคืน

**ตารางที่ 3** การศึกษาการเจริญ (Regeneration) ของ *Gracilaria fishii* ในอาหาร PES ที่มี BA

| treatment | Regeneration (%) | | | | Physical change after $d_{10}$ (%) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $d_0$ | $d_3$ | $d_7$ | $d_{10}$ | no change | pale | greenish |
| 1. AB mix2 1 hr (80 segments) | 0 | 0 | 20 | 20 | 6.25 | 76.25 | 17.5 |
| 2. AB mix2 2 hr (100 segments+BA 0.01%) | 0 | 20 | 32 | 32 | 0 | 19.0 | 81.0 |
| 3. AB mix2 overnight (100 segments+BA 0.01%) | 0 | 15 | 36 | 36 | 30.0 | 54.0 | 16.0 |
| 4. AB mix2 overnight (120 segments+BA 0.01%) | 0 | 35 | 48.3 | 48.3 | 0 | 15.0 | 85.0 |

<u>หมายเหตุ</u> ผลการศึกษาการเจริญของท่อนสาหร่ายในความเข้มข้นของ BA 0.001, 0.005,0.0001% และ NAA ความเข้มข้น 0.01, 0.001, 0.005 และ 0.0001% ท่อนสาหร่ายมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ค่อนข้างต่ำ และ pigment ในเซลล์สาหร่ายจางหายไปหมดก่อน 7 วัน

**ตารางที่ 4** การศึกษาการเจริญ (Regeneration) ของสาหร่าย ***Gracilaria fishii*** ในอาหาร PES ที่มี ความเข้มข้นต่าง ๆกัน และมีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ BA

| treatment | Regeneration (%) (100 segments) | | | | Physical change after d18 (%) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | d0 | d3 | d10 | d18 | no change | pale | greenish |
| 1. 2x PES | 0 | 28 | 46 | 72 | 70.0 | 14.0 | 16.0 |
| 2. 3x PES | 0 | 32 | 55 | 72 | 66.0 | 6.0 | 28.0 |
| 3. 2x PES + BA 0.1 % | 0 | 38 | 72 | 89 | 68.0 | 8.0 | 24.0 |
| 4. 2x PES + BA 0.01 % | 0 | 21 | 55 | 74 | 72.0 | 14.0 | 14.0 |
| 5. 3x PES + BA 0.1 % | 0 | 24 | 79 | 97 | 99.0 | - | 1.0 |
| 6. 3x PES + BA 0.01 % | 0 | 24 | 70 | 85 | 73.0 | 6.0 | 21.0 |

จากการทดลองเพิ่มความเข้มข้นของสูตรอาหาร PES ในการเพาะเลี้ยงท่อนสาหร่ายพบว่า ที่ความเข้มข้น 2 เท่า และ 3 เท่า ทำให้ท่อนสาหร่ายคงสภาพเดิมได้มากขึ้น ทำให้ท่อนสาหร่ายมีการแตกกิ่งแขนงเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ในการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร PES ความเข้มข้น 3 เท่า ที่มีการเติม BA 0.1 เปอร์เซ็นต์ ท่อนสาหร่ายมีเปอร์เซ็นต์การงอก (วันที่ 18)สูงสุด ถึง 97 % ส่วนในการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร PES ความเข้มข้น 2 เท่า ที่มีการเติม BA 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์การงอกรองลงมา คือ 89 &

อย่างไรก็ตาม ในการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร PES ความเข้มข้น 2 และ 3 เท่าที่ไม่มีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ให้เปอร์เซ็นต์การงอกในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยงที่ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อมีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ BA 0.01 % ลงในอาหารด้วย เปอร์เซ็นต์การงอกในการเลี้ยงสาหร่ายด้วยสูตรอาหาร PES ความเข้มข้น 3 เท่า จะดีกว่าการเพาะเลี้ยง ในการด้วยอาหาร PES ความเข้มข้น 2 เท่า คือมี เปอร์เซ็นต์การงอกที่ 85 และ 72 % ตามลำดับ และนอกจากนี้ในการเลี้ยงสาหร่ายด้วยสูตรอาหาร PES ความเข้มข้น 3 เท่า พบว่ามีศักยภาพการเจริญของกิ่งแขนงที่เพิ่งงอกใหม่ดีกว่า มีการสังเคราะห์แสงเกิดขึ้นในแขนงที่งอกใหม่สังเกตได้ชัด และท่อนสาหร่ายยังคงสภาพเดิมมากกว่าการเลี้ยงในอาหาร PES ความเข้มข้น 2 เท่า

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

ภาพที่ 4 ท่อนสาหร่ายที่มีการงอกแขนงใหม่ ๆจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร PES ที่มีความเข้มข้น 2 เท่าจากสูตรเดิม (ซ้าย) ไม่มีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ในอาหาร (ขวา) เติม BA 0.1 % และ (ล่าง) เติม BA 0.01%

ภาพที่ 5 ท่อนสาหร่ายที่มีการงอกแขนงใหม่ ๆจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร PES ที่มีความเข้มข้น 3 เท่าจากสูตรเดิม (ซ้าย) ไม่มีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ในอาหาร (ขวา) เติม BA 0.1 % และ (ล่าง) เติม BA 0.01%

๖๗๙.๘๙
ก๔๙๔
ฉ.๖
249307

**การศึกษาการเจริญ** (Regeneration) **ของสาหร่าย** *Gracilaria fishii* **เปรียบเทียบกับการเจริญของ** *Gracilaria lemaneiformis* **และ** *Gracilaria salicornia*

ความสามารถในการเจริญของกิ่งแขนงของท่อนสาหร่ายที่ถูกตัดเป็นท่อนสั้นขนาด 1 เซนติเมตร ของสาหร่าย *G. fishii* เมื่อเปรียบเทียบกับ *G. lemaneiformis* และ *G. salicornia* แล้ว ความสามารถในการเจริญของท่อนสาหร่าย *G. fishii* ดีกว่าสาหร่าย *G. lemaneiformis* และ สาหร่าย *G. salicornia* เมื่อเลี้ยงในอาหาร PES ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การศึกษาการเจริญ (Regeneration) ของ *Gracilaria fishii* เปรียบเทียบกับการเจริญของ *G. lemaneiformis* และ *G. salicornia*

| treatment | Regeneration(%) (100segments)at d7 | Contaminatiom (%) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | bacteria | fungus | diatom | other algae |
| 1x PES *G. fishii* | 36 | 4 | - | 1 | 73 |
| 2x PES *G. fishii* | 44 | 21 | - | - | 60 |
| 3x PES *G. fishii* | 58 | 27 | - | 1 | 73 |
| 1xPES *G. lemaneiformis* | 18 | - | - | 25 | 12 |
| 2xPES *G. lemaneiformis* + 0.01 BA | 32 | - | - | 21 | 9 |
| 2xPES *G. lemaneiformis* + 0.001 BA | 23 | - | - | 36 | 13 |
| 1xPES *G. salicornia* | 9 | - | - | - | - |
| 2xPES *G. salicornia* + 0.01 BA | 28 | - | 1 | - | 4 |
| 2xPES *G. salicornia* + 0.001 BA | 13 | - | 4 | - | 3 |

อย่างไรก็ตาม พบว่าในการเพาะเลี้ยง *Gracilaria fishii* และ *G. salicornia* ยังมีการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียและราบ้าง และพบว่าเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของอาหาร เป็น 2 เท่า และ 3 เท่า จากสูตรปกติ สาหร่าย *Gracilaria fishii* มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อมีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ BA ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยง *G. lemaneiformis* และ *G. salicornia* สาหร่ายทั้งสองชนิดมีความสามารถงอกได้ดีขึ้นเมื่อปริมาณฮอร์โมนมากขึ้น โดยถ้าเลี้ยง *G. lemaneiformis* ด้วยอาหาร PES สูตรปกติ จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกเพียง 18 % แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอาหารเป็น 2 เท่า และเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ BA 0.001 % และ 0.01 % *G. lemaneiformis* จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกเพิ่มขึ้นอีก 23 % และ 32 % ตามลำดับ เช่นเดียวกับการเลี้ยงสาหร่าย *G. salicornia* ถ้าเลี้ยงด้วยอาหาร PES สูตรปกติ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การงอกเพียง 9 % แต่เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของอาหาร เป็น 2

เท่า พร้อมกับมีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ BA 0.001 % และ 0.01 % พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การงอกเพิ่มขึ้นเป็น 13% และ 28 % ตามลำดับ

## วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษา เพื่อให้ได้ Axenic culture ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *G. fishii* นั้นพบว่า การใช้แสงอุลตราไวโอเลตในการฆ่าเชื้อบริเวณผิวท่อนสาหร่าย ต้องใช้เวลานานมากกว่าการใช้วิธีการฆ่าเชื้อด้วยสารแอนติไบโอติก ในการฆ่าเชื้อด้วยแสงอุลตราไวโอเลต เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ไม่ให้ผลในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราบริเวณผิวท่อนสาหร่ายเลย เนื่องจากยังมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียบางชนิดและเชื้อราถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และถ้าเพิ่มระยะเวลาในการให้แสงท่อนสาหร่ายเป็น 2 ชั่วโมง สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียได้ถึง 54 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นหากจะใช้วิธีนี้ในการฆ่าเชื้ออาจจะต้องใช้ระยะเวลามากขึ้นอย่างน้อยถึง 3 ชั่วโมง

สำหรับวิธีการฆ่าเชื้อบริเวณผิวท่อนสาหร่ายด้วยการแช่ในสารละลายผสมของสารแอนติไบโอติก ABmix 1 ซึ่งประกอบด้วยเพนิซิลลิน จี 622.5 มก. สเตรปโตมัยซิน ซัลเฟต 250 มก. และคลอแรมเฟนิคอล 100 มก. ต่อน้ำทะเลที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ลิตร พบว่า จากการใช้สารละลายผสมของสารแอนติไบโอติก ABmix 1 ความเข้มข้น 1 เท่า แช่ท่อนสาหร่ายค้างคืนจะช่วยลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียและเชื้อราได้เกือบหมด แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นเป็น 5 เท่า ใช้เวลาแช่ท่อนสาหร่ายเพียง 1 ชั่วโมง ก็สามารถฆ่าเชื้อราและแบคทีเรียได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ถ้าแช่ท่อนสาหร่ายในสารละลายผสมของสารแอนติไบโอติก ABmix 2 ซึ่งประกอบด้วยสเตรปโตมัยซินซัลเฟต คานามัยซิน และอีรีโธรมัยซิน 0.02% 0.01% และ 0.02% ตามลำดับ พบว่าสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียและราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาแช่ท่อนสาหร่ายเพียง 2 ชั่วโมงโดยไม่ต้องเพิ่มความเข้มข้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสาหร่ายนั้น หากมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา พบว่าจะมีผลโดยตรงต่อการงอกกิ่งแขนงใหม่ ๆและการเจริญของแขนงที่งอกใหม่ แต่ถ้าเป็นการปนเปื้อนด้วย diatom หรือ สาหร่ายขนาดเล็กชนิดอื่น ซึ่งเป็นเพียง epiphyte ที่ผิวนอกของท่อนสาหร่ายส่วนมากแล้วจะไม่มีผลต่อการงอกแขนงใหม่ ๆหรือการเจริญของกิ่งแขนงแต่อย่างใด

ผลการศึกษาการเจริญ (Regeneration)จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ของสาหร่าย *Gracilaria fishii* พบว่าในทุก ๆ การทดลองจะพบการงอกกิ่งแขนงขึ้นใหม่ แต่กิ่งแขนงที่งอกนั้นมีขนาดเล็กกว่าท่อนสาหร่ายเดิมและไม่ค่อยมี pigment เป็นส่วนใหญ่ รวมทั้งสีท่อนสาหร่ายจะค่อย ๆมีการเปลี่ยนแปลงไปจากสีม่วงแดง เป็นสีม่วงแดงที่จางลงและค่อย ๆเป็นสีเขียว และในที่สุดก็จะมีสีซีดขาวหมดทั้งท่อน เมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงนานขึ้น เนื่องจากปริมาณความเข้มแสงอาจไม่เพียงพอสำหรับการเจริญและการสังเคราะห์แสง ประกอบกับอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง ทำให้ photosynthetic pigments ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ อัตราการสังเคราะห์แสงลดลง ในที่สุดก็เกิดอาการซีดขาว (bleaching) เนื่องจากปริมาณความเข้มแสงสูงสุดที่สามารถให้ได้จากหลอดไฟ daylight จำนวน 6 หลอด มีเพียง 25-27.6$\mu$mol $m^{-2}.s^{1}$ (แสงจากดวงอาทิตย์ในเวลากลางวันมีค่าประมาณ 2,000 $\mu$mol $m^{-2}.s^{1}$ ) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ upper และ mid-sublitteral ปริมาณแสงที่ส่องถึงเต็มที่ประมาณ 150 ถึง 250 000 $\mu$mol $m^{-2}. s^{1}$ ส่วนปริมาณแสงที่บริเวณ deep-sublitteral จะต่ำกว่า 100 $\mu$mol $m^{-2}. s^{1}$ เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณน้ำลึกหรือในถ้ำ จะมีปริมาณแสงเพียง 0.9-21 $\mu$mol $m^{-2}.s^{1}$ (Lobban และ Harrison, 1997) นับว่าปริมาณความเข้มแสงที่ใช้ใน

การทดลองค่อนข้างน้อย แต่ถ้าหากต้องการเพิ่มปริมาณแสงให้มากขึ้น ก็ต้องพยายามควบคุมไม่ให้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเพิ่มสูงขึ้นด้วย แม้ว่ากิ่งแขนงที่งอกใหม่จากท่อนสาหร่ายบางส่วนมีสีซีดขาวแม้สาหร่ายท่อนเดิมจะยังคงมีสภาพไม่เปลี่ยนแปลงแต่ก็ยังพบว่าเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของสูตรอาหาร เป็น 2 เท่า และ 3 เท่าจากสูตรปกติ กิ่งแขนงที่งอกใหม่จะสามารถสร้าง pigment และสามารถสังเคราะห์แสงได้เป็นปกติเมื่อใช้เวลาเพาะเลี้ยงที่ยาวนานขึ้น

อย่างไรก็ตาม เมื่อปริมาณแสงที่สาหร่ายได้รับมีความสัมพันธ์กับขบวนการสังเคราะห์แสงอย่างมาก ระยะเวลาที่ให้แสงต่อวันรวมทั้งความเข้มแสง (Photon Flux Density) จึงเป็นสิ่งที่สำคัญและส่งผลต่อการเจริญของสาหร่าย นอกจากนี้ยังมีผลต่อรูปร่างลักษณะของสาหร่ายด้วย Macler และ Zupan (1991) พบว่าเมื่อค่าความเข้มแสงน้อยกว่า 50 $\mu$mol $m^{-2}.s^{1}$ สาหร่ายมักจะเจริญเป็นต้นตรง ๆไม่ค่อยแตกกิ่งแขนง แต่ถ้าความเข้มแสงมีมากกว่า 150 $\mu$mol $m^{-2}.s^{1}$ สาหร่ายจะถูกกระตุ้นให้สร้างกิ่งแขนงมากขึ้น

จากการศึกษาผลการเจริญ (Regeneration) ของสาหร่ายในอาหารสูตรต่าง ๆ โดยเพิ่มปริมาณความเข้มข้นอาหารตามสูตร PES เดิม และใส่ปริมาณวุ้นต่าง ๆกันตั้งแต่ 0.125 % 0.25% และ 0.5 % พบว่าท่อนสาหร่าย *Gracilaria fishii* ให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตอยู่รอด (หลังจาก 14 วัน) และให้เปอร์เซ็นต์การงอกที่ดีที่สุดที่สูตรอาหาร 0.5 เท่า ของอาหาร PES และเปอร์เซ็นต์ของวุ้นในอาหาร 0.125 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นผลที่ตรงข้ามกับการศึกษาในครั้งหลังซึ่งเป็นการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของ *Gracilaria fishii* กับ *G. **lemaneiformis*** และ ***G.** salicornia* ที่เวลาการเพาะเลี้ยง 7 วัน พบว่าในอาหาร PESที่มีความเข้มข้น มากขึ้น 2 เท่า และ 3 เท่า *Gracilaria fishii* มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ดีกว่าการเพาะเลี้ยงที่สูตรอาหาร PES ปกติ คือที่สูตรอาหารเข้มข้น 3 เท่า มีเปอร์เซ็นต์การงอก 58 % ที่สูตรอาหารเข้มข้น 2 เท่า ให้เปอร์เซ็นต์การงอก 44 % ในขณะที่ สูตรอาหารความเข้มข้นปกติ (1 เท่า) ให้เปอร์เซ็นต์การงอก 36% ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้ให้ผลที่แตกต่างกันในทางตรงกันข้าม อาจเนื่องจากมีปัจจัยอื่น ๆเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น อายุ ความแข็งแรงสมบูรณ์ของเนื้อเยื่อ รวมทั้งส่วนที่นำมาเลี้ยงเป็นส่วนที่ใกล้โคนหรือใกล้ส่วนปลายของทัลลัส ตลอดจนประวัติในการได้รับแร่ธาตุและสารอาหารก่อนหน้าที่จะนำมาทดลอง ซึ่งปัจจัยต่าง ๆเหล่านี้จะมีผลโดยตรงต่อการดูดซึมของแร่ธาตุ (Lobban และคณะ,1985) ในการทดลองแต่ละครั้งอาจได้ท่อนสาหร่ายที่มีคุณภาพที่แตกต่างกันรวมทั้งมีประวัติในการได้รับแร่ธาตุที่มีความแตกต่างกันมาก่อน แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองครั้งหลังเมื่อมีการเปรียบเทียบการงอกในสาหร่าย *Gracilaria* อื่น ๆอีก 2 ชนิด คือ *G. lemaneiformis* และ *G. salicornia* ก็ให้ผลสนับสนุนผลการทดลองในครั้งหลัง คือ ในสูตรอาหาร PES ที่มีความเข้มข้น 3 เท่า ให้เปอร์เซ็นต์การงอกดีกว่าสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นเพียง 2 เท่า และ 1 เท่า (เปอร์เซ็นต์วุ้น 0.25%) และเมื่อมีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ BA 0.01 % เปอร์เซ็นต์การงอกจะสูงกว่าในการเลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มีการเติมฮอร์โมน และเมื่อมีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ BA เพิ่มสูงขึ้นเป็น 0.1 % ท่อนสาหร่ายจะมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ดีกว่าการเลี้ยงที่มีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ 0.01 % และ 0.001 % ส่วนการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ NAA ในทุกระดับความเข้มข้นให้เปอร์เซ็นต์การงอกที่ต่ำมากจนไม่อาจจะนำมาใช้ในการทดลองในครั้งต่อ ๆไปได้ ซึ่งเป็นผลการทดลองที่ตรงกันกับการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสาหร่าย ของ Xue-wu และ Gordon ( Xue-wu และ Gordon, 1987) ที่ทดลองเติม NAA ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Pterocladia* และ *Porphyra* ซึ่งให้ผลการงอกที่ไม่ดีเช่นกัน

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสาหร่ายขนาดใหญ่ในห้องปฏิบัติการที่จำเป็นต้องมีการควบคุมปัจจัยต่าง ๆให้เหมาะสมกับชนิดสาหร่ายที่ทำการศึกษานั้น ยังมีข้อจำกัดหลายอย่างที่ทำให้สภาพของการทดลองแต่ละครั้งอาจแตกต่างกันได้บ้าง จึงทำให้ผลการทดลองในแต่ละครั้งมีความแตกต่างกันบ้าง แต่จากการทำซ้ำทำให้ทราบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสูตรอาหารเป็น 2 เท่า และ 3 เท่า กลับเป็นสิ่งที่ดีกว่า และถ้าหากมีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ BAในปริมาณความเข้มข้น 0.1 % กลับมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกที่ดีกว่าการใช้ฮอร์โมน ปริมาณ 0.01 % และแม้ว่าจะไม่มีการใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์เลย ท่อนสาหร่ายก็สามารถงอกได้เช่นกันแต่งอกได้ในเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำกว่า แน่นอนว่าในสภาพที่ทุก ๆปัจจัยที่อยู่ภายใต้การควบคุมนั้นย่อมไม่ดีเท่ากับในสภาพธรรมชาติ อย่างไรก็ตามท่อนสาหร่ายที่มีการเพาะเลี้ยงให้งอกจนถึงวันที่18 นั้น เมื่อมีการนำไปไว้ในธรรมชาติจะยังคงสามารถมีการเจริญเติบโตแตกกิ่งแขนงต่อไปได้ตามปกติ เนื่องจากในสภาพธรรมชาติ มีการเคลื่อนที่ไหลเวียนของน้ำ และอากาศ ทำให้สาหร่ายมีอัตราการเจริญที่สูงขึ้นด้วย ซึ่งตรงกันข้ามกับการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ แม้ว่าสาหร่ายจะได้รับแร่ธาตุต่าง ๆครบ แต่อยู่ในสภาพที่นิ่ง การแพร่ของแร่ธาตุที่จะผ่านผนังเซลล์เข้าไปจึงไม่ดีเท่ากับการที่สาหร่ายอยู่ในสภาพธรรมชาติที่มีน้ำล้อมอยู่โดยรอบ และมีการเคลื่อนที่หมุนเวียนของน้ำอยู่ตลอดเวลา

## สรุปและข้อเสนอแนะ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสาหร่าย *Gracilaria fishii* ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ พบว่าท่อนสาหร่าย *Gracilaria fishii* ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดจากการเลี้ยงด้วยอาหาร PES ( Provasoli,1968) ที่มีความเข้มข้น 3 เท่าจากสูตรปกติ และมีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ $N^6$ -Benzyladenine (BA) ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยให้เปอร์เซ็นต์การงอก 97 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร PES ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า จากสูตรปกติ และเติมฮอร์โมน BA 0.1 % ให้เปอร์เซ็นต์การงอกรองลงมา คือ 89 เปอร์เซ็นต์ การเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร PES ที่มีความเข้มข้นเป็น 3 เท่าแต่เติม ฮอร์โมน BA 0.01 % ให้เปอร์เซ็นต์การงอกน้อยกว่าเมื่อเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ BA ความเข้มข้น0.1 % โดยให้เปอร์เซ็นต์การงอกที่ 85 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหาร PES ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า และ 3 เท่า โดยไม่เติมฮอร์โมนสังเคราะห์ใด ๆ ให้เปอร์เซ็นต์การงอกที่ใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงในอาหาร PES ความเข้มข้น 2 เท่าที่มีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ BA 0.01 % โดยให้เปอร์เซ็นต์การงอกที่ 72 และ 74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และนอกจากนี้การเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร PES ที่มีความเข้มข้น 3 เท่ายังช่วยให้ท่อนสาหร่ายคงสภาพเดิม แขนงที่งอกใหม่มีการสังเคราะห์แสงได้เหมือนเดิม ได้นานกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหาร PES สูตรปกติ และสูตรความเข้มข้น 2 เท่า

การเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ 1-Napthylacetic acid, NAA ที่มีความเข้มข้น 0.0001, 0.005, 0.001, 0.01 และ 0.1 % ให้เปอร์เซ็นต์การงอกที่ค่อนข้างต่ำ เมื่อเลี้ยงในอาหาร PES สูตรปกติ ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เพื่อเพิ่มความสามารถในการงอก ( regeneration) ของท่อนสาหร่ายในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ส่วนการเจริญ (regeneration) ของสาหร่าย *Gracilaria* ชนิดอื่น เช่น *G. salicornia* และ *G. lemaneiformis* สามารถงอกแขนงใหม่ ๆได้เหมือนกัน แต่มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่น้อยกว่า *Gracilaria fishii* และใน *G. salicornia* ค่อนข้างจะเป็นการแตกหน่อใหม่ ๆมากกว่าและต้องมีการเติมฮอร์โมนสังเคราะห์ BA รวมทั้งเพิ่มความเข้มข้นของสูตรอาหารจึงจะสามารถงอกได้มากขึ้น

**ข้อเสนอแนะ** การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสาหร่ายอาจกระทำได้หลายระดับ ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัย เช่นอาจเพาะเลี้ยงจาก carpospore, cell suspension หรือ protoplast ของสาหร่าย แต่อย่างไรก็ตามหากต้องการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้สารประกอบที่เซลล์สาหร่ายสร้างขึ้นเพื่อนำมาใช้ประโยชน์เป็นปริมาณมาก ๆในทางอุตสาหกรรม การเพาะเลี้ยงในสภาพธรรมชาติจะให้ผลผลิตที่สูงกว่าและประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่า

## เอกสารอ้างอิง

นันทวัน สุเภากิจ ทวี หอมชง และพรรณี เพชรยศ.2534. การแพร่กระจายของสาหร่ายสีแดงบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย เอกสารงานวิจัยเลขที่ 45/2534 สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี. 34 หน้า

Dawes, C. J.1974. Marine Algae of the West Coast of Florida University of Miami Press. Florida 201 p.

Druehl , L. D and Hsiao, S. I. C. 1969. Axenic culture of Laminariales in defined media. Phycologia 8 : 47 - 49

Garcia-Reina, G., Go'mez-Pinchetti, L., Robledo, D.R. and Sosa, P. 1991. Actual, Potential and speculative applications of seaweed cellcular biotechnology : some specific comments on Gelidium. Hydrobiologia 221 : 181 - 194

Garcia-Reina, G., Robaina, R., Tejedor, M., and Luque, A. 1988. Attempts to establish axenic cultures and photoautotrophic growth of *Gelidium versicolor* , *Gracilaria ferox* and *Laurencia* sp cell cultures. In. Stadler *et.al.* (eds.) Algal Biotechnology, Elsevier Applied Scieuce, London. 521 p.

Liu Xue-Wu and Gordon, M. E. 1987. Tissue and cell culture of New Zealand *Pterocladia* and *Porphyra* species. Hydrobiologia. 151/152 : 147 - 154

Lobban, C. S., Harison, P. J. and Duncan, M. J. 1985. The Physiological Ecology of Seaweeds. Cambridge University Press. London. 242 p.

Macler, B.A. and Zupan. J. R. 1991. Physiological basis for the cultivation of the Gelidiaceae. Hydrobiologia 221 : 83 - 90.

Nakanishi, K. 1992. A naw method for the preparation of an axenic primary cell culture of the giant coenocytic algae. In. MBI Report 1992, Marine Biotechnology Institute Co., Ltd. Tokyo. Japan. pp. 53 - 56

Polne-fuller, M., and Gibor, A. 1987. Calluses and callus-like growth in seaweeds : Induction and culture. Hydrobiologia 151/152 : 131 - 138

Provasoli, L. 1968. Media and prospects for the cultivation of Marine alga. *In* Hatori, A. (ed.). Proc. U.S.-Jpn. Conf., Culture and Collection of Algae, p. 63-75. Jpn.Soc. Plant Physiol., Kyoto.

Smith , G. M. 1951. Marine Algae of the Monterey Peninsula. Standford University Press, Stand-ford, California.