

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพูสีไทยในสภาพปลอดเชื้อ

IN VITRO CONSERVATION OF BAT FLOWERS

(*TACCA CHANTRIERI* ANDRE) GERMPLASM

วรินทร์พร จิวัรัตนสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพูสีไทยในสภาพปลอดเชื้อ

วรินทร์พร จิวรรตณสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพูสีไทยในสภาพปลอดเชื้อ
In vitro Conservation of Bat Flowers (*Tacca chantrieri* Andre)
Germplasm

ชื่อ – นามสกุล

นางสาววรินทร์พร จีวรตันสกุล

สาขาวิชา

เทคโนโลยีการผลิตพืช

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปิยะวดี เจริญวัฒนะ, Ph.D.

ปีการศึกษา

2557

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชดา ทนวิทูวงศ์, วท.ค.)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์บัวทิพย์ อุบลประเสริฐ, วท.ค.)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปิยะวดี เจริญวัฒนะ, Ph.D.)

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ศักดิ์แพทย์หญิงรุ่งสรวรรค์ วรรณสุทธิ, พบ.ม.)

วันที่ 7 เดือน กันยายน พ.ศ. 2558

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพุลีไทยในสภาพปลอดเชื้อ
ชื่อ – นามสกุล	นางสาววรินทร์พร จีวรัตนสกุล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีการผลิตพืช
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปิยะวดี เจริญวัฒนะ, Ph.D.
ปีการศึกษา	2557

บทคัดย่อ

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพุลีไทย มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพุลีไทยในสภาพปลอดเชื้อ โดยทดลองเก็บรักษาดัชนีพืชโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโตและการเก็บรักษาปลายยอดในสภาพเยือกแข็ง

จากการเก็บรักษาดัชนีพืชโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต โดยนำต้นอ่อนอายุ 3 เดือน จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) จำนวน 9 สูตร ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักและน้ำตาลซูโครส 3 ระดับ คือ MS, $\frac{1}{2}$ MS และ $\frac{1}{4}$ MS และ 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ภายใต้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) แบ่งเป็น 9 สูตรอาหาร แต่ละสูตรมี 10 ซ้ำ บันทึกผลความสูงต้น และจำนวนใบ เป็นเวลา 9 เดือน พบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพุลีไทยโดยการชะลอการเจริญเติบโต คือ อาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร สามารถชะลอการเจริญเติบโตของพืชได้ดีที่สุด โดยให้ค่าเฉลี่ยความสูงของต้นและจำนวนใบต่อดัชนีต่ำสุด เท่ากับ 2.22 เซนติเมตร และ 3.9 ใบ ตามลำดับ

สำหรับการเก็บรักษาส่วนปลายยอดในสภาพเยือกแข็ง โดยใช้เทคนิค Encapsulation – Vitrification วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) แบ่งออกเป็น 5 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ บันทึกผลอัตราความมีชีวิตของปลายยอด พบว่า การปรับสภาพปลายยอดก่อนการเก็บในไนโตรเจนเหลว บนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 0.3 โมลาร์ แซ่สารละลาย PVS2 20 นาที มีอัตราความมีชีวิตสูงสุด เท่ากับ 33.33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำปลายยอดที่ผ่านการปรับสภาพเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 1 เดือน ไม่พบการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดเมื่อเก็บรักษาด้วยวิธีนี้

คำสำคัญ: การเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อ เนระพุลีไทย การชะลอการเจริญเติบโต การเก็บในสภาพเยือกแข็ง encapsulation -vitrification

Thesis Title	<i>In vitro</i> Conservation of Bat Flower (<i>Tacca chantrieri</i> Andre) Germplasm
Name – Surname	Miss Varinporn Jewruttanasakul
Program	Crop Production Technology
Thesis Advisor	Assistant Professor Piyavadee Charoenwattana, Ph.D.
Academic Year	2014

ABSTRACT

The conservation of Bat Flowers (*Tacca chantrieri* Andre) germplasm was carried out to determine appropriate methods for *in vitro* conservation. The research was performed through minimal growth and shoot tip cryopreservation, using Encapsulation –Vitrification technique.

The 3 months-old plantlets from the seeds culture *in vitro* were used in the minimal growth method. The plantlets were cultured on 9 media with 3 different MS strengths (MS, ½ MS, ¼ MS), and three different sucrose concentrations (30, 60 and 90 g/l). Subsequently, the plantlets were transferred to a culture room, and maintained at the temperature between 25-27°C, with light intensity of 2,000 luxs for 16 hour photoperiods. The experiment was a completely randomized design (CRD) divided into 9 media, each media is 10 replications and recorded the results in terms of plants height and number of leaves for over 9 months. It was found that the best conservation of the bat flower germplasm through the minimal growth of plantlets was achieved through the use of ½ MS medium containing 90 g/l sucrose. The plantlets cultured on this medium had the lowest height and number of leaves of 2.22 cm. and 3.9 leaves, respectively.

The cryopreservation of shoot tips was established by using Encapsulation – Vitrification technique. The experiment was a completely randomized design (CRD) divided into 5 treatments, each treatment is 3 replications. The rate of the viability of shoot tips were recorded. The pre-culture step was performed on MS medium supplemented with 0.3 M sucrose followed by incubation in infusion solution (PVS2) for 20 minutes. The results showed the survival of shoot tips was 33.3 percent. The pre-treatment shoot tips were then stored in liquid nitrogen for 24 hours. It was found that the growth of shoot tips could not be recovered after one month cultured on MS medium.

Keywords: *in vitro* conservation, *Tacca chantrieri* Andre, minimal growth, cryopreservation, encapsulation - vitrification

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะวดี เจริญวัฒนะ อาจารย์ที่ปรึกษาหลักวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้คำปรึกษาและให้คำแนะนำในการเรียนการค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชดา ทนวิทูร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บัวทิพย์ อุบลประเสริฐ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณปาริฉัตร สังข์สะอาด นักวิชาการเกษตรชำนาญการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาดูแลการทำงานวิจัยในทุกขั้นตอนในด้านข้อมูลเครื่องมืออุปกรณ์ต่างๆในห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณพี่ๆ ทุกคน ของกลุ่มวิจัยพัฒนารานการเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ ที่ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือเรื่องข้อมูลของงานวิจัย และขอขอบคุณสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ คลอง 6 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จังหวัดปทุมธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ที่ใช้ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ ประสิทธิ์ประสาทวิชา บ่มเพาะจนผู้วิจัยสามารถนำเอาหลักการมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่ ครอบครัวและเพื่อนนักศึกษาปริญญาโท รวมถึงบุคลากรบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้สนับสนุน ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้แก่ผู้วิจัยอย่างดีเสมอมา หากงานวิจัยในครั้งนี้ขาดตกบกพร่องประการใด ผู้วิจัยขอกราบขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

วรินทร์พร จีวรัตนสกุล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	(3)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	(4)
กิตติกรรมประกาศ.....	(5)
สารบัญ.....	(6)
สารบัญตาราง.....	(8)
สารบัญภาพ.....	(10)
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	2
1.3 สมมุติฐานของการวิจัย.....	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.5 ขั้นตอนการศึกษาวิจัย.....	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์.....	5
2.2 การใช้ประโยชน์.....	6
2.3 การปลูกเลี้ยงและการขยายพันธุ์.....	7
2.4 การเก็บรักษาพันธุ์กรรมพืช.....	7
2.5 การเก็บรักษาพันธุ์กรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ.....	9
2.6 เทคนิคการเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation).....	16
2.7 การเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยเทคนิคเมล็ดเทียม (encapsulation or artificial seeds).....	19
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
3.1 อุปกรณ์.....	21

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3.2 วิธีการทดลอง.....	22
การทดลองที่ 1 ศึกษาการเก็บรักษาดัชนีระยะฟูลีไทยในสภาพปลอดเชื้อโดย	
การชะลอการเจริญเติบโต.....	22
การทดลองที่ 2 ศึกษาการเก็บรักษาปลายยอดพืชระยะฟูลีไทยในสภาพ	
เยือกแข็งโดยใช้เทคนิค encapsulation – vitrification.....	23
3.3 สถานที่และระยะเวลาที่ทำการวิจัย.....	25
4 ผลการทดลอง.....	26
4.1 การเก็บรักษาดัชนีระยะฟูลีไทยในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโต..	26
4.2 การเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดพืชระยะฟูลีไทยในสภาพเยือกแข็งโดยใช้	
เทคนิค encapsulation – vitrification.....	40
5 วิเคราะห์ผลการทดลอง สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	45
5.1 วิเคราะห์ผลการทดลอง.....	45
5.2 สรุปผลการวิจัย.....	49
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	49
บรรณานุกรม.....	51
ภาคผนวก.....	58
ภาคผนวก ก.....	59
ภาคผนวก ข.....	62
ประวัติผู้วิจัย.....	68

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ความสูงของต้นเนระพูสีไทย เมื่อทำการเก็บรักษาพันธุ์กรรมพืชโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต บนอาหาร MS สูตรต่างๆ จำนวน 9 สูตร เป็นเวลา 9 เดือน.....	33
4.2	จำนวนใบของต้นเนระพูสีไทย เมื่อทำการเก็บรักษาพันธุ์กรรมพืชโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต บนอาหาร MS สูตรต่างๆ จำนวน 9 สูตร เป็นเวลา 9 เดือน.....	34
4.3	อัตราความมีชีวิตของเนื้อเยื่อปลายยอดเนระพูสีไทยที่ผ่านการ preculture ในอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ และแช่ในสารละลาย PVS2 ที่ช่วงเวลาต่างๆ เมื่อเก็บรักษาปลายยอดพืชในสภาพเยือกแข็งโดยวิธี encapsulation – vitrification.....	42



สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962).....	59
2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสูงต้นเนระพูสีไทย ที่เก็บรักษาโดยการ ชะลอการเจริญเติบโตบนอาหาร MS สูตรต่างๆ 9 สูตร เป็นเวลา 3, 6 และ 9 เดือน.....	60
3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนใบต้นเนระพูสีไทย ที่เก็บรักษาโดยการ ชะลอการเจริญเติบโตบนอาหาร MS สูตรต่างๆ 9 สูตร เป็นเวลา 3, 6 และ 9 เดือน.....	60
4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนอัตราความมีชีวิตของเนื้อเยื่อปลายยอดเนระพูสีไทยที่ ผ่านการ preculture ในอาหารสูตร MS ที่ เติมน้ำตาลซูโครส 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ และแช่ในสารละลาย PVS2 ที่ช่วงเวลาต่างๆ เมื่อเก็บรักษาปลายยอดพืชในสภาพ เยือกแข็งโดยวิธี encapsulation-vitrification.....	61



สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	พืชวงศ์ Taccaceae ที่สำรวจพบในประเทศไทย จำนวน 5 พันธุ์.....	4
2.2	ส่วนต่างๆ ของต้นเนระพูสีไทย	6
3.1	ฝักและเมล็ดของเนระพูสีไทย.....	21
3.2	ขั้นตอนการเก็บรักษาปลายยอดเนระพูสีไทยในไนโตรเจนเหลวโดยวิธี encapsulation – vitrification.....	25
4.1	ความสูงของต้นเนระพูสีไทยที่เก็บรักษาพันธุ์กรรมพืชโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต บนอาหาร MS สูตรต่างๆ จำนวน 9 สูตร เป็นเวลา 9 เดือน.....	35
4.2	จำนวนใบของต้นเนระพูสีไทยที่เก็บรักษาพันธุ์กรรมพืชโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต บนอาหาร MS สูตรต่างๆ จำนวน 9 สูตร เป็นเวลา 9 เดือน.....	35
4.3	ลักษณะต้นเนระพูสีไทยที่เก็บรักษาด้วยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต เป็นเวลา (ก) 1 เดือน (ข) 3 เดือน (ค) 6 เดือน และ (ง) 9 เดือน โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS สูตรต่างๆ 9 สูตร.....	36
4.4	ต้นเนระพูสีไทยที่เก็บรักษาด้วยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS สูตรต่างๆ 9 สูตร เป็นเวลา 9 เดือน	37
4.5	ความสูงของต้นเนระพูสีไทยที่เก็บรักษาโดยการชะลอการเจริญเติบโตบนอาหารสูตร MS, ½ MS และ ¼ MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่างกัน คือ 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน	38
4.6	ความสูงของต้นเนระพูสีไทยที่เก็บรักษาโดยการชะลอการเจริญเติบโตบนอาหารสูตร MS, ½ MS และ ¼ MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่างกัน คือ 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 เดือน	38
4.7	ความสูงของต้นเนระพูสีไทยที่เก็บรักษาโดยการชะลอการเจริญเติบโตบนอาหารสูตร MS, ½ MS และ ¼ MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่างกัน คือ 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 9 เดือน	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.8	เนื้อเยื่อปลายยอดเนระพูสีไทยที่ผ่านการ preculture บนอาหาร MS ที่เติมชูโครส 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ ผ่านการแช่สารละลาย PVS2 ที่ช่วงเวลาต่างๆ และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 1 เดือน	43
4.9	เนื้อเยื่อปลายยอดเนระพูสีไทยที่ผ่านการ preculture บนอาหารสูตร MS ที่เติมชูโครส 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ ผ่านการแช่สารละลาย PVS2 ที่ช่วงเวลาต่างๆ เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว 24 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เป็นเวลา 1 เดือน	44



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ต้นเนระพูสีไทย หรือ ค้างคาวดำ (*Tacca chantrieri* Andre) อยู่ในวงศ์ Taccaceae เป็นพืชล้มลุก มีหัวหรือเหง้าอยู่ใต้ดิน ลักษณะดอกคล้ายหน้าค้างคาว มีหนวดสวยงามแปลกตา ดอกมีสีดำนั่นเนระพูสีไทยมีประโยชน์ในหลายด้าน คือ ด้านสมุนไพร ช่วยดับพิษไข้ รักษาโรคความดันเลือดต่ำ บำรุงกำลัง เจริญอาหาร โรคในปากคอ แก้เม็ดผื่นคันตามร่างกาย เป็นต้น ด้านอาหารนำมาทำเป็นผักสด ในปัจจุบันนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ ใช้เป็นส่วนผสมในตำรับยาไทย และพัฒนามาเป็นไม้ดอกไม้ประดับ เนื่องจากเป็นพืชที่มีลักษณะแปลกและน่าสนใจ แต่ละพื้นที่ก็จะมีการเรียกชื่อที่แตกต่างกันออกไป เช่น ดิงหว่า คลุ้มเสีย วานหัวลา ดิปลาซ่อน เนระพูสีไทย มังกรดำ ม้าถอนหลัก และวานพังพอน เป็นต้น สำหรับประเทศไทยจัดเป็นพืชสมุนไพรที่หายาก และตลาดมีความต้องการอีกมาก พืชในสกุลนี้พบว่ามีประมาณ 5 ชนิด ที่ขึ้นอยู่ในป่าเมืองไทย ปัจจุบันต้นเนระพูสีไทย มีจำนวนลดลงและค่อนข้างที่จะหายาก เนื่องจากมีการลักลอบนำออกมาจากป่าเพื่อการจำหน่ายโดยขาดการอนุรักษ์ มีการลักลอบบุกรุกพื้นที่ป่าไม้ ทำเป็นพื้นที่ทำกินและเป็นที่อยู่อาศัย ซึ่งเป็นการทำลายแหล่งกำเนิดของพืชด้วย และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ต้นเนระพูสีไทยมีจำนวนลดลงอย่างมากในธรรมชาติ และมีโอกาสสูญพันธุ์ได้ในอนาคต ด้วยสาเหตุนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องให้ความสำคัญต่อการเก็บรักษาและการอนุรักษ์พันธุ์พืชอย่างจริงจัง ไม่ว่าจะเป็นการอนุรักษ์ในสภาพแปลงปลูก หรือการเก็บรักษาในรูปเมล็ดพันธุ์ เพื่อไม่ให้เกิดการสูญพันธุ์ในธรรมชาติ แต่ปัญหาที่พบในการเก็บรักษาและอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืช คือ ความเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ความเสี่ยงต่อการถูกทำลายจากโรคแมลง และการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศเมื่ออนุรักษ์ไว้ในสภาพธรรมชาติหรือแปลงปลูก ดังนั้นเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการอนุรักษ์พันธุ์พืชเนระพูสีไทย ซึ่งในปัจจุบันวิธีที่มีศักยภาพ คือ การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชโดยการชะลอการเจริญ (minimal growth storage) เป็นการเก็บรักษาพันธุ์กรรมในระยะปานกลางโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง ให้มีการเจริญเติบโตที่ช้าลงโดยการจำกัดหรือจัดการปัจจัยบางประการที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืช สามารถเก็บรักษาในช่วงเวลาประมาณไม่เกิน 2 ปี ซึ่งช่วยลดการเปลี่ยนอาหาร และความเสี่ยงของการเกิด somaclonal variation ส่วนการเก็บรักษาพันธุ์กรรมพืชในระยะยาว (long term storage) เป็นการเก็บรักษาพันธุ์พืชไว้ในสภาพอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง โดยนำเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาเก็บในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -196

องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในระยะยาวที่มีประสิทธิภาพและเสียค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษา น้อยต่อตัวอย่างต่อปีต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเก็บรักษาแบบอื่น (Engelmann, 2000) และยังปลอดภัยจากเชื้อปนเปื้อน ใช้พื้นที่ในการเก็บรักษาน้อย ไม่มีผลกระทบจากการปลูกและดูแลรักษา สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชจากหลายๆ แหล่งไว้ในที่เดียวกัน และเก็บไว้ได้เป็นระยะเวลานาน (ลัดดาวัลย์, 2552)

งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชเนระพูสีไทย โดยการเก็บรักษาเนื้อเยื่อโดยการชะลอการเจริญเติบโต และการเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) การเก็บรักษาด้วยวิธีเหล่านี้สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ หรือเก็บรักษาพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เป็นการกำจัดเชื้อโรคที่ทำลายพืชในธรรมชาติ ตลอดจนเก็บรักษาพันธุกรรมพืชที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการต่างๆ (Bajaj, 1995) เพื่อนำมาใช้ในการขยายพันธุ์ได้เมื่อต้องการ เพื่อใช้ประโยชน์ต่อการวิจัยและการศึกษาในอนาคต หรือเพื่อการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์ หรือเป็นเชื้อพันธุ์นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชเนระพูสีไทย ในสภาพปลอดเชื้อโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต

1.2.2 ศึกษาวิธีการเก็บรักษาปลายยอดพืชเนระพูสีไทยในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค Encapsulation - Vitrification

1.3 สมมุติฐานของการวิจัย

เชื้อพันธุกรรมพืชเนระพูสีไทยสามารถเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้วิธีการชะลอการเจริญเติบโตและเก็บรักษาปลายยอดในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค Encapsulation - Vitrification ได้

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพุลีไทยในสภาพปลอดเชื้อ ประกอบด้วย 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การเก็บรักษาต้นเนระพุลีไทยในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโต

การทดลองที่ 2 การเก็บรักษาปลายยอดพืชเนระพุลีไทยในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค Encapsulation – Vitrification

1.5 ขั้นตอนการศึกษาวิจัย

งานวิจัยมีรายละเอียดในการดำเนินงานดังนี้

1.5.1 ศึกษาการเก็บรักษาต้นพืชเนระพุลีไทยในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโต ทำการทดลองบนสูตรอาหาร MS สูตรต่างๆ 9 สูตร เก็บรักษาเป็นเวลา 9 เดือน

1.5.2 ศึกษาการเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดพืชเนระพุลีไทย ในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค Encapsulation – Vitrification ทดลองปรับสภาพเนื้อเยื่อปลายยอดบนสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.3 โมลาร์, 0.5 โมลาร์ และ ไม่เติมน้ำตาลซูโครส และทำการเปรียบเทียบระยะเวลาในการแช่สารละลาย PVS2 ที่ 0, 20, 40, 60 และ 80 นาที เพื่อหาช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตของปลายยอดเมื่อเก็บในสภาพเยือกแข็ง

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้วิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพุลีไทยในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการอนุรักษ์ในระยะปานกลางและในระยะยาว

1.6.2 เป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาพัฒนาวิธีการเก็บรักษาเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อที่เหมาะสมต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนระพูสีไทย หรือ ค้างคาวดำ (*Tacca chantrieri* Andre) ชื่อสามัญ bat flower และมีชื่อท้องถิ่น ได้แก่ ว่านพังพอน (ยะลา) ว่านนางครวญ (นครศรีธรรมราช) ละเบ้าะบูเก๊ะ (มลายู) ม้าถอนหลัก (ชุมพร) เนียมฤาษี (เชียงใหม่) ดีปลาซ่อน (ตราด) นิลพูสี (ตรัง) ดิงหว่า (ภาคเหนือ) เนระพูสีไทย ค้างคาวดำ (ภาคกลาง) ว่านหัวพา (จันทบุรี) เป็นต้น เป็นพืชล้มลุก อายุหลายปี มีหัวหรือเหง้าอยู่ใต้ดิน เป็นพันธุ์ไม้ป่าเมืองไทย กระจายพันธุ์อยู่ในป่าลึก ในประเทศไทยพบขึ้นทั่วไปตามป่าผลัดใบ ป่าดิบแล้ง หรือป่าดิบชื้น ที่ความสูงจากระดับน้ำทะเล 500 - 1,000 เมตร ในภาคใต้ของประเทศไทยมีมาก ในต่างประเทศพบที่ อินเดีย บังกลาเทศ พม่า จีนตอนใต้ ลาว เวียดนาม จนถึงชายฝั่งมาเลเซีย ออกดอก และติดผลตลอดปี เป็นพืชในวงศ์ Taccaceae สกุล *Tacca* พืชวงศ์ Taccaceae ที่สำรวจพบในประเทศไทยมีประมาณ 5 พันธุ์ คือ เนระพูสีไทยหรือค้างคาวดำ (*Tacca chantrieri* Andre) ว่านพังพอน หรือค้างคาวขาว (*Tacca integrifolia* Ker Gawl.) เท้ายายม่อม (*Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze) บุกฤาษี (*Tacca palmata* Blume) และหนวดเสือ (*Tacca plantaginea* (Hance) Drenth) (ก่องกานดา, 2551) (ภาพที่ 2.1)



เนระพูสีไทย

ค้างคาวขาว

เท้ายายม่อม



บุกฤาษี

หนวดเสือ

ภาพที่ 2.1 พืชวงศ์ Taccaceae ที่สำรวจพบในประเทศไทย จำนวน 5 พันธุ์

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี มีหัวหรือเหง้าใต้ดิน รูปทรงกระบอก คล้ายหัวเผือกฝังอยู่ใต้ดิน ต้นสูงประมาณ 30 – 60 เซนติเมตร

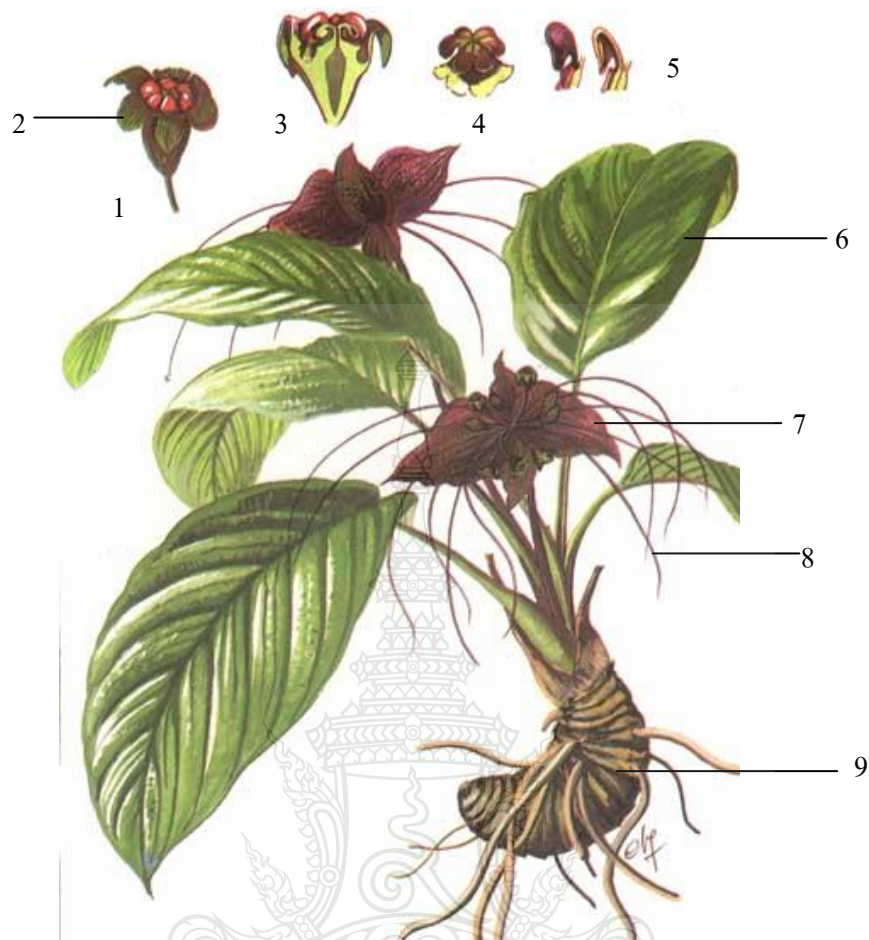
ใบ ใบเดี่ยวสีเขียวเข้ม เรียงสลับเวียนเป็นรัศมี รูปวงรี ลักษณะของใบเป็นรูปรีกว้าง หรือเป็นรูปใบหอกแกมรูปขอบขนาน ปลายใบแหลม โคนใบมน ส่วนขอบใบเรียบ ใบมีขนาดกว้าง 6 – 18 เซนติเมตร ยาว 20 - 60 เซนติเมตร ก้านใบยาว 15 - 30 เซนติเมตร เส้นแขนงของใบแตกออกจากเส้นกลางใบโค้งจรดกันเกือบถึงขอบใบ แผ่นใบเกลี้ยงเป็นสีเขียวเข้ม หลังใบเรียบเป็นมัน ส่วนท้องใบเรียบ แผ่นใบสีเขียวเข้มกว่าท้องใบ ก้านใบสีเขียวคล้ำชูขึ้นสูง

ดอก ออกเป็นช่อลักษณะเป็นกลุ่ม มีดอกย่อย 4 - 6 ดอก (มีมากที่สุดถึง 25 ดอกย่อย) ดอกของนระพูสีไทยมีสีม่วงดำหรือเป็นสีเขียวเข้ม ก้านดอกชูขึ้นมาสูงจากกลางกอ ก้านช่อดอก ยาว 30 - 50 เซนติเมตร กลีบดอกมี 6 กลีบ โคนกลีบดอกจะเชื่อมติดกัน กลีบด้านนอก 3 กลีบมีลักษณะเป็นรูปไข่หรือเป็นรูปสามเหลี่ยม มีขนาดกว้างประมาณ 3 - 8 มิลลิเมตร และยาวประมาณ 5 - 12 มิลลิเมตร ส่วนกลีบด้านใน 3 กลีบ มีขนาดกว้างประมาณ 4 - 12 มิลลิเมตร และยาวประมาณ 4 - 11 มิลลิเมตร ดอกมีขนาดกว้างประมาณ 0.6 - 2 เซนติเมตร ยาวประมาณ 1 - 2.5 เซนติเมตร ดอกมีเกสรตัวผู้และตัวเมียสีม่วงดำ ส่วนรังไข่ มีขนาดกว้างประมาณ 3 - 5 มิลลิเมตร และยาวประมาณ 2 - 7 มิลลิเมตร ส่วนก้านดอกย่อย ยาวประมาณ 2 - 3.5 เซนติเมตร และดอกยังมีใบประดับเป็นสีม่วงดำหรือเป็นสีเขียวเข้มอยู่ 2 คู่ ออกตรงข้ามสลับตั้งฉาก ไม่มีก้าน ใบประดับคู่นอก มีลักษณะเป็นรูปรี หรือรูปไข่ หรือรูปใบหอก มีขนาดกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร และยาวประมาณ 6 เซนติเมตร ส่วนใบประดับคู่ในแผ่กว้างออก มีลักษณะเป็นรูปไข่ หรือรูปไข่กลับ กว้างประมาณ 4 - 8 เซนติเมตร และยาวประมาณ 7 - 17 เซนติเมตร และมีใบประดับที่ลดรูปเป็นเส้นด้ายอีก 5 - 25 อัน ยาวประมาณ 10 - 25 เซนติเมตร เป็นสีเขียว หรือ สีม่วง และกลีบดอกจะติดอยู่ไม่หลุดร่วงได้ง่าย เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ดอกมีกลิ่นสาบหืน (ภาพที่ 2.2)

ผล มีลักษณะเป็นกระสวย รูปสามเหลี่ยม มีสัน 6 สัน มีวงกลีบรวมที่ยังไม่ร่วงติด ผลแก่ เมื่อแก่ไม่แตก ผลมีขนาดกว้าง 1 - 2.5 เซนติเมตร และยาว 2.5 - 5 เซนติเมตร

เมล็ด มีลักษณะเป็นรูปไต เมล็ดมีขนาดกว้างประมาณ 2 - 2.3 มิลลิเมตร และยาวประมาณ 3 - 4 มิลลิเมตร และมีความหนาประมาณ 1 - 1.5 มิลลิเมตร รูปเมล็ดสามเหลี่ยมสีม่วงจนถึงม่วงอมน้ำตาล

หัว เป็นเหง้าหัว เจริญตามแนวราบใต้พื้นดิน



ที่มา: WHO medicines bookshelf 1.0 (1990)

ภาพที่ 2.2 ส่วนต่างๆ ของต้นเนระพูสีไทย

- | | |
|-----------------|------------------|
| (1) ดอก | (5) เกสรตัวผู้ |
| (2) กลีบดอก | (6) ใบ |
| (3) รังไข่ | (7, 8) ใบประดับ |
| (4) เกสรตัวเมีย | (9) หัวหรือเหง้า |

2.2 การใช้ประโยชน์

ส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์ คือ ต้น หัว และใบ

หัวหรือเหง้า ต้มให้เด็กกินแก้ชาง หรือเป็นยาอายุวัฒนะ ทำให้สุขภาพแข็งแรง นำมาต้มหรือคองสุราดื่มแก้โรคความดันเลือดต่ำ บำรุงกำลังทางเพศ บำรุงกำลังสตรีระหว่างการตั้งครรภ์ แก้อาการพิการ ช่วยขับพิษไข้ แก้ไข้กาฬ ไข้เหนือ ไข้สันนิบาต และไข้ท้องเสีย ช่วยรักษาโรคในปากคอ แก้กลิ่น

คอเปื่อย แก้วปอดพิการ แก้วบิด บิดมูกเลือด แต่เดิมชาวบ้านจะใช้เหง้านามาชอยเป็นจีนและบดให้เป็นผงละเอียด แล้วนำมาละลายในน้ำดื่มเดือด แซ่ทั้งไว้สักครู่พออุ่นก็ให้ใช้ผ้าขนหนูชุบน้ำมาประคบบริเวณที่มีอาการปวด หรืออักเสบ สารสกัดจากเหง้าเนระพูสีไทยมีฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารของหนอนใยผัก ซึ่งเป็นแมลงศัตรูพืชผักที่สำคัญชนิดหนึ่งได้ (มยุรฉัตร และคณะ, 2553)

ต้น นำมาต้มอาบแก้เม็ดผื่นคันตามร่างกาย ช่วยแก้อาการอาหารไม่ย่อย อาหารเป็นพิษ ช่วยรักษาโรคกระเพาะอาหาร แผลในกระเพาะอาหาร และยังไม่ก่อให้เกิดอาการระคายเคืองแผลในกระเพาะอาหารเหมือนกับการรับประทานยาแก้อักเสบทั่วไป ทั้งต้นใช้ผสมกับสมุนไพรชนิดอื่นนำมาฝนรวมกันกินแก้อาการเบื่อเมา

ใบ ต้มกินแก้มะเร็ง ใบสดนำมารับประทาน ช่วยทำให้เจริญอาหารนอกจากนี้ใบสดยังนำมาย่างไฟแล้วบริโภคนเป็นเครื่องเคียงในอาหารประเภทลาบต่าง ๆ ใช้เป็นใบตองห่อของต่างๆ

อื่นๆ เป็นไม้ประดับ เนื่องจากมีใบเขียวสด ดอกรูปคล้ายหน้าค่างขาว มีหนวดสวยงามแปลกตา เป็นไม้ประดับประเภทของแปลก ก้านช่อดอกยาว นำมาปักแจกันได้

2.3 การปลูกเลี้ยงและการขยายพันธุ์

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต เป็นพืชที่ชอบที่ชุ่มชื้น แสงแดดรำไร ใก้ล้นหานองน้ำ ความสัมพันธ์กับระบบนิเวศน์ อยู่ตามร่มไม้ โดยถ้าอยู่ในที่ร่มจะให้ดอกสีเข้มกว่าอยู่ในที่แสงแดดจัด (วงศ์สถิตินันท์ และคณะ, 2539) การปลูกในดินร่วนที่มีการระบายน้ำดีหรือดินที่ผสมทรายเล็กน้อยต้นจะเจริญเติบโตได้ดีและควรนำไปไว้ในที่ร่ม รดน้ำเช้าเย็น (ธวัชชัย และ รัชชัย, 2544) สามารถขยายพันธุ์ได้ 2 วิธี คือ เพาะเมล็ด และการแยกหัวหรือเหง้า โดยขุดเหง้ามาตัดเป็นท่อน แล้วนำไปชำในที่ชื้น วิธีที่ง่ายคือการแยกหัว เพราะการเพาะเมล็ดจะโตช้า

2.4 การเก็บรักษาพันธุกรรมพืช

การเก็บรักษาพันธุกรรมพืช (germplasm conservation) สามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ ชนิดของพืช สภาพแวดล้อม ความสะดวก และความสามารถในการดำเนินการ สามารถแบ่งวิธีการหลักได้ 2 วิธี คือ

2.4.1 การเก็บรักษาในสภาพป่าหรือในแหล่งธรรมชาติ (in situ conservation) เป็นการเก็บรักษา ชนิดพันธุ์ สายพันธุ์ ไว้ในระบบนิเวศธรรมชาติ นิยมใช้เก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมของไม้ป่าชนิดต่างๆ ต้องมีการดูแลและวางแผนการจัดการอย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนใหญ่จะเก็บรักษาในวนอุทยานแห่งชาติ เขตป่าสงวนต่างๆ ข้อดีของวิธีการนี้ คือ กระบวนการวิวัฒนาการของพืชชนิดนั้น ๆ ยังคง

เป็นไปตามปกติ เป็นการรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรม แต่ข้อเสียที่สำคัญ คือ มีปัญหาเกี่ยวกับค่าใช้จ่าย ปัญหาทางสังคมและปัญหาทางการเมือง ภัยพิบัติต่างๆ อย่างไรก็ตามค่าใช้จ่ายอาจลดลงได้ด้วยการอนุรักษ์พืชพร้อมกันหลายชนิด หรือทุกชนิด แทนที่จะทำกับพืชเพียงไม่กี่ชนิด

2.4.2 การเก็บรักษาในสภาพนอกแหล่งธรรมชาติ (*ex situ* conservation) เป็นการเก็บรักษาโดยนำเชื้อพันธุ์พืชมาปลูกไว้ในสถานที่ที่เตรียมไว้ ส่วนใหญ่จะเก็บไว้ใน สวนพฤกษศาสตร์ สวนสมุนไพร สวนรุกขชาติ แปลงรวบรวมพันธุ์ เรือนเพาะชำหรือเรือนกระจก โดยพยายามให้สิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิดมากที่สุด (ชลิต, 2532) ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถดำเนินการได้ในพื้นที่ขนาดเล็ก สามารถดูแลได้ทั่วถึง นอกจากนี้นักปรับปรุงพันธุ์พืชยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย ข้อเสียคือ ใช้น้ำและแรงงานค่อนข้างมากทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง (ไพบูลย์, 2524) พืชจะหยุดกระบวนการวิวัฒนาการ กระบวนการคัดเลือกตามธรรมชาติ และการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมก็หยุดไปเช่นกัน นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการแปรปรวนทางพันธุกรรม เนื่องจากประชากรมีขนาดเล็ก มีการสูญหายของความหลากหลายทางพันธุกรรมได้มาก วิธีการเก็บรักษาในสภาพนอกแหล่งธรรมชาติทำได้ดังนี้

(1) การเก็บในแปลงรวบรวมพันธุ์ (*ex situ* in field genebank) นิยมใช้ในพืชหัวหรือไม้ผลชนิดต่างๆ หรือพืชที่ถ้าปลูกด้วยเมล็ดพันธุ์จะเกิดการกลายพันธุ์ อาจเก็บในรูปของหัว เหง้า กิ่ง ปักชำ หรือพืชทั้งต้น พันธุ์พืชที่ไม่สามารถขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศได้จะเก็บแบบเมล็ดพันธุ์แทน และมีการจัดสร้างแหล่งอนุรักษ์พันธุกรรมในภูมิภาคต่าง ๆ เพื่อให้มีความเหมาะสมของชนิดพันธุ์พืชกับสภาพแวดล้อม

(2) การเก็บในธนาคารเมล็ดพันธุ์พืช (*ex situ* in seed genebank) เป็นวิธีที่ใช้ในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ที่สามารถทำให้แห้งโดยกระบวนการต่างๆจนมีความชื้นในเมล็ดต่ำ และสามารถเก็บในสภาพอุณหภูมิต่ำเป็นเวลานานได้โดยไม่เสียความงอก เมล็ดพันธุ์ที่มีความชื้นในเมล็ดต่ำมากๆ เช่น 4-6 เปอร์เซ็นต์ ควรเก็บไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส จะช่วยให้เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ได้นานหลายสิบปีหรือมากกว่าร้อยปี ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ข้อจำกัดของการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์คือ ต้องปลูกพืชอย่างต่อเนื่องเพื่อสร้างเมล็ดที่ยังคงความมีชีวิต เมื่อนำมาเก็บรักษาไว้ในระยะเวลานาน อีกทั้งเมล็ดของพืชบางชนิดมีอายุสั้นและติดเมล็ดน้อยหรือไม่ติดเมล็ด

(3) การเก็บในสภาพปลอดเชื้อในหลอดแก้ว (*in vitro* conservation) เป็นการเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วย สามารถที่จะเก็บรักษาพันธุ์ได้ตั้งแต่ระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และต้นอ่อนที่เก็บและเลี้ยงไว้ในหลอดแก้ว ซึ่งสามารถเก็บรักษาได้หลายลักษณะของชิ้นส่วนพืช ได้แก่ เมล็ด ปลายยอด ราก แคลลัส โปรโตพลาสต์ ต้นอ่อน เซลล์แขวนลอย

ละอองเกสร และ กัณเฑาะ จุดสำคัญคือ ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเก็บต้องมีความสามารถในการพัฒนาเป็น ต้นพืชได้ ปัจจุบันวิธีนี้นิยมนำมาใช้ในการเก็บรักษาพันธุ์กรรมพืชเนื่องจากมีข้อดีหลายประการ เช่น ประหยัดเนื้อที่ในการเก็บเมื่อเทียบกับการเก็บรักษาในสภาพธรรมชาติและพืชที่เก็บรักษาอยู่ในสภาพ ปลอดภัยจากเชื้อโรค แมลง และไวรัส สามารถเพิ่มปริมาณได้เมื่อต้องการ ลดการเสี่ยงอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ การทำลายของศัตรูพืชและการดูแลรักษาที่ไม่เหมาะสม ประหยัดงบประมาณในการเก็บรักษา นอกจากนี้ยังสะดวกในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์พืชระหว่าง ประเทศ

2.5 การเก็บรักษาพันธุ์กรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ

จากการศึกษาพื้นฐานการเก็บรักษาสามารถแบ่งได้ 3 วิธี คือ

2.5.1 การเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชในสภาพที่มีการเจริญเติบโตตามปกติ (normal growth storage) การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้เป็นการเก็บรักษาในระยะเวลาสั้นทำได้โดยย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่ ในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมอย่างสม่ำเสมอ แต่มีข้อเสีย คือ ต้องมีการเปลี่ยนอาหาร (subculture) บ่อยๆ

2.5.2 การทำให้พืชเจริญเติบโตอย่างช้าๆ (minimal growth)

การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้เป็นการเก็บรักษาในระยะเวลาปานกลาง ซึ่งสามารถช่วยขยายช่วงเวลา การย้ายเลี้ยงออกไป เนื้อเยื่อบางชนิดและในบางกรณีมีอัตราการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ แม้จะได้รับ สภาพหรือปัจจัยต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงอย่างเต็มที่ อย่างไรก็ตามเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงส่วนใหญ่ ต้องการปัจจัยพิเศษทั้งด้านอาหารและปัจจัยสภาพแวดล้อมเพื่อให้มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าลง (รังสฤษดิ์, 2540) ดังนั้น การเก็บรักษาภายใต้สภาวะการเจริญเติบโตต่ำจึงมีบทบาทสำคัญเป็นอีก ทางเลือกหนึ่งในการเก็บรักษาพันธุ์กรรมพืช (Withers, 1989) สำหรับวิธีที่มีการพัฒนาขึ้นนี้มีด้วยกัน หลายวิธี ได้แก่

(1) การใช้อุณหภูมิต่ำ จากที่ทราบแล้วว่าอุณหภูมิต่ำมากสามารถลดการเจริญเติบโต ของต้นเมื่อเก็บรักษาได้ แต่การใช้อุณหภูมิต่ำมากเกินไปก็อาจสูง ดังนั้นการเก็บรักษาด้วยอุณหภูมิต่ำ แต่ไม่ต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ก็สามารถเก็บรักษาและลดการเจริญเติบโตของพืชได้เช่นกัน Maruyama *et al.* (1997) ได้ทำการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิต่อระยะเวลาในการเก็บรักษาพันธุ์พืช *Cedrela odorata*, *Guazuma crinita* และ *Jacaranda mimosaeifolia* โดยนำส่วนยอด (shoot tip) มา ห่อหุ้มด้วย แคลเซียมแอลจิเนต พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเก็บรักษาพันธุ์กรรมพืชแต่ละชนิดมี ความแตกต่างกัน โดย *Cedrela odorata* มีอัตราการรอดถึง 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 12

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี *Guazuma crinita* มีอัตราการรอดชีวิตถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี และ *Jacaranda mimosaeifolia* มีอัตราการรอดชีวิตถึง 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน แต่อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาพันธุ์กรรมพืช แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันไป เช่น ถ้าเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในเขตหนาว เช่น มันฝรั่ง สตรอว์เบอร์รี่ กล้วยอาหารสัตว์บางชนิด และ แอปเปิ้ล มักทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 0 - 6 องศาเซลเซียส ในขณะที่พืชที่เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อน เช่น มันสำปะหลัง มักทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 15 - 20 องศาเซลเซียส เป็นต้น

(2) การใช้สารชะลอการเจริญเติบโต (growth retardants) สารชะลอการเจริญเติบโตจัดเป็นกลุ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่พืชไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้สารในกลุ่มนี้ทั้งหมดเป็นสารอินทรีย์ที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้นเพื่อประโยชน์ในการเกษตร คุณสมบัติหลักของสารในกลุ่มนี้ คือ ชะลอการแบ่งเซลล์ และการยืดตัวของเซลล์ในบริเวณใต้ปลายยอดของกิ่งพืช จึงมีผลทำให้ต้นพืชที่ได้รับสารมีความสูงน้อยกว่าปกติ มีประโยชน์ในการควบคุมความสูงของไม้ดอกไม้ประดับให้มีขนาดกะทัดรัด เหมาะแก่การปลูกในกระถาง ผลทางอ้อมมีประโยชน์อย่างมากมายทางการเกษตร เช่น เพิ่มคุณภาพผล ช่วยการติดผล เร่งการออกดอก ปัจจุบันมีสารชะลอการเจริญเติบโตหลายชนิดที่ผลิตขึ้นมาจำหน่าย เช่น ดามิโนไซด์ พาโคลบิวทราซอล เมพิแควตคลอไรด์ กรดแอบไซสิก ซอลบิทอล เป็นต้น (ครรรชิต, 2547) ซึ่ง ฟิรเดซ (2537) ได้รายงานว่ ดามิโนไซด์ ลดความสูงของต้นดาวเรือง ดาวกระจาย และ พิทูเนีย ได้ผลดี โดยต้นที่ได้รับสารจะมีปล้องสั้นกว่ารูปทรงกะทัดรัด ในขณะที่ขนาดดอก และจำนวนดอกไม้ได้ลดลง นอกจากนี้ได้มีการนำเอา ดามิโนไซด์ มาใช้กับพืชหัว ในส่วนของกลั้วไม้ได้มีการทดลองในกลั้วไม้ *Bletilla striata* โดยใช้สารชะลอการเจริญเติบโตต่างๆ กัน 4 ชนิด คือ ยูนิโคนาโซล พาโคลบิวทราซอล แอนไซมิโดล และ N-dimethylsuccinamic acid เติมนลงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง พบว่าสารทั้ง 4 ชนิด สามารถช่วยชะลอการเจริญเติบโตลงได้ แต่สารยูนิโคนาโซล ส่งผลให้รูปร่างของใบมีลักษณะผิดปกติ (Chang et al., 1999)

(3) การใช้วุ้น รังสฤษดิ์ (2540) กล่าวว่า การใช้วุ้นมากเกินไป อาจยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ ดังนั้น ความเข้มข้นของวุ้นที่พอเหมาะสำหรับอาหารที่ใช้อย่างแพร่หลายและได้ผลดีคือ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นได้ว่า อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่วไปมักอยู่ในสภาพของเหลวหรือกึ่งแข็งกึ่งเหลว ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช ซึ่งโดยปกติปริมาณของวุ้นที่ใช้เพิ่มขึ้นมีผลให้ค่าพลังงานที่ทำงานได้ต่อโมลของน้ำลดลง เนื่องจากไปลดการยึดเกาะกันระหว่างโมเลกุลของน้ำกับโมเลกุลของสารบางชนิดที่

เป็นองค์ประกอบของอาหาร ซึ่งจะมีผลต่อความสามารถในการส่งน้ำและธาตุอาหารต่าง ๆ ไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตในระหว่างที่อยู่ในหลอดแก้ว (Debergh *et al.*, 1981) Debergh (1983) ยังพบอีกว่า การเพิ่มความเข้มข้นวุ้นหรือสารอื่น ๆ ที่ใช้ทดแทนวุ้นนั้นมีผลต่อการนำสารอื่นไปใช้ โดยเฉพาะไซโตไคนิน แต่การเพิ่มปริมาณวุ้นในอาหาร ลดอัตราการขยายพันธุ์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด และช่วยลดการเกิดการนำน้ำของเนื้อเยื่อพืชอีกด้วย (Debergh *et al.*, 1981; Ziv *et al.*, 1982; Hakkaart and Versluijs, 1983)

(4) การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต ปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องต่อการเพิ่มปริมาณต้นคือ BA ผลของ BA นี้ De Bruyn and Ferreira (1992) พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA ทำให้จำนวนยอดต่อชิ้นของแกดดิโอลัสเพิ่มมากขึ้น รังสีมา และคณะ (2544) พบว่า การใช้ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาของบุกเนื้อทราย มีผลทำให้ชิ้นส่วนมีการเจริญเติบโต และมีตาขนาดเล็กเกิดขึ้นบริเวณหัวมากมาย และตาก็พัฒนาไปเป็นต้นสูง ส่วนในงานด้านเก็บรักษาพันธุ์ Dussert *et al.* (1997) ได้ทำการเก็บรักษาพันธุ์กาแฟ โดยนำปลายยอดมาเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อ โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 0.29 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำการย้ายเนื้อเยื่อทุก 6 เดือน พบว่ากาแฟบางสายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์

(5) การใช้ธาตุอาหารหลักและน้ำตาล ส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารทุกสูตร เป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นมากต่อการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงในสภาพปลอดแก้ว มีการสังเคราะห์แสงในอัตราที่ต่ำเพราะได้รับแสงน้อย และมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์จำกัด น้ำตาลที่นิยมใช้ คือ ซูโครส (sucrose) ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่พืชสังเคราะห์ได้เอง และมีความจำเป็นอย่างมากต่อเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิด สำหรับน้ำตาลชนิดอื่น เช่น กลูโคส (glucose) และฟรุคโตส (fructose) มีการใช้บ้าง ปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของพืช โดยทั่วไปพืชจะเจริญเติบโตดีขึ้นเมื่อได้รับปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่ง จากนั้นการเพิ่มปริมาณน้ำตาลมากขึ้นอีกจะลดการเจริญเติบโตลง Bonnier and Van Tuyl (1997) ได้ทำการศึกษาถึงการเก็บเนื้อเยื่อของหัวลิลลี่ในสภาพปลอดเชื้อภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 2 ระดับ คือ -2 และ 25 องศาเซลเซียส ร่วมกับอาหาร 2 ชนิด คือ $\frac{1}{4}$ MS และ MS ที่มีน้ำตาล 2 ความเข้มข้น คือ 6 เปอร์เซ็นต์ และ 9 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เนื้อเยื่อของลิลลี่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{4}$ MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 9 เปอร์เซ็นต์ และเก็บรักษาไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดเมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 28 เดือน มีอัตราการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อดำที่สุด เนื่องจากการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารต่ำกว่าปกติ และเพิ่มความดันออสโมติก โดยการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาล ส่วนเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาไว้

ที่ -2 องศาเซลเซียสเกิดอาการตายในระหว่างการเก็บรักษา เนื่องจากต้นเสื่อมโทรมในสภาวะอุณหภูมิ
ต่ำและอาหารแข็งตัว

ข้อดีของเทคนิคการชะลอการเจริญเติบโต คือ เนื้อเยื่ออยู่ในสภาพพร้อมที่จะขยายพันธุ์ และ
สามารถใช้กับเนื้อเยื่อได้เกือบทุกชนิด ข้อเสีย คือ เก็บรักษาได้เป็นเวลาอันสั้นหรือปานกลาง
(2 เดือน ถึง 2 ปี) นอกจากนี้ยังอาจเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมขึ้นได้เอง วิธีการที่ใช้ในพืชแต่ละ
ชนิดแตกต่างกัน การสูญเสียจากปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ตลอดจนการสูญเสีย
ความสามารถในการเกิดอวัยวะ (สมยศ, 2541)

2.5.3 การเก็บรักษาพันธุ์พืชแบบแช่แข็ง (cryopreservation)

ในปัจจุบันวิธีที่มีศักยภาพในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์คือการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในระยะยาว
ซึ่งเป็นการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส อุณหภูมิดังกล่าวจะหยุด
กิจกรรมทุกอย่างของเซลล์ ไม่มีกระบวนการทางชีวฟิสิกส์ หรือการเคลื่อนที่ของน้ำ (Morris *et al.*,
1981) ความมีชีวิตของชิ้นส่วนจึงไม่เปลี่ยนแปลงตลอดช่วงการเก็บในไนโตรเจนเหลว ส่วนความ
เสี่ยงต่อการมีชีวิตหรือความแปรปรวน เกิดขึ้นเฉพาะในช่วงของกระบวนการแช่ในไนโตรเจนเหลว
(critical cool) และช่วงของการละลายน้ำแข็ง ซึ่งถ้าไม่เหมาะสมจะทำให้เกิดความเสียหายแก่ชิ้นส่วน
พืชได้ การเก็บรักษาแบบแช่แข็งนี้ น้ำในเซลล์พืชจะเปลี่ยนสภาพจากของเหลว (liquid phase) เป็น
สภาพที่ไม่มีโครงสร้างที่ชัดเจน หรือ สภาพแก้ว (amorphous phase หรือ glass) อย่างรวดเร็วเพื่อ
หลีกเลี่ยงการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ก่อนการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชต้องทำให้น้ำออกจากเซลล์
โดยการนำเซลล์หรือชิ้นส่วนพืชแช่ในสารละลายที่สามารถดึงน้ำหรือทำให้แห้งโดยการตาก
(air desiccation) ข้อสำคัญ คือ การทำให้น้ำออกจากเซลล์พืชต้องไม่กระทบต่อการมีชีวิตของเซลล์
ดังนั้นการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กรรมในสภาพนี้สามารถเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานโดยเซลล์ไม่ตาย
และพันธุกรรมไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อต้องการที่จะทำให้เซลล์กลับมามีชีวิตเหมือนเดิมก็เพิ่ม
อุณหภูมิให้เซลล์กลับมาใช้ชีวิตตามปกติ นอกจากนี้ การเก็บด้วยวิธีนี้ใช้พื้นที่น้อย สามารถป้องกันการ
ปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ มีการดูแลรักษาน้อย และเป็นการลดต้นทุนในการเก็บรักษา และ
สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในธนาคารยีนสำหรับพืชที่หายากหรือใกล้สูญพันธุ์ โดยทั่วไปการเก็บ
รักษาด้วยวิธีนี้ เหมาะสำหรับพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยส่วนของร่างกาย (vegetatively propagated plant)
สำหรับชิ้นส่วนที่สามารถนำมาเก็บรักษาด้วยวิธีการนี้ เช่น เซลล์ โปรโตพลาสต์ ชิ้นส่วนปลายยอด
เมสส์ โซมาติกเอ็มบริโอ หรือ โซโกติกเอ็มบริโอ เรวัต (2544) กล่าวว่า การเก็บรักษาเนื้อเยื่อ
ปลายยอดในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation of shoot tip) มีวัตถุประสงค์เพื่อการเก็บรักษาเชื้อ
พันธุ์กรรม โดยการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยให้มีชีวิตรอด เพื่อให้พืชมีการสร้างตัวขึ้นมาใหม่

(regeneration) จากการแยกชิ้นเนื้อเยื่อพืชไปลงในอาหารเพาะเลี้ยงตามด้วยการเก็บไว้ในสภาพเยือกแข็ง โดยพืชเมื่อผ่านการละลายน้ำแข็งจะยังคงสภาพมีชีวิตและเจริญเติบโตได้ เพื่อให้บรรลุถึงการเก็บรักษาปลายยอดพืชในสภาพจุดเยือกแข็งโดยค่อยๆให้ความเย็นเพื่อคงไว้ซึ่งพันธุกรรมของพืช ให้ความเสถียรภาพสูงสุด การใช้ส่วนปลายยอด (shoot tip) ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชก็เนื่องจากส่วนปลายยอดมีความเสถียรของพันธุกรรม จะคงไว้ซึ่งลักษณะของพืชได้ตรงตามสายพันธุ์ (true - to - type) มีประสิทธิภาพสูงในการฟื้นชีวิตและเจริญเติบโตได้ ใช้ในการขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว (rapid clonal propagation) และปลอดเชื้อไวรัส (virus-free plant) Vicient and Martinez (1998) รายงานว่า ชนิดและระยะพัฒนาการของชิ้นส่วนที่นำมาเก็บรักษามีผลต่อความสำเร็จในการเก็บรักษา โดยปริมาณน้ำในเนื้อเยื่อ หรือชิ้นส่วน จำนวนและขนาดของแวคิโอลล์ ส่งผลต่อการทนต่ออุณหภูมิต่ำ เซลล์ที่มีจำนวน และ แวกิโอลล์ขนาดเล็กจะทนต่ออุณหภูมิต่ำมากกว่าเซลล์ที่มีขนาด และ จำนวน แวกิโอลล์มาก เซลล์ของสิ่งมีชีวิตนั้นประกอบไปด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นการเก็บรักษาด้วยวิธีที่ใช้อุณหภูมิต่ำมาก จึงจำเป็นต้องหลีกเลี่ยงการแข็งตัวของน้ำภายในเซลล์ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เซลล์ตายได้ ขั้นตอนต่างๆในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเป็นขั้นตอนซึ่งแบ่งขั้นตอนต่างๆได้ดังนี้

(1) การปรับสภาพพืชก่อนการให้ความเย็น (pre-growth conditions) เพื่อให้เกิดความทนทานมากที่สุด โดยวิธีนี้จะต้องนำมาผ่านกระบวนการพิเศษบางอย่าง หรือเรียกได้อีกอย่างว่า 프리โกรต (pre growth) แม้ขั้นตอนนี้ไม่เกี่ยวข้องโดยตรง กับกระบวนการแช่แข็ง แต่การปรับสภาพของเซลล์ หรือเนื้อเยื่อให้เหมาะสม สามารถช่วยเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์ หลังผ่านกระบวนการแช่แข็งแล้วได้ดีขึ้น ขั้นตอนนี้อาจเป็นการเดิมสารเคมีบางชนิดให้แก่เซลล์เพื่อให้ทนทานต่อสภาวะเครียดต่างๆ (อารีย์, 2541) การเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารเคมีบางชนิด การเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิที่ต่ำกว่าปกติ เป็นต้น เพื่อกระตุ้นเนื้อเยื่อให้มีการปรับตัว สามารถทนต่อสภาพการเย็นจนแข็งตัวในขณะการเก็บรักษา นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยเซลล์ที่แข็งแรง สมบูรณ์จะทนต่อความเย็นจัดได้ดี (แสงจันทร์, 2547)

(2) การใช้สารป้องกันอันตรายจากการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotection) เป็นวิธีการที่ทำให้เนื้อเยื่อมีความต้านทานต่อสภาวะเยือกแข็งมากยิ่งขึ้น โดยใช้สารป้องกันอันตรายจากความเย็นจัดจนเกิดผลึกน้ำแข็ง ก่อนการเก็บรักษาในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำมากอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จะต้องเติมสารพวก cryoprotectants สารเคมีดังกล่าวได้แก่ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) กลีเซอรอล โพลีเอทิลีนไกลคอล โพรลีน หรือพวกน้ำตาลต่างๆ เช่น ซอร์บิทอล ซูโครส แมนนิทอล กลูโคส สารเหล่านี้ช่วยลดขนาดและอัตราการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ป้องกันการสูญเสียน้ำในระยะแรก

ของการลดอุณหภูมิรวมถึงการคงรูปของเยื่อหุ้มเซลล์ สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ ในปัจจุบันได้มีผู้ทำการศึกษาค้นคว้า cryoprotectants หลายชนิดมาผสมกันเป็น cryoprotectants ชนิดใหม่ซึ่งให้ผลในการรักษาคุณภาพและควมมีชีวิตของเซลล์ดีกว่าการใช้เพียงชนิดเดียว เช่น DMSO หรือ Dextrans เป็นต้น สามารถแบ่ง cryoprotectants ออกเป็นสองประเภทตามคุณสมบัติการทำงาน ได้แก่ intracellular cryoprotectants สารประเภทนี้เป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ จะสามารถแทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไป เพื่อช่วยปกป้องส่วนประกอบภายในเซลล์ ไม่ให้ถูกทำลายจากอุณหภูมิที่เย็นจัด ตัวอย่างสารประเภทนี้ เช่น กลีเซอรอล และ DMSO เป็นต้น ส่วน extracellular cryoprotectants เป็นสารที่มีมวลโมเลกุลสูง ไม่สามารถแทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปภายในเซลล์ได้ แต่จะช่วยป้องกันเซลล์จากภายนอกเมื่อเซลล์ถูกลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วลดการเกิดผลึกน้ำแข็ง ช่วยในการเกิดสภาพใสคล้ายแก้ว (vitrification) จากภายนอกเซลล์ หรือที่เรียกว่า extracellular glass formation ตัวอย่างสารประเภทนี้ เช่น hydroxy ethyl starch (HES) และ polyvinylpyrrolidone เป็นต้น สาร cryoprotectants นี้ต้องใช้ในสัดส่วนที่เหมาะสมผสมลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงเพื่อให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อปรับสภาพการซึมผ่านได้ (permeability) และจุดเยือกแข็ง (freezing point) ซึ่งจะทำให้ทนทานต่อการแข็งตัว (freezing) และการละลายตัว (thawing) หลังการเก็บรักษาได้โดยไม่มีผลกระทบต่อการพัฒนาของเซลล์หรือเนื้อเยื่อ Engelmann *et al.* (1995) รายงานว่าการปรับสภาพในอาหารที่เติมซูโครส เป็นการเพิ่มการสร้างแป้งบริเวณผิวเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่และเป็นออสโมติคัม ป้องกันความเสียหายในระหว่างการสูญเสียน้ำและการแข็งตัวในไนโตรเจนเหลว Takagi *et al.* (1997) รายงานว่าการปรับสภาพปลายยอดเฟืองในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมซูโครสเข้มข้น 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วแช่ในสารละลาย LS (ประกอบด้วย กลีเซอรอลเข้มข้น 2 โมลาร์ และ ซูโครสเข้มข้น 0.4 โมลาร์) เป็นเวลา 20 นาที ก่อนแช่ใน PVS2 (plant vitrification solution 2) เป็นเวลา 10 นาที แล้วจุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่า ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 83.1 เปอร์เซ็นต์

(3) การทำให้เนื้อเยื่อแข็งตัวอย่างช้าๆ (slow freezing) เมื่ออุณหภูมิของการเก็บรักษาลดต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส จนถึงประมาณ -100 องศาเซลเซียส จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากเกิดเป็นผลึกน้ำแข็งทั้งภายในและภายนอกเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไซโตพลาสซึมภายในเซลล์จะแข็งตัวและเพิ่มปริมาตรขึ้น ดังนั้น การลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ เป็นการช่วยไม่ให้เซลล์ได้รับอันตรายจากการเกิดผลึกน้ำแข็งขณะเดียวกันก็ช่วยดึงน้ำออกจากเซลล์ไปในตัว ในกรณีที่มีการแข็งตัวอย่างรวดเร็วจะทำให้สูญเสียน้ำออกมาได้น้อย เมื่อเกิดผลึกน้ำแข็งและมีปริมาตรเพิ่มขึ้นจะทำให้เซลล์ได้รับความเสียหาย อย่างไรก็ตามถ้าเซลล์สูญเสียน้ำมากเกินไปอาจเกิดความเสียหายได้เช่นกัน ดังนั้นอัตราการอยู่

รอดของเซลล์จึงขึ้นกับสมดุลระหว่างอัตราการลดลงของอุณหภูมิอย่างช้าๆ กับอัตราการสูญเสียน้ำออกไปจากเซลล์ด้วย และอัตราการอยู่รอดดังกล่าวนี้ขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อที่เก็บรักษา (รังสฤษฎ์, 2540)

(4) การเก็บรักษาไว้ในที่เย็นจัด (freeze storage) หลังจากทำให้เซลล์แข็งตัวอย่างช้าๆ แล้วต้องย้ายไปเก็บไว้ในที่เย็นจัด (ต่ำกว่า -100 องศาเซลเซียส) เพื่อป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์อีกครั้งหนึ่ง ในทางปฏิบัติเพื่อความสะดวกจึงนิยมเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวที่ -196 องศาเซลเซียส หรือในไอของไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapour) ที่ -150 องศาเซลเซียส (รังสฤษฎ์, 2540)

(5) การละลายพืชน้ำแข็ง (warming or thawing) เมื่อต้องการนำเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวมาใช้ ต้องนำเนื้อเยื่อที่เก็บแช่แข็งมาละลายน้ำแข็งที่เกาะตัวนั้นอย่างรวดเร็วเพื่อไม่ให้เซลล์ได้รับอันตราย โดยนำเซลล์หรือเนื้อเยื่อใส่ในน้ำอุ่นปลอดเชื้อที่มีอุณหภูมิประมาณ 37 - 40 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำเนื้อเยื่อไปเลี้ยงบนอาหารปกติต่อไป ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ต้องระมัดระวังเนื่องจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อดังกล่าวนี้ได้ผ่านขั้นตอนต่าง ๆ มากมายจนอาจมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระของเซลล์และเซลล์จะมีการอ่อนแออย่างยิ่งจึงต้องมีการปรับวิธีการเพาะเลี้ยงให้มีความเหมาะสม เช่น อาจมีการเลี้ยงในอาหารพิเศษ สภาพพิเศษ หรือเปลี่ยนอาหารบ่อยๆ ในช่วงแรกเนื่องจากว่าอาหารแต่ละครั้งไม่เหมือนกัน โดยจะค่อยๆ ปรับลดความเข้มข้นของสารบางตัวลงเพราะถ้าหากเปลี่ยนแปลงทันทีทันทีอาจจะมีผลกระทบต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อได้ หรือบางครั้งอาจต้องมีการวางกระดาดรองลงบนอาหารก่อนที่จะวางเซลล์หรือเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นการช่วยให้เซลล์หรือเนื้อเยื่ออยู่ในสภาพที่ไม่จมน้ำจนเกินไปจนทำให้เซลล์หรือชิ้นส่วนที่เก็บสามารถกลับมามีชีวิตได้อีกครั้ง

(6) การทำให้เนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตได้อีกครั้ง (recovery) เนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอนต่างๆ ข้างต้นมาแล้ว อาจมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเซลล์และมักจะอ่อนแออย่างยิ่งต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นตามมา จึงต้องปรับสภาพการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้องการอาหารเพาะเลี้ยงพิเศษที่แตกต่างจากสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงก่อนเก็บรักษา (รังสฤษฎ์, 2540) ความมีชีวิตของเนื้อเยื่อหลังการแช่แข็ง เป็นข้อบ่งชี้ถึงความสำเร็จของวิธีการ ดังนั้นการวัดความมีชีวิต (viability) หรือตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์และเนื้อเยื่อพืช สามารถทำการตรวจสอบได้หลายวิธี ได้แก่

การตรวจสอบด้วยตาเปล่า เป็นวิธีที่ง่ายที่สุด คือ สังเกตลักษณะหรือสัญญาณความมีชีวิตของตัวอย่างพืช เช่น ตัวอย่างพืชยังคงมีสีเขียว มีการแบ่งเซลล์ หรือมีการเจริญเติบโต เป็นต้น

การตรวจสอบด้วยวิธี FDA assay การย้อมสี ด้วย FDA (fluorescein diacetate) เซลล์พืชมีเอนไซม์เอสเทอร์เรส จะย่อยโมเลกุลของ FDA แล้วให้สารเรืองแสงสีเขียวเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

(อารีย์, 2541)

การตรวจสอบด้วยวิธี TTC assay สาร 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) เป็นสารที่ใช้ในการย้อมเพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์พืชโดย International Seed Testing Association (ISTA) ใช้ในการตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ซึ่งสามารถนำมาใช้ตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์พืชภายหลังจากการแช่แข็งได้ (Vujanovic *et al.*, 2000 และ Verleysen *et al.*, 2004) ซึ่งหลักการตรวจสอบคือ สารละลาย TTC เป็นสารที่สีไม่มีสี ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสารสีแดงเมื่อถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ ดีไฮโดรจีเนส ที่เกิดจากกิจกรรมภายในของเซลล์พืช การที่สารละลาย TTC ถูกเปลี่ยนเป็นสีแดงแสดงว่าเซลล์พืชนั้นๆยังคงมีชีวิตอยู่ (Chang *et al.*, 1999)

การตรวจสอบความคงตัวของสารพันธุกรรม เซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมเนื่องจากความเย็นที่ได้รับ ซึ่งการตรวจสอบความคงตัวของสารพันธุกรรมในปัจจุบันมีหลายวิธี ขึ้นอยู่กับความสะดวกและความต้องการของผู้ตรวจสอบ เช่น ตรวจสอบ DNA ด้วยวิธี RAPD, RFLP และ AFLP เป็นต้น หรือหากต้องการตรวจสอบโปรตีนอาจใช้การตรวจสอบเอนไซม์บางชนิดก็ได้

2.6 เทคนิคการเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation)

ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคในการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชก่อนการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยการปรับปริมาณน้ำให้เหมาะสม ให้เซลล์มีการปรับสภาพ และสามารถทนต่อสภาพเย็นได้โดยเซลล์ไม่ตาย และสามารถแช่ในไนโตรเจนเหลวได้โดยตรง

2.6.1 การเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยเทคนิค dehydration

การเก็บรักษาด้วยวิธีการนี้เป็นการลดปริมาณน้ำในเซลล์ เพื่อการป้องกันไม่ให้น้ำในเซลล์ของเนื้อเยื่อพืชนั้นเกิดการแข็งตัวในขณะที่ทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การฝังเซลล์ให้แห้งโดยตากไว้ในตู้ laminar flow การใช้สารดูดความชื้นซิลิกาเจล รวมไปถึงการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง น้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นสูงจะมีผลต่อแรงดันออสโมซิสของเซลล์ โดยการทำให้เซลล์สูญเสียน้ำ แต่เซลล์ไม่ได้รับความเสียหาย ซึ่งในพืชแต่ละชนิดจะใช้น้ำตาลซูโครส ที่เหมาะสมแตกต่างกันออกไป ดังนั้นจึงต้องพิจารณาทั้งชนิดของพืช ขนาดของชิ้นส่วนของพืชก่อนที่จะนำมาทำการทดลอง

2.6.2 การเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยเทคนิค vitrification

เป็นวิธีการเก็บรักษาโดยใช้สารเคมี เพื่อป้องกันอันตรายจากความเย็นจนเกิดผลึกน้ำแข็ง (แสงจันทร์, 2547) มีหลักการคือ การกำจัดน้ำออกจากตัวอย่างพืชโดยแช่ในสารละลาย PVS2

ที่มีค่า ออสโมติกัมสูง จากนั้นจึงแช่ ในไนโตรเจนเหลวอย่างรวดเร็ว (Takagi, 2000) ซึ่งสารเคมีที่ใช้นี้มีทั้งที่สามารถซึมผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์หรืออาจห่อหุ้มอยู่ภายนอก สารเคมีที่ใช้เพื่อป้องกันไม่ให้ น้ำในเซลล์ตกผลึกแข็งตัวจะมีความเข้มข้นสูง จึงป้องกันไม่ให้เกิดการแข็งตัวของน้ำในเซลล์ เซลล์จึงไม่แตก (อารีย์, 2541) สารที่ใช้ป้องกันอันตรายจากการเกิดผลึกน้ำแข็งมีหลายชนิด เช่น ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ซูโครส กลูโคส เอทิลีนไกลคอล โพลีเอทิลีนไกลคอล กลีเซอรอล โพรลีน และ สารประกอบไฮดรอกซิลิกบางชนิด เป็นต้น สารละลาย PVS2 จะประกอบไปด้วย กลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 15 เปอร์เซ็นต์ และเอทิลีนไกลคอล 15 เปอร์เซ็นต์ สารที่เป็นองค์ประกอบของสารละลาย PVS2 เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการปกป้องเนื้อเยื่อพืชจากอันตรายขณะแช่แข็ง โดยมีผลต่อแรงดันออสโมติกของเซลล์ โดยการดึงน้ำออกจากเซลล์ และอาจไปมีผลในการปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย (Engelmann, 1991) นอกจากนี้ในสารละลาย PVS2 ยังมีสาร ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ เป็นส่วนประกอบ ซึ่งหากใช้ในความเข้มข้นที่สูงอาจมีผลไปรบกวนกระบวนการ เมตาบอลิซึมของ RNA หรือ DNA และโปรตีนก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชได้ แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานถึงการใช้อนุสารละลาย PVS2 ในการเก็บรักษาตัวอย่างพืชหลายชนิดและพบว่าประสบความสำเร็จเป็นจำนวนมาก เช่น กล้วย (Tsukazaki *et al.*, 2000) กล้วยไม้ (Ishikawa *et al.*, 1997 และ Hirano *et al.*, 2005; Thammasiri and Soamkul, 2007 และ Vendrame *et al.*, 2007) แอฟริกันไวโอเล็ต (Moges *et al.*, 2004) และ เฟือก (*Colocasia esculenta*) (Takagi *et al.*, 1997)

2.6.3 การเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยเทคนิค encapsulation – dehydration

วิธีการนี้พัฒนาเพื่อใช้ในการผลิตเมล็ดสังเคราะห์ (synthetic seed) หรือเมล็ดเทียม ชิ้นส่วนพืชจะถูกเคลือบด้วยสารอัลจินต ใช้กับ ยอดอ่อน โขมาติกเอ็มบริโอ และ ไมโครสปอร์ เอ็มบริโอ ข้อดีของวิธีนี้คือ คือ ใช้ได้กับชิ้นส่วนพืชที่มีขนาดใหญ่ เช่น ยอดอ่อนที่มีความยาว 5 มิลลิเมตร หรือ โขมาติกเอ็มบริโอที่มีความยาว 2 - 3 มิลลิเมตร ชิ้นส่วนพืชต้องผ่านกระบวนการเพื่อเพิ่มความสามารถในการอยู่รอด โดยนำชิ้นส่วนพืชมาเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของซูโครสสูงเพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์ ชิ้นส่วนที่ถูกเคลือบทำให้แห้งโดยใช้ ซิลิกาเจล (silica gel) หรือ การตาก (air-desiccation) แต่การใช้ซิลิกาเจลเป็นวิธีที่นิยมที่สุดเนื่องจากทำให้เซลล์มีอัตราการสูญเสียน้ำคงที่ เป็นการเพิ่มการอยู่รอดและความสามารถในการงอก หลังจากนั้นจึงนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลว และสามารถเก็บรักษาได้หลายปีโดยยังคงสภาพความมีชีวิตอยู่

2.6.4 การเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยเทคนิค encapsulation - vitrification

เป็นวิธีการผสมผสานระหว่างวิธี vitrification และ encapsulation โดยขึ้นส่วนพืชนำมาหุ้มด้วยสารอัลจินเต แล้วดึงน้ำออกโดยแช่สารละลาย cryoprotectant เหมือนวิธี vitrification (Engelmann, 2000) โดยสารอัลจินเตจะมีส่วนในการป้องกันการสูญเสีย น้ำ ลดความเป็นพิษที่ขึ้นส่วนของพืชจะต้องสัมผัสสารเคมีโดยตรง และป้องกันออสโมติก เมื่อแช่ในสารละลายตามวิธีการ vitrification (Hirai and Sakai, 1999) เทคนิคนี้ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาพืชมาแล้วหลายชนิดได้แก่ วาซาบิ (Matsumoto *et al.*, 1995), สตรอว์เบอร์รี่ (Hirai *et al.*, 1998), มันฝรั่ง (Hirai and Sakai, 1999), 'Troyer' citrange (Wang *et al.*, 2002), มันเทศ (Haria and Sakai, 2003), แอฟริกันไวโอเล็ต (Moges *et al.*, 2004) และ Gentian (Tanaka, 2004) เป็นต้น

ในปัจจุบัน เทคนิคที่ประสบผลสำเร็จในพืชหลายชนิด ได้แก่ เทคนิค vitrification, encapsulation - vitrification และ encapsulation - dehydration ขึ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาพันธุ์กรรมด้วยวิธี cryopreservation คือเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดเนื่องจาก ไม่กลายพันธุ์และปลอดไวรัส โดย ศิริกุล และคณะ (2548) ได้ทดลองเก็บรักษาปลายยอดจำปีสิรินธรในไนโตรเจนเหลวโดยวิธี encapsulation - vitrification โดยการ preculture เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำปลายยอดมาทำ encapsulation และแช่ใน osmoprotective solution เป็นเวลา 60 นาที แล้วย้ายมาแช่ใน PVS2 เป็นเวลา 60 นาที จึงนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว หลังจากนำปลายยอดมาละลายน้ำแข็ง และนำไปเลี้ยงบนอาหารชักนำต้น (regeneration medium) พบว่าสามารถเจริญเป็นต้นตามปกติได้ 26.6 ± 8.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Panis *et al.* (2005) รายงานขนาดฐานของเนื้อเยื่อส่วนยอดต่ออัตราการรอดชีวิตหลังการเก็บรักษาของกล้วยพันธุ์ Williams (AAA group) พบว่าขนาด 1 มิลลิเมตร ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 65.8 เปอร์เซ็นต์ ขนาดที่ใหญ่กว่านี้ให้อัตราการรอดชีวิตลดลงตามลำดับ ส่วนขนาดเล็กกว่านี้ไม่เหมาะสมเนื่องจากเสี่ยงต่อความเสียหายเนื่องจากการตัด สุจิตรา (2541) รายงานว่าการเก็บรักษากล้วย Abaca ในสภาพเยือกแข็งโดย วิธี encapsulation - vitrification พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 0.3 โมลาร์ ที่เพิ่มลงไปในการ ½ MS เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำ preculture เนื่องจากมีอัตราการเกิดยอดสูงสุด 78 เปอร์เซ็นต์ และมีความสูงเฉลี่ยของยอด 0.5 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับการทำ encapsulated meristems ใน PVS2 เป็นเวลา 20 - 30 นาที ก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือ 1 วัน พบว่าวิธีการเก็บรักษาทั้ง 2 วิธี ให้ผลไม่แตกต่างกันโดยต้นอ่อนที่ได้จากการเก็บรักษาทั้งวิธี vitrification และวิธี encapsulated - vitrification มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกัน มีอัตราการรอดชีวิต 90 และ 91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.7 การเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยเทคนิคเมล็ดเทียม (encapsulation or artificial seeds)

เทคนิคเมล็ดเทียมเป็นอีกทางเลือกสำหรับการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืช เพื่อทดแทนระบบการเก็บรักษาในสภาพปลอดแก้วแบบเก่าที่มักเกิดความผันแปรทางพันธุกรรม จากการย้ายเลี้ยงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้สูญเสียความตรงตามพันธุ์ได้ จึงมีการนำเอาเทคนิคเมล็ดเทียมเข้ามาใช้เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นได้ (สมยศ, 2541) เมล็ดเทียมเป็นเมล็ดที่เกิดจากการนำโซมาติกเอ็มบริโอมาหุ้มด้วยสารที่มีลักษณะเป็นวุ้น ทำหน้าที่เสมือนเปลือกหุ้มเมล็ด เพื่อป้องกันอันตรายให้แก่เอ็มบริโอที่อยู่ภายใน โดยชั้นส่วนพืชจะถูกห่อหุ้มด้วยสารไฮโดรเจล (hydrogel) เช่น โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) โพแทสเซียมอัลจิเนต (potassium alginate) โซเดียมเพกเตต (sodium pectate) คาร์เรจีแนน (carrageenan) คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) และ เจลาติน (Redenbaugh *et al.*, 1984 และ Rai *et al.*, 2008) นำมาเคลือบชั้นส่วนของพืช ก่อนทำการเก็บรักษา (Redenbaugh *et al.*, 1987) เมล็ดเทียมมีประโยชน์ในการขยายพันธุ์พืชหายาก พืชใกล้สูญพันธุ์ พืชถูกผสมหายาก พืชสมุนไพร และพืชเศรษฐกิจ (Mandal *et al.*, 2000) พืชที่ได้มีพันธุกรรมเหมือนเดิม ใช้ในการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชโดยไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรค และใช้อนุรักษ์พันธุกรรมพืชที่ปลอดภัยทั้งในระยะต้นและระยะยาว ชั้นส่วนพืชที่นำมาผลิตเมล็ดเทียม ได้แก่ microbulb microtuber แ่ง หน่อ ส่วนของตายอดหรือตาข้าง แคลลัส และโปรโตคอร์ม ควรมีขนาด 3-5 มิลลิเมตร (Standardi and Piccioni, 1998) การผลิตเมล็ดเทียมจากปลายยอดหรือตาข้างประสบผลสำเร็จในพืชหลายชนิด Saiprasad and Polisetty (2003) ได้ทำการเก็บรักษาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Dendrobium Sonia* ด้วยการเคลือบสารอัลจิเนตและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถเก็บรักษาได้นานถึง 90 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 56 และในการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 60 วัน ยังคงมีความงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ Singh *et al.* (2006) ผลิตเมล็ดเทียมจากปลายยอดของ *Phyllanthus amarus* พบว่าโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 75 มิลลิโมลาร์ มีความเหมาะสมที่สุดในการผลิตเมล็ดเทียม เมล็ดเทียมที่ได้สามารถงอกเป็นต้นพืชได้ 90 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ต้นพืชที่ได้มีการเจริญของปลายยอดและรากตามปกติ Srivastava *et al.* (2009) ผลิตเมล็ดเทียมจากพืชสมุนไพร *Cineraria maritime* จากปลายยอดและส่วนของข้อขนาด 3-5 มิลลิเมตร โดยใช้อาหารสูตร ½ MS ชูโครสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน รักษาความชื้นของเมล็ดเทียมโดยสเปรย์น้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้วทุกๆ 15 วัน หลังจากย้ายเลี้ยง

บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมล็ดเทียมเริ่มออกเป็นต้นพืช และภายใน 4 สัปดาห์ เมล็ดเทียมงอกเป็นต้นพืชได้ 82 เปอร์เซ็นต์ สมปอง และลัดดาวัลย์ (2549) ผลิตเมล็ดเทียมหญ้าแฝกจากยอดอ่อนขนาด 3-5 มิลลิเมตร หุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต (Wako) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมล็ดเทียมงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ 2 สัปดาห์ และพัฒนาเป็นต้นกล้าที่แข็งแรงในเวลา 2 สัปดาห์ ต่อมา ลัดดาวัลย์ (2552) ผลิตเมล็ดเทียมหญ้าแฝกจากชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 3 มิลลิเมตร โดยใช้โซเดียมอัลจิเนต (Fluka) ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากแคลเซียมคลอไรด์ หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.28 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าเมล็ดเทียมที่หุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ มีการรอดชีวิตสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ และการรอดชีวิตลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตลดลง

เทคนิคเมล็ดเทียมยังสามารถดัดแปลงสำหรับใช้เก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชแบบแช่แข็งได้ เช่น การรักษารูปร่างพืชแบบเก็บแช่แข็งโดยวิธีการการเคลือบ และคั่งน้ำออก (encapsulation - dehydration method) โดยการนำเมล็ดเทียมที่มีชิ้นส่วนพืชฝังตัวอยู่ภายใน ไปเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง จากนั้นนำไปคั่งน้ำออกบางส่วนก่อนที่จะนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวต่อไป (Martinez *et al.*, 1999) หรือการเก็บรักษารูปร่างพืชแบบแช่แข็ง โดยวิธีการเคลือบและการป้องกันไม่ให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (encapsulation - vitrification) ในขณะแช่แข็งโดยการเลี้ยงเมล็ดเทียมที่มีชิ้นส่วนพืชฝังตัวอยู่ภายในบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง จากนั้นเติมสารละลายปกป้องเนื้อเยื่อพืชขณะแช่แข็ง (plant vitrification solution; PVS) ก่อนนำไปเก็บแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวต่อไป (Phunchindawan *et al.*, 1997)

สำหรับงานวิจัยในประเทศไทย มีรายงานว่าได้ดำเนินการศึกษาการเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชโดยใช้เทคนิค cryopreservation ในพืชหลายชนิด เช่น กัญชง กล้วยไม้ มะม่วง ขนุน หน่อไม้ฝรั่ง มันสำปะหลัง และพืชสมุนไพรต่างๆ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 พืชทดลอง

เมล็ดพันธุ์เนระพุสีไทยที่ได้จากธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี คัดเลือกเมล็ดที่มีลักษณะแก่ สมบูรณ์ เมล็ดมีสีดำ (ภาพที่ 3.1) นำมาชักนำเป็นต้นอ่อนด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ



ภาพที่ 3.1 พืชและเมล็ดของเนระพุสีไทย

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

(1) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง เครื่องชั่งไฟฟ้า เตาแก๊ส บีกเกอร์ กระจกบดวางซ้อนตักสาร หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ มีดผ่าตัด ปากกิบ ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 2 ออนซ์ ขนาด 4 ออนซ์ พร้อมฝาปิด

(2) ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส พร้อมชั้นวางที่มีหลอดไฟเรืองแสงสีขาว ความเข้มแสงประมาณ 2,000 ลักซ์ ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

(3) อุปกรณ์สำหรับเก็บข้อมูลและบันทึกผล

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ หลอดพลาสติกทนความเย็น ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว

3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

(1) สารเคมีในการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) (ตารางผนวกที่ 1)

(2) สารควบคุมการเจริญเติบโตได้แก่ N_6 -benzyladenine purine (BAP)

(3) สารเคมีสำหรับฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ แอลกอฮอล์ คลอโรกซ์ และสารลดแรงตึงผิว (tween 20)

(4) สารเคมีที่ใช้ปรับความเป็นกรด่างของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl)

3.1.5 สารเคมีที่ใช้สำหรับการเก็บในสภาพเยือกแข็ง

ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) กลีเซอรอล (Glycerol) เอทิลีนไกลคอล (Ethylene glycol) โซเดียมอัลจีเนต (Na Alginate) และ แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

3.2 วิธีการทดลอง

การเตรียมพืชทดลอง

(1) นำเมล็ดพันธุ์เนระพุลีไทยมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อโดยคัดเลือกเมล็ดที่มีลักษณะดี สมบูรณ์ สีดำ มาแช่แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ก่อนที่จะฆ่าเชื้อผิวเมล็ดด้วย สารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เดิม ทวิน 20 ประมาณ 1-2 หยด (รณิษฐ์ และคณะ, 2551) แช่ 10 -15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ

(2) นำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว คีบเมล็ดใส่ขวดอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 8 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.6

(3) นำขวดที่เพาะเลี้ยงเมล็ดไปวางบนชั้นเลี้ยงในห้องภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เพื่อให้เจริญเป็นต้นอ่อนเป็นเวลา 3 เดือน เพื่อใช้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเก็บรักษาต้นเนระพุลีไทยในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโต

1.1 นำต้นพืชเนระพุลีไทยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ คัดเลือกต้นอ่อนที่มีใบจำนวน 2 ใบ ขนาด 1.5-2.0 เซนติเมตร รากสมบูรณ์ มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS 9 สูตร โดยเติมน้ำตาล 8 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่าง 5.6 ในอาหารทุกสูตร

อาหารสูตรที่ 1 MS + Sucrose 30 g/l

อาหารสูตรที่ 2 MS + Sucrose 60 g/l

อาหารสูตรที่ 3 MS + Sucrose 90 g/l

อาหารสูตรที่ 4 $\frac{1}{2}$ MS + Sucrose 30 g/l

อาหารสูตรที่ 5 $\frac{1}{2}$ MS + Sucrose 60 g/l

อาหารสูตรที่ 6 $\frac{1}{2}$ MS + Sucrose 90 g/l

อาหารสูตรที่ 7 $\frac{1}{4}$ MS + Sucrose 30 g/l

อาหารสูตรที่ 8 $\frac{1}{4}$ MS + Sucrose 60 g/l

อาหารสูตรที่ 9 $\frac{1}{4}$ MS + Sucrose 90 g/l

1.2 ทดลองเลี้ยงในขวด ขนาด 2 ออนซ์ ที่มีปริมาณอาหาร 10 มิลลิลิตร และนำไปเพาะเลี้ยงในห้องภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส โดยใช้สูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นอาหารสูตรควบคุม

1.3 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) แบ่งออกเป็น 9 สูตรอาหาร โดยแต่ละสูตรมี 10 ซ้ำ แต่ละซ้ำจะเพาะเลี้ยงต้นอ่อน 1 ต้น และทำการบันทึกผลทุกเดือน เป็นเวลา 9 เดือน โดยบันทึกจำนวนยอดที่เกิดขึ้นใหม่ ความสูงต้น จำนวนใบลักษณะของต้นเนระพูสีไทย และอัตราการรอดชีวิตหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 9 เดือน วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ IRRISTAT version 3/93 (สุทธิราภรณ์ และคณะ, 2537) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

การทดลองที่ 2 ศึกษาการเก็บรักษาปลายยอดพืชเนระพูสีไทยในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค encapsulation - vitrification

2.1 ขั้นตอนการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดเนระพูสีไทยด้วยเทคนิค encapsulation - vitrification

นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 3 เดือน มาตัดเนื้อเยื่อปลายยอดให้ได้ขนาดประมาณ 2 - 3 มิลลิเมตร นำปลายยอดที่ได้มาทำการทดลองดังนี้

2.1.1 ขั้นตอนการเตรียมความพร้อมของเนื้อเยื่อ (preculture)

โดยนำชิ้นส่วนปลายยอดมาเตรียมความพร้อมของเนื้อเยื่อบนอาหารปรับสภาพก่อนทำการทดลอง สูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.3 โมลาร์, 0.5 โมลาร์ และไม่เติมน้ำตาลซูโครส เป็นเวลา 1 วัน (ภาพ 3.2 ก) เลี้ยงบนชั้นวางเนื้อเยื่อในห้องภายใต้สภาพแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.1.2 ขั้นตอน encapsulation – vitrification ประกอบด้วย

การทำเมล็ดเทียม (encapsulation) โดยนำเนื้อเยื่อปลายยอดที่ผ่านการ เตรียมความพร้อมบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ แช่ในสารละลาย loading solution ที่มีส่วนผสมของ กลีเซอรอล 2 โมลาร์ น้ำตาลซูโครส 0.4 โมลาร์ และ โซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นใช้ไมโครปิเปตที่ตัดปลายทึบ (tip) พลาสติก ดูดสารละลายให้มีชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อปลายยอดติดมาด้วยหยดลงในสารละลาย MS ที่เติม แคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ และ น้ำตาลซูโครส 0.4 โมลาร์ แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จนเนื้อเยื่อมีลักษณะคล้ายมีวุ้นมาห่อหุ้มอยู่ (beads) (ภาพ 3.2 ข)

การทำ vitrification โดยนำเมล็ดเทียม (encapsulated meristems) ที่ได้ บรรจุใน หลอดพลาสติกทนความเย็น (cryotube) หลอดละ 10 beads เติมสารละลาย PVS2 ซึ่งประกอบด้วย กลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ เอทิลีนไกลคอล 15 เปอร์เซ็นต์ และ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ 15 เปอร์เซ็นต์ (Sakai *et al.*, 1990) ทำการเปรียบเทียบระยะเวลาในการแช่สารละลาย PVS2 ที่ 0, 20, 40, 60 และ 80 นาที เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนต่างๆของการปรับสภาพปลายยอดก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (ภาพ 3.2 ค)

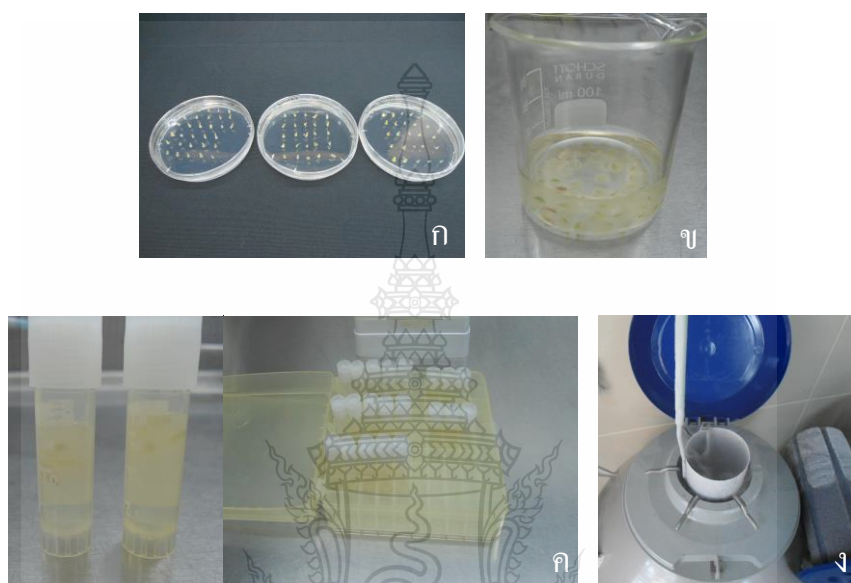
นำ เมล็ดเทียม ไปแช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพ 3.2 ง)

2.1.3 การทำให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตอีกครั้ง โดยนำหลอดพลาสติกทนความเย็นที่บรรจุเมล็ดเทียมออกจากไนโตรเจนเหลวมาละลายผลึกน้ำแข็งด้วยน้ำอุ่น อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 - 3 นาที ดูดสารละลาย PVS2 ทิ้ง แล้วเติมน้ำตาลซูโครส 1.2 โมลาร์ แช่ไว้เป็นเวลา 20 นาที ย้าย เมล็ดเทียม มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 1 เดือน เพื่อคัดเลือกรอดชีวิต จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อปลายยอดในเมล็ดเทียม ที่มีการเจริญ ยอดมีสีเขียวโผล่พ้นเมล็ดเทียมออกมาซึ่งเป็นปลายยอดที่มีศักยภาพพัฒนาเป็นต้น มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (รมณีย์ และคณะ, 2551) เป็นเวลา 1 เดือน เพื่อชักนำให้ปลายยอดพัฒนาเป็นต้นต่อไป

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) (CRD) แบ่งออกเป็น 5 สิ่งทดลอง โดยแต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำใช้เมล็ดเทียม 10 เมล็ด บันทึกผลอัตราการรอดชีวิตของปลายยอดใน เมล็ดเทียม โดยประเมินจากการเจริญและเพิ่มปริมาณของปลายยอดในแต่ละ เมล็ดเทียม เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารชักนำให้ปลายยอดเติบโตและเพิ่มปริมาณ โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการรอดชีวิต (\%)} = \frac{\text{จำนวน beads ที่ปลายยอดมีการเติบโต} \times 100}{\text{จำนวน beads ทั้งหมด}}$$

วิเคราะห์ผลทางสถิติ ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ IRRISTAT version 3/93 (สุทธิราภรณ์ และคณะ, 2537) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการเก็บรักษาปลายยอดเนระพูสีไทยในไนโตรเจนเหลวโดยวิธี encapsulation – vitrification

- ก. เพาะเลี้ยงปลายยอดเนระพูสีไทยในอาหาร preculture นาน 1 วัน
- ข. ทำ encapsulation ปลายยอด ใน โซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์
- ค. แช่เมล็ดเทียม ใน PVS2 ที่ระยะเวลาต่างๆ
- ง. เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว

3.3 สถานที่และระยะเวลาที่ทำการวิจัย

3.3.1 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ. ัญบุรี จ. ปทุมธานี

3.3.2 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เริ่มทำการวิจัยเดือน เมษายน 2555 ถึงเดือน มีนาคม 2557

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเก็บรักษาดันเนระพุสไทยในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโต

จากการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพุสไทยด้วยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโตของพืช โดยเลี้ยงต้นอ่อนขนาด 1.5 – 2 เซนติเมตร ที่มีจำนวน 2 ใบ ในอาหาร MS สูตรต่างๆ 9 สูตร เพาะเลี้ยงในสภาพปกติ โดยไม่มีการเปลี่ยนถ่ายอาหาร เป็นเวลา 9 เดือน พบว่า เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 เดือน ความสูงของต้นพืชมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ต้นพืชที่เลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีความสูงของต้นต่ำสุดเท่ากับ 1.81 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และ ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความสูงเท่ากับ 1.86 1.98 และ 2.01 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีความสูงต้นมากที่สุด เท่ากับ 3.26 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.1)(ภาพที่ 4.1) การนับจำนวนใบของต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยง พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบน้อยที่สุดเท่ากับ 2.1 ใบ ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และ ¼ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบเท่ากัน คือ 2.2 ใบ ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบมากที่สุด เท่ากับ 4.0 ใบ (ตารางที่ 4.2)(ภาพที่ 4.2) ลักษณะต้นพืชที่เก็บรักษาเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ทุกสูตร ต้นมีลักษณะแข็งแรงและปกติ

เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 2 เดือน ความสูงของต้นพืชมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และ ¼ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร มีความสูงของต้นน้อยที่สุดเท่ากัน คือ 2.03 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความสูงเท่ากับ 2.05 2.12 และ 2.50 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีความสูงต้นมากที่สุด เท่ากับ 3.71 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.1)(ภาพที่ 4.1) การนับจำนวนใบของต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยง พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 90

กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบน้อยที่สุดเท่ากับ 2.2 ใบ ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบ เท่ากับ 2.6 ใบ ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบมากที่สุด เท่ากับ 4.6 ใบ (ตารางที่ 4.2)(ภาพที่ 4.2) ลักษณะต้นพืชที่เก็บรักษาเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ทุกสูตร ต้นมีลักษณะแข็งแรง และปกติ

เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือน ความสูงของต้นพืชมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร มีความสูงของต้นน้อยที่สุดเท่ากับ 2.05 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ½ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และ ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความสูงเท่ากับ 2.15 2.17 และ 2.21 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีความสูงต้นมากที่สุด เท่ากับ 3.77 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.1)(ภาพที่ 4.1) การนับจำนวนใบของต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยง พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบน้อยที่สุดเท่ากับ 2.7 ใบ ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบ เท่ากับ 2.8 และ 3.1 ใบ ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบมากที่สุด เท่ากับ 5.6 ใบ (ตารางที่ 4.2) (ภาพที่ 4.2) ลักษณะต้นพืชที่เก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือน พบว่า ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ทุกสูตร ต้นมีลักษณะแข็งแรง ปกติ

เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 เดือน ความสูงของต้นพืชมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีความสูงของต้นน้อยที่สุดเท่ากับ 2.18 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความสูงเท่ากับ 2.22 2.25 2.26 และ 2.76 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีความสูงต้นมากที่สุด เท่ากับ 4.03 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.1)(ภาพที่ 4.1) การนับจำนวนใบของต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยง พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบน้อยที่สุดเท่ากับ 2.7 ใบ ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบ เท่ากับ 3.2 ใบ ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบมากที่สุด เท่ากับ 6.2 ใบ (ตารางที่ 4.2)(ภาพที่ 4.1) ลักษณะต้น

พืชที่เก็บรักษาเป็นเวลา 4 เดือน พบว่า ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก MS และ $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 30 60 และ 90 กรัมต่อลิตร ต้นมีลักษณะแข็งแรง และปกติ ใบเขียว และมีรากแข็งแรง โดยต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตของต้นสูงจนชนฝาขวด ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ก้านใบเริ่มเปลี่ยนเป็นสีดำ ใบเริ่มเป็นสีเหลือง

เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 5 เดือน ความสูงของต้นพืชมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีความสูงของต้นน้อยที่สุดเท่ากับ 2.22 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความสูงเท่ากับ 2.23 2.26 2.35 และ 2.82 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีความสูงต้นมากที่สุด เท่ากับ 4.40 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.1)(ภาพที่ 4.1) การนับจำนวนใบของต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยง พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบน้อยที่สุดเท่ากับ 3.0 ใบ ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบ เท่ากับ 3.4 ใบ ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบมากที่สุด เท่ากับ 6.4 ใบ (ตารางที่ 4.2)(ภาพที่ 4.2) ลักษณะต้นพืชที่เก็บรักษาเป็นเวลา 5 เดือน พบว่า ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตของต้นสูงจนชนฝาขวด อาหารมีลักษณะเหลว ต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ก้านใบเปลี่ยนเป็นสีดำ ใบเริ่มเป็นสีเหลือง ซึ่งสูตร $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร อาหารมีลักษณะเหลว ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร บางต้นมีลักษณะอวบ ใบเล็กหนา ใบไม่กางออก

เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน ความสูงของต้นพืชมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีความสูงของต้นน้อยที่สุดเท่ากับ 2.22 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความสูงเท่ากับ 2.24 2.27 2.36 และ 2.89 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีความสูงต้นมากที่สุด เท่ากับ 4.64

เซนติเมตร (ตารางที่ 4.1)(ภาพที่ 4.1) การนับจำนวนใบของต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยง พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบน้อยที่สุดเท่ากับ 3.3 ใบ ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และ ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบ เท่ากับ 3.7 และ 3.8 ใบ ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบมากที่สุด เท่ากับ 7.1 ใบ (ตารางที่ 4.2)(ภาพที่ 4.2) ลักษณะต้นพืชที่เก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน พบว่า ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ½ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ ¼ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตของต้นสูงจนชนฝาขวด ต้นมีการโค้งงอจากน้ำหนักอาหารมีลักษณะเหี่ยว ใบเริ่มเป็นสีเหลือง ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ก้านใบเปลี่ยนเป็นสีดำ มีอาการใบเหลือง 1-2 ใบ ซึ่งอาหารสูตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีบางต้น ใบเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองออกน้ำตาล (ภาพที่ 4.3)

เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 7 เดือน ความสูงของต้นพืชมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีความสูงของต้นน้อยที่สุดเท่ากับ 2.22 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และ ¼ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความสูงเท่ากับ 2.25 2.28 และ 2.36 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีความสูงต้นมากที่สุด เท่ากับ 4.79 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.1)(ภาพที่ 4.1) การนับจำนวนใบของต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยง พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบน้อยที่สุดเท่ากับ 3.5 ใบ ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และ ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบ เท่ากับ 3.8 และ 4.0 ใบ ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบมากที่สุด เท่ากับ 7.9 ใบ (ตารางที่ 4.2)(ภาพที่ 4.2) ลักษณะต้นพืชที่เก็บรักษาเป็นเวลา 7 เดือน พบว่า ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ½ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ ¼ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตของต้นสูงจนชนฝาขวด จนต้นมีอาการโค้งงอ อาหารมีลักษณะเหี่ยว ใบเริ่มเป็นสีเหลือง ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ต้นมีก้านใบเป็นสีดำเข้ม มีอาการใบเหลือง 3-4 ใบ อาหารมีลักษณะเหี่ยว ซึ่งอาหารสูตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ต้นแสดงอาการซีดเหลือง

เริ่มเป็นสีน้ำตาล ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร ½ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ ½ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ต้นมีลักษณะแข็งแรง ใบเขียว ปกติ

เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 8 เดือน ความสูงของต้นพืชมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีความสูงของต้นน้อยที่สุดเท่ากับ 2.22 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และ ¼ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความสูงเท่ากับ 2.25 2.28 และ 2.36 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีความสูงต้นมากที่สุด เท่ากับ 4.82 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.1)(ภาพที่ 4.1) การนับจำนวนใบของต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยง พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และ ½ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบน้อยที่สุดเท่ากัน คือ 3.9 ใบ ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบ เท่ากับ 4.0 ใบ ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบมากที่สุด เท่ากับ 7.9 ใบ (ตารางที่ 4.2)(ภาพที่ 4.2) ลักษณะต้นพืชที่เก็บรักษาเป็นเวลา 8 เดือน พบว่า ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ½ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ ¼ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตของต้นสูงจนชนฝาขวด จนต้นมีอาการโค้งงอ อาหารมีลักษณะเหลว ใบเริ่มเป็นสีเหลือง ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ต้นมีก้านใบเป็นสีดำเข้ม มีอาการใบเหลือง 3-4 ใบ บางต้นมีใบเหลืองทั้งต้น อาหารมีลักษณะเหลว ซึ่งอาหารสูตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ต้นแสดงอาการขีดเหลืองเริ่มเป็นสีน้ำตาล ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร ½ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ ½ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ต้นมีลักษณะแข็งแรง ใบเขียว

เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 9 เดือน ความสูงของต้นพืชมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีความสูงของต้นน้อยที่สุดเท่ากับ 2.22 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ¼ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และ ¼ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความสูงเท่ากับ 2.25 2.28 และ 2.36 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีความสูงต้นมากที่สุด เท่ากับ 4.89 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.1)(ภาพที่ 4.1) การนับจำนวนใบของต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยง พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดย

ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบน้อยที่สุดเท่ากับ 3.9 ใบ ซึ่งไม่แตกต่างกับต้นพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และ $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบ เท่ากับ 4.0 และ 4.0 ใบ ตามลำดับ ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบมากที่สุด เท่ากับ 7.9 ใบ (ตารางที่ 4.2) (ภาพที่ 4.2) ลักษณะต้นพืชที่เก็บรักษาเป็นเวลา 9 เดือน พบว่า ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตของต้นสูงจนชนฝาขวด จนต้นมีอาการโค้งงอ อาหารมีลักษณะเหลว ใบมีสีเหลือง 3-4 ใบ (ภาพที่ 4.4 กง และ ข) ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ต้นมีก้านใบเป็นสีดำเข้ม มีอาการใบเหลือง 3-4 ใบ และเริ่มเป็นสีน้ำตาลมีบางต้นตาย อาหารมีลักษณะเหลว (ภาพที่ 4.4 ชช และ ฉ) ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ต้นมีลักษณะแข็งแรง ใบเขียว ปกติ (ภาพที่ 4.4)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองของการเก็บรักษาด้านเนระพูสีไทย บนอาหาร MS สูตรต่างๆ 9 สูตร เป็นระยะเวลา 9 เดือน พบว่า ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก และปริมาณน้ำตาลมีผลต่อการเก็บรักษาด้านพืชในสภาพปลอดเชื้อ ความสูงของต้นเมื่อทำการเก็บรักษาในอาหารทุกความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก (MS $\frac{1}{2}$ MS และ $\frac{1}{4}$ MS) ที่มีปริมาณน้ำตาล 30 60 และ 90 กรัมต่อลิตร จะมีการพัฒนาความสูงของต้นแตกต่างกันทางสถิติ ในเดือนที่ 9 ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตรมีความสูงของต้นน้อยที่สุด เท่ากับ 2.22 เซนติเมตร และไม่มีการเปลี่ยนแปลงของความสูงในช่วงเดือนที่ 4 – 9 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ กับต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารทุกความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในทุกความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักมีความสูงต้นมากที่สุด โดยต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีความสูงต้นมากที่สุด เท่ากับ 4.89 เซนติเมตร การนับจำนวนใบของต้นพืช จากผลการทดลอง พบว่า ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบน้อยที่สุดเท่ากับ 3.9 ใบ และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ กับต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารทุกความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบมากที่สุด เท่ากับ 7.9 ใบ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนใบในช่วงเดือนที่ 8 – 9 โดยต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ในทุกความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักมีจำนวนใบน้อยที่สุด ลักษณะต้นที่ได้เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 9 เดือน พบว่า ต้นที่เพาะเลี้ยงใน

อาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ต้นมีลักษณะแข็งแรง และ ปกติ ใบเขียว และมีรากแข็งแรง (ภาพที่ 4.4) ต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 30 60 และ 90 กรัมต่อลิตร ในช่วงเดือนที่ 6 – 9 ก้านใบเปลี่ยนเป็นสีดำ ใบเริ่มมีอาการเหลือง ส่วนต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ในช่วงเดือนที่ 4 – 9 มีการเจริญเติบโตของต้นสูงจนชนฝาขวด อัตราการรอดชีวิตของต้นพืชที่เก็บรักษาเป็นเวลา 9 เดือนพบว่า ต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และ $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุด เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์



ตารางที่ 4.1 ความสูงของต้นเนระพูสีไทย เมื่อทำการเก็บรักษาพันธุ์กรรมพืชโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต บนอาหาร MS สูตรต่างๆ จำนวน 9 สูตร เป็นเวลา 9 เดือน

สูตรอาหาร	ความสูง (เซนติเมตร)								
	เดือน 1	เดือน 2	เดือน 3	เดือน 4	เดือน 5	เดือน 6	เดือน 7	เดือน 8	เดือน 9
1. MS + sucrose 30 g/l	2.91±0.16 ^{1/} cd ^{2/}	3.45±0.17cd	3.69±0.21d	4.03±0.2d	4.08±0.20de	4.22±0.24de	4.28±0.24ef	4.33±0.26d	4.37±0.25ef
2. MS + sucrose 60 g/l	2.41±0.18bc	2.50±0.20ab	2.70±0.17bc	2.76±0.18ab	2.82±0.19ab	2.89±0.21ab	2.96±0.23bc	2.96±0.23bc	3.00±0.24bc
3. MS + sucrose 90 g/l	1.98±0.15ab	2.05±0.11a	2.15±0.11ab	2.18±0.11a	2.23±0.11a	2.24±0.11a	2.25±0.11a	2.25±0.11a	2.25±0.11a
4. ½ MS + sucrose 30 g/l	3.26±0.17d	3.71±0.17d	3.77±0.17d	3.98±0.22d	4.40±0.2e	4.64±0.22e	4.79±0.23f	4.82±0.22d	4.89±0.20f
5. ½ MS + sucrose 60 g/l	2.61±0.19c	2.97±0.28bc	3.11±0.30c	3.26±0.33bc	3.40±0.34bc	3.42±0.35bc	3.43±0.35cd	3.43±0.35c	3.45±0.35cd
6. ½ MS + sucrose 90 g/l	1.81±0.10a	2.03±0.12a	2.17±0.14ab	2.22±0.12a	2.22±0.12a	2.22±0.12a	2.22±0.12a	2.22±0.12a	2.22±0.12a
7. ¼ MS + sucrose 30 g/l	2.76±0.21c	3.17±0.24cd	3.25±0.23cd	3.40±0.22c	3.56±0.29cd	3.64±0.3cd	3.73±0.33de	3.53±0.27c	3.74±0.34de
8. ¼ MS + sucrose 60 g/l	1.86±0.15a	2.03±0.13a	2.05±0.14a	2.25±0.14a	2.35±0.19a	2.36±0.19a	2.36±0.19ab	2.36±0.19ab	2.36±0.19ab
9. ¼ MS + sucrose 90 g/l	2.01±0.17ab	2.12±0.16a	2.21±0.15ab	2.26±0.15a	2.26±0.15a	2.27±0.15a	2.28±0.15ab	2.28±0.15a	2.28±0.15a
CV (%)	21.9	22.0	21.4	21.1	22.1	22.8	23.3	22.5	23.2
F –test	**	**	**	**	**	**	**	**	**

1/ ค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย

2/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

** มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

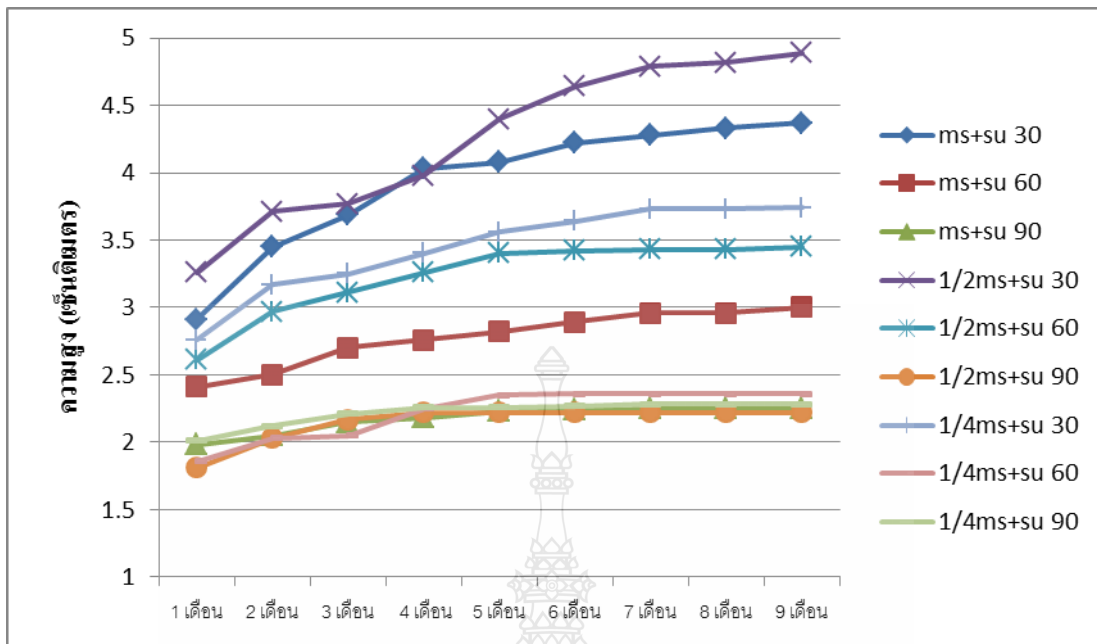
ตารางที่ 4.2 จำนวนใบของต้นเนระพูสีไทย เมื่อทำการเก็บรักษาพันธุ์กรรมพืชโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต บนอาหาร MS สูตรต่างๆ จำนวน 9 สูตร เป็นเวลา 9 เดือน

สูตรอาหาร	จำนวนใบ (ใบ)								
	เดือน 1	เดือน 2	เดือน 3	เดือน 4	เดือน 5	เดือน 6	เดือน 7	เดือน 8	เดือน 9
1. MS + sucrose 30 g/l	3.1±0.1 ^{1/cd^{2/}}	3.4±0.22d	4.4±0.22e	4.9±0.31d	5.2±0.29d	5.9±0.31d	6.6±0.43d	6.8±0.42d	6.8±0.42d
2. MS + sucrose 60 g/l	2.9±0.1bcd	2.9±0.1bc	3.2±0.13bc	3.6±0.16b	4.1±0.1c	4.2±0.13b	4.4±0.22b	4.8±0.25b	4.8±0.25b
3. MS + sucrose 90 g/l	2.7±0.15bc	2.7±0.15b	3.1±0.18ab	3.4±0.22b	3.4±0.22ab	3.7±0.21ab	3.8±0.2ab	3.9±0.18a	4.0±0.18a
4. ½ MS + sucrose 30 g/l	4.0±0.21e	4.6±0.22e	5.6±0.27f	6.2±0.25e	6.4±0.27e	7.1±0.28e	7.9±0.18e	7.9±0.18e	7.9±0.18e
5. ½ MS + sucrose 60 g/l	3.2±0.13d	3.3±0.15cd	4.0±0.15de	4.2±0.25c	4.8±0.25d	5.1±0.23c	5.1±0.23c	5.4±0.22bc	5.4±0.22bc
6. ½ MS + sucrose 90 g/l	2.2±0.13a	2.2±0.13a	2.7±0.15a	2.7±0.15a	3.0±0.21a	3.3±0.26a	3.5±0.27a	3.9±0.35a	3.9±0.35a
7. ¼ MS + sucrose 30 g/l	2.2±0.13a	2.9±0.1bc	3.8±0.13d	4.5±0.17cd	4.8±0.13d	5.2±0.2cd	5.7±0.15c	5.8±0.2c	5.8±0.2c
8. ¼ MS + sucrose 60 g/l	2.6±0.16b	2.7±0.15b	3.6±0.16cd	4.7±0.15cd	4.9±0.18d	5.2±0.2cd	5.3±0.21c	5.3±0.26bc	5.0±0.33bc
9. ¼ MS + sucrose 90 g/l	2.1±0.1a	2.6±0.16ab	2.8±0.13ab	3.2±0.13ab	3.7±0.26bc	3.8±0.25ab	4.0±0.26ab	4.0±0.26a	4.0±0.26a
F –test	**	**	**	**	**	**	**	**	**

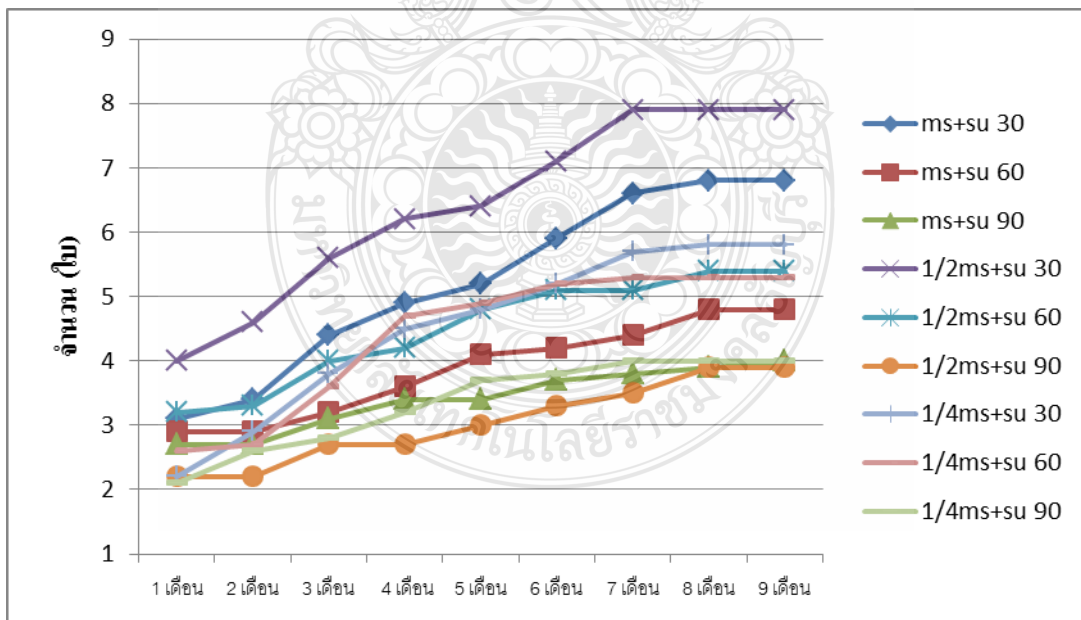
1/ ค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย

2/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

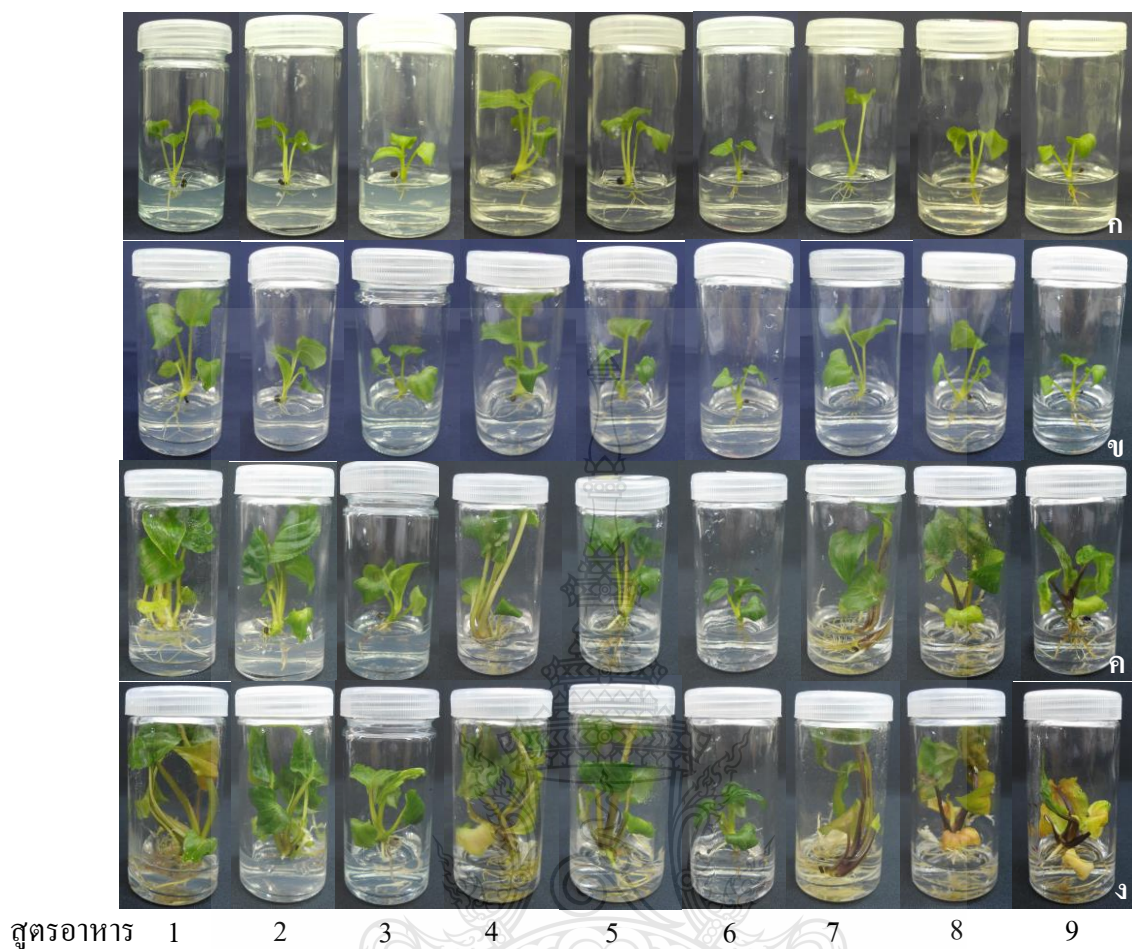
** มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.1 ความสูงของต้นนาระพาลีไทยที่เก็บรักษาพันธุ์กรรมพืชโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโตบนอาหาร MS สูตรต่างๆ จำนวน 9 สูตร เป็นเวลา 9 เดือน



ภาพที่ 4.2 จำนวนใบของต้นนาระพาลีไทยที่เก็บรักษาพันธุ์กรรมพืชโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโตบนอาหาร MS สูตรต่างๆ จำนวน 9 สูตร เป็นเวลา 9 เดือน



ภาพที่ 4.3 ลักษณะต้นเนระพูสีไทยที่เก็บรักษาด้วยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต เป็นเวลา

(ก) 1 เดือน (ข) 3 เดือน (ค) 6 เดือน และ (ง) 9 เดือน โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS สูตรต่างๆ 9 สูตร

สูตรอาหาร 1 คือ MS + Sucrose 30 g/l

สูตรอาหาร 2 คือ MS + Sucrose 60 g/l

สูตรอาหาร 3 คือ MS + Sucrose 90 g/l

สูตรอาหาร 4 คือ $\frac{1}{2}$ MS + Sucrose 30 g/l

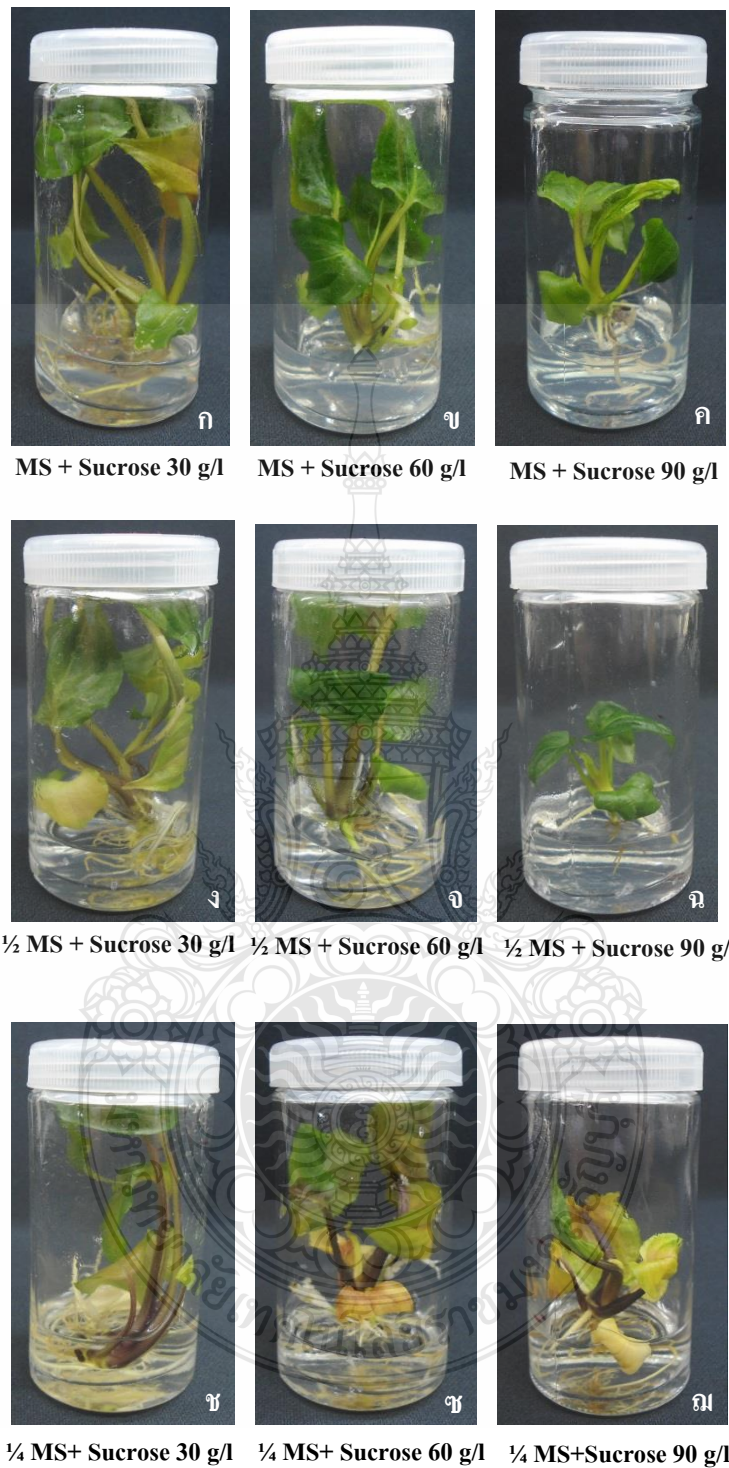
สูตรอาหาร 5 คือ $\frac{1}{2}$ MS + Sucrose 60 g/l

สูตรอาหาร 6 คือ $\frac{1}{2}$ MS + Sucrose 90 g/l

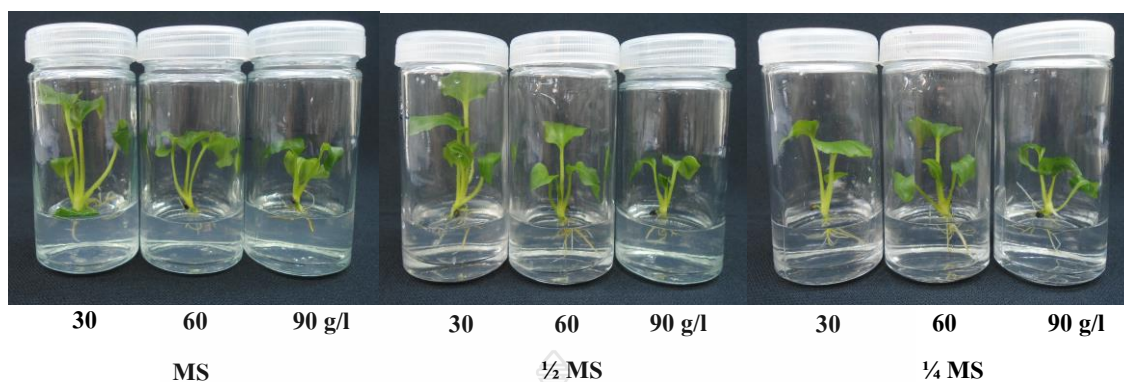
สูตรอาหาร 7 คือ $\frac{1}{4}$ MS + Sucrose 30 g/l

สูตรอาหาร 8 คือ $\frac{1}{4}$ MS + Sucrose 60 g/l

สูตรอาหาร 9 คือ $\frac{1}{4}$ MS + Sucrose 90 g/l



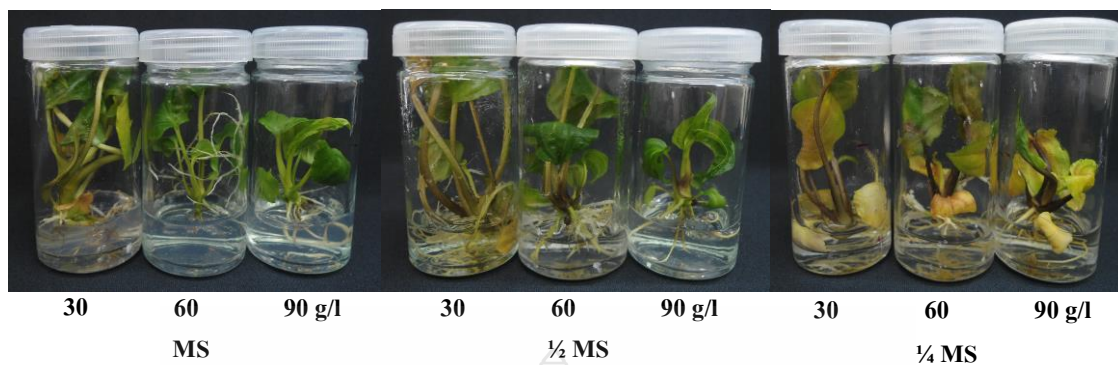
ภาพที่ 4.4 ต้นเนระพูสีไทยที่เก็บรักษาด้วยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS สูตรต่างๆ 9 สูตร เป็นเวลา 9 เดือน



ภาพที่ 4.5 ความสูงของต้นเนระพูสีไทยที่เก็บรักษาโดยการชะลอการเจริญเติบโตบนอาหารสูตร MS, $\frac{1}{2}$ MS และ $\frac{1}{4}$ MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่างกัน คือ 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 เดือน



ภาพที่ 4.6 ความสูงของต้นเนระพูสีไทยที่เก็บรักษาโดยการชะลอการเจริญเติบโตบนอาหารสูตร MS, $\frac{1}{2}$ MS และ $\frac{1}{4}$ MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่างกัน คือ 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 เดือน



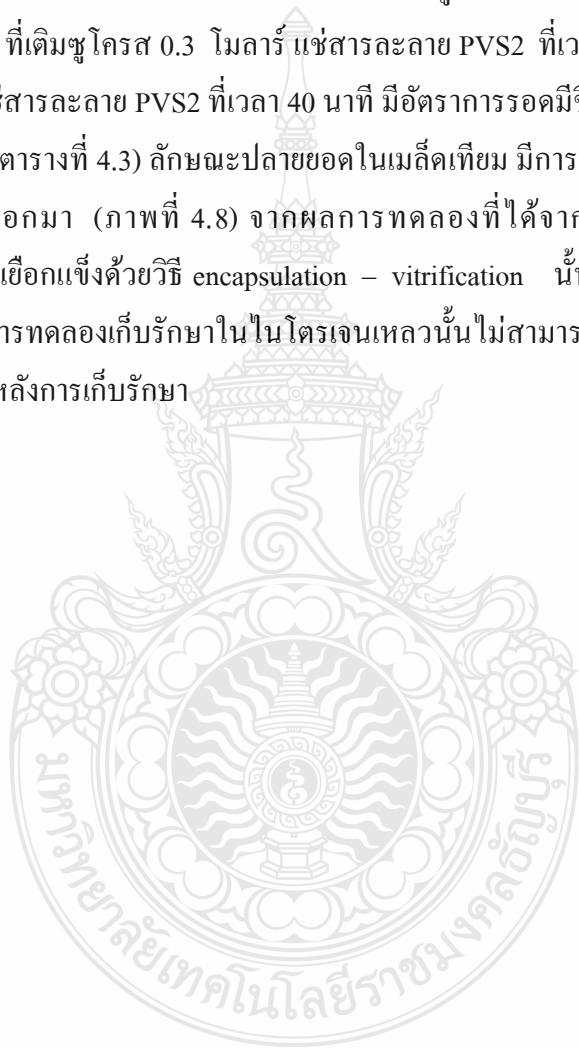
ภาพที่ 4.7 ความสูงของต้นเนระพูสีไทยที่เก็บรักษาโดยการชะลอการเจริญเติบโตบนอาหารสูตร MS, $\frac{1}{2}$ MS และ $\frac{1}{4}$ MS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่างกัน คือ 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 9 เดือน



4.2 การเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดพืชในสภาวะเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค encapsulation – vitrification

จากการทดลองเก็บรักษาปลายยอดพืชในสภาวะเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส โดยใช้เทคนิค encapsulation – vitrification โดยการพอกฆ่าเชื้อเมล็ด และนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เพื่อชักนำให้เป็นต้นอ่อนในสภาวะปลอดเชื้อ เป็นเวลา 3 เดือน คัดเลือกต้นอ่อนที่ได้นำมาตัดเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดให้ได้ขนาด 2-3 มิลลิเมตร แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารปรับสภาพเนื้อเยื่อ (preculture) ก่อนทำการทดลองด้วยการเติมน้ำตาลซูโครส 0.3 โมลาร์, 0.5 โมลาร์ และ 1 โมลาร์ เติมน้ำตาลซูโครส เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำเนื้อเยื่อปลายยอดเข้าสู่ขั้นตอนการสร้างเมล็ดเทียมด้วยการห่อหุ้มเนื้อเยื่อด้วยโซเดียมอัลจิเนต แล้วนำมาทดลองเก็บรักษาในสภาวะเยือกแข็งโดยวิธี encapsulation – vitrification ทำการเปรียบเทียบระยะเวลาในการแช่สาร cryoprotectant คือ PVS2 ที่เวลา 0, 20, 40, 60 และ 80 นาที เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการปรับสภาพปลายยอดก่อนทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เมื่อทำการทดลองเก็บรักษาปลายยอดในสภาวะเยือกแข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ปลายยอดที่ผ่านการปรับสภาพเนื้อเยื่อในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครส และทำการแช่ในสารละลาย PVS2 ที่ช่วงเวลาต่างๆ แต่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในสภาวะเยือกแข็งด้วยการแช่ในไนโตรเจนเหลว ปลายยอดที่แช่สารละลาย PVS2 ที่เวลา 20 และ 60 นาที มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด เท่ากันคือ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับทุกช่วงเวลาของการแช่สารละลาย PVS2 ปลายยอดที่ผ่านการปรับสภาพเนื้อเยื่อในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.3 โมลาร์ และทำการแช่ในสารละลาย PVS2 ที่ช่วงเวลาต่างๆ พบว่า ปลายยอดที่แช่สารละลาย PVS2 ที่เวลา 20 นาที มีอัตราการรอดมีชีวิตสูงสุด เท่ากับ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับปลายยอดที่แช่สารละลาย PVS2 ที่เวลา 40 นาที มีอัตราการรอดมีชีวิต เท่ากับ 26.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ปลายยอดที่แช่สารละลาย PVS2 ที่เวลา 0 60 และ 80 นาที มีอัตราการรอดชีวิต เท่ากับ 13.33 16.67 และ 13.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนปลายยอดที่ผ่านการปรับสภาพเนื้อเยื่อในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.5 โมลาร์ และทำการแช่ในสารละลาย PVS2 ที่ช่วงเวลาต่างๆ พบว่า ปลายยอดที่แช่สารละลาย PVS2 ที่เวลา 20 นาที มีอัตราการรอดมีชีวิตสูงสุด เท่ากับ 30.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปลายยอดที่แช่สารละลาย ที่เวลา 0 40 และ 60 นาที มีอัตราการรอดชีวิต เท่ากับ 16.67 23.33 และ 16.67 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) ส่วนปลายยอดที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ไม่มีการรอดชีวิตในทุกช่วงเวลาของการแช่สารละลาย PVS2 (ตารางที่ 4.3) คือเมื่อนำปลายยอดในเมล็ดเทียม ออกมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ปลายยอดเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวซีดลงจนเป็นสีขาวซีด และตายในที่สุด (ภาพที่ 4.9)

จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารที่ใช้ในการปรับสภาพเนื้อเยื่อก่อนทำการทดลอง ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.3 โมลาร์, 0.5 โมลาร์ และไม่เติมน้ำตาลซูโครส และช่วงเวลาที่เหมาะสมของการแช่สารละลาย PVS2 ในการปรับสภาพปลายยอดก่อนทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า ปลายยอดที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาด้วยการแช่ในไนโตรเจนเหลว ที่ปรับสภาพเนื้อเยื่อในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 0.3 โมลาร์ แช่สารละลาย PVS2 ที่เวลา 20 นาที มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด เท่ากับ 33.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา MS ที่เติมซูโครส 0.5 โมลาร์ แช่สารละลาย PVS2 ที่เวลา 20 นาที MS ที่เติมซูโครส 0.3 โมลาร์ แช่สารละลาย PVS2 ที่เวลา 40 นาที และ MS ที่เติมซูโครส 0.5 โมลาร์ แช่สารละลาย PVS2 ที่เวลา 40 นาที มีอัตราการรอดมีชีวิต 30.0 26.67 และ 23.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ(ตารางที่ 4.3) ลักษณะปลายยอดในเมล็ดเทียม มีการเจริญเติบโตเป็นยอดสีเขียว โผล่พ้นเมล็ดเทียมออกมา (ภาพที่ 4.8) จากผลการทดลองที่ได้จากการเก็บรักษาปลายยอดเนระพุสีไทยในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี encapsulation – vitrification นั้น ยังไม่ประสบความสำเร็จ เพราะปลายยอดที่ทำการทดลองเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวนั้นไม่สามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้หลังการเก็บรักษา



ตารางที่ 4.3 อัตราความมีชีวิตของเนื้อเยื่อปลายยอดมะพร้าวไทยที่ผ่านการ preculture ในอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ และแช่ในสารละลาย PVS2 ที่ช่วงเวลาต่างๆ เมื่อเก็บรักษาปลายยอดพืชในสภาพเยือกแข็งโดยวิธี encapsulation - vitrification

เวลาการแช่ PVS2 (นาทีก)	อัตราการรอดชีวิต (%)					
	Preculture บน MS + non		Preculture บน MS + sucrose		Preculture บน MS + sucrose	
	sucrose		0.3 M		0.5 M	
	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN	+LN
0	3.33a ^{1/}	0	13.33c	0	16.67ab	0
20	10.00a	0	33.33a	0	30.00a	0
40	6.67a	0	26.67ab	0	23.33ab	0
60	10.00a	0	16.67bc	0	16.67ab	0
80	6.67a	0	13.33c	0	13.33b	0
F-test	ns		*		ns	

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย

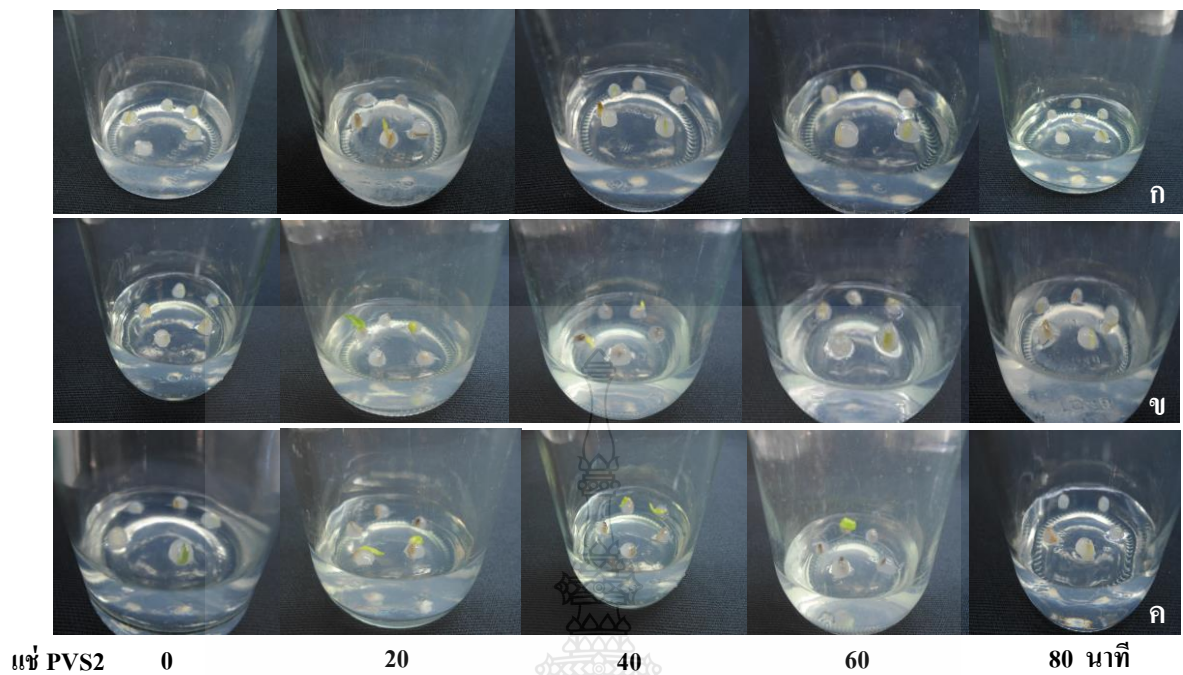
โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

* มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

-LN ปลายยอดที่ไม่เก็บในไนโตรเจนเหลว

+LN ปลายยอดที่เก็บในไนโตรเจนเหลว



ภาพที่ 4.8 เนื้อเยื่อปลายยอดเนระพูสีไทยที่ผ่านการ preculture บนอาหาร MS ที่เติมซูโครส 0, 0.3, และ 0.5 โมลาร์ ผ่านการแช่สารละลาย PVS2 ที่ช่วงเวลาต่างๆ และเพาะเลี้ยงบนอาหาร สูตร MS เป็นเวลา 1 เดือน

- ก) ปลายยอดเนระพูสีไทยที่ preculture บนอาหารสูตร MS
- ข) ปลายยอดเนระพูสีไทยที่ preculture บนอาหารสูตร MS + sucrose 0.3 M
- ค) ปลายยอดเนระพูสีไทยที่ preculture บนอาหารสูตร MS + sucrose 0.5 M



ภาพที่ 4.9 เนื้อเยื่อปลายยอดเนระพูสีไทยที่ผ่านการ preculture บนอาหาร MS ที่เติมซูโครส 0, 0.3, และ 0.5 โมลาร์ ผ่านการแช่สารละลาย PVS2 ที่ช่วงเวลาต่างๆ เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว 24 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 1 เดือน

- ก) ปลายยอดเนระพูสีไทยที่ preculture บนอาหารสูตร MS
- ข) ปลายยอดเนระพูสีไทยที่ preculture บนอาหารสูตร MS + sucrose 0.3 M
- ค) ปลายยอดเนระพูสีไทยที่ preculture บนอาหารสูตร MS + sucrose 0.5 M



บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1.1 การเก็บรักษาดัชนีระยะพสุไทยในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโต

จากการเก็บรักษาดัชนีระยะพสุไทยในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโตในอาหาร MS สูตรต่างๆ 9 สูตร เป็นเวลา 9 เดือน พบว่า อาหารสูตร 1/2 MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีความสูงของต้นน้อยที่สุด เท่ากับ 2.22 เซนติเมตร และมีจำนวนใบน้อยที่สุดเท่ากับ 3.9 ใบซึ่งจะเห็นได้ว่า สูตรอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสจะขัดขวางการเจริญของปลายยอดและต้นอ่อนได้ดีเนื่องจากซูโครสเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก สามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ดี และทำให้เซลล์รับสารอาหารได้มากขึ้นตลอดจนเป็นแหล่งคาร์บอนให้เซลล์ไปใช้สร้างผนังเซลล์หรือไปเปลี่ยนขนาดของเซลล์ทำให้ผนังเซลล์มีความยืดหยุ่นมากขึ้นป้องกันการดึงน้ำออกจากเซลล์และช่วยรักษาแรงดันออสโมติก ทำให้ต้นพืชแข็งแรงขึ้น สามารถทนต่อความเครียด (stress) ต่างๆ นอกจากนี้ยังเป็นสารอาหารให้พลังงาน ทำให้เซลล์สามารถนำพลังงานไปใช้ผลักดันกระบวนการเมตาโบลิซึมต่างๆ ในเซลล์ได้ เนื้อเยื่ออยู่ในสภาพที่ดี การลดปริมาณสารอาหารหรือการจำกัดอาหารร่วมกับการเติมน้ำตาลสามารถชะลอการเจริญเติบโตของพืชได้ทำให้พืชสามารถเก็บรักษาได้ในระยะปานกลาง และอาหารที่ใช้ในการชะลอการเจริญเติบโต อาจลดความเข้มข้นลงเหลือเพียงครึ่งหรือหนึ่งในสี่ก็สามารถทำให้พืชเจริญเติบโตช้าลงได้ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของพืช (รังสฤษฎ์, 2545) สอดคล้องกับการทดลองของ Bonnier and Van Tuyt (1997) ที่ศึกษาการเก็บเนื้อเยื่อของหัวลิเล่ในสภาพปลอดเชื้อภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 2 ระดับคือ -2 และ 25 องศาเซลเซียส ร่วมกับธาตุอาหารหลัก 2 ชนิดคือ MS และ 1/4 MS ที่มีน้ำตาล 6 และ 9 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เนื้อเยื่อของหัวลิเล่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/4 MS ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 9 เปอร์เซ็นต์ และเก็บรักษาไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดเมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 28 เดือน และมีอัตราการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อต่ำที่สุด เนื่องจากการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารต่ำกว่าปกติและเพิ่มความดันออสโมติกโดยการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาล ส่วนเนื้อเยื่อที่ เก็บรักษาไว้ที่ -2 องศาเซลเซียส เกิดอาการตายในระหว่างการเก็บรักษาเนื่องจากต้นเสื่อมโทรมในสภาวะอุณหภูมิต่ำและอาหารแข็งตัว ส่วนการทดลองของ สุจิตรา (2541) รายงานว่ากล้วย Abaca ที่นำมาเลี้ยงในอาหาร 1/2 MS สามารถยืดอายุการย้ายเนื้อเยื่อ 1 ปี และการเติมน้ำตาลซูโครสในอาหาร 1/2 MS ทำให้อัตราการรอดชีวิตของกล้วย Abaca สูงกว่าในสูตร 1/2 MS ที่ไม่เติมน้ำตาลโดยการเติมน้ำตาลซูโครส 15 และ 30 กรัมต่อลิตร มีผลของอัตราการรอดชีวิต 60 และ 75

เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานของ อร์ดี (2541) ซึ่งรวบรวมพันธุ์กล้วยโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเก็บในหลอดทดลองที่มีฝาปิดขนาด 2.5 x 10 เซนติเมตร บรรจุอาหาร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร ในห้องอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน สามารถอยู่รอดได้ 1 ปี โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหารและไม่ต้องใช้สารชะลอการเจริญเติบโต และการเก็บรักษาในขวดทดลองขนาดเล็กเป็นการจำกัดอากาศ โดยสัดส่วนของออกซิเจนมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตคือ อัตราการเจริญเติบโตของต้นพืชจะลดลงเมื่ออัตราส่วนของออกซิเจนต่ำกว่า 50 มิลลิเมตรของปรอท และพบว่าไม่มีผลต่อการเจริญและลักษณะของพืชหลังย้ายออกปลูกในธรรมชาติ (Dodds, 1991) โดย สนธิชัย (2548) ได้ศึกษาผลการลดการเจริญเติบโตของพืชวงศ์ขิง 3 ชนิด ได้แก่ ขิง ไพล และขมิ้นอ้อย พบว่า การใช้อาหารสูตร MS ร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 40 - 60 กรัมต่อลิตร หรือน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ mannitol 30 กรัมต่อลิตร หรือ อาหารสูตร ½ MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 40 - 50 กรัมต่อลิตร หรือน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ mannitol 30 - 40 กรัมต่อลิตร สามารถชะลอการเจริญเติบโตได้ โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเดิมได้นานอย่างน้อย 8 เดือน

5.1.2 การเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดพืชเนระพูสีไทยในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค encapsulation – vitrification

จากการทดลองเก็บรักษาปลายยอดเนระพูสีไทยในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค encapsulation – vitrification ด้วยการห่อหุ้มเนื้อเยื่อด้วย โซเดียมอัลจิเนต มีลักษณะเป็นเมล็ดเทียมพบว่าเนื้อเยื่อปลายยอดที่เก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง หลังจากนำออกจากการเก็บในไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS สภาพเนื้อเยื่อจะมีสีเขียวและเริ่มชีดลงจนเป็นสีขาวเมื่อเลี้ยงไปได้ 1 สัปดาห์ในทุกการทดลอง แสดงว่าเนื้อเยื่อปลายยอดดังกล่าว ไม่มีการรอดชีวิต และไม่มีการเจริญเติบโตพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ วิธี encapsulation – vitrification นั้นถึงแม้ว่าจะมีการห่อหุ้มเนื้อเยื่อปลายยอดด้วยโซเดียมอัลจิเนต ที่ช่วยป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อได้รับอันตรายเมื่อผ่านการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง เนื้อเยื่อก็ไม่สามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของเนื้อเยื่อ และความสามารถในการตัดเนื้อเยื่อให้ได้ขนาดที่เหมาะสม

จากผลการทดลองที่ยังไม่ประสบผลสำเร็จนั้น พบว่ามีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้องได้แก่ ธรรมชาติ และสรีระวิทยาของเนื้อเยื่อก่อนทำการเก็บ โดยอายุของเนื้อเยื่อที่อ่อนจะให้ผลดีกว่า อัตราการรอดของเซลล์ขึ้นอยู่กับความสมดุลระหว่างอัตราการลดลงของอุณหภูมิอย่างช้าๆ กับอัตราการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ (รังสฤษฎี, 2540)

ในขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ (preculture) ได้ทำการเตรียมเนื้อเยื่อปลายยอดมะพร้าวไทยบนอาหาร 3 สูตรได้แก่ อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.3 โมลาร์ 0.5 โมลาร์ และไม่เติมน้ำตาลซูโครส จากผลที่ได้ พบว่า ปลายยอดที่ไม่แช่ในไนโตรเจนเหลว ที่เตรียมเนื้อเยื่อ บนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.3 โมลาร์ แซ่สารละลาย PVS2 เป็นเวลา 20 นาที จะให้อัตราการรอดชีวิตของปลายยอดสูงกว่าสูตรอาหารที่ไม่มีการเติมน้ำตาลซูโครส หรือ เติมน้ำตาลมากเกินไป การเติมน้ำตาลซูโครสในอาหารเตรียมเนื้อเยื่อ มีผลทำให้ปริมาณน้ำในเซลล์ลดลงโดยหากความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมากขึ้น น้ำภายในเซลล์ก็จะยิ่งลดลง การเตรียมความพร้อมของเนื้อเยื่อก่อนทำการเก็บรักษา สามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดพืช และชิ้นส่วนที่เก็บรักษา เช่น เติมน้ำซูโครสความเข้มข้นสูงในอาหารเพาะเลี้ยง การลดความชื้นบางส่วน หรือการให้อากาศเย็น (cold pretreatment) โดยส่วนใหญ่นิยมใช้น้ำตาลซูโครส Engelmann *et al.* (1995) กล่าวว่า การ pretreatment ในอาหารเติมน้ำตาลซูโครส เป็นการเพิ่มการสร้าง และสะสมแป้งบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ และเพิ่มออสโมติคัมช่วยป้องกันความเสียหายในระหว่างการสูญเสียน้ำ และการแข็งตัวในไนโตรเจนเหลว ขนาดของเนื้อเยื่อก็มีผลเช่นกัน ในการตัดเนื้อเยื่อปลายยอดขนาดเล็กต้องมีความชำนาญเพื่อให้ได้เนื้อเยื่อที่มีขนาดที่เหมาะสม อาจต้องทำการตัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่ง Panis *et al.* (2005) รายงานขนาดฐานของเนื้อเยื่อส่วนยอดต่ออัตราการรอดชีวิต หลังการเก็บรักษาของกล้วยพันธุ์ Williams (AAA group) พบว่าขนาด 1 มิลลิเมตร ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 65.8 เปอร์เซ็นต์ ขนาดที่ใหญ่กว่านี้ให้อัตราการรอดชีวิตลดลงตามลำดับ ส่วนขนาดเล็กกว่านี้ไม่เหมาะสมเนื่องจากเสี่ยงต่อความเสียหายเนื่องจากการตัด

ในขั้นตอนการเก็บรักษาปลายยอดในสภาพเยือกแข็งด้วยเทคนิค encapsulation – vitrification โดยนำปลายยอดในเมสส์เทียม แซ่ในสารละลาย cryoprotectants คือ PVS2 ที่ช่วงเวลาต่างๆเพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนของการปรับสภาพปลายยอดก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า หลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว 24 ชั่วโมง ปลายยอดเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีขาวซีดหลังจากเพาะเลี้ยงไปได้ 1 สัปดาห์ แสดงว่า ปลายยอดไม่สามารถรอดชีวิตหลังการเก็บในไนโตรเจนเหลว ส่วนปลายยอดที่ไม่ได้ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว คือ ทดลองในสภาพปกติ ปลายยอดที่แช่สารละลาย PVS2 ที่เวลา 20 นาที ปลายยอดมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด เท่ากับ 33.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนช่วงเวลาแช่ 0 และ 80 นาที มีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุด เท่ากับ 3.3 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า สารละลาย PVS2 มี ผลต่อการรอดชีวิตของปลายยอดมะพร้าวไทย คือ เมื่อระยะเวลาการแช่ในสารละลาย PVS2 เพิ่มขึ้นเมสส์เทียมมีอัตราการรอดชีวิตลดลง ในขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ ถ้าใช้ชนิดของสาร cryoprotectant และความเข้มข้นที่เหมาะสมจะเป็นตัวช่วยป้องกันอันตรายจากการ

ตกผลึกของน้ำแข็ง ป้องกันความเสียหายที่จะเกิดกับเยื่อหุ้มเซลล์และต้องคำนึงถึงความสามารถในการซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อของสาร การป้องกันบาดแผลที่เกิดจากแรงดันออสโมติก้มมากเกินไป ตลอดจนความเป็นพิษของสารเคมี (Rall, 1987) สุจิตรา (2541) กล่าวว่า PVS2 ที่ซึมเข้าสู่เซลล์เนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยในปริมาณที่ไม่เหมาะสมอาจใช้เวลานานเกินไป จึงทำให้สารไม่สามารถปกป้องเซลล์ให้ทนทานต่อการเก็บในอุณหภูมิต่ำมากๆ ได้ หรืออาจใช้เวลานานเกินไป จนมีผลทำให้เกิดพิษต่อเนื้อเยื่อและตายก่อนที่จะเก็บในไนโตรเจนเหลว สารที่เป็นองค์ประกอบของสารละลาย PVS2 เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการปกป้องเนื้อเยื่อพืชจากอันตรายขณะแช่แข็ง โดยไปมีผลต่อแรงดันออสโมติกของเซลล์ โดยการดึงน้ำออกจากเซลล์ และอาจไปมีผลในการปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย นอกจากนี้ในสารละลาย PVS2 ยังมี สารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เป็นส่วนประกอบ ซึ่งหากใช้ ในความเข้มข้นที่สูงอาจมีผลไปรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมของ RNA และโปรตีน ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชได้ ซึ่งการเคลื่อนชิ้นส่วนพืชด้วยสาร โซเดียมอัลจินต ก่อนการได้รับสารละลายสามารถช่วยลดความเป็นพิษของสารละลายเหล่านี้ลงได้ Takagi *et al.* (1997) เปรียบเทียบขนาดของเผือกต่อการทนต่อสารประกอบ PVS2 โดยแช่เป็นระยะเวลา 10 - 60 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าปลายยอดขนาด 0.8 และ 2 มิลลิเมตร และตาข้าง 1 - 1.5 มิลลิเมตร มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่ใน PVS2 เป็นเวลา 20 นาที อย่างไรก็ตามหลังจากแช่นานกว่า 30 นาที ความมีชีวิตของชิ้นส่วนค่อยๆ ลดลงโดยขนาดชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 0.8 มิลลิเมตร ลดลงมากที่สุด และเมื่อแช่เป็นเวลา 60 นาที ความมีชีวิตเป็น 60, 65 เปอร์เซ็นต์ และ 80 เปอร์เซ็นต์ ในชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 0.8 มิลลิเมตร 2 มิลลิเมตร และตาข้าง ตามลำดับ นอกจากนี้ Yin and Hong (2009) ได้รายงานถึงการเก็บรักษาโพรโทคอร์มกล้วยไม้ *D. candidum* โดยการผลิตเป็นเมล็ดเทียมก่อนแช่ในสารละลาย PVS2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที เมล็ดเทียมมี อัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 76.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมล็ดเทียมที่แช่ในสารละลาย PVS2 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150 นาที โพรโทคอร์มมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 89.4 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังมีขั้นตอนของการนำเนื้อเยื่อออกสู่อุณหภูมิปกติที่เป็นปัจจัยแห่งความสำเร็จในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อในสภาพเยือกแข็ง อีกประการหนึ่ง

จากรายงานความสำเร็จในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชแต่ละชนิด พบว่า โดยทั่วไปปัจจัยที่ส่งเสริมความมีชีวิตรอดหลังผ่านกระบวนการเก็บในไนโตรเจนเหลว ประกอบด้วย ชิ้นส่วนที่นำมาใช้ เทคนิคหรือวิธีการในการเตรียมชิ้นส่วนเพื่อให้มีความทนต่ออุณหภูมิต่ำเมื่อมีการแช่ในไนโตรเจนเหลว ตลอดจนการละลายน้ำแข็ง และเพาะเลี้ยง ซึ่งแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด

การทดลองเก็บรักษาปลายยอดมะพร้าวไทยในสภาพเยือกแข็งดังที่กล่าวมาข้างต้นนั้น ไม่สามารถชักนำพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนปลายยอดหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลวได้ และไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าเกิดจากปัจจัยตัวใด ทั้งนี้เนื่องจากแต่ละปัจจัยหรือแต่ละขั้นตอนมีผลต่อเนื่องกัน และล้วนแต่มีผลต่อความสำเร็จในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว สำหรับการศึกษาต่อไปในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชมะพร้าวไทยโดยใช้ชิ้นส่วนปลายยอด โดยใช้เทคนิคบนพื้นฐานของ vitrification นั้น อาจจะศึกษาเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของสารหรือน้ำตาลเพิ่มเติม ตั้งแต่การ pretreatment องค์ประกอบของสาร cryoprotectants นอกจากนี้ต้องตรวจสอบความมีชีวิตและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ทุกขั้นตอน เพื่อให้ทราบถึงปัจจัยหรือขั้นตอนที่มีผลต่อการรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืชที่ทดลองเก็บรักษาด้วยวิธีนี้

5.2 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาหาวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชมะพร้าวไทยในสภาพปลอดเชื้อทำให้ทราบวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสมของพืชมะพร้าวไทย โดยสรุปได้ดังนี้

1. การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชมะพร้าวไทยในสภาพปลอดเชื้อโดยชะลอการเจริญเติบโต สูตรอาหารที่เหมาะสมและสามารถชะลอการเจริญเติบโตให้ช้าลงได้ดีที่สุดคือ อาหารสูตร ½ MS ที่เติม ซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ต้นพืชมีความสูงของต้น และมีจำนวนใบน้อยที่สุด เท่ากับ 2.22 เซนติเมตร และ 3.9 ใบ ตามลำดับ ต้นมีลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง เป็นปกติ

2. การเก็บรักษาปลายยอดพืชมะพร้าวไทยในสภาพเยือกแข็งโดยวิธี encapsulation – vitrification การปรับสภาพปลายยอดบนอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.3 โมลาร์ แสงสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 20 นาที ก่อนการเก็บในไนโตรเจนเหลว พืชมีอัตราความมีชีวิตสูงสุด เท่ากับ 33.33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำปลายยอดพืชจากการปรับสภาพมาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เนื้อเยื่อปลายยอดไม่สามารถพัฒนา และเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. การเก็บรักษาต้นอ่อนพืชมะพร้าวไทยในสภาพการชะลอการเจริญเติบโตโดยวิธีการลดความเข้มข้นของสารอาหาร (½ MS และ ¼ MS) และใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่างกัน ต้นมะพร้าวไทยสามารถเก็บรักษาได้ดีในสูตรอาหาร ½ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 90 กรัมต่อลิตร จากผลการศึกษานำไปพัฒนาต่อยอด เกี่ยวกับความสามารถของพืชในการ

เจริญเติบโตและการรอดชีวิตเมื่อย้ายต้นที่เก็บรักษาออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาต่อไป

2. การเก็บรักษาปลายยอดพืชเนระพูสีไทยในสภาพเยือกแข็งนั้น ต้องมีการศึกษาทดลองปรับเปลี่ยนเทคนิค ของขั้นตอนในการเก็บรักษา มีความระมัดระวังการปฏิบัติในทุกขั้นตอน เช่น ขั้นตอนการ preculture การศึกษาชนิดของสาร cryoprotectant และระยะเวลาในการแช่สาร cryoprotectant ในการทดลองเก็บรักษาต่อไป



บรรณานุกรม

- ก่องกานดา ชยามฤต. (2551). **ลักษณะประจำวงศ์พันธุ์ไม้ 3**. กรุงเทพฯ: สำนักงานหอพรรณไม้
สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช.
- กรรชิต ธรรมศิริ. (2547). **เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้**. กรุงเทพฯ: อัมรินทร์พรินต์ติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.
- ชลิต พงศ์สุกสมิทธิ. (2532). **เทคโนโลยีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. เชียงใหม่: ภาควิชาพืชสวน สถาบัน
เทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้.
- ธวัชชัย อินทุโส และรัชชัย อินทุโส. (2544). **ว่านยา-เสน่ห์หม่อมมงคล เล่ม 1**. กรุงเทพฯ: บริษัทพิมพ์
พรินต์ติ้งเซ็นเตอร์จำกัด.
- พีรเดช ทองอำไพ. (2537). **ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ : แนวทางการใช้ประโยชน์ใน
ประเทศไทย**. กรุงเทพฯ: วิชาการพิมพ์.
- ไพบุลย์ กวินเลิศวัฒนา. (2524). **หลักและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มยุรฉัตร เกื้อชู ศิริพรรณ ตันดาคม และธรรมศักดิ์ ทองเกตุ. (2553). ประสิทธิภาพในการกำจัด
หนอนใยผักของสารสกัดจากเหง้าค้ำคาวดำที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ. **วิทยาสาร
กำแพงแสน**, 8 (1) , 14-19.
- รมณีย์ เจริญทรัพย์, คาร์ตัน เทียนทอง และ ศาลักษณ์ พรรณศิริ. (2551). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้น
เนระพูสีไทย (*Tacca chantrieri* Andre.): พืชสมุนไพร. ใน **เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการ
ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46: สาขาพืช** (น. 425-430). กรุงเทพฯ:
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เรวัต เลิศฤทัยโยธิน. (2544). **การเก็บรักษาเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง**. [เอกสารประกอบการสอน].
นครปฐม: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.
- รังสฤษฎ์ กาวีตะ. (2545). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รังสิมา อัมพวัน, ทิพย์สุดา ปุกมณี และนพมณี โทบุญญานนท์. (2544). อิทธิพลของออกซินต่อการ
ขยายพันธุ์บุกเนื้อทราย (*Amorphophallus oncophyllus* Prain ex Hook. F.) ในสภาพปลอด
เชื้อ. ใน **การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 3** (น. 635). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ลัดดาวัลย์ มุสิกปาละ. (2552). เทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดฟางผสมพันธุ์สงขลา 3

(*Vetiveria zizanioides* Nash) ในไนโตรเจนเหลว. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิต,
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์).

วงศ์สถิตน์ นั้วกุล, พร้อมจิต สรลัมพ์, วิจิต เปานิด และรุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล. (2539). สมุนไพร
พื้นบ้านล้านนา. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล.

ศิริกุล เกศา, พัชรา ติมปะนะเวช, สุมิตรา คงชื่นสิน, ปิยรัชฎ์ ปริญาพงษ์, และ พรชัย จุฑามาศ. (2548).
การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์จำปีสิรินธร *Magnolia sirindhorniae* Noot.& Chalermglin ในหลอด
ทดลองโดยการเก็บรักษาในภาวะชะลอการเจริญและการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว.
(วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย).

สนธิชัย จันท์เปรม. (2548). การเก็บรักษาพืชวงศ์จิงบางชนิดโดยการลดการเจริญเติบโตในสภาพ
ปลอดเชื้อ. ใน รายงานการประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 2 ทรัพยากรไทย: สรรพสิ่งล้วน
พันเกี่ยว (น. 384 - 389). นครราชสีมา: ศูนย์อนุรักษ์พันธุกรรมพืชคลองไผ่.

สมปอง เตชะโต และลัดดาวัลย์ มุสิกปาละ. (2549). การผลิตเมล็ดเห็ดฟางผสมพันธุ์เพื่อปลูกอนุรักษ์ดิน
และน้ำ ภาคใต้. ใน รายงานการวิจัย ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ.
สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมยศ มีสุข. (2541). การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กล้วยไม้ไทยพันธุ์แท้บางชนิดโดยเทคนิคเมล็ดเห็ด.
(วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่).

แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ. (2547). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. เชียงใหม่: คณะวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุจิตรา โพธิ์ปาน. (2541). การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กล้วย Abaca (*Musa textiles* Nee.) ในสภาพ
ปลอดเชื้อ. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์).

สุทธิราภรณ์ สิริสิงห์, สุนันทา ศรีสุข และ พุฒนา รุ่งระวี. (2537). โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ
IRRISTAT version 3/93. กรุงเทพฯ: กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์ทางสถิติ งานวิจัยเกษตร
กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร.

อารีย์ วรรณวุฒิก. (2541). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. นครราชสีมา: สำนักวิชา
เทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยสุรนารี.

อรดี สหวัชรินทร์. (2541). การอนุรักษ์และขยายพันธุ์กล้วยที่มีความสำคัญต่อวัฒนธรรม
และประเพณีไทย. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- Bajaj, Y.S. (1995). **Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity.** *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry. (ed. Y. P. S., Bajaj) Vol. 32, pp. 3-28. New York : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bunnier, F.J.M. & Van Tuyl, J.M. (1997). **Long term in vitro storage of lily: Effects of nutrients and sucrose.** *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 49: 81-87.
- Chang, C.W., Chen, H.M. & Lee, M.T. (1999). **2,3,5-triphenyltetrazolium reduction in the viability assay of *Ulva fasciata* (Chlorophyta) in response to salinity stress.** *Botanical Bulletin of Academic Sinica.* 40: 207-212.
- Debergh, P.C., Harbaoui, V. & Lemeur, R. (1981). **Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*) : Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential.** *Physiol. Plant.* 53: 181-187.
- Debergh, P.C. (1983). **Effect of agar brand and concentration on the tissue culture medium.** *Physiol. Plant.* 59: 270-276.
- De Bruyn, M.H. & Ferreira, D.I. (1992). **In Vitro corm production of gladiolus *delenii* and *G. tristis*.** *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 31: 123-128.
- Dodds, J. H. (1991). ***In vitro* Methods for conservation of plant genetic resources.** Chapman and Hall Publishers, London. 247.
- Dussert, S., Chabrillange, N., Anthony, F., Engelmann, F., Recalt, C. & Hamon, S. (1997). **Variability in storage response within a coffee core collection under slow growth condition.** *Plant Cell Rep.* 16: 344-348.
- Engelmann, F., (1991). **In vitro conservation of tropical plant germplasm -review.** *Euphytica* 57: 227-243.
- Engelmann, F., Assy-Bah, B., bagniol, S., Dumet, D. & Michaux-Ferriere, N. (1995). **Cryopreservation of date palm, oil palm and coconut.** *In* Biotechnology in agriculture and forestry. (ed. Y. P. and S. Bajaj) Vol. 32, pp. 236-244. Verlag Berlin Heidelberg: Springer.

- Engelmann, F. (2000). **Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources.** In Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. (eds. F. Engelmann and H. Takagi) pp. 8-20. Rome, Italy : IPGRI.
- Hakkaart, F. A. & Versluijs, J. M. (1983). **Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures.** Neth. J. Plant Pathol. 89: 7-53.
- Hirai, D., Shirai, K., Shirai, S. & Sakai, A. (1998). **Cryopreservation of in vitro-grown meristems of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification.** Euphytica 101: 109-115.
- Hirai, D. & Sakai, A. (1999). **Cryopreservation of in vitro-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification.** Potato Research 42: 153-160.
- Hirano, T., Godo, T., Mii, M. & Ishikawa, K. (2005). **Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification.** Plant Cell Rep. 23: 534-539.
- Ishikawa, K., Harata, K., Mii, M., Sakai, A., Yoshimatsu, K. & Shimomura, K. (1997). **Cryopreservation of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification.** Plant Cell Reports 16: 754-757.
- Mandal, J., Pattnaik, S. & Chand, P. K. (2000). **Alginate encapsulation of axillary buds of *Ocimum americanum* L. (hoary basil), *O. basilicum* L. (sweet basil), *O. sanctum* (sacred basil).** In vitro Cellular and Developmental Biology Plant 36: 287-292.
- Martinez, D., Tames, S.R. & Revilla, A.M. (1999). **Cryopreservation of in vitro-growth shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using capsulation/dehydration.** Plant Cell Reports 19: 59-63.
- Maruyama, E., Kinoshita, I., Ishii, K., Ohba, K. & Saito, A. (1997). **Germplasm conservation of the tropical forest trees, *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart., and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don. by shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12 - 25°C.** Plant Cell Rep. 16: 393 - 396.
- Masumoto, T., Sakai, A., Takahashi, C. & Yamada, K. (1995). **Cryopreservation of In vitro grown apical meristem of wasabi (*Wasabi japonica*) by encapsulation- vitrification method.** Cryo-Letters 16: 189 - 196.

- Moges, A.M., Shibli, R.A. & Karam, N.S. (2004). **Cryopreservation of african violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) shoot tips**. In *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 389 - 395.
- Morris, L., Davis, D. & Hutchings, C. (1981). **Cognitive and emotional components of anxiety: literature review and revised worry-emotionality scale**. *Journal of educational psychology* 75, 541–555.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture**. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Panis, B., Piette, B. & Swennen, R. (2005). **Droplet vitrification of apical meristem: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae***. *Plant Science* 168 : 45-55.
- Phunchindawan, M., Hirata, K., Sakai, A. & Miyamoto, K. (1997). **Cryopreservation of encapsulated shoot primordial induced in horseradish (*Armoracia rusticana*) hairy root cultures**. *Plant Cell Reports* 16: 469-473.
- Rai, M. K., Jaiswal, V. S. & Jaiswal, U. (2008). **Encapsulation of shoot tips of guava (*Psidium guajava* L.) for short-term storage and germplasm exchange**. *Scientia Horticulturae* 118: 33-38.
- Rall, W. F. (1987). **Factor affecting the survival of mouse embryo cryopreserved by vitrification**. *Cryobiology*. 24: 367-402.
- Redenbaugh, K., Nichol, J. W., Kossler, M. E. & Paasch, B. D. (1984). **Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production**. In *Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 20: 256 - 257.
- Redenbaugh, K., Fujii, J.A., Slade, D. & Kossler, M. (1987). **Artificial seeds-encapsulated somatic embryos**. In: *Biotechnology in agriculture and forestry* 17 (High Tech and Micropropagation I), Bajaj, Y.P.S. (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, 395-416.
- Sakai, A., Kobayashi, S. & Oiyama, I. (1990). **Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification**. *Plant Cell Reports* 9 : 30-33.
- Saiprasad, G.V. & Polisetty, R. (2003). **Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies**. *In vitro Cell Dev. Biol. (Plant)* 39: 42-48.

- Singh, A. K., Sharma, M., Varshney, R., Agarwal, S. S. & Bansal, K. C. (2006). **Plant regeneration from alginate-encapsulated shoot tips of *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn, a medicinally important plant species.** *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant* 42: 109-113.
- Srivastava, V., Khan, S. A. & Banerjee, S. (2009). **An evaluation of genetic fidelity of encapsulated microshoots of the medicinal plant: *Cineraria maritime* following six months of storage.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 193-198.
- Standardi, A. & Piccioni, E. (1998). **Recent perspective on synthetic seed technology using nonembryogenic *in vitro*-derived explants.** *International Journal of Plant Sciences* 59: 968 - 978.
- Takagi, H., Tien-Thinh, N., Islam, O.M., Senboku, T. & Sakai, A. (1997). **Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of taro [*Colocasia esculenta* L. Schott] by vitrification.1.** Investigation by basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Rep.* 16, 594 - 599.
- Takagi, H. (2000). **Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species.** In *Cryopreservation of Tropical Germplasm. Current Research Progress and Application.* (ed. Engelmann, F. and Takagi, H.). Rome : JIRCAS.
- Tanaka, D., Niino, T., Isuzugawa, K. & Hikage, T. (2004). **Cryopreservation of shoot apices of in-vitro grown gentian plants: Comparison of Vitrification and Encapsulation-vitrification Protocols.** *Cryoletters* 25(3): 167-176.
- Thammasiri, K. & Soamkul, L. (2007). **Cryopreservation of *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. seeds by vitrification.** *Sci. Asia* 33: 223–227.
- Tsukazaki, H., Mii, M., Tokuhara, K. & Ishikawa, K. (2000). **Cryopreservation of *Doritaenops* suspension culture by vitrification.** *Plant Cell Reports* 19: 1160-1164.
- Vendrame, W. A., Carvalho V. S. & Dias, J. M. M. (2007). **In vitro germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds.** *Scientia Hort.* 114: 188–193.

- Verleysen, H., Samyn, G., Van Bockstaele, E. & Debergh, P. (2004). **Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 11-21.
- Vicient, C. M. & Martinez, F. X. (1998). **The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology.** Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 10: 1-12.
- Vujanovic, V., St-Arnaud, M., Barabe, D. & Thibeault, G. (2000). **Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination.** Annals of Botany 86: 79-86.
- Wang, Q., Batuman, O., Li, P., Bar-Joseph, M. & Gafny, R. (2002). **A simple and efficient cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of 'Troyer' Citrange [*Poncirus trifoliata* L. Raf. × *Citrus sinensis* L. Osbeck.] by encapsulation-vitrification.** Euphytica 128 (1): 135-142.
- WHO medicines bookshelf 1.0. (1990). **Medicinal plants in Viet Nam.** (ระบบออนไลน์). แหล่งที่มา <http://www.nzdl.org/gsdldmod?e=q-00000-00---off-0whoedm--00-0---0-10-0---0---0direct-10---4-----stt--0-11--11-en-50---20-about-Tacca+chantrieri+Andr%C3%A9--00-0-1-00-0--4---0-0-11-10-0utfZz-8-00&a=d&c=whoedm&srp=0&srn=0&cl=search&d=HASH16e13d8f98944d7e8576f3.3.184> (9 มิถุนายน 2558)
- Withers, L.A. (1989). **In Vitro conservation and germplasm utilisation.** In : Brown A.D.H., D.R. Marshall, O.H. Frankel and J.T. Williams. (eds) The use of plant genetic resources. cambridge university press/IBPGR. cambridge. 309-334.
- Yin, M., and Hong, S. (2009). **Cryopreservation of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. protocorm-like bodies by encapsulation-vitrification.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 98(2), 179-185.
- Ziv, M., Meir, G. & Halevy, A. H. (1982). **Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets *in vitro*.** Plant Cell Tissue and Organ Culture 2: 55-65.

ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)

ธาตุอาหาร	ปริมาณ (มิลลิกรัม/ลิตร)
Macronutrients	
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00
KH_2PO_4	170.00
Micronutrients	
KI	0.83
H_3BO_3	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22.30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.60
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Fe-EDTA Solution	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.80
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	37.20
Organic compounds	
Glycine	2.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine-HCl	0.50
Thiamine-HCl	0.10
Myo-inositol	100.00
Others	
Sugar	30,000
Phytigel	2,500
PH	5.6

ตารางผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสูงต้นเนระพูสีไทย ที่เก็บรักษาโดยการชะลอการเจริญเติบโตบนอาหาร MS สูตรต่างๆ 9 สูตร เป็นเวลา 3, 6 และ 9 เดือน

SOV	df	Mean Square		
		เดือน 3	เดือน 6	เดือน 9
Treatments	8	4.71 **	8.52 **	10.03 **
Error	81	0.36	0.5	0.54
Total	89			

** แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนใบต้นเนระพูสีไทย ที่เก็บรักษาโดยการชะลอการเจริญเติบโตบนอาหาร MS สูตรต่างๆ 9 สูตร เป็นเวลา 3, 6 และ 9 เดือน

SOV	df	Mean Square		
		เดือน 3	เดือน 6	เดือน 9
Treatments	8	0.064 **	0.012 **	0.015 **
Error	81	0.003	0.0005	0.0006
Total	89			

** แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนอัตราความมีชีวิตของเนื้อเยื่อปลายยอดมะพร้าวไทยที่ผ่านการ preculture ในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ และแช่ในสารละลาย PVS2 ที่ช่วงเวลาต่างๆ เมื่อเก็บรักษาปลายยอดพืชในสภาพเยือกแข็งโดยวิธี encapsulation-vitrification

SOV	df	Mean Square		
		MS + non sucrose	MS + sucrose 0.3 M	MS + sucrose 0.5 M
Treatments	4	0.0014ns	0.046 *	0.026ns
Error	10	0.051	0.008	0.01
Total	14			

ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

* แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ภาคผนวก ข
ผลงานที่ตีพิมพ์เผยแพร่



การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพูสีไทยในสภาพปลอดเชื้อ โดยการชะลอการเจริญเติบโต

In vitro conservation of bat flower (*Tacca chantrieri* Andre) through minimal growth

วรินทร์พร จิรวรรณสกุล¹ และ ปิยะวดี เจริญวัฒน์^{1*}

Varinporn Jewruttanasakul¹ and Piyavadee Charoenwattana^{1*}

บทคัดย่อ: การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพูสีไทยในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโต เพาะเมล็ดบนอาหารสูตร MS (Murashige และ Skoog) ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และนำต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้ออายุ 3 เดือน มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS จำนวน 9 สูตร ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักและซูโครส 3 ระดับ คือ MS, ½ MS และ ¼ MS และ 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นำไปเพาะเลี้ยงในห้องภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ และ ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า อาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร เป็นสูตรที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาเนระพูสีไทยสามารถชะลอการเจริญเติบโตของพืชได้ดีที่สุด โดยมีความสูงของต้นและจำนวนใบน้อยที่สุด เท่ากับ 2.22 เซนติเมตร และ 3.3 ใบตามลำดับ

คำสำคัญ: การเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อ, เนระพูสีไทย, การชะลอการเจริญเติบโต, ความเข้มข้นของซูโครส

ABSTRACT: A study of an appropriate medium for *in vitro* conservation of bat flowers (*Tacca chantrieri* Andre) germplasm through minimal growth were carried out. The seeds were cultured on MS (Murashige and Skoog) medium containing 30 g/l sucrose. Once the cultures were established, the 3 months-old plantlets from these cultures were used for the experiment. The plantlets were cultured on 9 media with 3 different MS strengths (MS, ½ MS, ¼ MS) and sucrose concentrations (30, 60 and 90 g/l). The plantlets were transferred to a culture room and maintained at a temperature range of 25-27°C with a light intensity of 2,000 luxs for 16 hour photoperiods over 6 months. To conserve the germplasm of bat flowers, it was found that the minimal growth of plantlets was best achieved on ½MS medium containing 90 g/l sucrose. The plantlets cultured on this medium had the lowest height and number of leaves of 2.22 cm and 3.3 leaves, respectively.

Keywords: *in vitro* conservation, *Tacca chantrieri* Andre, minimal growth, sucrose concentration

บทนำ

ต้นเนระพูสีไทย หรือ ค้างคาวดำ (*Tacca chantrieri* Andre.) เป็นพืชล้มลุกที่มีเหง้าอยู่ใต้ดิน เกิดและกระจายพันธุ์ในเขตร้อนสำหรับในประเทศไทยพบได้

ทั่วไปในป่าดงดิบชื้น ที่ความสูงจากระดับน้ำทะเล 500-1,000 เมตร โดยพบมากทางภาคใต้ของประเทศไทย ต้นเนระพูสีไทยเป็นพืชสมุนไพรที่สามารถนำมาทำเป็นยาสมุนไพรได้ทุกส่วน นอกจากจะมีสรรพคุณทางยาแล้ว สารสกัดจากพืชชนิดนี้ยังสามารถยับยั้งการ

¹ สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

Division of Crop Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi

* Corresponding author: piyavadee55@gmail.com

ทำลายของหนอนกระพุ่มได้ (ไตรรัตน์, 2552) นอกจากนี้จากลักษณะดอกที่มีรูปร่างและสีที่สวยงามแปลกตา จึงมักถูกนำมาใช้เป็นไม้ประดับ พืชในสกุลนี้ที่พบขึ้นอยู่ในป่าเมืองไทย มี 5 ชนิด คือ เนระพู่สีไทย วานพ้องพอน เท้ายายม่อม บุกฤาษี และ หนวดเสือ (เครือข่ายวิจัยนิเวศวิทยาป่าไม้ประเทศไทย, 2555) ในปัจจุบันต้นเนระพู่สีไทยมีจำนวนน้อยลง และค่อนข้างหายาก เนื่องจากมีการลักลอบนำออกมาจากป่าเพื่อการจำหน่ายโดยขาดการอนุรักษ์ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ต้นเนระพู่สีไทยมีจำนวนลดลงอย่างมากในธรรมชาติ และมีโอกาสสูญพันธุ์ได้ในอนาคต ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องให้ความสำคัญต่อการเก็บรักษาและการอนุรักษ์พันธุ์พืชอย่างจริงจังไม่ว่าจะเป็นการอนุรักษ์ในสภาพแปลงปลูก หรือการเก็บรักษาในรูปเมล็ดพันธุ์ เพื่อไม่ให้เกิดการสูญพันธุ์ในธรรมชาติ ปัญหาที่พบในการเก็บรักษาและอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืช คือ การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ การถูกทำลายจากโรค แมลง และการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศเมื่ออนุรักษ์ไว้ในสภาพธรรมชาติหรือแปลงปลูก จึงทำให้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทสำคัญในการอนุรักษ์พันธุ์พืชต้นเนระพู่สีไทย

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชโดยลดการเจริญเติบโต (minimal growth preservation) เป็นการเก็บรักษาในระยะเวลานานหรือปานกลาง (2 เดือน - 2 ปี) ซึ่งสามารถช่วยขยายช่วงเวลาในการย้ายเลี้ยงออกไปเนื้อเยื่อบางชนิดและในบางกรณีมีอัตราการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ แม้จะได้รับสภาพหรือปัจจัยต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงอย่างเต็มที่ ดังเช่น งานวิจัยของ Bonnier and Van Tuyl (1997) ได้ศึกษาการเก็บเนื้อเยื่อของหัวลิลลี่ในสภาพปลอดเชื้อภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 2 ระดับ คือ -2 และ 25 องศาเซลเซียส ร่วมกับอาหาร 2 ชนิด คือ $\frac{1}{4}$ MS และ MS ที่เติมน้ำตาล 2 ระดับ คือ 6 และ 9% พบว่าเนื้อเยื่อของลิลลี่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมน้ำตาล 9% และเก็บรักษาไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดเมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 28 เดือน อย่างไรก็ตามเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงส่วนใหญ่ต้องการปัจจัย

พิเศษทั้งด้านอาหารและปัจจัยสภาพแวดล้อมเพื่อให้มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าลง (รังสฤษดิ์, 2540) และการเก็บรักษาภายใต้สภาวะการเจริญเติบโตต่ำจึงมีบทบาทสำคัญเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเก็บรักษาพันธุกรรมพืช (Withers, 1989) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพู่สีไทยในหลอดทดลอง ในสภาพชะลอการเจริญเติบโต

วิธีการทดลอง

การเตรียมพืชทดลอง

นำเมล็ดพันธุ์เนระพู่สีไทยได้จากสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร มาทำการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อโดย คัดเลือกเมล็ดที่มีลักษณะแก่ สมบูรณ์และนำมาฟอกฆ่าเชื้อโดย แช่แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 % เป็นเวลา 1 นาที ก่อนที่จะฆ่าเชื้อผิวเมล็ดด้วยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10 % ที่เติมทวิน 20 1-2 หยด (รมณี และคณะ, 2551) แล้วเชยเป็นเวลา 10 -15 นาที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ นำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพาะบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige และ Skoog, 1962) ที่เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 8 กรัมต่อลิตร และมีความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.6 นำขวดเพาะเลี้ยงเมล็ดวางบนชั้นในห้องเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ และ ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เพื่อชักนำให้เจริญเป็นต้นอ่อนเป็นเวลา 3 เดือน จะได้ต้นที่มีใบจำนวน 2 ใบ และมีรากสมบูรณ์ เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

การทดสอบต้นพืชบนสูตรอาหารต่างๆ ในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดขนาด 1.5-2.0 เซนติเมตร และมีอายุประมาณ 3 เดือน มาเลี้ยงบนอาหาร 9 สูตร คือ MS, $\frac{1}{2}$ MS และ $\frac{1}{4}$ MS ซึ่งเติมน้ำตาลความเข้มข้น 30 60 และ 90 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทดลองเลี้ยงในขวด ขนาด 2 ออนซ์ ที่มีปริมาณอาหาร 10 มิลลิกรัม และนำไปเพาะเลี้ยงในห้องภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส โดยใช้สูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นอาหารสูตรควบคุม

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วยอาหาร 9 สูตร จำนวน 10 ข้ำ โดยเพาะเลี้ยงจำนวน 1 ต้นต่อขวด

ทำการทดลองที่ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ในช่วงระหว่างเดือน เมษายน 2555 ถึงเดือน มีนาคม 2557

การบันทึกผลและการวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกความสูงของต้น จำนวนใบ และลักษณะของต้นเนระพุสไทย ที่ใช้ในการทดสอบทุกเดือน เป็นเวลา 6 เดือน วิเคราะห์ข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กรรมพืชเนระพุสไทย ด้วยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ โดยการชะลอการเจริญเติบโตของพืช ในอาหาร MS สูตรต่างๆ 9 สูตร เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า ต้นพืชมีการรอดชีวิตทั้งหมดในอาหารทุกสูตรโดยมีความสูงต้นที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ต้นพืชที่เลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีความสูงของต้นน้อยที่สุด เท่ากับ 2.22 เซนติเมตร และไม่มีการเปลี่ยนแปลงของความสูงในช่วงเดือนที่ 4-6 รองลงมา คือ อาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร, 1/4 MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และ 1/4 MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร เท่ากับ 2.24, 2.27 และ 2.36 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนต้นที่เลี้ยงในอาหาร สูตร 1/2 MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีความสูงของต้นมาก

ที่สุด เท่ากับ 4.64 เซนติเมตร และไม่มี ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจากสูตรควบคุม (Table 1) ลักษณะต้นที่ได้เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือนพบว่า ต้นพืชที่เลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ต้นมีลักษณะแข็งแรง และ ปกติ ใบเขียว และมีรากแข็งแรง (Figure 1F) ต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตร 1/4 MS ที่เติมซูโครส 60 และ 90 กรัมต่อลิตร ก้านใบเปลี่ยนเป็นสีดำ ใบเริ่มมีอาการเหลือง อาหารมีลักษณะเหลว (Figure 1H, 1I) ส่วนต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ต้นจะมีการเจริญเติบโตสูงจนชนฝาขวด อาหารมีลักษณะเหลว (Figure 1D) จากการนับจำนวนใบจากต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยง พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยในอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ต้นพืชมีจำนวนใบน้อยที่สุด เท่ากับ 3.3 ใบ ส่วนต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบมากที่สุด เท่ากับ 7.1 ใบ (Table 2) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Bonnier and Van Tuyl (1997) ที่ศึกษาผลของความเข้มข้น ของธาตุอาหารหลักที่ลดลงร่วมกับปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นที่มีต่อการเจริญเติบโตของลิลลี่ พบว่าต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักเป็น 1/2-1/4 เท่า ร่วมกับการเพิ่มปริมาณน้ำตาลตั้งแต่ 60-90 กรัมต่อลิตร มีความสูงของต้นและจำนวนใบน้อยกว่าต้นที่เก็บรักษาในอาหาร MS สูตรมาตรฐาน ที่มีปริมาณน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักต่ำกว่าปกติร่วมกับการเพิ่มความดันออสโมติก และจากการเพิ่มปริมาณน้ำตาลทำให้พืชสามารถนำธาตุอาหารที่จำเป็นไปใช้ สำหรับการเจริญเติบโตได้น้อยลง จากผลการทดลองนี้ พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมและส่งผลต่อการชะลอการเจริญเติบโตของต้นเนระพุสไทย คือ อาหารสูตร 1/2 MS ที่เติม ซูโครส 90 กรัมต่อลิตร เนื่องจาก เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน ต้นที่ได้มีความสูงน้อยที่สุดแต่ต้นมีลักษณะปกติ และแข็งแรง

Table 1 Effect of different strengths of MS medium and sucrose concentrations on plant height of bat flowers after cultured for 6 months.

medium	Plant height (cm)					
	1 month	2 months	3 months	4 months	5 months	6 months
1. MS + sucrose 30 g/l	2.91±0.16 ^{1/} cd ^{2/}	3.45±0.17cd	3.69±0.21d	4.03±0.2d	4.08±0.20de	4.22±0.24de
2. MS + sucrose 60 g/l	2.41±0.18bc	2.50±0.20ab	2.70±0.17bc	2.76±0.18ab	2.82±0.19ab	2.89±0.21ab
3. MS + sucrose 90 g/l	1.98±0.15ab	2.05±0.11a	2.15±0.11ab	2.18±0.11a	2.23±0.11a	2.24±0.11a
4. ½ MS + sucrose 30 g/l	3.26±0.17d	3.71±0.17d	3.77±0.17d	3.98±0.22d	4.40±0.2e	4.64±0.22e
5. ½ MS + sucrose 60 g/l	2.61±0.19c	2.97±0.28bc	3.11±0.30c	3.26±0.33c	3.40±0.34bc	3.42±0.35bc
6. ½ MS + sucrose 90 g/l	1.81±0.10a	2.03±0.12a	2.17±0.14ab	2.22±0.12a	2.22±0.12a	2.22±0.12a
7. ¼ MS + sucrose 30 g/l	2.76±0.21c	3.17±0.24cd	3.25±0.23cd	3.40±0.22c	3.56±0.29cd	3.64±0.3cd
8. ¼ MS + sucrose 60 g/l	1.86±0.15a	2.03±0.13a	2.05±0.14a	2.25±0.14a	2.35±0.19a	2.36±0.19a
9. ¼ MS + sucrose 90 g/l	2.01±0.17ab	2.12±0.16a	2.21±0.15ab	2.26±0.15a	2.26±0.15a	2.27±0.15a
F-test	**	**	**	**	**	**

^{1/} Values are the mean number (±SEM) of plant height in ten replicates

^{2/} Means followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$ by DMRT

** significant different at $P \leq 0.01$

Table 2 Effect of different strengths of MS medium and sucrose concentrations on leaf number of bat flowers after cultured for 6 months.

medium	number of leaves					
	1 month	2 months	3 months	4 months	5 months	6 months
1. MS + sucrose 30 g/l	3.1±0.1 ^{1/} cd ^{2/}	3.4±0.22d	4.4±0.22e	4.9±0.31d	5.2±0.29d	5.9±0.31d
2. MS + sucrose 60 g/l	2.9±0.1bcd	2.9±0.1bc	3.2±0.13bc	3.6±0.16b	4.1±0.1c	4.2±0.13b
3. MS + sucrose 90 g/l	2.7±0.15bc	2.7±0.15b	3.1±0.18ab	3.4±0.22b	3.4±0.22ab	3.7±0.21ab
4. ½ MS + sucrose 30 g/l	4.0±0.21e	4.6±0.22e	5.6±0.27f	6.2±0.25e	6.4±0.27e	7.1±0.28e
5. ½ MS + sucrose 60 g/l	3.2±0.13d	3.3±0.15cd	4.0±0.15e	4.2±0.25c	4.8±0.25d	5.1±0.23c
6. ½ MS + sucrose 90 g/l	2.2±0.13a	2.2±0.13a	2.7±0.15a	2.7±0.15a	3.0±0.21a	3.3±0.26a
7. ¼ MS + sucrose 30 g/l	2.2±0.13a	2.9±0.1bc	3.8±0.13d	4.5±0.17cd	4.8±0.13d	5.2±0.2cd
8. ¼ MS + sucrose 60 g/l	2.6±0.16b	2.7±0.15b	3.6±0.16cd	4.7±0.15cd	4.9±0.18d	5.2±0.2cd
9. ¼ MS + sucrose 90 g/l	2.1±0.1a	2.6±0.16ab	2.8±0.13ab	3.2±0.13ab	3.7±0.26bc	3.8±0.25ab
F-test	**	**	**	**	**	**

^{1/} Values are the mean number (±SEM) of number of leaves in ten replicates

^{2/} Means followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$ by DMRT

** significant different at $P \leq 0.01$

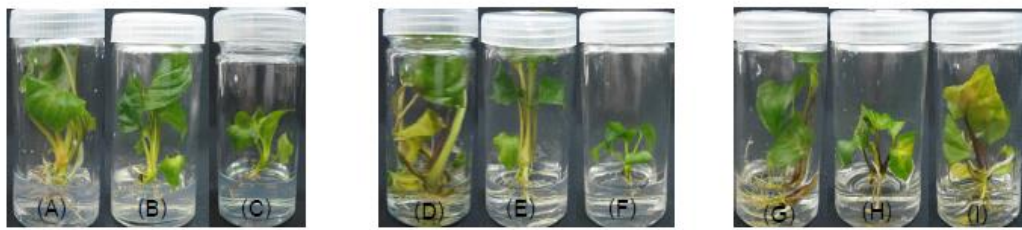


Figure 1. Plant regeneration from cultured plantlets of *Tacca chantrieri* Andre. on MS media plus 30, 60, 90 g/l sucrose (A-C), $\frac{1}{2}$ MS media plus 30, 60, 90 g/l sucrose (D-F), and $\frac{1}{4}$ MS media plus 30, 60, 90 g/l sucrose (G-I) for 6 months.

สรุป

จากการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในระพู่ไทยในสภาพปลอดเชื้อโดยชะลอการเจริญเติบโตโดยทดลองเลี้ยงในอาหาร MS สูตรต่างๆ 9 สูตร เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมและสามารถชะลอการเจริญเติบโตให้ช้าลงได้ดีที่สุดคืออาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม ซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ต้นพืชมีความสูงของต้น และมีจำนวนใบน้อยที่สุด เท่ากับ 2.22 เซนติเมตร และ 3.3 ใบ ตามลำดับ โดยพืชรอดชีวิตทุกต้น และต้นมีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง เป็นปกติ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณปาริฉัตร สังข์สะอาด นักวิชาการเกษตรชำนาญการ ที่ช่วยเหลือและให้คำปรึกษาตลอดการทำวิจัยในทุกขั้นตอน รวมทั้งในด้านข้อมูล อุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณนักวิชาการทุกท่านของกลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุพืชและจุลินทรีย์ที่ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือเรื่องข้อมูลของงานวิจัย และขอขอบคุณ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพกรมวิชาการเกษตร คลอง 6 จังหวัดปทุมธานี ที่ให้อาคารและสถานที่ที่ใช้ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- เครือข่ายวิจัยนิเวศวิทยาป่าไม้ประเทศไทย. 2555. รายชื่อพรรณไม้ (ป่า) ในประเทศไทย. แหล่งข้อมูล: http://t-fern.forest.ku.ac.th/Forest/?action=family&action2=family_detail&fam=TACCACEAE.html. ค้นเมื่อ 17 พฤษภาคม 2557.
- ไตรรัตน์ หนูเอียด. 2552. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากคางคกดำและพาหมีที่มีต่อหนอนใยผัก *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) และเพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch (Homoptera: Aphididae). วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- รมณีย์ เจริญทรัพย์. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นระพู่ไทย (*Tacca chantrieri* Andre.): พืชสมุนไพร. น. 425-430. ใน: ประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46: สาขาพืช. 29 ม.ค. - 1 ก.พ. 2551. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- รังสฤษดิ์ กาวีตะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Bonnier, F.J.M. and J.M. Van Tuyl. 1997. Long term *in vitro* storage of lily: Effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 49: 81-87.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3): 473-497.
- Withers, L.A. 1989. *In Vitro* Conservation and Germplasm Utilisation. p. 309-334. In: Brown A.D.H., D.R. Marshall, O.H. Frankel and J.T. Williams. (eds.). *The Use of Plant Genetic Resources*. Cambridge University Press/IBPGR. Cambridge.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาววรินทร์พร จีวรรตณสกุล
วัน เดือน ปีเกิด	10 ตุลาคม 2527
ที่อยู่	29 หมู่ 8 ตำบลบางแรม อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000
การศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ปี พ.ศ. 2550
ประสบการณ์ทำงาน	ผู้ช่วยนักวิจัยในห้องปฏิบัติการ ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ คลอง 6 อำเภอชัยบุรี จังหวัดปทุมธานี กรมวิชาการเกษตร พ.ศ. 2550 ถึง ปัจจุบัน
ผลงานทางวิชาการ	นำเสนอผลงานทางวิชาการ ในหัวข้อ การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชตระกูลถั่วในประเทศไทย ในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโต ในการประชุมวิชาการ พืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 13 “นวัตกรรมพืชสวนเพื่อชีวิตที่ยืนยาวอย่างมีความสุข” ณ โรงแรมเซ็นทาราแออนด์คอนเวนชั่นเซ็นเตอร์ จังหวัดขอนแก่น 29-31 กรกฎาคม 2557
เบอร์โทรศัพท์	086-8061198
อีเมล	oil_bio27@hotmail.com