รายงานโครงการวิจัย

เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

Technology on Plant Genetic Resources Conservation in DOA Genebank.

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย
นางกัญญาภรณ์ พิพิธแสงจันทร์
Ms. Kunyaporn Pipithsangchan

ปี พ.ศ. 2559-2561

รายงานโครงการวิจัย

เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

Technology on Plant Genetic Resources Conservation in DOA Genebank.

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย
นางกัญญาภรณ์ พิพิธแสงจันทร์
Ms. Kunyaporn Pipithsangchan

ปี พ.ศ. 2559-2561

คำปรารภ

โครงการวิจัยเทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชกรมวิชาการเกษตร เป็นงานวิจัยที่เน้นด้านการอนุรักษ์เมล็ดพันธุ์พืชที่สามารถลดความชื้นภายในเมล็ดพันธุ์ได้ เช่น เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ เดือย ชมจันทร์ และดาวอินคา โดยยังคงความงอกและมีชีวิต (Orthodox seed) และนำเอาเทคโนโลยีวิทยาการด้านเมล็ดพันธุ์มาใช้ประโยชน์ในการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดโดยวิธีเร่งอายุด้วยน้ำเกลือ (SSAA Test), เร่งอายุ (AA Test) และวิธี Controlled Deterioration (CD Test) เก็บรักษาในห้องเก็บอนุรักษ์ระยะปานกลางและระยะยาว ศึกษาเทคนิคการเก็บรักษา และกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง โดยอาศัยพื้นฐานด้านเทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์ เพื่อการอนุรักษ์ภายใต้ระบบการจัดเก็บเมล็ดพันธุ์ปัจจุบันของธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพกรมวิชาการเกษตร นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในระยะยาว โดยใช้วิธีการอนุรักษ์เมล็ดพันธุ์ในสภาพเยือกแข็ง (Cryopreservation) สำหรับการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชที่ไม่สามารถอนุรักษ์โดยใช้เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์ได้ จึงนำมาศึกษาการอนุรักษ์โดยใช้เนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อ วิธีการเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโต (slow growth) เช่น มันเทศ ดองดึง กลอย เจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว ซึ่งเป็นการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในระยะปานกลาง หรือการอนุรักษ์ในสภาพเยือกแข็ง (Cryopreservation) ซึ่งเป็นการเก็บรักษาในระยะยาว เช่น การอนุรักษ์พันธุกรรมอ้อย และเผือก

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	5
ผู้วิจัย	6
บทนำ	8
บทคัดย่อ	9
กิจกรรมที่ 1 เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช	
การทดลองที่ 1 : ศึกษาวิธีการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ เพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช	12
การทดลองที่ 2 : เทคนิคการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช	43
การทดลองที่ 3 : เทคนิคการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์ชมจันทร์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช	57
กิจกรรมที่ 2 เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ	
การทดลองที่ 1 : การอนุรักษ์พันธุกรรมอ้อยในสภาพเยือกแข็งโดยใช้ปลายยอด	71
การทดลองที่ 2 : การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวโดยวิธีชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ	81
การทดลองที่ 3 : การอนุรักษ์ดองดึงโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ	93
การทดลองที่ 4 : เทคนิคการเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโตของมันเทศ (*Ipomoea batatas*) เพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช	104
การทดลองที่ 5 : การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrification เพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช	109
การทดลองที่ 6 : การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชสกุลกลอยในรูปหัวจิ๋วในสภาพปลอดเชื้อ	119
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	123
เอกสารอ้างอิง	127
ภาคผนวก	136

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ขอขอบคุณหัวหน้าการทดลอง ผู้ร่วมวิจัย คณะทำงาน และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของกลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และหน่วยงานภายนอกทุกหน่วยงาน ที่มีส่วนช่วยในสนับสนุนการดำเนินงานโครงการวิจัยฯ นี้ให้เป็นผลสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดียิ่ง

หัวหน้าโครงการวิจัย

ผู้วิจัย

กิจกรรมที่ 1 เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

ชื่อการทดลองที่ 1 : ศึกษาวิธีการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ เพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

นางกัญญาภรณ์	พิพิธแสงจันทร์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	หัวหน้าการทดลอง
ดร .ปิยรัษฎ์	เจริญทรัพย์	โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สวนจิตรลดา	
ผศ. ฉันทนา	วิชรัตน์	มหาวิทยาลัยแม่โจ้	
นางสาวอัสนี	ส่งเสริม	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	

ชื่อการทดลองที่ 2 เทคนิคการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

นางสาวเสาวณี	เดชะคำภู	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	หัวหน้าการทดลอง
นางอัญชลี	แก้วดวง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	
นางสาวชลลดา	สามพันพวง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	

ชื่อการทดลองที่ 3 เทคนิคการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์ชมจันทร์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

นางอัญชลี	แก้วดวง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวเสาวณี	เดชะคำภู	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	
นางรัชนก	ทองเวียง	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี	

กิจกรรมที่ 2 เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ

ชื่อการทดลองที่ 1 การอนุรักษ์พันธุกรรมอ้อยในสภาพเยือกแข็งโดยใช้ปลายยอด

นางสาวปาริฉัตร	สังข์สะอาด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวสุกัลยา	ศิริฟองนุกูล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	
นางรัชนก	ทองเวียง	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี	
นายวรกิจ	ห้องแซง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	
นายกษิดิศ	ดิษฐบรรจง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	

ชื่อการทดลองที่ 2 การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวโดยวิธีชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

นางสาวสุกัลยา	ศิริฟองนุกูล	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	หัวหน้าการทดลอง
นางรัชนก	ทองเวียง	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี	
นายวรกิจ	ห้องแซง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	

ชื่อการทดลองที่ 3 การอนุรักษ์ดองดึงโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

นางสาวสุพินญา	บุญมานพ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวปาริฉัตร	สังข์สะอาด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	
นางสาวภัทรียา	สุทธิเชื้อนาค	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	

ชื่อการทดลองที่ 4 เทคนิคการเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโตของมันเทศ (*Ipomoea batatas*) เพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

นางสาวปาริฉัตร	สังข์สะอาด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวสุพินญา	บุญมานพ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	
นายพิทยา	วงษ์ช้าง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	
นางสาวพัฒน์นรี	รักษ์คิด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	
นางสาวภัทรียา	สุทธิเชื้อนาค	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	

ชื่อการทดลองที่ 5 การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrificationเพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

นางสาวพัฒน์นรี	รักษ์คิด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวปาริฉัตร	สังข์สะอาด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	
นางสาวพัชร	ปิริยะวินิตร	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	
นายทวีป	หลวงแก้ว	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร	

ชื่อการทดลองที่ 6 การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชสกุลกลอยในรูปหัวจิ๋วในสภาพปลอดเชื้อ

นางสาวภัทรียา	สุทธิเชื้อนาค	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	หัวหน้าการทดลอง
นางสาวสุพินญา	บุญมานพ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	

บทนำ

โครงการวิจัยเทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชกรมวิชาการเกษตร เป็นงานวิจัยที่เน้นด้านการอนุรักษ์เมล็ดพันธุ์พืชที่สามารถลดความชื้นภายในเมล็ดพันธุ์ได้ เช่น เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ เดือย ชมจันทร์ และดาวอินคา โดยยังคงความงอกและมีชีวิต (Orthodox seed) และนำเอาเทคโนโลยีวิทยาการด้านเมล็ดพันธุ์มาใช้ประโยชน์ในการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดโดยวิธีเร่งอายุด้วยน้ำเกลือ (SSAA Test), เร่งอายุ (AA Test) และวิธี Controlled Deterioration (CD Test) เก็บรักษาในห้องเก็บอนุรักษ์ระยะปานกลางและระยะยาว ศึกษาเทคนิคการเก็บรักษา และกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง โดยอาศัยพื้นฐานด้านเทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์ เพื่อการอนุรักษ์ภายใต้ระบบการจัดเก็บเมล็ดพันธุ์ปัจจุบันของธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในระยะยาว โดยใช้วิธีการอนุรักษ์เมล็ดพันธุ์ในสภาพเยือกแข็ง (Cryopreservation) สำหรับการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชที่ไม่สามารถอนุรักษ์โดยใช้เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์ได้ จึงนำมาศึกษาการอนุรักษ์โดยใช้เนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อ วิธีการเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโต (slow growth) เช่น มันเทศ ดองดึง กลอย เจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวซึ่งเป็นการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในระยะปานกลาง หรือการอนุรักษ์ในสภาพเยือกแข็ง (Cryopreservation) ซึ่งเป็นการเก็บรักษาในระยะยาว เช่น การอนุรักษ์พันธุกรรมอ้อย และเผือก โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. เพื่อศึกษาวิธีการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับตัวชี้วัดอายุการเก็บรักษาเพื่อการจัดการในการอนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

2. เพื่อศึกษาผลของความชื้นในเมล็ดพันธุ์ที่มีต่ออายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์เดือย เมล็ดชมจันทร์ และดาวอินคาภายใต้อุณหภูมิในการเก็บรักษาต่างๆ สำหรับอนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

3. เพื่อศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาปลายยอดอ้อยในสภาพเยือกแข็งและอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมเผือกของไทยในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrification ที่เหมาะสมสำหรับการอนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

4. เพื่อศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อได้อย่างน้อย 6 เดือนหรือมากกว่า ต่อการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงหนึ่งครั้ง และศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาที่เหมาะสมสำหรับเชื้อพันธุ์มันเทศและดองดึงในสภาพชะลอการเจริญเติบโต (slow growth) เพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช และหาเทคนิคในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชสกุลกลอยในรูปหัวจิ๋ว (microtuber) ในสภาพปลอดเชื้อ

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยเทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชกรมวิชาการเกษตรอยู่ในแผนงานวิจัยการอนุรักษ์ความหลากหลายของทรัพยากรพันธุกรรมพืช แบ่งเป็น 2 กิจกรรม **กิจกรรมที่ 1 เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช** และ **กิจกรรมที่ 2 เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ** โดยกิจกรรมแรกเป็นการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชในลักษณะเมล็ดเชื้อพันธุ์ ได้แก่ **การทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ เพื่อการอนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช** ผลการทดลองเป็นดังนี้ 1.ที่อุณหภูมิ 5°C และ -10°C ของการเก็บรักษามีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดผักและความแข็งแรงมากกว่าเก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิ 25°C 2.สำหรับวิธี Control แสดงผลมีเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงสูงสุดตามด้วยวิธี SSAAT, AAT และ CD ตามลำดับ 3.เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมไม่สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เก็บได้เพียง 21 เดือน 4.สำหรับเมล็ดพันธุ์ผักทั้ง 5 ชนิด สามารถเก็บรักษาได้ดีกว่าในอุณหภูมิ -10°C และ 5°C สามารถเก็บรักษาได้นานกว่า 33 เดือน ส่วนการเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ผักทั้ง 5 ชนิดในสภาพ -196°Cพบว่าเมล็ดพันธุ์ผักทั้ง 5 ชนิดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาทดสอบการรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวมีอัตราการรอดชีวิตเป็น 100% ทุกการทดลอง สำหรับ**การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เดือย** พบว่าระดับความชื้นในเมล็ดก่อนการเก็บรักษาและอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่อการมีชีวิตและความแข็งแรงของเมล็ดเดือย ที่ความชื้น 8 และ 6% สามารถเก็บรักษาได้นาน 27 เดือน เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 5°C, -10°C และสภาพเยือกแข็ง นอกจากการเก็บที่ 5°C สามารถลดความชื้นในเมล็ดเดือยให้เหลือ 12% หรือต่ำกว่าได้โดยยังคงเก็บรักษาได้ภายในเวลา 27 เดือน สำหรับเทคนิคการเก็บรักษา**เมล็ดเชื้อพันธุ์ชมจันทร์**ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชพบว่าความชื้นเมล็ดระยะเวลาการเก็บรักษามีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกทุกอุณหภูมิที่เก็บรักษา, การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เมล็ดที่ระดับความชื้น 6,8 และ 10 เก็บรักษาได้นาน 18 เดือน มีความงอด 77, 82 และ 60% ตามลำดับขณะที่เมล็ดไม่ได้ลดความชื้นเก็บได้นานเพียง 9 เดือน และเมื่อลดอุณหภูมิลง -196°Cเมล็ดชมจันทร์มีความงอก 83, 75, 75 และ 67% ตามลำดับ **สำหรับกิจกรรมที่ 2 การอนุรักษ์พันธุกรรมอ้อยในสภาพเยือกแข็ง**โดยใช้ปลายยอดพบว่าการทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยในสภาพเยือกแข็งโดยเทคนิค Vitrificationปลายยอดอ้อยทุกพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่าเทคนิค Encapsulation-Vitrificationและ Encapsulation-dehydration เมื่อไม่ได้แช่ในไนโตรเจนเหลว แต่เมื่อแช่ในไนโตรเจนเหลวยังไม่พบอัตราการรอดชีวิตในทุกเทคนิค สำหรับ**การอนุรักษ์เจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาว**โดยใช้วิธีชะลอการเจริญเติบโตนั้น พบว่าอาหารสูตร MS และ half-MS สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีและง่ายต่อการย้ายออกปลูกในธรรมชาติได้ง่าย เมื่อทดลองสูตรอาหารเพื่อชะลอการเจริญเติบโต พบว่าอาหารสูตรที่สามารถอนุรักษ์พืชนี้เป็นเวลาอย่างน้อย 7-10 เดือน ได้แก่ อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล sucrose 2-3% ร่วมกับการเติม Manitol 0-1% สำหรับ**การทดลองอนุรักษ์ดองดึง**โดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าการขยายปริมาณเหง้าของดองดึงในสภาพปลอดเชื้อสามารถทำได้โดยใช้ชิ้นส่วนของยอดดองดึงในอาหาร MS + NAA 4mg/L + BA 4 mg/L และการเก็บรักษาเหง้าดองดึงในสภาพปลอดเชื้อเก็บได้นานถึง 9 เดือน สำหรับมันเทศ พบว่า**เทคนิคการเก็บรักษามันเทศ**ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยวิธี Slow growth สามารถเก็บรักษาในอาหารสูตร ½MS ที่เก็บน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร สูตรอาหาร MS ที่เติม ABA 2-6 มก./ลิตร และสูตรอาหาร MS ที่เติม ancymidol 10µmolได้นาน 9 เดือนขึ้นไป ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม Manitol1 % สามารถเก็บรักษาได้นาน 6 เดือน

สำหรับ**การอนุรักษ์เผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrification** พบว่าสาร cryprotectantที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาปลายยอดเผือก คือสาร PVS3 และระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่คือ 30 นาที ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตของเผือกไข่ เผือกอ้อย เผือกหอมดอยมูเซอ และเผือกหอมพะเยา คือ 49.5, 64.1, 52.7 และ 59.5% ตามลำดับ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS 4 สัปดาห์

Abstract

The project of Technology of Plant Genetic Resources Conservation in DOA Genebank was comprised of **activity1.** Technology for Plant Genetic Conservation in DOA Genebank (seeds) and **activity2.** Technology for plant genetic conservation (*in vitro* condition).

The study "Seed vigour test of Lettuce, Chinese Cabbage, Flowering White Cabbage, Chinese Kale and Pak choi for DOA Genebank Conservation were conducted at DOA genebank. It was concluded that 1.At 5°C and -10°C, it was shown that the germination percentage of all vegetable seeds had more vigour than 25°C 2.The control method was shown in highest germination and seed vigour by SSAAT, AAT and CD, respectively 3.The lettuce seeds could not preserved at 25°C for 21 months. 4. All vegetable seeds could be better preserved in -10°C and 5°C condition for 33 months than 25°C. For part of RSPG project has collaborated with DOA Genebank, It was found that the seeds which were not plunged into liquid nitrogen (LN) had 100% viability in every experiment. Therefore, The conservation of these seed in LN by encapsulation dehydration is the optional for the conservation of these vegetable seeds. For conservation of *Coix lachryma-jobi L.* seed, studied on seed moisture content and storage temperature. We found that the optimum moisture contents 5(%) for all storage temperature were 8 or 6 because the seeds still remained the same viability and vigor after 27 months. In addition, the temperature storage at 5°C could reduce the moisture level in the seeds to 12°C on lower because the Coix seed could remain the viability and vigor for 27 months.

Study of **Ipomoea alba** for conservation in DOA genebank. The results showed that seed moisture and period of seed storage affected to the percent of seed germination in all temperature. The room temperature with 6, 8 and 10 percent of seed moisture (storage for 18 months) showed% germination 77, 82 and 60%, respectively, while non-reduced seed moisture could be storage about 9 months. At -196°C, the seed germination were 83, 75, 75 and 67%, respectively.

Acctivily2 in vitro condition are as followed, the shoot tips of sugarcane were used for cryopreservation technique. We found that the vitrification technique showed the higher percentage of the survival rate than Encapsulation-vitrification and Encapsulation-dehydration techniques in all. In contrast, the survival rate was not found after cryopreservation. For In vitro Conservation of Chettamuun Phloeng Khaw and Chettamuun

Phloeug Daeng were conducted. It was found that MS and half MS medium could be easily induced root and easily to more to greenhouse. For slow growth experiment, MS 2-3% sucrose and 0-1% manitol was able to conserve this plant 7-10 months in vitro condition For Sweet potato by slow growth technique. Four genotypes were used (PJ265-1, PJ0106-6, PJ65-3 and PJ284-17) with 4 experiments are induce the concentrations of MS salts and sucrose (1/2MS, 1/4 MS and 30, 60, 90 g/L), the osmoticum control by manitol concentrations 0, 1, 2, 3 and 4 %), using of growth regulator (ABA 0, 2, 4, 6, 8 and 10 mg/L) and using of growth retardants (ancymidol 0, 5, 10, 15 and 20 µ). The survival (%) was evaluated every three months, the four genotypes of sweet potato was obtained over nine months by using 1/2MS medium plus 30 mg/L of sucrose, MS medium plus ABA 2-6 mg/L and MS medium plus ancymidol 10 µ. By the way MS medium plus manitol 1% could be stored for six months.

For taro with vitrification: The results indicated that after 16 weeks cultured, the highest shoot number of ‘Phueak Khai’ (10.25 shoots per explant) and ‘Phueak Aoi’ (9.19 shoots per explant) on MS medium supplemented with 5 mg/l BA and 2 mg/l NAA, whereas, ‘Pheuak Hom Doi Moo Ser’ and ‘Pheuak Hom Phayao’ showed the highest shoot number on MS medium contained 5 mg/l BA and 1 mg/l NAA at 10.04 and 9.57 shoots per explant, respectively. The taro shoots were investigated for cryopreservation using vitrification method. Shoot tips were dehydrated at 25^{0}c by PVS3 solution for 30 minutes as suitable techniques for cryopreservation of shoot tips of taro. After 4 weeks, ‘Pheuak Kai’, ‘Pheuak Aoi’, ‘Pheuak Doi Moo Ser’ and ‘Pheuak Hom Phayao’ were cultured on MS medium showed the high recovery rate as 49.5, 64.1, 52.7 และ 59.5%, respectively.

กิจกรรมที่ 1 เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช
การทดลองที่ 1 : ศึกษาวิธีการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาด ฮ่องเต้ เพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

: Lettuce, Chinese Cabbage, Flowering White Cabbage, Chinese Kale and Pak Choi for Seed Vigour test for DOA Genebank Conservation

ชื่อผู้วิจัย

หัวหน้าการทดลอง	**:**	นางกัญญาภรณ์ พิพิธแสงจันทร์
ผู้ร่วมงาน	:	1. ดร.ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงศ์ เจริญทรัพย์
	:	2. ผศ. ฉันทนา วิชรัตน์
	:	3. นางสาวอัสนี ส่งเสริม

คำสำคัญ (Key words)

ความแข็งแรง เมล็ดผักกาดหอม เมล็ดผักกาดขาวปลี เมล็ดผักกาดเขียวกวางตุ้ง เมล็ดผักคะน้า เมล็ดผักกาดฮ่องเต้ ธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

Vigour, *Lactuca sativa*, chinese cabbage, flowering white cabbage, Chinese kale, Green Park tsai, Genebank

1. บทคัดย่อ

การศึกษาวิธีการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า ผักกาดฮ่องเต้ ที่อนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชกรมวิชาการเกษตร มีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับตัวชี้วัดอายุการเก็บรักษาเพื่อการจัดการอนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร โดยวางแผนการทดลองแบบ split plot designจำนวน 4 ซ้ำโดย main plot เป็นวิธีการทดสอบความแข็งแรง ได้แก่ 1.วิธีเร่งอายุ (Accelerated Aging Test, AAT) 2.วิธีเร่งอายุด้วยสารละลายอิ่มตัว (Saturated Salt Accelerated Aging Test; SSAAT) 3.วิธี Controlled Deterioration Test (CD Test) 4.วิธีทดสอบความงอกปกติ เป็นตัวควบคุมและ Sub plot เป็นจำนวนระยะเวลาในการเก็บรักษาจากแรกเริ่มจนถึงอายุ 33 เดือน (12 ครั้ง) ในแต่ละ 3 สภาพอุณหภูมิการเก็บรักษา ได้แก่ สภาพอุณหภูมิที่ 5°C, -10°C และ 25°C โดยดำเนินการทดสอบความชื้นก่อนเก็บ ทดสอบความงอก ความแข็งแรงทั้ง 4 วิธี ทุก 3 เดือนในทุกอุณหภูมิ ตั้งแต่ ธ.ค. 2558 – ส.ค. 2561 เป็นระยะเวลา 3 ปีที่เก็บรักษา ผลเป็นดังนี้

วิธีการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ เพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช พบว่าในผักทั้ง 5 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงเมื่อทดสอบด้วยวิธีต่างๆ ทั้ง 4 วิธี พบว่ามีความแตกต่างกัน สำหรับการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ ในสภาพอุณหภูมิต่างๆ กันของห้องเก็บรักษาที่มีอยู่ ได้แก่อุณหภูมิ 5°C , -10°Cและ 25°C พบว่า ใน**ผักกาดหอม** ที่อุณหภูมิ 5°C เปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงยังดีมากในทุกวิธีการทดสอบ สำหรับอุณหภูมิ -10°C พบว่ามีวิธี control มีความแข็งแรงสูงสุด คือ 19.13 ถึงแม้เก็บเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมรักษาไว้นานถึง 33 เดือน ในขณะที่วิธีอื่นๆ มีค่า AAT, SSAAT และ CD มีค่าความแข็งแรงเป็น 13.52, 15.12 และ 13.71 ตามลำดับ สำหรับอุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 21 เดือน พบว่าเริ่มไม่งอก แม้วิธีเพาะแบบธรรมดา (Control) และเมื่อเก็บรักษา

นานถึง 24 เดือนพบว่าไม่มีความงอกเลย **ผักกาดขาวปลี** พบว่าที่อุณหภูมิ 25°C ความแข็งแรงของเมล็ดผักกาดขาวปลีลดลงมากกว่าอุณหภูมิ 5, -10°Cและมีความสอดคล้องกับผักอื่นๆ สำหรับผักกาดขาวปลี พบว่า ที่อุณหภูมิ 25°C เมื่อเก็บรักษานาน 33 เดือน ความงอกเมื่อทดสอบด้วยวิธี AAT SSAAT CD และ Control ลดลงเป็น 13, 51, 5 และ33% ตามลำดับ สำหรับ**ผักกาดเขียวกวางตุ้ง** มีความงอกเมื่อเก็บรักษานาน 33 เดือน ยังคงดีมากที่อุณหภูมิ 25°C เป็น 79, 74, 30 และ 79% ตามลำดับ และ**ผักคะน้า** มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเป็น 33, 38, 0 และ 17% ตามลำดับ สำหรับ**ผักกาดฮ่องเต้**มีเปอร์เซ็นต์ความงอกสุดท้ายของอุณหภูมิ 25°C เป็น 23, 62, 1 และ 13% ตามลำดับ โดยสรุป

1. ที่อุณหภูมิ 5°C และ -10°C ของการเก็บรักษามีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดผักและความแข็งแรงมากกว่าเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25°C

2. สำหรับวิธี Control แสดงผลมีเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงสูงสุดตามด้วยวิธี SSAAT, AAT และ CD ตามลำดับ

3. เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ไม่สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เก็บได้เพียง 21 เดือน

4. สำหรับเมล็ดพันธุ์ผักทั้ง 5 ชนิด สามารถเก็บรักษาได้ดีกว่าในอุณหภูมิ -10°C และ 5°C สามารถเก็บรักษาได้นานกว่า 33 เดือน

สำหรับการทดลองวิธีการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ ในสภาพปลอดเชื้อ (-196°C)

สำหรับการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง (-196°C) โดยวิธี Encapsulation – dehydration ทดลองที่ห้องปฏิบัติการโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พระราชวัง สวนจิตรลดา ซึ่งมีงานวิจัยร่วมกับธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร สำหรับผลการทดลองพบว่าเมล็ดพันธุ์ผัก ทั้ง 5 ชนิดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาทดสอบการรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวมีอัตราการรอดชีวิตเป็น 100% ทุกการทดลอง โดยที่เมล็ดพันธุ์ผักสามารถงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์บนอาหาร MS เป็นเวลา 14 วัน แสดงว่าระยะเวลาในการแช่สาร loading solution ที่เวลา 10 และ 20 นาที และระยะเวลาในการใช้ silica gel เป็นเวลา 14 และ 21 ชั่วโมง ไม่ทำให้เมล็ดพันธุ์ผักทั้ง 5 ชนิดได้รับความเสียหาย พบว่ามีค่าความงอกของ**ผักกาดหอม ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้** มีความงอกถึง 100% ใน **ผักกาดขาวปลี** และ**ผักกาดเขียวกวางตุ้ง** มีความงอก 60 - 90.9% และ และ 25 – 91.60 % ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเมล็ดผักสามารถรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวและสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าปกติได้การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ผักในสภาพเยือกแข็งเป็นทางเลือกหนึ่งในการเก็บรักษาพันธุ์ผัก ซึ่งอาจช่วยลดต้นทุนในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์โดยไม่ต้องนำเมล็ดเพื่อออกปลูกขยายพันธุ์

Abstract

The study “Seed vigour test of Lettuce, Chinese Cabbage, Flowering White Cabbage, Chinese Kale and Pak choi for DOA Genebank Conservation were conducted at DOA Genebank, Genebank Research and Development group, Biotechnology Research and Development Office. Department of Agriculture, Thailand. The objective of this research was to find out the appropriate seed vigor test and preservative time for managing in DOA genebank. The experiment was conducted by split plot design in 4 replications which

main plot was four methods of seed vigour test 1) Accelerated Aging Test, AAT 2) Saturated Salt Accelerated Aging Test, SSAAT 3) Controlled Deterioration Test (CD Test) 4) control. The sub plot was the time for seed conservation (12 times) since December 2015 up to August 2018. It was three years experiment. There are 3 types of storage rooms (5°C, -10°C and 25°C) at DOA genebank. The germination test, the moisture content test and the seed vigor test were collected before experiments and also collected in every 3 months for 5°C, -10°C and 25°C. The result of the experiment was as followed.

Seed vigour test of lettuce, chinese cabbage, flowering white cabbage, chinese kale and pak choi in DOA genebank Conservation were done. It was found that there were different in germination percentage and seed vigour in all seed vigour test in all condition of storage rooms. In lettuce seeds, we found that at 5°C the germination and seed vigour remain in good results in all test. For -10°C, the control had shown highest in seed vigour, 19.13 for 33 months. The seed vigour of AAT, SSAAT and CD method were 13.52, 15.12 and 13.71, respectively. For lettuce seeds at 25°C which were preserved for 21 month appearing no germinate even control. There is no germination for the seeds were preserved for 24 months.

For **Chinese cabbage** seeds at 25°C, germination test and seed vigour test of the seeds were shown decreasing rapidly more than 5, -10°C and the same result as the other seeds. At 25°C, 33 month preservation for AAT, SSAAT, CD and Control were 13, 51, 5 and 33%, respectively. For **flowering white cabbages** at 25°C were preserved for 33 months, the germination were 79, 74, 30 and 79%, respectively.

Chinese Kale seeds were 33, 38, 0 and 17% respectively and **Pak choi** seeds which preserved for 33 months at 25°C condition were 23, 62, 1 and 13%, respectively.

It was concluded that

1. At 5°C and -10°C, it was shown that the germination percentage of all vegetable seeds had more vigour than 25°C.

2. The control method was shown in highest germination and seed vigour by SSAAT, AAT and CD, respectively.

3. The lettuce seeds could not preserved at 25°C for 21 months.

4. All vegetable seeds could be better preserved in -10°C and 5°C condition for 33 months than 25°C.

For part of plant genetic conservation project under the Royal Initiation of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG) has collaborated with DOA genebank (Genebank Research and Development Group, Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, to study Encapsulation-dehydration for cryopreservation technique of lettuce, Chinese cabbage, flowering white cabbage, chinese kale and pak choi seeds.

It was found that the seeds which were not plunged into liquid nitrogen (LN) had 100% viability in every experiment. It appeared that seeds could germinate to be normal seedlings on MS medium after 14 d. The duration time for loading solution (0.8M sucrose + 1M glycerol) was 10 and 20 min and the duration time for silica gel was 14 and 21 h. did not damage the seeds. Cryopreserved seeds showed normal seedling go on MS medium at 14 d. It was found that lettuce, Chinese kale and pak choi had 100% survival. For Chinese cabbage and flowering white cabbage, they had 60-90.9% and 25-91.60% survival, respectively and were able to grow in the field conditions. Therefore, the conservation of these seeds in LN by encapsulation dehydration is the optional for the conservation of these vegetable seeds.

บทนำ

ผักกาดหอม (*Lactuca sativa*) อยู่ใน Genus Lactuca เป็นพืชในวงศ์ Asteraceae ลำต้นเตี้ย มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชียและยุโรป ประเทศจีนปลูกผักกาดหอมมาตั้งแต่คริสต์ศตวรรษที่ 5 ผักกาดหอมมีชื่อเรียกอื่นๆว่า ผักสลัด ผักกาดยี พังฉ้าย เป็นต้น ผักกาดหอมมักใช้เป็นส่วนประกอบของสลัด แซนวิช แฮมเบอร์เกอร์ หรือรับประทานเป็นผักสด แกล้มกับอาหารรสจัดจำพวกยำหรือลาบ สาคูไส้หมู สายพันธุ์ของผักกาดหอมแบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ผักกาดหอมที่ห่อหัวคล้ายกระหล่ำปลี (Head Lettuce) ผักกาดหอมชนิดธรรมดาไม่ห่อ (Leaf Lettuce) และผักกาดหอมที่มีลำต้นยาว (Stem Lettuce) สำหรับในไทยนิยมปลูก 2 ประเภท คือ คริสป์เฮด (Crisp Head) หรือ ไอซ์เบิร์ก (Iceberg) คือผักกาดหอมห่อหรือผักกาดแก้ว และอีกประเภทคือ ลีฟ (Leaf) หรือ Loose Leaf คือผักกาดหอมใบหยิก เรามักพบเห็นใบสีเขียวอ่อนมากกว่า พันธุ์นี้สามารถปลูกได้ตลอดปี สำหรับมูลค่าทางเศรษฐกิจนั้น เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมมีมูลค่าสูงมากถึงกิโลกรัมละประมาณ 20,000 บาท อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเมล็ดพันธุ์มีราคาแพง นอกจากนี้เมล็ดพันธุ์ผักใน Family Cruciferae หรือ Brassicaceae ได้แก่ ผักกาดขาวปลี (chinese cabbage) ผักกาดเขียวกวางตุ้ง (flowering white cabbage) ผักคะน้า (Chinese kale) และผักกาดฮ่องเต้ (Pak choi) ผักกาดขาวปลี (chinese cabbage) *Brassica campestis* L. var. pekinensis เป็นผักที่ปลูกกันมากในประเทศจีนตอนใต้ ไต้หวันและในประเทศ **ผักกาดขาวปลี**นับว่าเป็นผักที่มีความสำคัญ ทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของไทย เนื่องจากนิยมบริโภคกันแพร่หลาย ผักกาดขาวปลีเป็นผักที่มีอายุปีเดียว ปลูกได้ดีในช่วงตุลาคม-กุมภาพันธ์ หากจัดผักกาดขาวปลีโดยการจำแนกพืชผักโดยอาศัยส่วนของพืชที่รับประทานได้จัดอยู่ในส่วนผักของรับประทานได้ในส่วนเหนือดิน, หากจำแนกตามการใช้ประโยชน์ สามารถจัดอยู่ในพวกผักที่สามารถมีการแปรรูปได้ลักษณะ หมักดอง หากจำแนกโดยอุณหภูมิพวก ผักกาดขาวปลีจัดเป็นพืชปลูกในฤดูหนาวเย็น Half-hardy หากจำแนกด้วยวิธีเพาะเลี้ยงจัด Chinese cabbage อยู่ในพวก Cole stem หรือ cabbage crops, crucifer or Brassicas เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Cabbage family จำแนกโดยอาศัยปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ผักกาดขาวปลี จัดอยู่ในพวกที่เสียหายง่ายเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำพอสมควรแต่ไม่ถึงจุดเยือกแข็ง (chilling injury) จัดอยู่ในพวกทนทานปานกลาง หากจำแนกพิจารณาถึงความลึกของรากที่หยั่งลงไปตัวกลางเพาะชำพอแยกพืชผักออกเป็นกลุ่มพวกความลึกของรากที่หยั่งลงไปในตัวกลางเพาะชำตื้น (18-24นิ้ว) (วังใน,2537) หากจำแนกโดยอาศัยวงจรชีวิต ผักกาดขาวปลีถูกจัดเป็นพืช

biennials ที่นำมาปลูกเป็นพืชฤดูเดียว (annuals) ซึ่งพืช biennial เป็นกลุ่มที่น่าสนใจเนื่องจาก มีความไวต่ออุณหภูมิเกี่ยวกับการออกดอก

พันธุ์ผักกาดขาวปลี แบ่งตามลักษณะของปลีได้เป็น 3 พวกใหญ่ๆ คือ

1. พันธุ์ปลียาว มีลักษณะทรงสูง รูปไข่ ได้แก่พันธุ์มิชิลีหรือผักกาดหางหงส์, ผักกาดโสภณ, ผักกาดขาวปลีฝรั่ง

2. พันธุ์ปลีกลม ลักษณะทรงสั้นกว่า อ้วนกลมกว่า มักเป็นพันธุ์เบา อายุสั้น

3. พันธุ์ปลีหลวม หรือไม่ห่อปลี ส่วนใหญ่เป็นผักพื้นเมืองของเอเชีย มักไม่ห่อปลี

สำหรับเมล็ดผักกาดขาวมีไขมัน เช่น Erucic acid, Linolenic acid และ glycerol sinapate เป็นต้น น้ำมันหอมระเหยที่สำคัญคือ Methyl mercaptan นอกจากนี้ยังมีสารที่ยับยั้งแบคทีเรีย คือ Raphanin นอกจากนี้ผักกาดขาวยังเป็นพืชที่ให้เส้นใย (dietary fiber) สูงมากชนิดหนึ่ง อุดมไปด้วย โฟเลต ซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของทารกในครรภ์ในระยะ 3 เดือนแรก ถ้าแม่ได้รับโฟเลตน้อยเกินไปการสร้างระบบประสาทและ DNA ของทารกอาจผิดปรกติได้ นอกจากนี้โฟเลตยังช่วยทำให้เม็ดเลือดแดงแข็งแรงอีกด้วย ผักกาดขาวมีสรรพคุณหลายด้านทั้งช่วยย่อยอาหาร ขับปัสสาวะ แก้ไอ ขับเสมหะ แก้พิษสุรา

ผักกาดเขียวกวางตุ้ง (*Brassica chinensis* L.var.parachinensis) หรือเรียกว่า flowering white cabbage เป็นพืชอยู่ในตระกูล Cruciferae เช่นกัน เป็นพืชอายุปีเดียว โดยใช้บริโภคส่วนของใบและก้านใบ เป็นผักที่นิยมบริโภคกันมาก ปลูกง่าย เจริญเติบโตเร็ว อายุเก็บเกี่ยวสั้น ประมาณ 35-45 วัน เป็นผักที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ปลูกได้ทุกฤดู ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ รากเป็นระบบรากแก้ว อยู่ในระดับตื้น ส่วนที่ใหญ่สุดของรากแก้ว ประมาณ 1.20 เซนติเมตร มีรากแขนงแตกออกจากรากแก้วมาก โดยรากแขนงแผ่อยู่ตามบริเวณผิวดิน รากแก้วอาจมีขนาดใหญ่ขึ้น ถ้าดินมีสภาพชื้นและเย็น

ผล ผลมีลักษณะเป็นฝัก รูปร่างเรียงยาว แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนปลายไม่มีเมล็ด ยาวประมาณ 0.9-1.5 เซนติเมตร และส่วนที่มีเมล็ดยาวประมาณ 3-4.1 เซนติเมตร กว้าง 0.3-0.5 เซนติเมตร ก้านผลยาว 1.3-2.5 เซนติเมตร ผลตั้งขึ้น เมื่อผลแก่จะแตกตามยาวจากโคนไปหาปลายเมื่ออ่อนมีสีเขียว ผลแก่มีสีน้ำตาล

เมล็ด ค่อนข้างกลม มีทั้งสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ ผิวเมล็ดมีลายแบบร่างแห เห็นไม่ค่อยชัด น้ำหนัก 1,000 เมล็ดประมาณ 2.5 กรัม

ผักกาดเขียวกวางตุ้งที่ปลูกมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน แต่นิยมปลูกและบริโภคกันมากคือ ผักกาดเขียวกวางตุ้งใบ สำหรับพันธุ์ผักกาดเขียวกวางตุ้งใบที่ทางกรมวิชาการเกษตรส่งเสริมแนะนำคือ พันธุ์น่าน 1 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกพันธุ์โดยกรมวิชาการเกษตร ลักษณะประจำพันธุ์ เป็นผักกาดชนิดไม่ห่อปลี ส่วนกลางของก้านใบค่อนข้างหนา ใบมีสีเขียวอ่อน ความยาวเฉลี่ย 19.5 เซนติเมตร (อายุ 40 วัน) ความหนา ของก้านใบเฉลี่ย 0.9 เซนติเมตร ความกว้างเฉลี่ย 1.3 เซนติเมตร ใบสีเขียว ลักษณะยาวรี ความยาวของใบเฉลี่ย 30 เซนติเมตร กว้าง 19 เซนติเมตร ความสูงเมื่ออายุ 40 วัน เฉลี่ย 57.26 เซนติเมตร น้ำหนักต้นเฉลี่ย 550 กรัม ออกดอกเมื่ออายุ 50 วัน

ลักษณะเด่นของพันธุ์น่าน 1 คือ เป็นพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็ว อายุสั้น เก็บเกี่ยวได้เมื่ออายุระหว่าง 30-40 วัน น้ำหนักเฉลี่ยต่อต้นสูง ต้นไม่แตกแขนงทำให้เสียหายน้อยในการบรรจุเพื่อการขนส่ง ไม่ออกดอกก่อนอายุ 40 วัน จึงสามารถทยอยเก็บเกี่ยวส่งตลาดได้ตั้งแต่อายุ 30-40 วัน แต่ข้อเสียของพันธุ์น่าน 1 ก็คือไม่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง

คะน้า ชื่อสามัญ Chinese kale มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Brassica oleracea* L.var alboglabra Bailey. (วิจิตร วังใน, 2537) คะน้าเป็นผักอยู่ในพวกสกุล Brassica รวมทั้งพวกบล็อกเคอรี่ กะหล่ำดอก ต่างๆ เป็นพืชผักใบเขียวที่นิยมรับประทานทั่วไปโดยบริโภคส่วนของใบและลำต้น มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชียและปลูกกันมากในประเทศจีน ฮ่องกง ไต้หวัน มาเลเซียและประเทศไทย คะน้ามีวิตามินหลายชนิด เช่น วิตามินเอ, วิตามินบีหนึ่ง, วิตามินบีสอง, วิตามินบีสาม, วิตามินบีหก, วิตามินบีเก้า, วิตามินซี, วิตามินอี และวิตามินเค มีธาตุอาหารต่างๆ เช่น แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม แมงกานีส ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โซเดียม สังกะสี

พันธุ์คะน้าที่นิยมปลูกในบ้านเรา คือ พันธุ์คะน้าจีน ซึ่งนิยมปลูกกัน 3 ประเภท คือ

1. คะน้าใบกลม ลักษณะลำต้นอวบใหญ่ ก้านเล็ก ใบกลมหนา
2. คะน้าใบแหลม ลักษณะใบแคบว่าคะน้าใบกลมและปลายใบแหลม
3. คะน้ายอดหรือคะน้าก้าน ลักษณะลำต้นอวบใหญ่ แต่ใบแหลมและก้านใหญ่ จำนวนใบต่อต้นน้อยกว่าคะน้าใบแหลม

- ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ อยู่ในสกุล *Brassica* ส่วนใหญ่ถิ่นกำเนิดในเขตอบอุ่น

- การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ ความต้องการพันธุ์ลูกผสมที่ดีทำให้พันธุ์ดั้งเดิมค่อนข้างหายไป ดังนั้น ความแปรปรวนทางด้านพันธุกรรมจำเป็นต้องมีการเก็บรวบรวมไว้ สำหรับที่ธนาคารเชื้อพันธุ์พืชในต่างประเทศที่มีการเก็บพืชสกุลนี้ไว้มีใน Tsukuba ประเทศญี่ปุ่น, ใน The Wellesbourne (United Kingdom), เมือง Wageningen ประเทศเนเธอร์แลนด์, Braunschweig ประเทศเยอรมนี และ Beltsville สหรัฐอเมริกา โดยมีความร่วมมือเครือข่ายประสานงานโดยคณะกรรมการด้านเชื้อพันธุกรรมพืชระหว่างชาติ (International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) (PROSEA, 1994) ทางด้านการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ มีการเก็บอนุรักษ์เชื้อพันธุ์คะน้า ไว้จำนวนไม่มากในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช หรือสถานศึกษาต่างๆ อย่างไรก็ดีราคาคะน้าราคาไม่แพงนัก (PROSEA, 1994)

ผักกาดฮ่องเต้ (Green Pak tsai) หรือ Pak Choi มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Brassica chinensis* var. chinensis (Chinensis group) มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีน ญี่ปุ่นและเอเชียกลาง นำเข้ามาปลูกในไทยเป็นระยะเวลานาน เป็นพืช 2 ฤดูแต่ปลูกเป็นพืชฤดูเดียว ก้านใบมีสีเขียวอ่อน ลักษณะแบน ส่วนโคนก้านใบจะขยายกว้างมากและหนา เนื้อกรอบ ปลายใบมน ไม่ห่อหัว ชอบอุณหภูมิ 20-25°C การใช้ประโยชน์และคุณค่าทางอาหาร ผักกาดฮ่องเต้ เป็นผักที่มีวิตามินสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิตามินเอ วิตามินซี นอกจากนี้ ยังมีธาตุอาหารพวกแคลเซียม และฟอสฟอรัสสูง จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบความงอกและความแข็งแรงเพื่อประเมินคุณภาพของเมล็ด สำหรับวิธีทดสอบความแข็งแรงด้วยวิธี SSAA Test นั้น เพื่อทดสอบความแข็งแรงของพืชเมล็ดขนาดเล็ก (Jianhua and Mc Donald,1996) และใช้ได้ดีกับเมล็ดผักต่างๆและเมล็ดไม้ดอก (Marcos Filho,2004) และมีรายงานของ Ribeiro and Carvalho,2001 ในเมล็ดแครอท ผักกาดหอมและบล็อกโคลีบ้างบางส่วน สำหรับในงานศึกษาครั้งนี้เป็นการรวบรวมเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมที่ทางมหาวิทยาลัยแม่โจ้ได้รวบรวมไว้กว่า 10 สายพันธุ์ โดยมีความร่วมมือกับโครงการ อพ.สธ. และเตรียมเพื่อนำมาเก็บรักษาไว้ที่ธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร สำหรับการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินคุณภาพและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมด้วยวิธีการเร่งอายุด้วยน้ำเกลือ (SSAA Test), Controlled Deterioration Test และวิธีเร่งอายุเพื่ออนุรักษ์ไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช ในห้องอนุรักษ์ในระยะต่างๆ และเก็บรักษาไว้ในห้องเก็บรักษาในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต และห้องเก็บอนุรักษ์ของโครงการ อพ.สธ. บริเวณใต้พระมหาธาตุนภเมทนีดลและพระมหาธาตุนภพลภูมิสิริ จังหวัดเชียงใหม่ สำหรับ**วัตถุประสงค์**ของโครงการวิจัยเพื่อศึกษาวิธีการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับตัวชี้วัดอายุการเก็บรักษาเพื่อการจัดการในการอนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช โดยมี**ขอบเขตของโครงการวิจัย** เป็นงานวิจัยที่ปฏิบัติโดยการนำเอาเทคโนโลยีวิทยาการเมล็ดพันธุ์มาใช้ประโยชน์ในการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดโดยวิธีเร่งอายุด้วยน้ำเกลือ (SSAA Test), เร่งอายุ (AA Test) และวิธี Controlled Deterioration (CD Test) เก็บรักษาในห้องเก็บอนุรักษ์ระยะต่างๆ โดยแบ่งเก็บรักษาในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชกรมวิชาการเกษตรและโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต และห้องเก็บอนุรักษ์ของโครงการ อพ.สธ. บริเวณใต้พระมหาธาตุนภเมทนีดลและพระมหาธาตุนภพลภูมิสิริ จังหวัดเชียงใหม่

สำหรับมูลค่าทางเศรษฐกิจนั้น เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมมีมูลค่าสูงมากถึงกิโลกรัมละประมาณ 20,000 บาท อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเมล็ดพันธุ์มีราคาแพง จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบความงอกและความแข็งแรงเพื่อประเมินคุณภาพของเมล็ด สำหรับวิธีทดสอบความแข็งแรงด้วยวิธี SSAA Test นั้น เพื่อทดสอบความแข็งแรงของพืชเมล็ดขนาดเล็ก (Jianhua and Mc Donald,1996) และใช้ได้ดีกับเมล็ดผักต่างๆและเมล็ดไม้ดอก (Marcos Filho,2004) และมีรายงานของ Ribeiro and Carvalho,2001 ในเมล็ดแครอท ผักกาดหอมและบล็อกโคลีบ้างบางส่วน สำหรับในงานศึกษาครั้งนี้เป็นการรวบรวมเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมที่ทางมหาวิทยาลัยแม่โจ้ได้รวบรวมไว้กว่า 10 สายพันธุ์ โดยมีความร่วมมือกับโครงการ อพ.สธ. และเตรียมเพื่อนำมาเก็บรักษาไว้ที่ธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร สำหรับการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินคุณภาพและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมด้วยวิธีการเร่งอายุด้วยน้ำเกลือ (SSAA Test), Controlled Deterioration Test และวิธีเร่งอายุเพื่ออนุรักษ์ไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช ในห้องเก็บระยะปานกลาง (5°C), ห้องเก็บระยะยาว (-10°C) และสภาพเยือกแข็ง (-196°C)

ในการประเมินคุณภาพเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนั้น จำเป็นที่จะต้องใช้วิธีทดสอบความแข็งแรงซึ่งจะทำให้การงอกเร็วขึ้น เนื่องมาจากว่า Ducournau et al, 2010 กล่าวว่าการใช้วิธี Pre-chilling และ KNO3 Solution นั้น ช่วยทำให้การงอกของเมล็ดผักกาดหอมงอกได้ดีขึ้นจริงอยู่ แต่การใช้ KNO3 สำหรับผักกาดหอมไม่ได้ในกฎของ ISTA ดังนั้นจึงต้องมีการใช้วิธีอื่นๆในการทดสอบความงอกของเมล็ดผักกาดหอม

สำหรับการศึกษาวิธีประเมินด้านกายภาพและสรีรวิทยาของเมล็ดผักกาดหอม (Mc Donald,1999) ทั้งวิธี standard germination ดูลักษณะภายนอกของเมล็ด การทดสอบเร่งอายุน้ำเกลือ (SSAA Test) และด้วยน้ำกลั่น (AA Test) รวมถึงวิธี Controlled deterioration (CD Test) เป็นวิธีที่น่าสนใจในการใช้ทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดผักกาดหอม จริงอยู่วิธี standard test ยังคงเป็นวิธีวัดคุณภาพเมล็ดที่ใช้ประจำมากที่สุดในพืชผักและการทดสอบนี้ใช้เวลา 7 วัน (ISTA,2014) วิธี TP,BP อุณหภูมิ 20oC ทำลายการพักตัวโดยการให้ความเย็น สำหรับวิธีเร่งอายุด้วยน้ำเกลือนั้น (Saturated Salt Accelerated Aging, SSAA Test) Jianhua และ Mc Donald, 1996 ; Mc Donald,1999) มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความแข็งแรงเพื่อการค้าอีกนัยหนึ่งด้วย

สำหรับ SSAA Test นั้นวัตถุประสงค์แรกเพื่อเป็นการทดสอบความแข็งแรงสำหรับเมล็ดพืชที่มีขนาดเล็ก (Jianhua and Mc Donald, 1996) และประสบความสำเร็จอย่างดีในพืชพวกผักและไม้ดอก

(Marcos Filho,2004) สำหรับวิธี SSAA Test นี้ใช้กับข้าวสาลีให้ผลเป็นมาตรฐานดีกว่าวิธี AA Test (Meriaux et al,2004) วิธีเร่งอายุ (AA Test) นั้น มักใช้กับเมล็ดถั่วเหลืองและข้าวโพดในเรื่องของการเก็บรักษา (ISTA,1995) ส่วนวิธี Controlled Deterioration (CD) Test นั้น มักใช้กับพืชที่มีขนาดเล็ก เช่น ข้าวไรน์ (Steiner and Stahl,2002) และพืชอื่นๆ (ISTA,1995) อย่างไรก็ตามเมล็ดพืชผักกาดหอมเป็นเมล็ดที่มีคุณค่าทั้งทางเศรษฐกิจและมีการเก็บรวบรวมเชื้อพันธุ์ผักกาดหอมที่ทางมหาวิทยาลัยแม่โจ้รวบรวมไว้ที่ธนาคารเชื้อพันธุ์พืชกรมวิชาการเกษตรด้วย

ระเบียบวิธีวิจัย

วิธีดำเนินการ :

ก. วิธีการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ ที่**อุณหภูมิ 5 , -10 และ 25°C**

1. รวบรวมเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้

2. เตรียมอุปกรณ์/ เครื่องมือ วิธีทดสอบ วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 ทรีตเมนต์ ได้แก่

1. วิธีเร่งอายุ (Accelerated Aging Test) AA Test

2. วิธีเร่งอายุด้วยสารละลายเกลืออิ่มตัว (Saturated Salt Accelerated Aging Test) หรือ SSAA Test

3. วิธีControlled Deterioration Test (CD Test)

4. วิธีทดสอบความงอกปกติ (Germination Test)

และมี 4 ซ้ำๆละ 100 เมล็ด โดยมีพารามิเตอร์ 2 ตัวได้แก่ 1.ทดสอบการเจริญเติบโต (Growth Test; G) 2. ทดสอบความแข็งแรง (Vigor Test; V) โดยมีทั้งหมด 5 ชนิดพืช ดังนี้ 1.พันธุ์ผักกาดหอม 2.ผักกาดขาวปลี 3.ผักกาดเขียวกวางตุ้ง 4. ผักคะน้า 5. ผักกาดฮ่องเต้ วิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA ใช้ IRRISTAT v.93 สำหรับเปอร์เซ็นต์ความงอกและอัตราการงอก

3. สุ่มเมล็ดพันธุ์

4. นำมาทดสอบความงอก และทดสอบความชื้นเริ่มต้น

5. นำมาบรรจุใส่ถุงพลาสติกซิปแล้วบรรจุใส่ขวดพลาสติกมีฝาปิด (ขวดPet) เก็บรักษาที่ห้องอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชระยะปานกลาง (5°C) และห้องอุณหภูมิ 25°C สำหรับห้อง -10°C เก็บไว้ในถุง aluminum foil และเก็บรักษาไว้ที่ -196°C

6. - นำมาทดสอบความงอก (Standard Germination Test)

- ทดสอบความแข็งแรงด้วยวิธี ดังนี้

1. วิธีเร่งอายุ (Accelerated Aging Test) AA Test

2. วิธีเร่งอายุด้วยสารละลายเกลืออิ่มตัว (Saturated Salt Accelerated Aging Test) หรือ SSAA Test

3. วิธีControlled Deterioration Test (CD Test)

4. วิธีทดสอบความงอกปกติ (Germination Test)

วิธีทดสอบความแข็งแรง

1. วิธีเร่งอายุ (Accelerated Aging Test) หรือ AA Test

หลักการโดยการนำเอาเมล็ดให้เกิดความเครียดโดยนำเมล็ดไปไว้ที่อุณหภูมิสูงและมีความชื้นสัมพัทธ์สูง(ประมาณ95%)ในช่วงเวลาอันสั้นแล้วแต่พืช ซึ่งช่วงระยะเวลานี้เมล็ดจะดูดความชื้นจากสิ่งแวดล้อมรอบๆเมล็ดทำให้ความชื้นของเมล็ดสูงขึ้นและพร้อมกับสภาพที่อุณหภูมิสูงเป็นการเร่งอายุของเมล็ดอย่างรวดเร็ว เมล็ดที่แข็งแรงเท่านั้นถึงจะทนอยู่ได้ในสภาพความเครียดเช่นนี้ ดังนั้นหลังจากการเร่งอายุเมล็ดที่แข็งแรงยังคงมีความงอกดี แต่ที่ไม่ทนแสดงว่าไม่แข็งแรง ความแข็งแรงลดลง

หมายเหตุ เมล็ดที่ใช้ไม่ควรคลุกยากันราถ้าเป็นไปได้อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องชั่งทศนิยมอย่างน้อย 3 ตำแหน่ง
- กล่องพลาสติก (11.0 X 11.0 X 3.5 cm,ยาว X กว้าง X ลึก)พร้อมฝาวางในตะแกรงลวด
- น้ำ 50ml กระบอกตวง(Graduated Cylinder)
- Aging Chamber 41±0.3°c ใส่น้ำเพื่อให้มีความชื้นระหว่างเร่งอายุ
- น้ำกลั่นหรือน้ำปราศจากอิออน
- อุปกรณ์วัดความชื้น container เครื่องชั่ง ตู้อบความร้อน

2. วิธีเร่งอายุด้วยสารละลายเกลืออิ่มตัว (Saturated Salt Accelerated Aging Test) หรือ SSAA Test

อุปกรณ์และเครื่องมือเหมือนการเร่งอายุธรรมดาแต่เปลี่ยนจากน้ำเป็นสารละลายเกลือ NaCl

วิธีดำเนินการ

1. นำเมล็ดชื้น10-14%มาทดลอง
2. นำเมล็ด200เมล็ดวางบนตะแกรงลวด มีขาสูงไม่ให้เมล็ดสัมผัสกับน้ำ
3. เติมน้ำ40มล.ไม่ให้ถูกเมล็ดใส่ในกล่องใส
4. ปิดภาชนะถือว่า %RH เป็น100%
5. วางตะแกรงปิดฝาให้สนิท
6. เข้าตู้อบ 41oc±0.3 oc เป็นเวลา 48ชม.± 15นาที ควรตั้งอุณหภูมิตู้อบก่อนประมาณ3ชม.
7. ครบกำหนดเวลาเอาออกมาทดสอบความงอก ประเมิน

เร่งอายุด้วยสารละลายเกลืออิ่มตัวทำเช่นเดียวกันกับวิธีการเร่งอายุด้วยน้ำแต่วิธีนี้เป็นสารละลายน้ำเกลือ (41oc±0.3 oc เป็นเวลา 48ชม.± 15 นาที) ใช้เมล็ดประมาณ 2 กรัม (Panobianco and Marcos Filho,1998)

ทดสอบความชื้น

ทดสอบก่อนsetแต่ละทรีตเมนต์และทดสอบความชื้นอีกครั้งหลังเร่งอายุในตู้อบ 105o c ± 3 o c เป็นเวลา 24 ชม.ใน2ซ้ำประมาณ 2g/ตัวอย่าง ผลวิเคราะห์แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ย (น้ำหนักสด) ต่อตัวอย่าง

3. วิธี Controlled Deterioration Test (CD)

การนำเมล็ดไปไว้ที่อุณหภูมิสูงขณะที่ควบคุมความชื้นของเมล็ดให้คงที่ทำให้เมล็ดแย่ลงอย่างรวดเร็ว ปริมาณความชื้นของตัวอย่างเมล็ดมีค่าสูงขึ้นก่อนที่จะนำเมล็ดไปไว้ที่อุณหภูมิสูงขึ้น ดังนั้นเพื่อให้

แน่ใจว่าตัวอย่างที่ทดสอบได้อยู่ในสภาพที่แย่ของการทดสอบ เมล็ดที่แข็งแรงสูงจะยังคงมีความงอกสูงหลังจากdeterioration ในขณะที่เมล็ดที่แข็งแรงต่ำจะมีความงอกลดน้อยลง

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. water Bath 45 oc ± 0.5 oc
2. Analytical balance 0.0001g
3. Aluminum foil packet ใส่เมล็ดพริก 100 เมล็ดในถุงชั้นเดียว เว้นช่วงห่าง 3 ซม. จากเมล็ดกับที่seal Packet ลึก 5-6 cmกว้างประมาณ 7-10 cm. ภาชนะที่ใส่ต้องกันความชื้นได้เช่น กระดาษขาว white kraft 60 g ซ้อนด้วย aluminum foil 8 m และ polyethylene film 40 m
4. packet sealer กันน้ำ
5. กระดาษเพาะ
6. container ใส่เมล็ด/filter และกระดาษเพาะในช่วงที่เพิ่มความชื้น เช่น petri dish, กล่องเพาะความงอก
7. ตู้เย็นอุณหภูมิ 7 ± 2 oc
8. อุปกรณ์ทดสอบความงอก
9. อุปกรณ์ทดสอบความชื้น ทดสอบภายใต้อุณหภูมิสูงและความชื้นสัมพัทธ์สูง

วิธีดำเนินการ

1. เริ่มที่ให้เมล็ดที่ทดสอบมีความชื้น 20% ทำ 4 ซ้ำ
2. เก็บในถุงที่ปิดสนิทที่อุณหภูมิ 7 ± 2 oc 1วัน
3. วันรุ่งขึ้นทดสอบโดยเอาเมล็ดที่มีความชื้น 20% นั้นมา 4 ซ้ำ
4. แช่ใน water bath 45 oc 24 ชม. ± 15 นาที
5. นำมาผ่านน้ำไหล (เย็น) นาน 5 นาที
6. ทดสอบความงอกทันทีภายใน 30 นาที หลังจากเอาออกจาก water bath

4. วิธีทดสอบความงอกปกติ (Control)

7. หลังจากนั้นทำการทดสอบความงอก ความชื้น และความแข็งแรงทั้ง 4 วิธี ทุก 3 เดือนในทุกอุณหภูมิเก็บรักษา (5°C, 25°C, -10°C) และ -196°C ทำการทดสอบ 1 ครั้ง

การทดสอบความงอก

1. **ผักกาดหอม** ใช้วิธีเพาะแบบ TP, BP อุณหภูมิ 20°C นับครั้งแรกวันที่ 4 นับครั้งสุดท้ายวันที่ 7
2. **ผักกาดขาวปลี** ใช้วิธีเพาะแบบ TP อุณหภูมิ 20-30°C, 20°C นับครั้งแรกวันที่ 5 นับครั้งสุดท้ายวันที่ 7
3. **ผักกาดเขียวกวางตุ้ง** ใช้วิธีเพาะแบบ TP อุณหภูมิ 20 – 30 °C, 20 °C นับครั้งแรกวันที่ 5 นับครั้งสุดท้ายวันที่ 7
4. **ผักคะน้า** ใช้วิธีเพาะแบบ TP อุณหภูมิ 20 – 30 °C, 20 °C นับครั้งแรกวันที่ 5 นับครั้งสุดท้ายวันที่ 10
5. **ผักกาดฮ่องเต้** ใช้วิธีเพาะแบบ TP อุณหภูมิ 20-30°C, 20°C นับครั้งแรกวันที่ 5 นับครั้งสุดท้ายวันที่ 7
8. บันทึกผลการทดลอง

9. ประเมินผล/สรุปผล/รายงานผล

ข. วิธีการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ ในสภาพปลอดเชื้อ (-196°C)

อุปกรณ์

1. พืชทดลอง

- ผักกาดหอม
- ผักกาดขาวปลี
- เขียวกวางตุ้งดอก
- ผักคะน้า
- ผักกาดฮ่องเต้

2. เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ

1.ถังไนโตรเจนเหลว 2. หลอดเก็บเนื้อเยื่อ (cryotube)

3. กล่องเก็บความเย็น (ice box) 4. water bath

5. เครื่องมืออื่นๆ เช่น ขวดแก้ว ไมโครปิเปต ขนาด 1,000 ไมโครลิตร tripปลายตัด trip

3. สารเคมี

1. สูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962)
2. clorox 20%
3. Tween
4. silica gel
5. Loading Solution (LS)
6. 3% Na-alginate
7. 0.1M CaCl2
8. Unloading solution (US)

วิธีการ

1. การเตรียมเมล็ดพันธุ์ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

นำเมล็ดพันธุ์ผักทั้ง 5 ชนิด มาฟอกฆ่าเชื้อ โดยล้างในน้ำไหลนาน 5 นาที 3 ครั้ง แล้วแช่ในสารละลาย Clorox 15% ร่วมกับ Tween 20 2-3 หยด นาน 20 นาที

2. การเก็บรักษาเมล็ดพริกในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี Encapsulation-dehydration

บรรจุเมล็ดพันธุ์ผักลงในขวดที่มี 3% Na-alginate ใช้ pipette tip ปลายตัดดูดสารละลาย 3% Na-alginate ให้มีเมล็ดพันธุ์ติดมาด้วย หยดลงในขวดที่มี 0.1 M CaCl2 ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นย้าย beads ที่มีเมล็ดพันธุ์มาแช่ใน loading solution (0.8 M sucrose + 1 M glycerol) เปรียบเทียบระยะเวลาในการแช่เป็นเวลา 10 และ 20 นาที นำ beads วางบนจานแก้วเพื่อดึงน้ำออกด้วย silica gel หนัก 50 กรัมต่อ beads 20 ชิ้น เปรียบเทียบระยะเวลาในการดึงน้ำออกเป็นเวลา 14 และ 21 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำ beads บรรจุลงใน cryotube แล้วนำไปแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. การทดสอบการรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

นำเมล็ดพันธุ์ผักที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว มาละลายน้ำแข็งด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที หลังจากนั้นนำมาล้างสาร cryoprotectant โดยใส่ unloading solution (US ; 1.2 M sucrose) เป็นเวลา 20 นาที แล้วย้ายมาเลี้ยงในอาหาร preculture (MS+0.5M sucrose) เป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 14 วัน เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

- เวลาและสถานที่ (ก และ ข)

ระยะเวลาโครงการ 3 ปี 0 เดือน

วันที่เริ่มต้น 1 ตุลาคม 2559 วันที่สิ้นสุด 30 กันยายน 2561

สถานที่ทำการทดลอง

ก. กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ข. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พระราชวัง สวนจิตรลดา

1. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลองและวิจารณ์วิธีการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ ที่อุณหภูมิ 5 , -10 และ 25°C

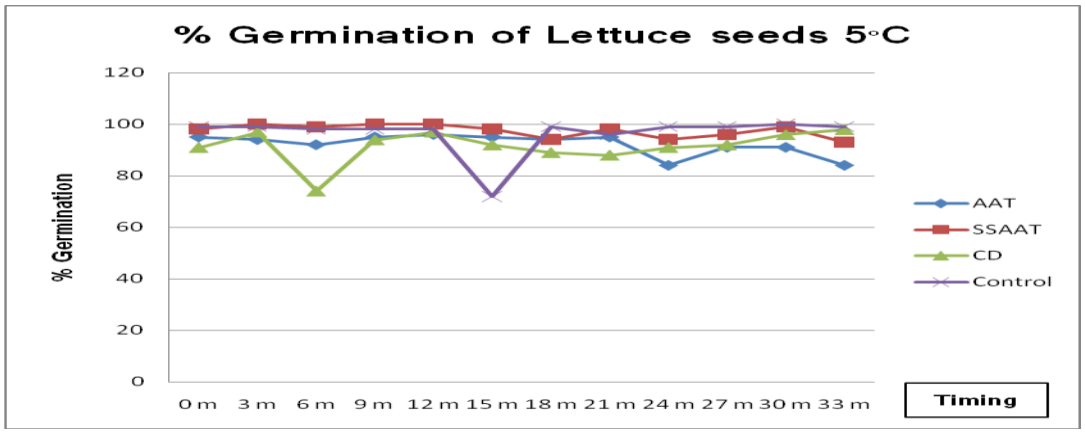
ความชื้นของเมล็ดพันธุ์ก่อนและหลังการทดลองสิ้นสุดมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 33 เดือน (ตารางที่ 1a)

ความชื้น	ค่าความชื้นเฉลี่ยก่อนการทดลอง-ธันวาคม 2558	ค่าความชื้นเฉลี่ยหลังการทดลอง-สิงหาคม 2561
1. ผักกาดหอม	4.59	6.73
2. ผักกาดขาวปลี	5.09	5.73
3. ผักกาดเขียวกวางตุ้ง	4.43	6.24
4. ผักคะน้า	4.88	5.79
5. ผักกาดฮ่องเต้	3.88	5.15

ตารางที่ 1a ตารางแสดงค่าความชื้นเฉลี่ยก่อนและหลังการทดลองของเมล็ดผักทั้ง 5 ชนิด

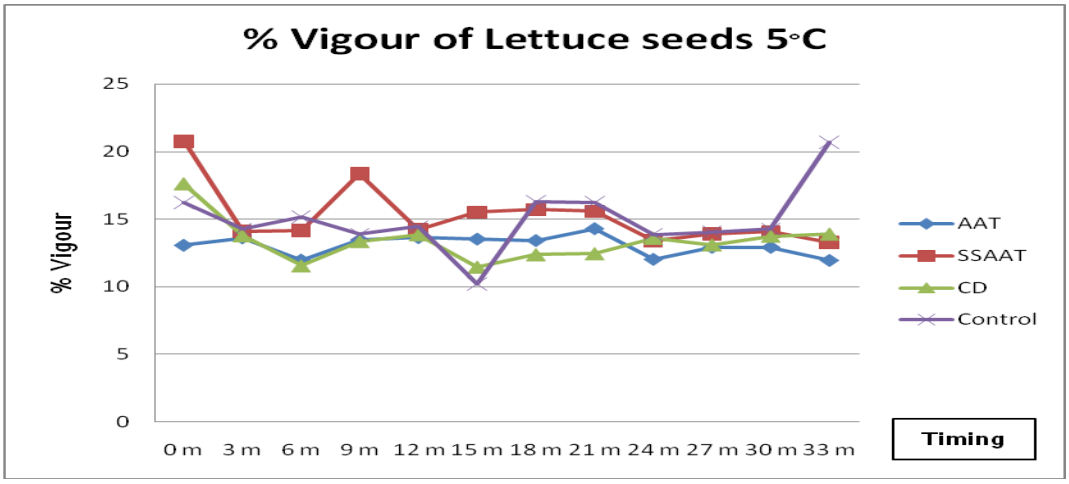
1. ผักกาดหอม(Lettuce) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Lactuca sativa*, Genus Lactuca วงศ์ Asteraceae

ที่อุณหภูมิ 5 °Cพบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดผักกาดหอมในการทดสอบความแข็งแรงด้วยวิธีต่างๆ ในแต่ละวิธี (AAT, SSAAT, CD และ Control) พบว่ามีความแตกต่างกันเมื่อเวลาผ่านไป 33 เดือน(ตารางที่ 1 และ 3) และพบว่าการเจริญเติบโตในทุกวิธีทดสอบความแข็งแรงเมื่อเวลาผ่านไปในการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ผักกาดนานถึง 33 เดือนไม่พบความแตกต่างกันในระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่า วิธีทดสอบความแข็งแรงที่เป็นตัวควบคุมคือ การทดสอบความงอกปกตินั้นเมื่อเก็บรักษาเมล็ดผักกาดหอมไว้นานจนถึง 33 เดือนยังสามารถมีอัตราการเจริญเติบโตได้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเจริญเติบโตของต้นอ่อนผักกาดหอมเมื่อทดสอบด้วยวิธีทดสอบ AAT, SSAAT, CD และวิธี Control นั้น มีค่าแรกเริ่ม 95, 98, 91 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเวลาผ่านไป 33 เดือนมีค่า 84, 93, 98 และ 99เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และกราฟที่ 1)



กราฟที่ 1 Germination percentage of lettuce seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

ความแข็งแรง(V) ของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 5 °C พบว่า เมื่อแรกเริ่มทดสอบความแข็งแรงต่างๆ (AAT, SSAAT, CD และ Control) มีค่าดังต่อไปนี้คือ 13.07, 20.78, 17.60 และ 16.24 ตามลำดับ และเมื่อยังคงเก็บรักษาเมล็ดผักกาดหอมไว้นานถึง 33 เดือน แล้วนำมาเพาะมีค่าความแข็งแรงเป็น 11.95, 13.27, 13.89 และ 20.71 ตามลำดับ (กราฟที่ 2)

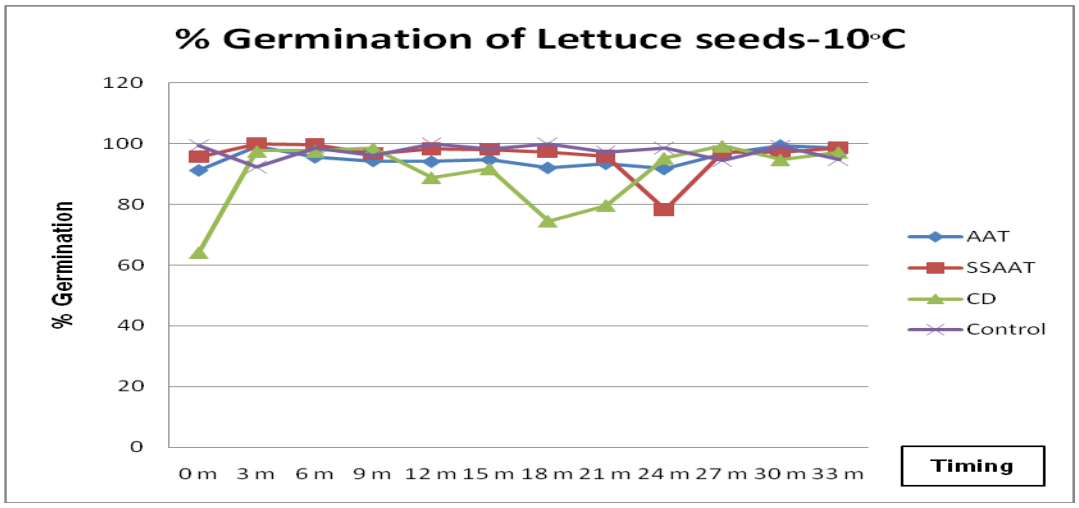


กราฟที่ 2 Vigour percentage of lettuce seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

สรุปแล้วถึงแม้เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมไว้เป็นเวลานานถึง 33 เดือนในห้องอนุรักษ์ระยะปานกลางอุณหภูมิ 5 °Cทั้งการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของเมล็ดผักกาดหอมยังดีมากในทุกวิธีทดสอบความแข็งแรง

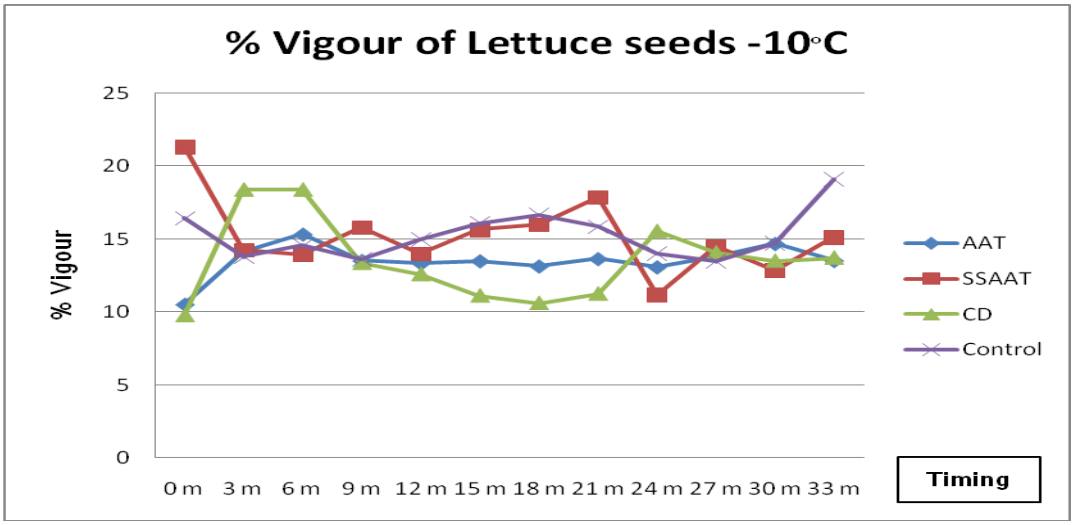
ที่อุณหภูมิ -10 °C พบว่า เมล็ดผักกาดหอมที่เก็บอนุรักษ์ในห้องระยะยาวที่อุณหภูมิ -10 °C พบว่าวิธีทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมมีค่าแตกต่างกัน และพบว่าทั้งเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงนั้น วิธีทดสอบความแข็งแรงกับเวลาในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์มีความแตกต่างกัน(ตารางที่ 4 และตารางที่ 6) และพบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกในทุกวิธีทดสอบความแข็งแรง เมื่อเวลาผ่านไปในการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนานถึง 33 เดือน ไม่พบความแตกต่างกัน โดยพบว่าถึงแม้ระยะเวลาการ

เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์จะนานถึง 33 เดือน เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพันธุ์ผักกาดในทุกวิธีทดสอบยังมีเปอร์เซ็นต์ความงอกดีมาก คือวิธี AAT, SSAAT, CD และ Control ตามลำดับดังนี้คือ 98.75, 98.64, 97.20 และ 94.80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (กราฟที่ 3)



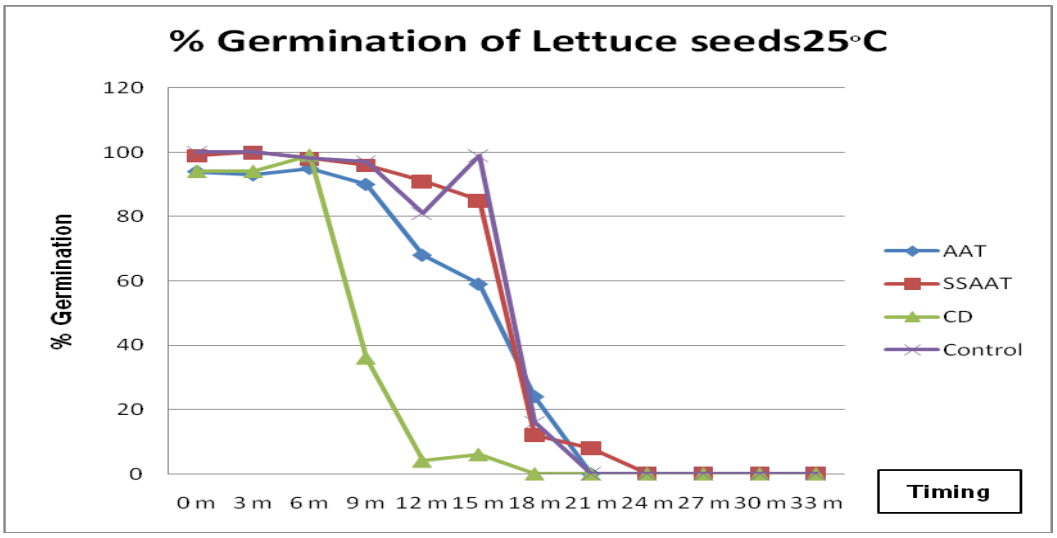
กราฟที่ 3 Germination percentage of lettuce seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

สำหรับความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมที่เก็บไว้ในห้องอนุรักษ์อุณหภูมิ -10 °C พบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกของวิธีทดสอบความงอกปกติมีค่าความแข็งแรงสูงสุด (19.13) ถึงแม้เมล็ดผักกาดหอมที่เก็บรักษาไว้นานถึง 33 เดือน ในห้องอุณหภูมิ -10 °C ในขณะที่วิธีทดสอบอื่นๆ มีความแข็งแรงของวิธี AAT, SSAAT และ CD เป็น 13.52, 15.12 และ 13.71 ตามลำดับ (ตารางที่ 7 และกราฟที่ 4)

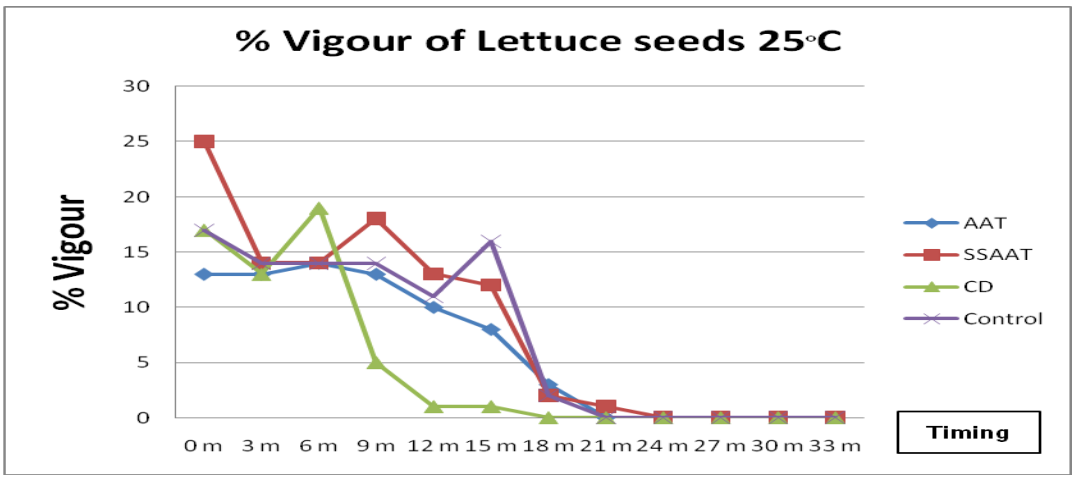


กราฟที่ 4 Vigour percentage of lettuce seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

ที่อุณหภูมิ 25 °C พบว่า วิธีทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมมีค่าแตกต่างกัน และพบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงนั้นเมื่อใช้วิธีทดสอบความแข็งแรงกับเวลาในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์มีความแตกต่างกัน(ตารางที่ 8 และตารางที่ 10) และพบว่าเมื่อนำเมล็ดผักกาดหอมที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 21 เดือนนั้น เมื่อทดสอบเปอร์เซ็นต์ความงอกแล้วพบว่าในเดือนที่ 21 เปอร์เซ็นต์ความงอกจะเริ่มเป็น 0 แม้วิธีการทดสอบความงอกแบบ Control และเมื่อนำเมล็ดที่เก็บรักษานานถึง 24 เดือน พบว่าเมล็ดผักกาดหอมไม่สามารถงอกได้เลยในทุกวิธีทดสอบ และเป็นไปในทำนองเดียวกันกับความแข็งแรง(ตารางที่ 9 และตารางที่ 11) (กราฟที่ 5 และกราฟที่ 6)



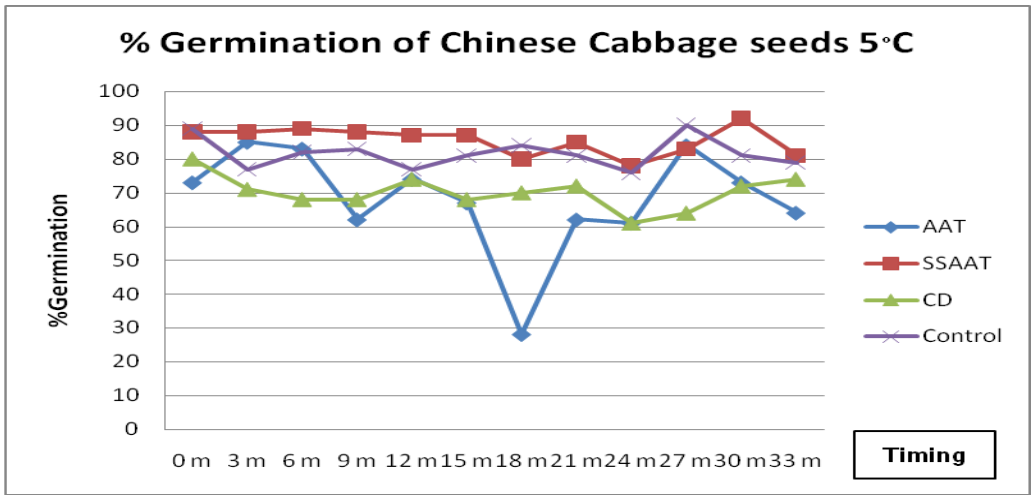
กราฟที่ 5 Germination percentage of lettuce seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.



กราฟที่ 6 Vigour percentage of lettuce seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

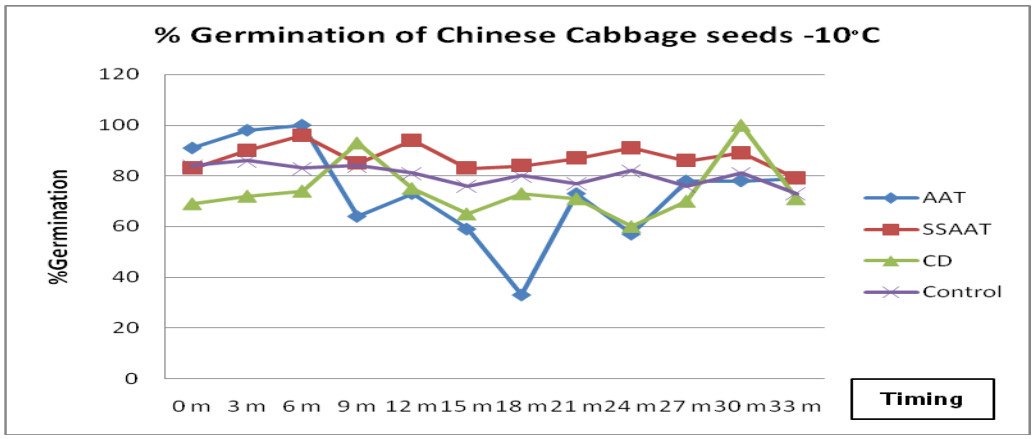
2. ผักกาดขาวปลี (Chinese Cabbage) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Brassica campestis* L.var.pekinensis (อยู่ใน Family Cruciferae หรือ Brassicaceae)

ที่อุณหภูมิ 5 °C เมล็ดผักกาดขาวปลีที่เก็บอนุรักษ์ในห้อง 5 °Cพบว่าวิธีทดสอบความแข็งแรงทั้ง 4 วิธีมีค่าแตกต่างกัน และอายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์มีความแตกต่างกัน(ตารางที่ 12) และพบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกกับเวลาในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์นั้น เมื่อเวลาผ่านไป 33 เดือน นำเมล็ดที่เก็บไว้ในห้องอนุรักษ์ระยะปานกลางอุณหภูมิ 5 °Cมาทดสอบความงอกแล้วพบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกมีค่าลดลงเล็กน้อย โดยแรกเริ่มเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพันธุ์ผักกาดขาวปลีนำไปทดสอบความแข็งแรงด้วยวิธีต่างๆ 4 วิธี คือ AAT, SSAAT, CD และ Control พบว่าแรกเริ่มมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 73, 88, 80, 89 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และนำเมล็ดพันธุ์ที่เก็บไว้นาน 33 เดือนมาทดสอบความงอกด้วยวิธีต่างๆ มีเปอร์เซ็นต์ความงอกดังนี้ 64, 81, 74 และ 79 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ(ตารางที่ 13 และกราฟที่ 7)



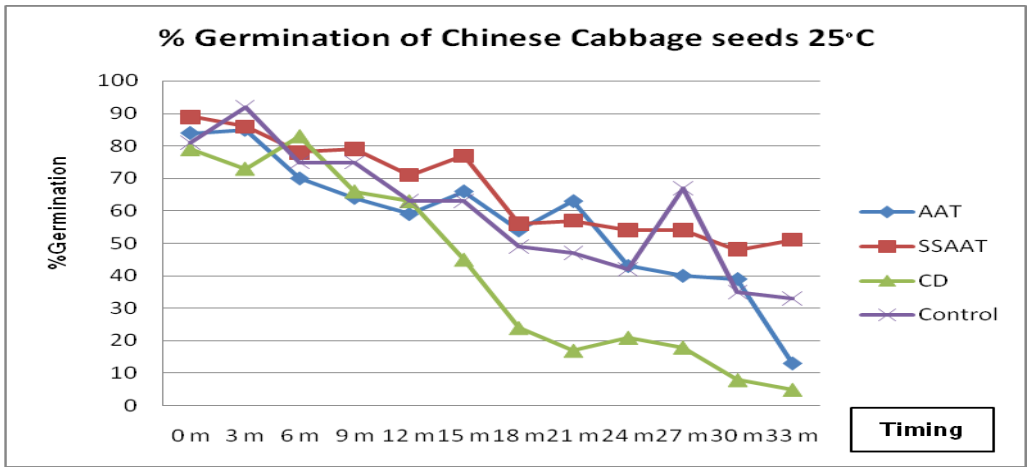
กราฟที่ 7 Germination percentage of Chinese Cabbage seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

ที่อุณหภูมิ -10 °Cพบว่าผลการทดสอบความงอกของวิธีทดสอบความแข็งแรงทั้ง 4 วิธีมีค่าแตกต่างกัน และอายุการเก็บรักษาต่างๆ มีความแตกต่างกันด้วย รวมถึงผลของวิธีกับระยะเวลายังมีความแตกต่างกันด้วย (ตารางที่ 14) สำหรับผลของเปอร์เซ็นต์ความงอกแรกเริ่มในการนำเอาเมล็ดพันธุ์ผักกาดขาวปลีมาทดสอบความงอก พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความงอกในแต่ละวิธีดังนี้ 91, 83, 69 และ 84 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำเมล็ดมาทดสอบหลังจากเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ผักกาดขาวปลีไว้ 33 เดือนมีค่าเปอร์เซ็นต์ความงอก 79, 79, 71 และ 73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 15 และกราฟที่ 8)



กราฟที่ 8 Germination percentage of Chinese Cabbage seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

ที่อุณหภูมิ 25 °Cพบว่าผลการทดสอบความงอกของวิธีทดสอบความแข็งแรงทั้ง 4 วิธี มีค่าแตกต่างกันและอายุการเก็บรักษาต่างๆ ด้วย รวมถึงผลของวิธีกับระยะเวลายังมีความแตกต่างกันด้วย (ตารางที่ 16) โดยเฉพาะเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดผักกาดขาวปลีแรกเริ่มมีเปอร์เซ็นต์ความงอกดังนี้ 84, 89, 79, และ 81 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำมาทดสอบหลังจากการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ผักกาดขาวปลีไว้นาน 33 เดือน มาทดสอบด้วยวิธีต่างๆ มีเปอร์เซ็นต์ความงอกลดลงอย่างมากดังนี้ 13, 51, 5 และ 33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 17 และกราฟที่ 9)

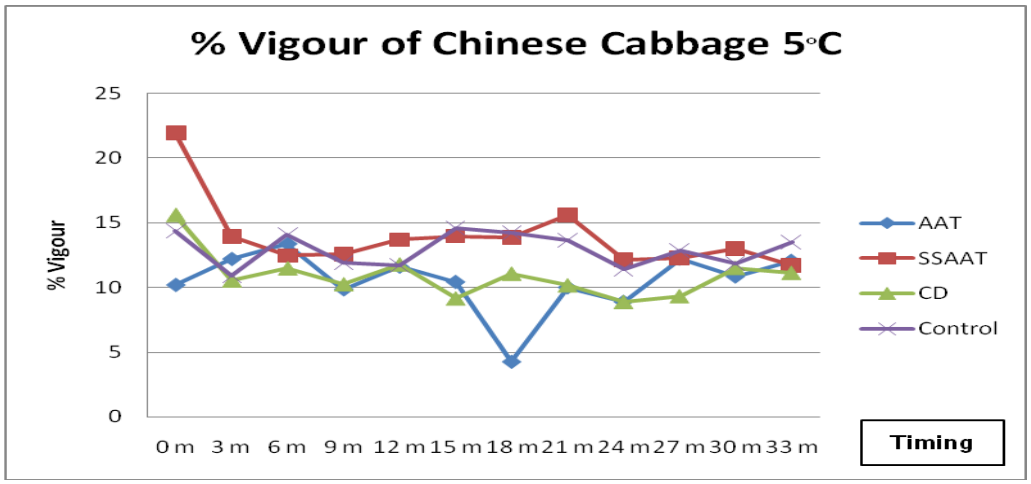


กราฟที่ 9 Germination percentage of Chinese Cabbage seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

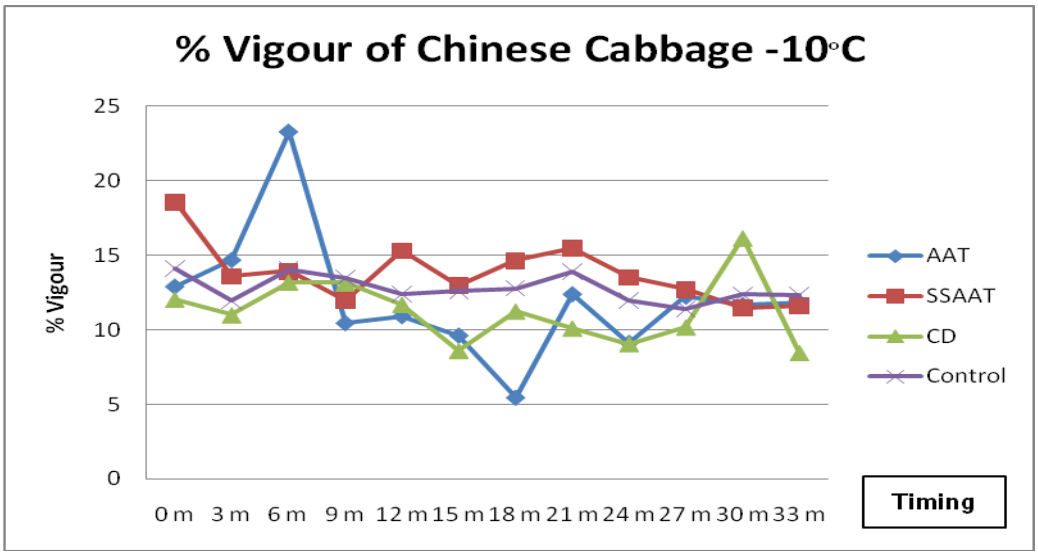
ความแข็งแรงของเมล็ดผักกาดขาวปลี

พบว่าทั้ง 3 สภาวะของอุณหภูมิการเก็บรักษานั้นสำหรับวิธีทดสอบความแข็งแรง, สภาพการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆกับวิธีทดสอบ, ระยะเวลาในการเก็บรักษาทั้งหมดมีค่าแตกต่างกันทั้งสิ้น (ตารางที่ 18) เมื่อเปรียบเทียบความแข็งแรงของวิธีทดสอบทั้ง 4 วิธีพบว่า ในสภาพอุณหภูมิ 25 °Cความแข็งแรงของเมล็ดผักกาดขาวปลีเมื่อเวลาการเก็บรักษาผ่านไป 33 เดือน มีค่าความแข็งแรงลดลงมากกว่าทุกอุณหภูมิ(5 ° C และ -10 °C) ในวิธี AAT, SSAAT, CD และ Control ดังนี้ 1.82, 7.31, 0.73 และ 4.74 ตามลำดับ ในขณะ

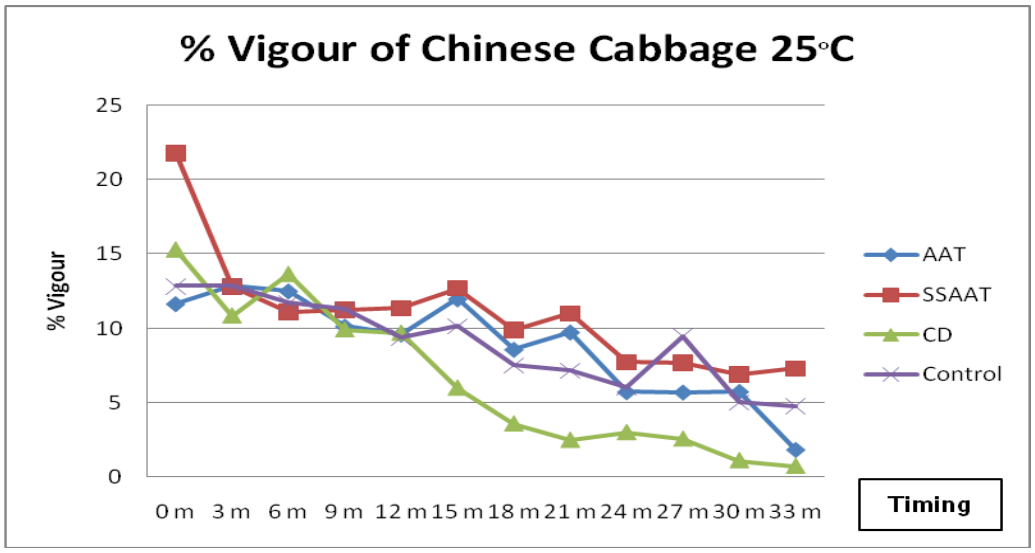
ที่แรกเริ่มมีความแข็งแรงที่ดีในทุกสภาพอุณหภูมิ มีค่าความแข็งแรงเฉลี่ยแรกเริ่มของอุณหภูมิ 5 °C, -10 °C และ 25 °Cดังต่อไปนี้ 15.55, 14.41 และ 15.40 ตามลำดับ (ตารางที่ 19) (กราฟที่ 10, กราฟที่ 11 และกราฟที่ 12)



กราฟที่ 10 Vigour percentage of Chinese Cabbage seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.



กราฟที่ 11 Vigour percentage of Chinese Cabbage seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

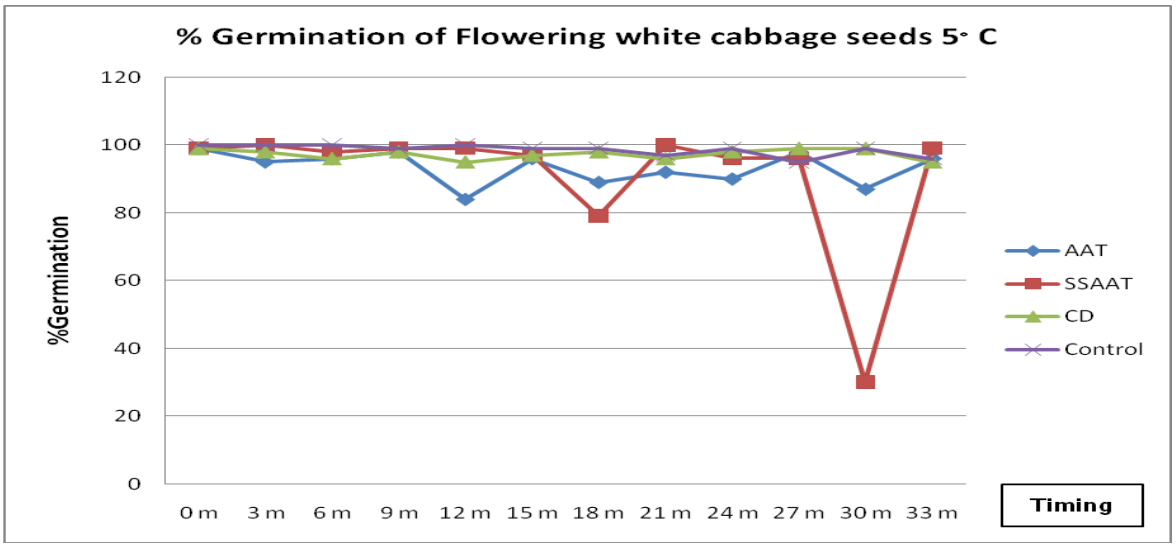


กราฟที่ 12 Vigour percentage of Chinese Cabbage seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

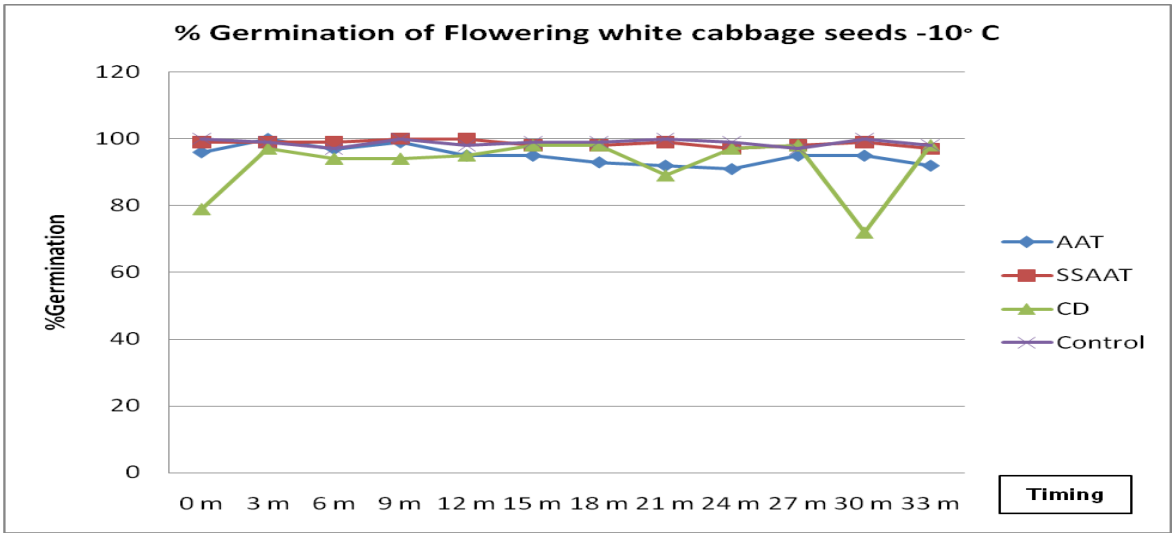
3. ผักกาดเขียวกวางตุ้ง (Flowering White Cabbage) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Brassica chinensis* L. var. parachinensis

พบว่าการเก็บรักษาเมล็ดผักกาดเขียวกวางตุ้ง (flowering white cabbage) ในทุกสภาพอุณหภูมิการเก็บรักษาคือ 5°, -10°และ 25 °C มีเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงแตกต่างกันและผลของเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงในทุกวิธีทดสอบความแข็งแรงมีค่าแตกต่างกันด้วย อีกทั้งเปอร์เซ็นต์ความงอกทุกสภาพอุณหภูมิที่เก็บรักษากับวิธีทดสอบมีค่าต่างกัน รวมถึงเวลาในการเก็บรักษาเมล็ดผักกาดเขียวกวางตุ้งเมื่อเก็บรักษาไว้ถึง 33 เดือน เปอร์เซ็นต์ความงอก/ความแข็งแรงของเมล็ดผักกาดเขียวกวางตุ้งมีค่าแตกต่างกันด้วย และทั้งทุกสภาพอุณหภูมิการเก็บรักษาเมล็ดกับเวลาและเปอร์เซ็นต์ความงอก ความแข็งแรงของเมล็ดในวิธีทดสอบกับเวลามีความแตกต่างกันด้วย และหมายรวมถึงสภาพการเก็บรักษาในทุกอุณหภูมิกับวิธีทดสอบกับเวลา ผลของเปอร์เซ็นต์ทดสอบความงอกมีค่าแตกต่างกันที่ระดับ 0.01 (ตารางที่ 20 และ 22)

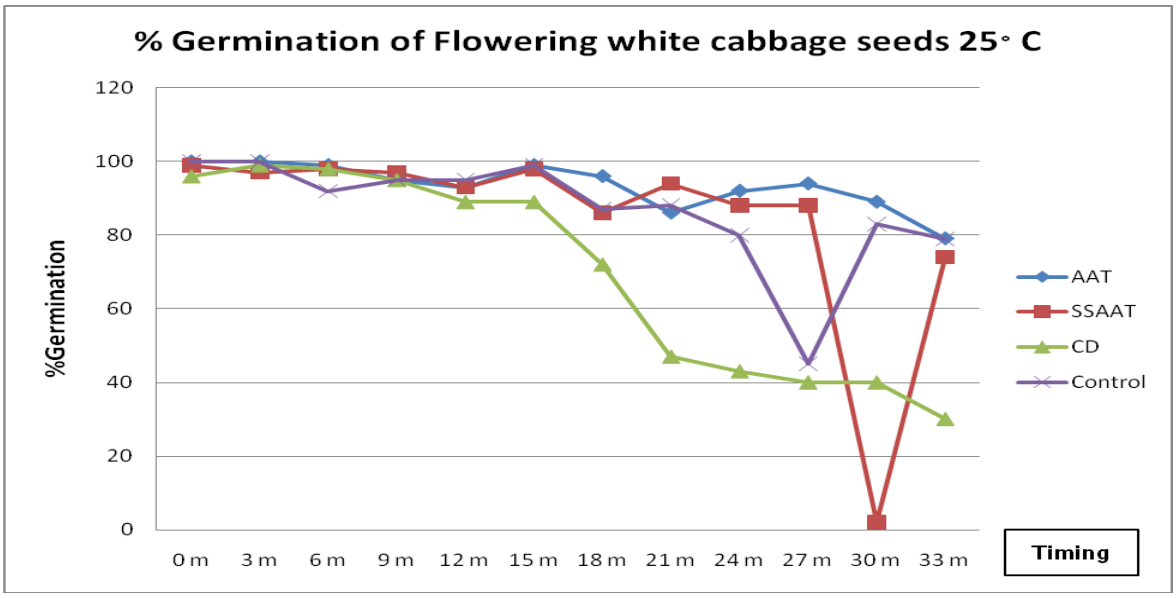
สำหรับการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวกวางตุ้งที่อุณหภูมิ 5° และ -10°C พบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกแรกเริ่มมีความงอกดีอยู่ระหว่าง 79 - 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำผักกาดเขียวกวางตุ้งที่เก็บไว้เป็นระยะเวลา 33 เดือน พบว่ายังคงมีเปอร์เซ็นต์ความงอกดีมากคือ 92 - 99 เปอร์เซ็นต์ สำหรับในสภาพอุณหภูมิ 25 °C พบว่า เมื่อนำเมล็ดผักกาดเขียวกวางตุ้งที่เก็บไว้นาน 33 เดือนมาทดสอบความงอกพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความงอกอยู่ที่ 79, 74, 30 และ 79 ในแต่ละวิธีทดสอบเรียงตามลำดับ(AAT, SSAAT,CD และ Control) พบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกมีค่าต่ำกว่าอุณหภูมิ 5° และ -10 °C (ตารางที่ 21) (กราฟที่ 13, กราฟที่ 14 และกราฟที่ 15)



กราฟที่ 13 Germination percentage of flowering white cabbage seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

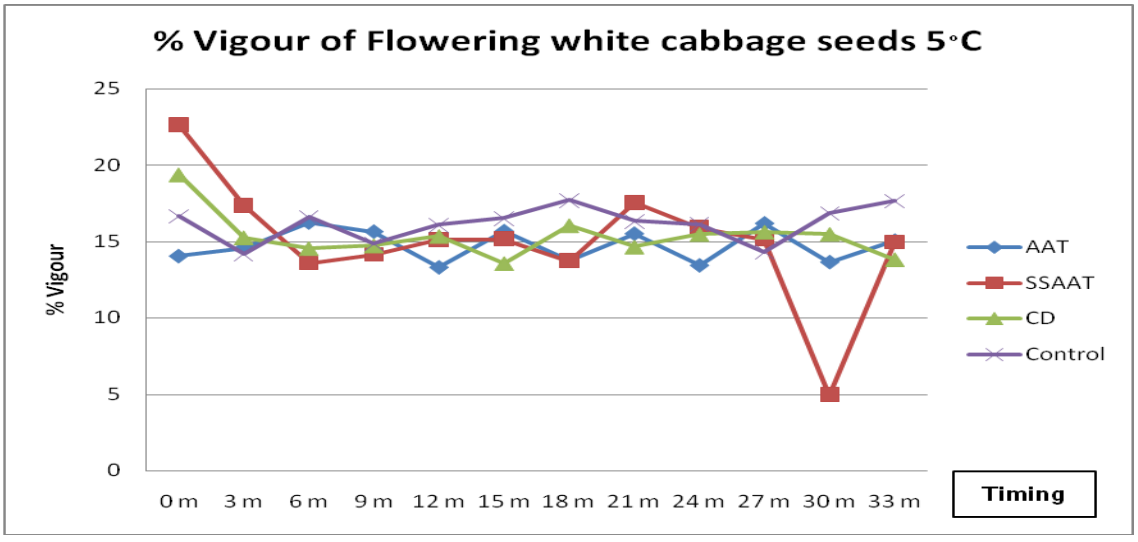


กราฟที่ 14 Germination percentage of flowering white cabbage seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

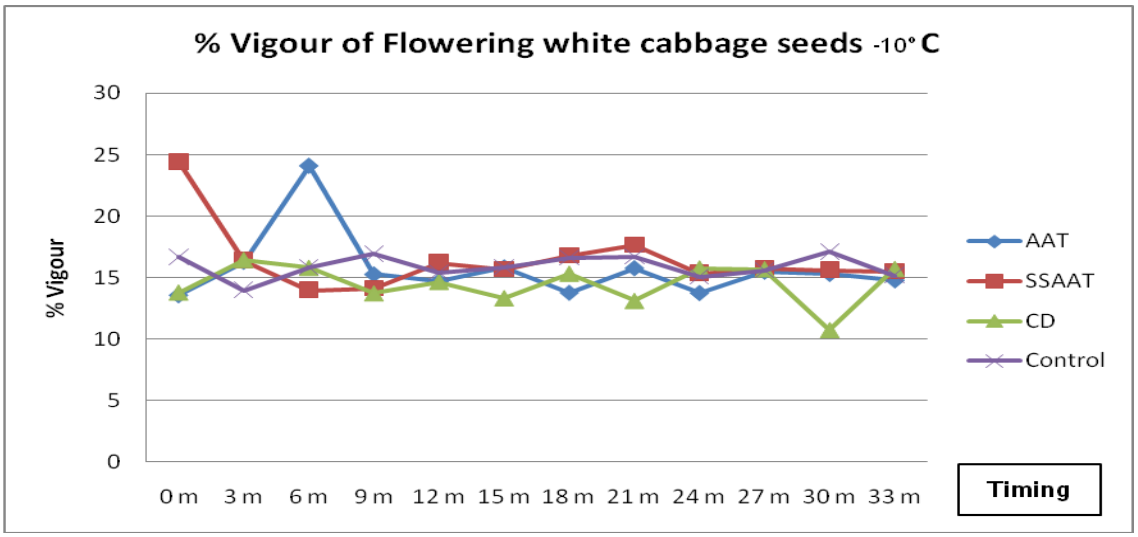


กราฟที่ 15 Germination percentage of flowering white cabbage seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

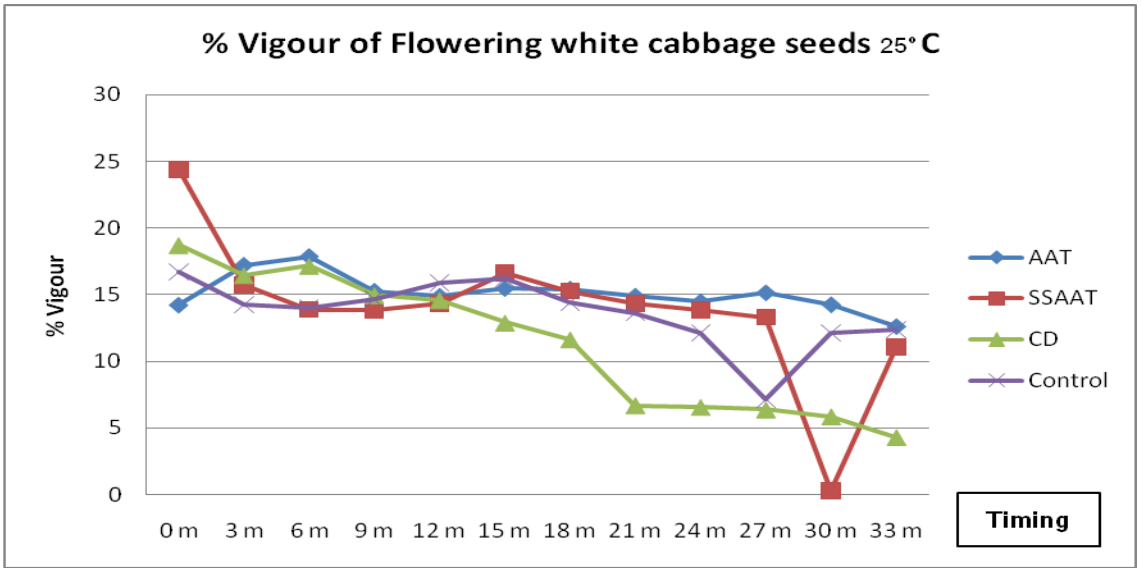
สำหรับผลของความแข็งแรงในการทดสอบความแข็งแรงด้วยวิธี AAT, SSAAT, CD และ Control พบว่า ในแต่ละสภาพอุณหภูมิ 5°, -10° และ 25 °C พบว่าความแข็งแรงเมื่อแรกเริ่มในทุกอุณหภูมิ 5°, -10°และ 25 °C มีค่าประมาณ 18.18, 17.11 และ 18.50 และเมื่อเวลาผ่านไป 33 เดือนนำเมล็ดมาทดสอบความแข็งแรงพบว่า มีค่าความแข็งแรงลดลงโดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 15.38, 15.28 และ 10.09 ของอุณหภูมิ 5°, -10°และ 25 °C ตามลำดับ (ตารางที่ 23) โดยเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงให้ผลที่สอดคล้องกัน และอุณหภูมิ 25°C ให้ผลการทดสอบความงอกและความแข็งแรงที่ต่ำกว่าอุณหภูมิ 5°C และ -10 °C (กราฟที่ 16, กราฟที่ 17 และกราฟที่ 18)



กราฟที่ 16 Vigour percentage of flowering white cabbage seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.



กราฟที่ 17 Vigour percentage of flowering white cabbage seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

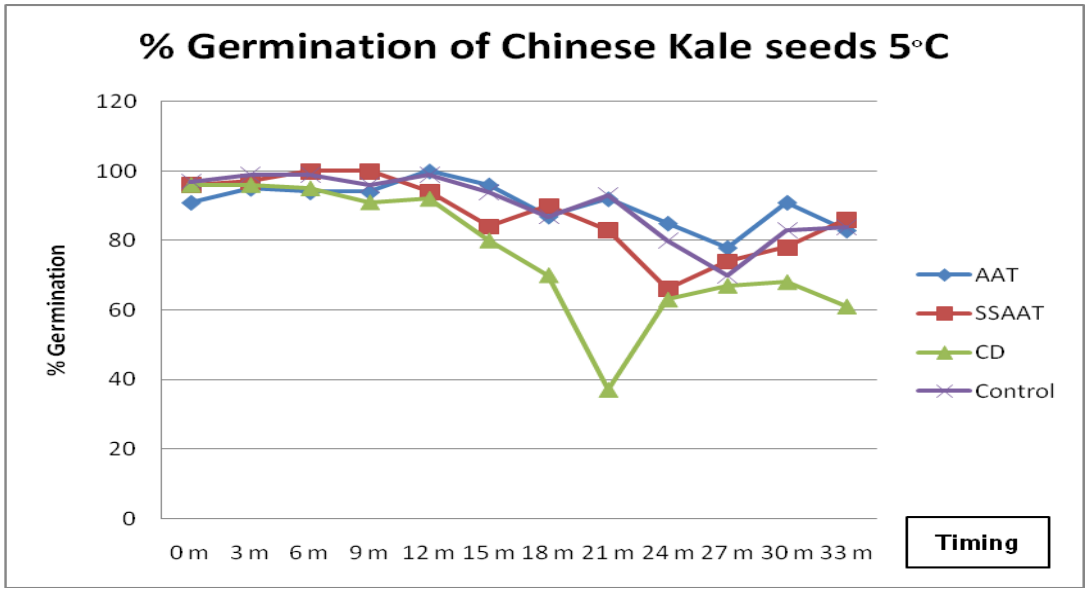


กราฟที่ 18 Vigour percentage of flowering white cabbage seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

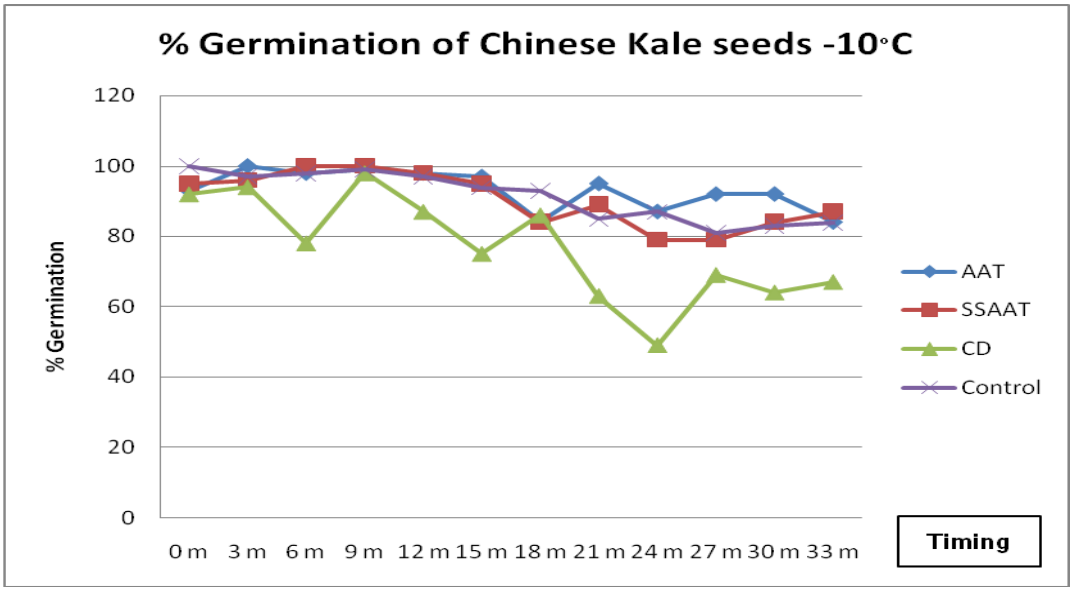
4. ผักคะน้า (Chinese Kale) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Brassica oleracea* L.var alboglabra Bailey

พบว่าการเก็บรักษาเมล็ดผักคะน้า(Chinese Kale) ในทุกสภาพอุณหภูมิการเก็บรักษาคือ 5 °C, -10 °C และ 25 °C มีเปอร์เซ็นต์ความงอกแตกต่างกัน และผลของเปอร์เซ็นต์ความงอกในทุกวิธีของวิธีทดสอบความแข็งแรงมีค่าแตกต่างกันด้วย อีกทั้งเปอร์เซ็นต์ความงอกของทุกสภาพอุณหภูมิที่เก็บรักษากับวิธีทดสอบมีค่าต่างกันอีกทั้งระยะเวลาของการเก็บรักษาเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดคะน้ามีค่าต่างกันและทุกสภาพอุณหภูมิกับเวลา, วิธีทดสอบกับเวลา รวมทั้งสภาพเก็บรักษาในทุกอุณหภูมิกับวิธีทดสอบกับเวลา ผลของเปอร์เซ็นต์ความงอกมีค่าแตกต่างกันที่ระดับ 0.01(ตารางที่ 24)

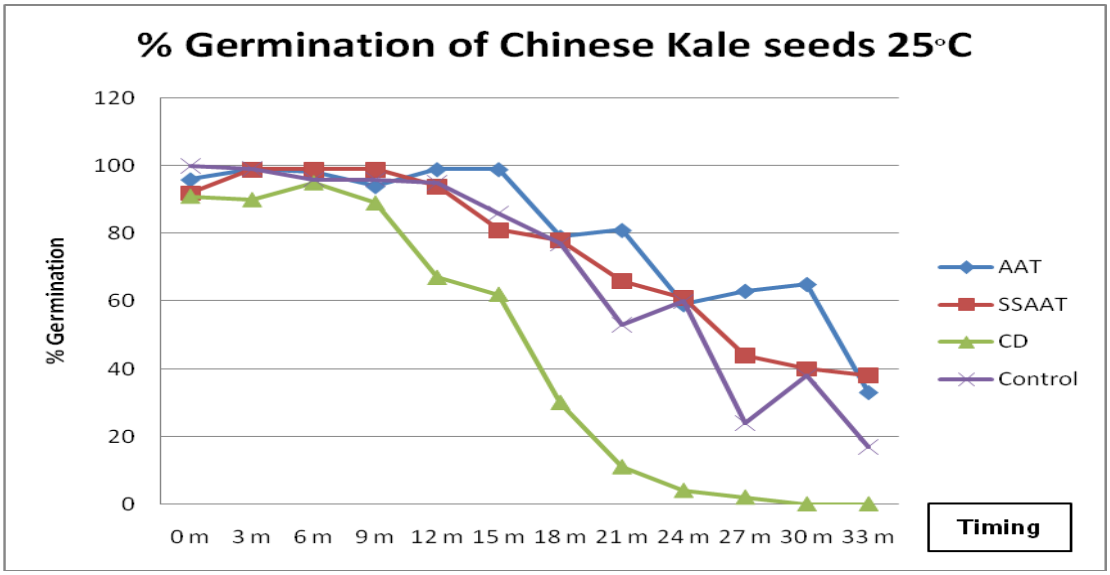
สำหรับเมล็ดคะน้าพบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกแรกเริ่มในสภาพอุณหภูมิทั้ง 3 อุณหภูมิคือ 5 °C, -10 °Cและ 25 °C มีค่าเฉลี่ยแรกเริ่มประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ทั้ง 3 อุณหภูมิ และเมื่อนำเมล็ดคะน้าที่เก็บรักษามา 33 เดือนไปทดสอบความงอกพบว่า ที่อุณหภูมิ 5° และ -10 °C มีค่าเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ยเป็น 79 และ 80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับที่อุณหภูมิ 25 °C พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ยลดลงเป็น 22 เปอร์เซ็นต์โดยเฉลี่ย (กราฟที่ 19, กราฟที่ 20 และกราฟที่ 21)



กราฟที่ 19 Germination percentage of Chinese Kale seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

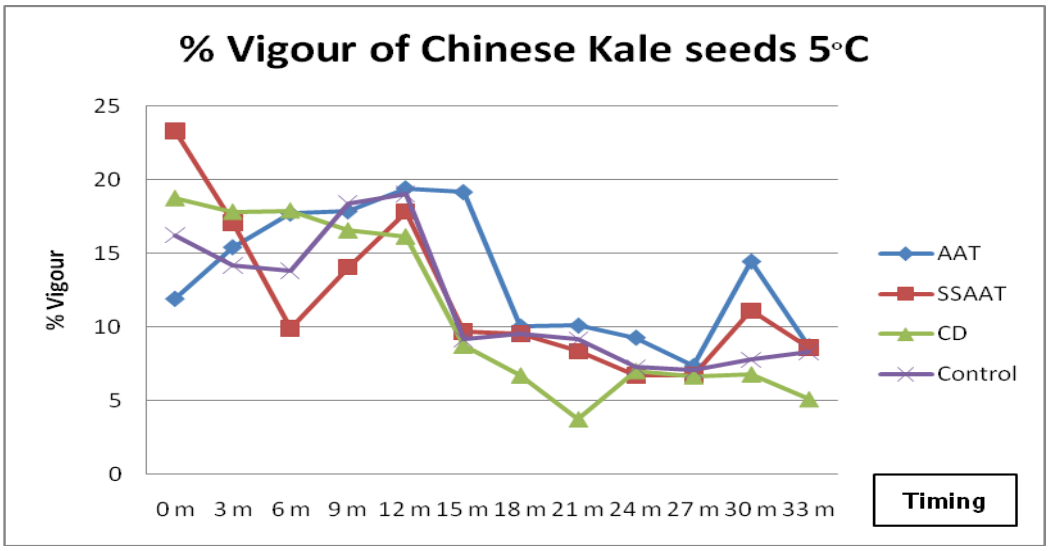


กราฟที่ 20 Germination percentage of Chinese Kale seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.



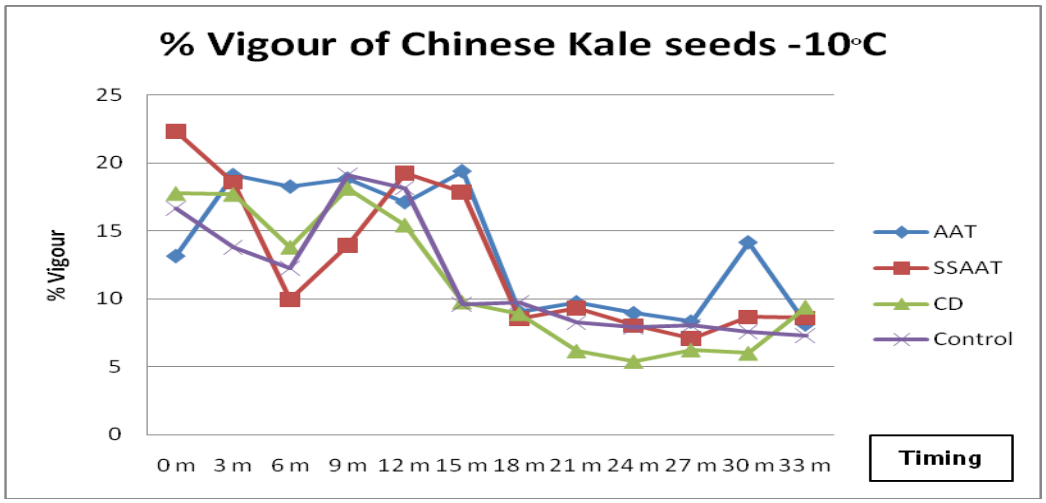
กราฟที่ 21 Germination percentage of Chinese Kale seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

และสำหรับความแข็งแรงของเมล็ดคะน้าที่อุณหภูมิ 5 °C พบว่าในทุกวิธีทดสอบมีค่าแตกต่างกัน และพบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษามีค่าแตกต่างกัน รวมทั้งวิธีการทดสอบกับระยะเวลาการเก็บรักษามีค่าต่างกัน ดังตารางที่ 26 สำหรับความแข็งแรงของเมล็ดผักคะน้าแรกเริ่มนั้นมีค่าเฉลี่ย 17.55 เมื่อเก็บรักษาเมล็ดผักคะน้าเป็นเวลา 12 เดือนยังคงมีความแข็งแรงอยู่ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 15 เดือนค่าความแข็งแรงของเมล็ดคะน้าที่ทดสอบนั้นพบว่ามีค่าลดลงเป็น 9.15 และ เมื่อเก็บรักษาเมล็ดผักคะน้าไว้นาน 33 เดือน พบว่ามีความแข็งแรงลดลงเหลือที่ค่าความแข็งแรงเฉลี่ย 7.68 ดังตารางที่ 27 (กราฟที่ 22)



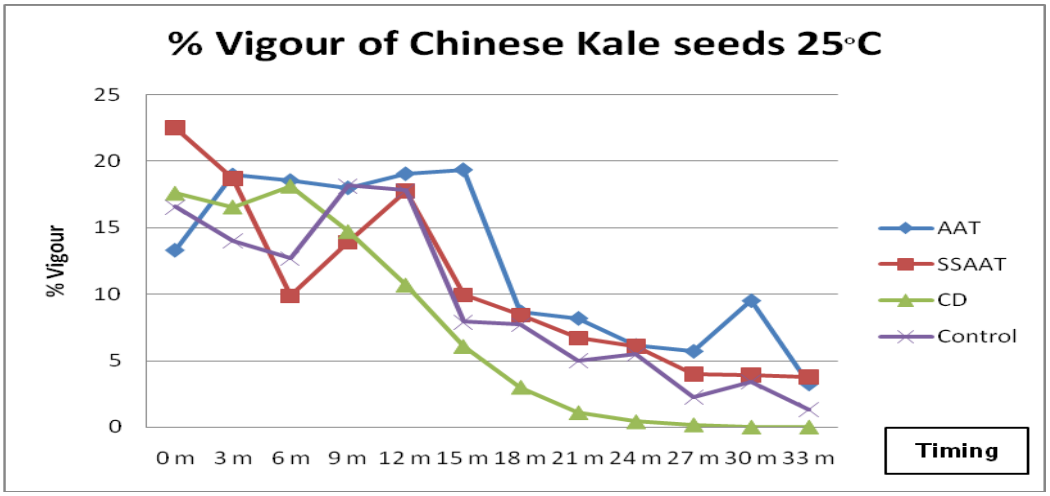
กราฟที่ 22 Vigour percentage of Chinese Kale seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

ที่สภาพอุณหภูมิ -10 °C พบว่าในทุกวิธีทดสอบมีค่าแตกต่างกันเช่นกันกับอุณหภูมิ 5°C และพบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษามีค่าแตกต่างกัน รวมถึงวิธีทดสอบกับระยะเวลาในการเก็บรักษามีค่าแตกต่างกัน (ตารางที่ 28) สำหรับความแข็งแรงของเมล็ดผักคะน้าแรกเริ่มนั้นมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 17.48 และเมื่อนำเมล็ดคะน้าจากการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -10 °C นาน 33 เดือน พบว่ามีความแข็งแรงเหลือ 8.34(ตารางที่ 29) (กราฟที่ 23)



กราฟที่ 23 Vigour percentage of Chinese Kale seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

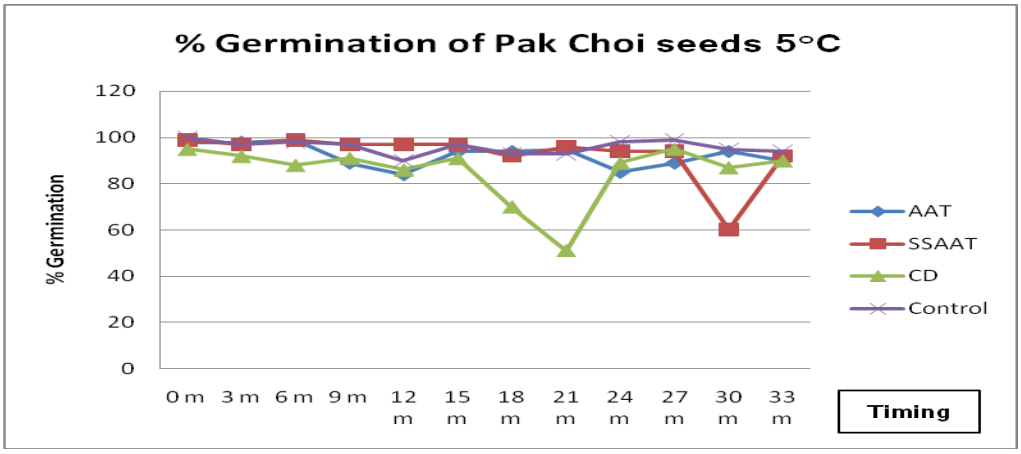
ที่สภาพอุณหภูมิ 25 °C ค่าความแข็งแรงของเมล็ดคะน้าในทุกวิธีแตกต่างกันและพบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษามีค่าแตกต่างกัน รวมถึงทุกวิธีกับเวลามีผลแตกต่างกัน (ตารางที่ 30) สำหรับผลของความแข็งแรงในทุกวิธีต่างๆ พบว่าแรกเริ่มเก็บรักษามีค่าความแข็งแรงเฉลี่ย 17.51 หากเมื่อนำเมล็ดคะน้าไปทดสอบเมื่อเก็บรักษาไว้ 33 เดือน พบว่ามีค่าความแข็งแรงเฉลี่ยเป็น 2.09 (ตารางที่ 31) (กราฟที่ 24)



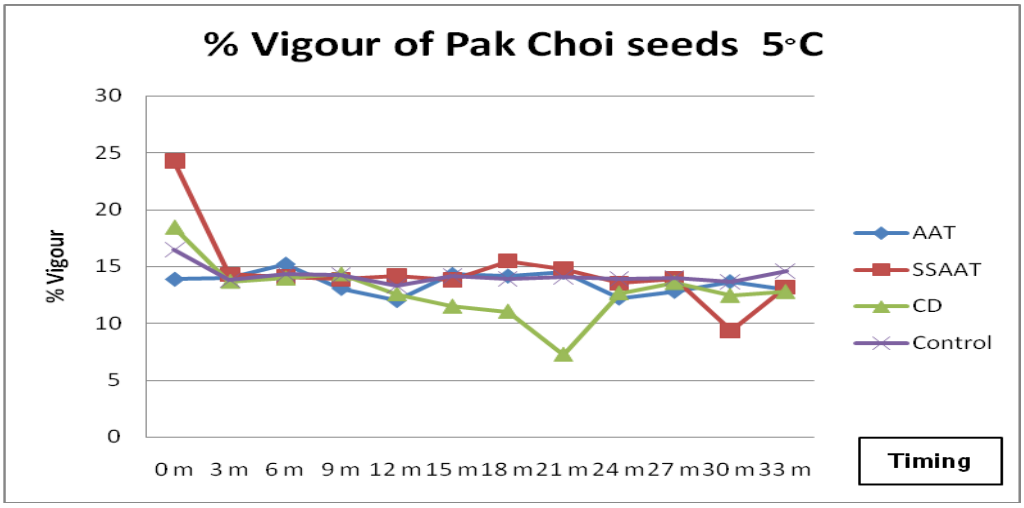
กราฟที่ 24 Vigour percentage of Chinese Kale seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

5. ผักกาดฮ่องเต้ Pak Choi ชื่อวิทยาศาสตร์ *Brassica chinensis* var. chinensis

ที่อุณหภูมิ 5°C พบว่า เปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงในวิธีทดสอบความแข็งแรงทั้ง 4 วิธี มีค่าแตกต่างกัน ระยะเวลาในการเก็บรักษาเมล็ดผักกาดฮ่องเต้มีค่าต่างกันด้วย รวมทั้งวิธีทดสอบความแข็งแรงด้วยวิธีต่างๆ (AAT, SSAAT, CD และ Control) กับระยะเวลาที่เก็บรักษาพบว่ามีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 32 และตารางที่ 34) และพบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ที่ทดสอบความแข็งแรงในทุกวิธีทดสอบ (AAT, SSAAT, CD และ control) มีค่า 98, 99, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาเมล็ดผักกาดฮ่องเต้เป็นเวลาถึง 33 เดือน แล้วนำมาทดสอบความงอกในแต่ละวิธี พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ความงอกเป็น 90, 92, 90 และ 94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 33) (กราฟที่ 25) สำหรับความแข็งแรง (V) พบว่าวิธีการทดสอบ AAT, SSAAT, CD และ Control แรกเริ่ม มีค่า 13.86, 24.27, 18.46 และ 16.50 ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ไว้ที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 33 เดือน พบว่ามีค่า 12.98, 13.20, 12.79 และ 14.59 ตามลำดับ (ตารางที่ 35 และกราฟที่ 26)

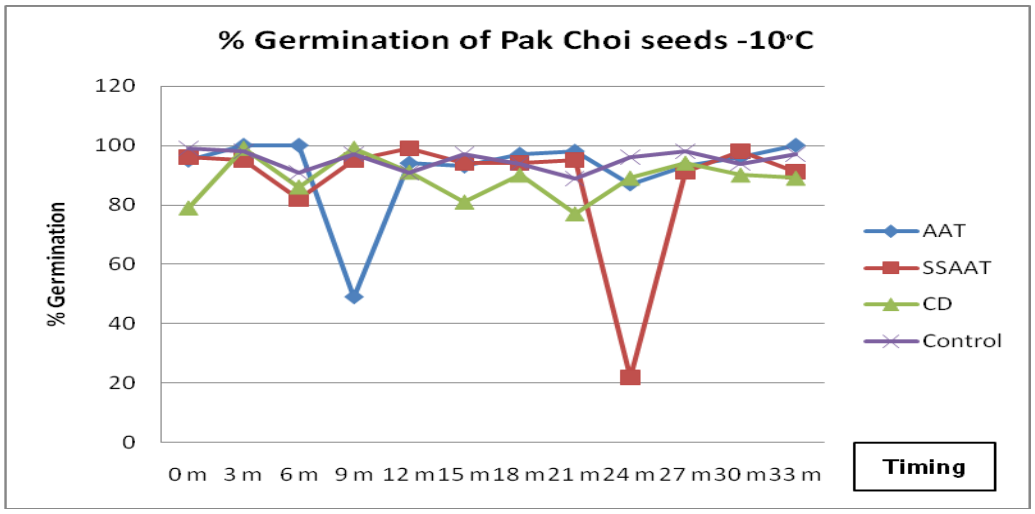


กราฟที่ 25 Germination percentage of Pak Choi seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

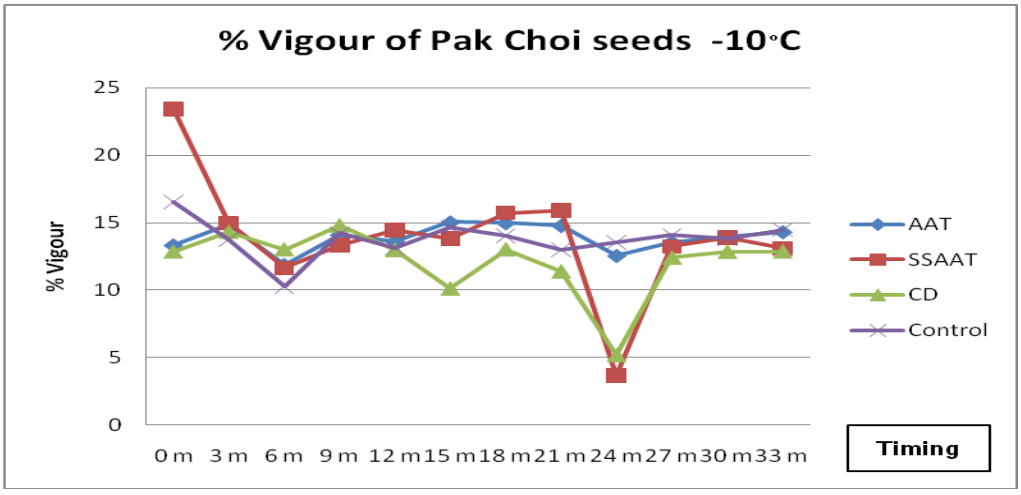


กราฟที่ 26 Vigour percentage of Pak Choi seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

<u>ที่อุณหภูมิ -10°C</u>พบว่า ทุกวิธีทดสอบเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงมีค่าต่างกัน และระยะเวลาในการเก็บรักษามีความแตกต่างกันด้วย รวมทั้งวิธีทดสอบกับระยะเวลาในการเก็บรักษามีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 36 และตารางที่ 38) และพบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกแม้เวลาในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ผักกาดฮ่องเต้เป็นระยะเวลา 33 เดือน ยังคงมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ยรวมสูงถึง 94 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 37) (กราฟที่ 27) สำหรับความแข็งแรงของเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ ที่ทดสอบความแข็งแรงในทุกวิธีทดสอบ (AAT, SSAAT, CD และ Control) มีค่าเฉลี่ยแรกเริ่มเป็น 16.54 และเมื่อเก็บรักษาเมล็ดผักกาดฮ่องเต้เป็นเวลา 33 เดือน แล้วนำออกมาทดสอบในวิธีทดสอบความแข็งแรงต่างๆ พบว่ามีค่าความแข็งแรงเฉลี่ย 13.69 (ตารางที่ 39 และกราฟที่ 28)

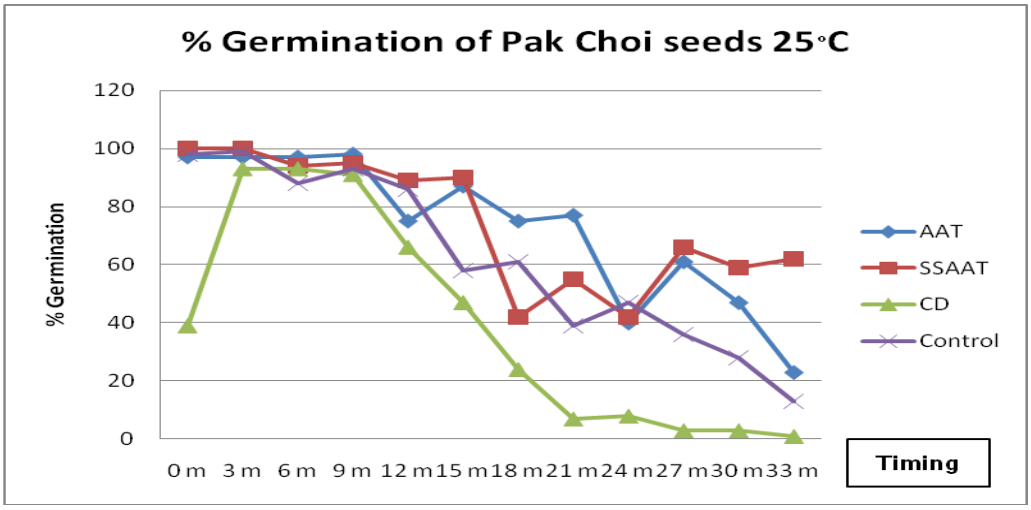


กราฟที่ 27 Germination percentage of Pak Choi seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

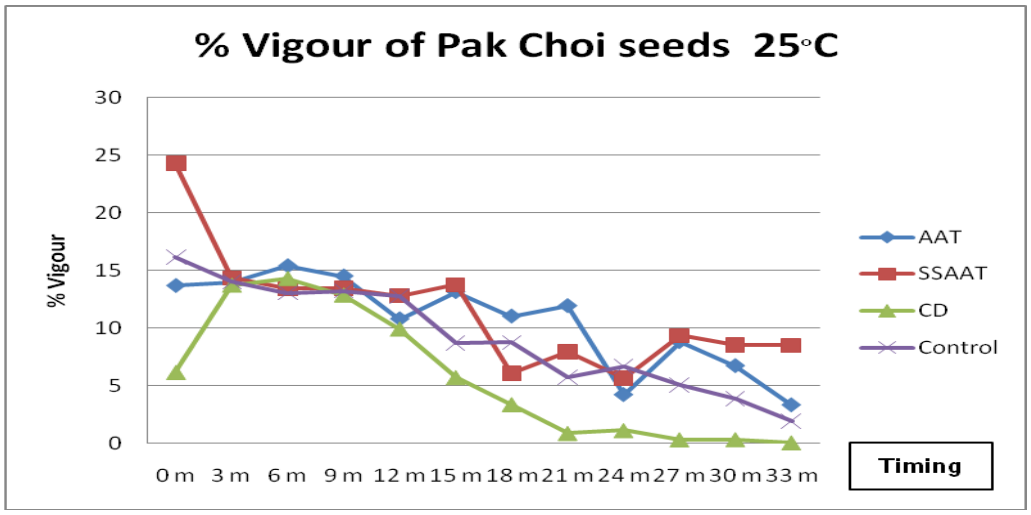


กราฟที่ 28 Vigour percentage of Pak Choi seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

<u>ที่อุณหภูมิ 25°C</u> พบว่าสอดคล้องกันกับอุณหภูมิ 5°C และ -10°C กล่าวคือ เปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงในวิธีทดสอบความแข็งแรงทั้ง 4 วิธี มีค่าแตกต่างกันระยะเวลาในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ผักกาดฮ่องเต้มีค่าต่างกันด้วย รวมทั้งวิธีทดสอบความแข็งแรงด้วยวิธีต่างๆ (AAT, SSAAT, CD และ Control) กับระยะเวลาที่เก็บรักษาพบว่ามีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 40 และ ตารางที่ 42) และพบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ ที่ทดสอบในวิธีทดสอบความแข็งแรงด้วยวิธีต่างๆ นั้น มีค่าแรกเริ่ม เฉลี่ย 84% และเมื่อนำเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ที่เก็บรักษาไว้นาน 33 เดือน มาทดสอบความงอกพบว่ามีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 25% เท่านั้น (ตารางที่ 41) (กราฟที่ 29) สำหรับความแข็งแรงก็เช่นกัน ในระยะแรกมีความแข็งแรงอยู่ที่ค่าเฉลี่ยของทุกวิธีการทดสอบ คือ 15.11 และ เมื่อนำเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ออกมาทดสอบจากที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 25°C แล้วพบว่ามีค่าความแข็งแรงเฉลี่ยอยู่ที่ 3.47 (ตารางที่ 43 และกราฟที่ 30)



กราฟที่ 29 Germination percentage of Pak Choi seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.



กราฟที่ 30 Vigour percentage of Pak Choi seeds in the experiment during 33 months conservation (12 times) in DOA Genebank were shown.

ผลของความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ ในสภาพปลอดเชื้อ (-196°C)

เมล็ดพันธ์ผักจำนวน 5 ตัวอย่าง ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ มาทดสอบหาช่วงเวลาในการแช่สาร loading solution เป็นเวลา 10 และ 20 นาที แล้วดึงน้ำออกด้วย silica gel เป็นเวลา 14 และ 21 ชั่วโมง พบว่า เมล็ดผักทั้ง 5 ตัวอย่าง ที่ไม่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวมีการอัตราการรอดชีวิตเป็น 100% ทุกการทดลอง โดยที่เมล็ดพันธุ์ผักสามารถงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์บนอาหาร MS เป็นเวลา 14 วัน แสดงว่า ระยะเวลาในการแช่สาร loading solution ที่เวลา 10 และ 20 นาที และระยะเวลาในการใช้ silica gel เป็นเวลา 14 และ 21 ชั่วโมง ไม่ทำให้เมล็ดพันธุ์ผักทั้ง 5 ชนิดได้รับความเสียหาย ส่วนเมล็ดพันธุ์ผักที่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวมีอัตราการรอดชีวิต (ตารางที่ 1-5) โดยที่เมล็ดผักสามารถงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์บนอาหาร MS เป็นเวลา 14 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการเก็บรักษาเมล็ดผักในไนโตรเจนเหลวเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ผัก โดยที่เมล็ดที่นำมาเก็บรักษาจะต้องเป็นเมล็ดที่มีคุณภาพดีและมีความแข็งแรง

ตารางที่ 1 แสดงอัตราการรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวช่วงเวลาต่าง ๆ ของเมล็ดผักกาดหอม

Silica gel / LS (min.)	14 ชั่วโมง	21 ชั่วโมง
10 นาที	66.67%	66.67%
20 นาที	100.00%	100.00%

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวช่วงเวลาต่าง ๆ ของเมล็ดผักกาดขาวปลี

Silica gel / LS (min.)	14 ชั่วโมง	21 ชั่วโมง
10 นาที	84.60%	81.25%
20 นาที	90.90%	60.00%

ตารางที่ 3 แสดงอัตราการรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวช่วงเวลาต่าง ๆ ของเมล็ดเขียวกวางตุ้งดอก

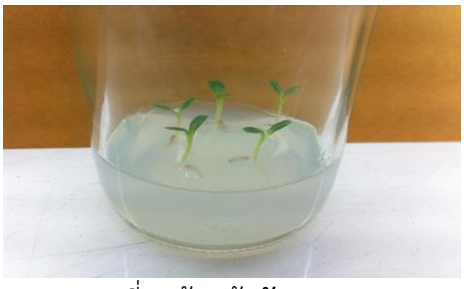
Silica gel / LS (min.)	14 ชั่วโมง	21 ชั่วโมง
10 นาที	25.00%	58.30%
20 นาที	75.00%	91.60%

ตารางที่ 4 แสดงอัตราการรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวช่วงเวลาต่าง ๆ ของเมล็ดผักคะน้า

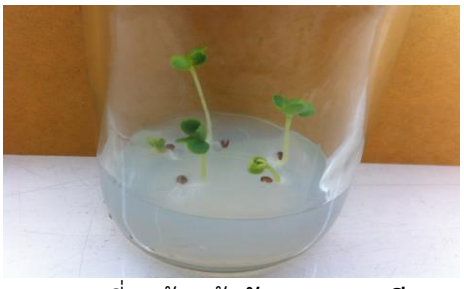
Silica gel / LS (min.)	14 ชั่วโมง	21 ชั่วโมง
10 นาที	91.70%	100.00%
20 นาที	50.00%	91.70%

ตารางที่ 5 แสดงอัตราการรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวช่วงเวลาต่าง ๆ ของเมล็ดผักกาดฮ่องเต้

Silica gel / LS (min.)	14 ชั่วโมง	21 ชั่วโมง
10 นาที	100.00%	100.00%
20 นาที	91.70%	100.00%



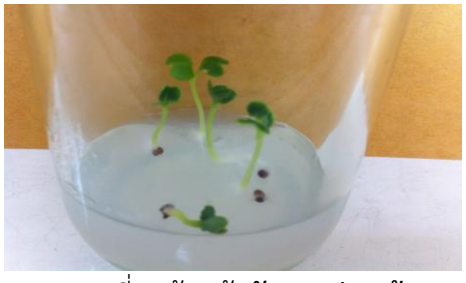
ภาพที่ 1 ต้นกล้า**ผักกาดหอม**



ภาพที่ 2 ต้นกล้า**ผักกาดขาวปลี**

ภาพที่ 3 ต้นกล้า**เขียวกวางตุ้งดอก**

ภาพที่ 4 ต้นกล้า**ผักคะน้า**



ภาพที่ 5 ต้นกล้า**ผักกาดฮ่องเต้**

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

วิธีการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ เพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช พบว่าในผักทั้ง 5 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงเมื่อทดสอบด้วยวิธีต่างๆ ทั้ง 4 วิธี พบว่ามีความแตกต่างกัน สำหรับการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ ในสภาพอุณหภูมิต่างๆ กันของห้องเก็บรักษาที่มีอยู่ ได้แก่อุณหภูมิ 5°C , -10°Cและ 25°C พบว่า ใน**ผักกาดหอม** ที่อุณหภูมิ 5°C เปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงยังดีมากในทุกวิธีการทดสอบ สำหรับอุณหภูมิ -10°C พบว่ามีวิธี control มีความแข็งแรงสูงสุด คือ 19.13 ถึงแม้เก็บเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมรักษาไว้นานถึง 33 เดือน ในขณะที่วิธีอื่นๆ มีค่า AAT, SSAAT และ CD มีค่าความแข็งแรงเป็น 13.52, 15.12 และ 13.71 ตามลำดับ สำหรับอุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าเริ่มไม่งอก แม้วิธีเพาะแบบธรรมดา (Control) และเมื่อเก็บรักษานานถึง 24 เดือนพบว่าไม่มีความงอกเลย **ผักกาดขาวปลี** พบว่าที่อุณหภูมิ 25°C ความแข็งแรงของเมล็ดผักกาดขาวปลีลดลงมากกว่าอุณหภูมิ 5, -10°Cและมีความสอดคล้องกับผักอื่นๆ สำหรับผักกาดขาวปลีพบว่า ที่อุณหภูมิ 25°C เมื่อเก็บรักษานาน 33 เดือน ความงอกเมื่อทดสอบด้วยวิธี AAT SSAAT CD และ Control ลดลงเป็น 13, 51, 5 และ33% ตามลำดับ สำหรับ**ผักกาดเขียวกวางตุ้ง** มีความงอกเมื่อเก็บรักษานาน 33 เดือน ยังคงดีมากที่อุณหภูมิ 25°C เป็น 79, 74, 30 และ 79% ตามลำดับ และ**ผักคะน้า** มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเป็น 33, 38, 0 และ 17% ตามลำดับ สำหรับ**ผักกาดฮ่องเต้**มีเปอร์เซ็นต์ความงอกสุดท้ายของอุณหภูมิ 25°C เป็น 23, 62, 1 และ 13% ตามลำดับ

โดยสรุป

1. ที่อุณหภูมิ 5°C และ -10°C ของการเก็บรักษามีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดผักและความแข็งแรงมากกว่าเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25°C

2. สำหรับวิธี Control แสดงผลมีเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงสูงสุดตามด้วยวิธี SSAAT, AAT และ CD ตามลำดับ

3. เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ไม่สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25°C ระยะเวลานานเกิน 21 เดือน

4. สำหรับเมล็ดพันธุ์ผักทั้ง 5 ชนิด สามารถเก็บรักษาในอุณหภูมิ -10°C และ 5°C ได้ดีกว่า 25°C และสามารถเก็บรักษาได้นานกว่า 33 เดือน

สำหรับการทดลองวิธีการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ ในสภาพปลอดเชื้อ (-196°C) การเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง (-196°C) โดยวิธี Encapsulation – dehydration ทดลองที่ห้องปฏิบัติการโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พระราชวัง สวนจิตรลดา ซึ่งมีงานวิจัยร่วมกับธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร สำหรับผลการทดลองพบว่าเมล็ดพันธุ์ผัก ทั้ง 5 ชนิดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาทดสอบการรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวมีอัตราการรอดชีวิตเป็น 100% ทุกการทดลอง โดยที่เมล็ดพันธุ์ผักสามารถงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์บนอาหาร MS เป็นเวลา 14 วัน แสดงว่าระยะเวลาในการแช่สาร loading solution ที่เวลา 10 และ 20 นาที และระยะเวลาในการใช้ silica gel เป็นเวลา 14 และ 21 ชั่วโมง ไม่ทำให้เมล็ดพันธุ์ผักทั้ง 5 ชนิดได้รับความเสียหาย พบว่ามีค่าความงอกของ**ผักกาดหอม ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้** มีความงอกถึง 100% ใน **ผักกาดขาวปลี** และ**ผักกาดเขียวกวางตุ้ง** มีความงอก 60 - 90.9% และ และ 25 – 91.60 % ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเมล็ดผักสามารถรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวและสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าปกติได้การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ผักในสภาพเยือกแข็งเป็นทางเลือกหนึ่งในการเก็บรักษาพันธุ์ผัก ซึ่งอาจช่วยลดต้นทุนในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์โดยไม่ต้องนำเมล็ดเพื่อออกปลูกขยาย

การทดลองที่ 2 : เทคนิคการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช**ชื่อการทดลอง**

: Seed Conservation of *Coix lacryma-jobi* L.

ชื่อผู้วิจัย

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวเสาวณี เดชะคำภู

ผู้ร่วมงาน : 1. นางสาวอัญชลี แก้วดวง

: 2. นางสาวชลลดา สามพันพวง

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำสำคัญ (Key words)

เมล็ดเชื้อพันธุ์เดือย พันธุ์เดือย ความชื้นในเมล็ดพันธุ์ อุณหภูมิในการเก็บรักษา การเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง ไนโตรเจนเหลว อายุการเก็บรักษา ความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ ความแข็งแรงเมล็ดพันธุ์

Coix lachryma-jobi L., seed moisture content, Temperature, cryopreservation, seed storage, seed viability

บทคัดย่อ

การศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช ได้ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการและเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์ของกลุ่มวิจัยและพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ระหว่างเดือนตุลาคม 2558 - กันยายน 2561 โดยศึกษาระดับเปอร์เซ็นต์ความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่ออายุการเก็บรักษา แบ่งเป็น 4 การทดลอง ตามอุณหภูมิการเก็บรักษา คือ สภาพอุณหภูมิห้อง 5 องศาเซลเซียส -10 องศาเซลเซียส และสภาพเยือกแข็ง (-196 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 27 เดือน แต่ละการทดลองวางแผนการทดลองแบบ Split plot design จำนวน 4 ซ้ำ main plot คือ ระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ 5 ระดับ ได้แก่ 18 (เริ่มต้น), 12, 10, 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ และ sub plot คือ ระยะเวลาในการเก็บรักษา 27 เดือน โดยเก็บข้อมูลความมีชีวิตและความแข็งแรงทุก 3 เดือน รวม 10 ระดับ พบว่าระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ก่อนการเก็บรักษาและอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่อความมีชีวิตและความแข็งแรงของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือย เมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยที่มีความชื้นในเมล็ด 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ สามารถเก็บรักษาได้นาน 27 เดือน เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 5 องศาเซลเซียส -10 องศาเซลเซียส และสภาพเยือกแข็ง นอกจากนี้การเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส สามารถลดความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยให้เหลือ 12 เปอร์เซ็นต์ หรือต่ำกว่าได้โดยยังคงเก็บรักษาได้ภายในระยะเวลา 27 เดือน

Abstract

Conservation of *Coix lachryma-jobi* L. Seed was studied from October 2015 to September 2018. This research was studied on seed moisture content (%) and storage temperature which divided into four experiments according to storage condition; room temperature (28.96±2.02 ℃), 5 ℃, -10 ℃ and -196 ℃ by using Split plot design with 4 replications. The Main plot was seed moisture content (%) at different levels; 18 (initial), 12, 10, 8, and 6. The sub plot was 10 levels of storage period (months) and checked the seeds viability and vigor. The result showed that seed moisture content before storage and storage temperature affected the Coix seeds viability and vigor seeds. The optimum moisture contents (%) for all storage temperature were 8 or 6 because the seeds still remained the same viability and vigor after 27 months of storage. In addition, the temperature storage at 5 ℃ could reduce the

moisture level in the seeds to 12 % or lower because the Coix seed could remain their viability and vigor after storage for 27 months.

บทนำ

เดือยเป็นธัญพืชพื้นเมืองของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จัดเป็นพืชอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่สำคัญก่อนการใช้ประโยชน์จากข้าวโพดและข้าวเป็นอาหารหลัก ในส่วนที่รับประทานได้ของเมล็ดเดือย มีน้ำ 10.1-15.0 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 9.1-23 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.5-6.1 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 58.3-77.2 เปอร์เซ็นต์ เส้นใย 0.3-8.4 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 0.7-2.6 เปอร์เซ็นต์ และให้ค่าพลังงานประมาณ 1,500 กิโลแคลอรี (PROSEA, 2001) จิราภรณ์ (2552) ได้รายงานเกี่ยวกับการวิจัยของนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มีสารสำคัญหลายชนิดซึ่งออกฤทธิ์ทางยาต่อร่างกาย เช่นสารโคอิกแซน เอ บี ซี (coixan A B C) สามารถคลายอาการเกร็งของกล้ามเนื้อ ลดความดันโลหิต ลดระดับน้ำตาลในเลือด และลดอุณหภูมิร่างกาย สารโคอิกซีโนไลด์ (coixenolide) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอก และป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง สารจำพวกไขมันธรรมชาติ (natural lipid) ที่สกัดได้จากส่วนของเอนโดสเปิร์ม (endosperm) ด้วยอะซิโตน มีฤทธิ์ต้านการเกิดมะเร็งที่ตับอ่อน Kuo *et al* (2002) พบสารประกอบในกลุ่มของโพลีฟีนอลิก (polyphenolic) มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุของการเกิดริ้วรอย การเกิดออกซิเดชั่นที่อวัยวะต่างๆ และป้องกันการเริ่มต้นของการเกิดเนื้องอกเนื่องจากกระบวนการออกซิเดชั่น Chiang *et al* (2002) ยังพบว่ามีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก (prebiotic) สามารถทำให้มีปริมาณกรดไขมันสายสั้นเพิ่มขึ้นในลำไส้ และช่วยลดปริมาณของไขมันและคลอเรสเตอรอลในเลือด มีกรดอะมิโนทุกชนิดที่สูงกว่าความต้องการตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก ยกเว้นเมทไธโอนีนและไลซีน นอกจากนี้ยังอุดมไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับร่างกาย โดยเฉพาะฟอสฟอรัส วิตามินบี 1 ซึ่งมีในปริมาณมากกว่าข้าวกล้อง ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำเดือยไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยา และอาหารเพื่อสุขภาพกันอย่างแพร่หลาย และเป็นที่นิยมบริโภคในหลายประเทศ เช่น จีน มาเลเซีย สิงคโปร์ เกาหลี ไต้หวัน และฮ่องกง

ในปัจจุบันมีการปลูกเดือยเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญเป็นอันดับรองทั่วไปในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน โดยเฉพาะในอินเดีย จีน ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย ประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน รวมทั้งประเทศไทย โดยเป็นพืชไร่ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของท้องถิ่นอย่างน้อย 40 ปีมาแล้ว แหล่งปลูกเดือยในอดีตอยู่ที่อำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา และอำเภอลำนารายณ์ จังหวัดลพบุรี และขยายไปยังจังหวัดต่างๆหลายจังหวัดในแถบภาคเหนือ และตะวันออกเฉียงเหนือ จนสุดท้ายการผลิตตกต่ำเพราะความต้องการของตลาดต่างประเทศลดลงทำให้ราคาตก ประกอบกับโรคราเขม่าดำระบาดรุนแรง พื้นที่เพาะปลูกจึงลดลงเหลือเพียงจังหวัดเลยที่ปลูกมากที่สุดโดยแหล่งเพาะปลูกอยู่ในอำเภอภูหลวง วังสะพุง เมือง และอำเภอปากชม สมเกียรติ (2547) รายงานระหว่างปี 2541-2546 เดือยมีพื้นที่ปลูกทั่วประเทศ 38,965 - 75,021 ไร่ เฉพาะที่จังหวัดเลยมีพื้นที่ปลูก 20,190 - 52,117 ไร่ ผลผลิตประมาณ 90-95 เปอร์เซ็นต์ ส่งขายต่างประเทศ ที่เหลือ 5-10 เปอร์เซ็นต์ บริโภคภายในประเทศ

พันธุ์เดือยที่ใช้เพาะปลูกในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นเดือยพันธุ์พื้นเมือง เช่นเดือยขบ เดือยหิน และที่ปลูกเป็นการค้าคือเดือยข้าวเจ้าและข้าวเหนียว ซึ่งเกษตรกรจะเก็บเมล็ดไว้ทำพันธุ์ทุกปีติดต่อกันเป็นเวลามากกว่า 10 ปี หรือนำมาจากพ่อค้าปะปนกันจากแหล่งต่างๆ ก่อให้เกิดความไม่สม่ำเสมอของพันธุ์ส่งผลต่อผลผลิตและคุณภาพต่ำ ทางกรมวิชาการเกษตรได้ทำการค้นคว้าวิจัยเรื่องเดือยตั้งแต่ ปี พ.ศ.2524 และในระหว่างปี พ.ศ. 2539- 2545 ได้ทำการรวบรวมพันธุ์จากแหล่งต่างๆ และปรับปรุงพันธุ์จนได้เดือยข้าวเหนียวพันธุ์เลย แต่หลังจากนั้นการศึกษาวิจัยในเดือยได้ชะลอและสิ้นสุดลง

ธนาคารเชื้อพันธุ์พืชได้มีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมเดือยบางสายพันธุ์จากงานปรับปรุงพันธ์เดือยของกรมวิชาการเกษตร และประสบปัญหาในเรื่องของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยที่นำเข้ามาอนุรักษ์มีความมีชีวิตต่ำและขาดข้อมูลในการจัดการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมเดือยให้สามารถเก็บรักษาได้ยาวนาน ประกอบกับเมล็ดเดือยถ้าเก็บรักษาในสภาพอากาศไม่เหมาะสมจะสูญเสียความงอก และเสื่อมคุณภาพอย่างรวดเร็ว (PROSEA, 2001) และในทางการค้าเมล็ดสามารถเก็บไว้เพื่อการขยายพันธุ์ได้เพียง 2-3 ปี (Royal Botany Gardens, 2008) โดยปัจจัยที่มีผลต่ออายุการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์ เช่น ชนิดพืช พันธุ์พืช คุณภาพของเมล็ดเชื้อพันธุ์ ความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ ความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิห้องเก็บรักษา เป็นต้น (Harrington, 1972) แต่ปัจจัยหลักที่สำคัญ คือ ความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ก่อนเก็บรักษา และอุณหภูมิในการเก็บรักษา (Ellis *at al.*, 1985) การเสื่อมสภาพของเมล็ดเชื้อพันธุ์จะลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ และ อุณหภูมิในการเก็บรักษา (Kapoor *et al.*, 2010) การลดลงของความงอกมีผลเนื่องมากจากปฏิกิริยารีดักชั่น (reduction) ของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส (α-amylase) และปริมาณคาร์โบไฮเดรต (Bailly, 2004) โดยการเพิ่มขึ้นของความชื้นและอุณหภูมิจะทำให้เกิดการทำลายโครงสร้างของดีเอ็นเอ และไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA) กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ขบวนการหายใจและการเคลื่อนที่ของสารผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้เกิดการเสื่อมของเมล็ดเชื้อพันธุ์อย่างรวดเร็ว (Mc Donald, 1999) ระดับความชื้นในเมล็ดที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ในพืชน้ำมันระดับความชื้นที่เหมาะสมค่อนข้างต่ำกว่าพืชที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ (Chenglian *at al.,1998*)

การทดลองครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาผลของความชื้นเมล็ดต่ออายุการเก็บรักษาของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยในสภาพอุณหภูมิการเก็บรักษาต่างๆของธนาคารเชื้อพันธุ์พืช คือ ห้องอนุรักษ์ระยะปานกลางอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ห้องอนุรักษ์ระยะยาวอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส และการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว เปรียบเทียบกับการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง เพื่อใช้เป็นข้อมูลเทคนิคในการจัดการอนุรักษ์เมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชให้มีอายุการเก็บรักษายาวนานที่สุดสำหรับใช้เป็นแหล่งฐานพันธุกรรมเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วิธีดำเนินการ :

- <u>อุปกรณ์</u>

1.เมล็ดเชื้อพันธุ์เดือย
2.เครื่องบด
3.เครื่องชั่งน้ำหนัก
4.ภาชนะอลูมิเนียม (Moisture can) พร้อมฝาปิด
5.ตู้อบความร้อนไฟฟ้าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Hot Air Oven)
6.ห้องลดความชื้นของธนาคารเชื้อพันธุ์พืชอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 15 เปอร์เซ็นต์ (Unheated seed room/seed moisture reduction room)
7.ถุงกระดาษสีน้ำตาล
8.ถุงซิปพลาสติกใส
9. ถุงอลูมิเนียมฟอยล์
10.โถดูดความชื้นที่มีสารดูดความชื้น
11.กระดาษทดสอบความงอก

- วิธีการ

การเตรียมเมล็ดเชื้อพันธุ์ทดลอง (ต.ค.2558 - มี.ค.2559)

ใช้เมล็ดเชื้อพันธุ์เดือย จากแปลงเกษตรกร อ.ภูซาง จ.พะเยา เก็บเกี่ยวในเดือนธันวาคม 2558 และยังไม่ผ่านการลดความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ เมื่อได้เมล็ดเชื้อพันธุ์นำมาทดสอบหาความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เริ่มต้นก่อนนำไปลดความชื้น แบ่งเมล็ดเชื้อพันธุ์ที่ไม่ลดความชื้นเก็บไว้ในถุงพลาสติกซ้อน 2-3 ชั้น มัดปากถุงให้แน่นเก็บเมล็ดไว้ที่ห้องพักเมล็ดอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์ และนำเมล็ดที่เหลือไปลดความชื้นให้ได้ 12, 10, 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ห้องลดความชื้นของธนาคารเชื้อพันธ์พืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 15 เปอร์เซ็นต์ นำเมล็ดเชื้อพันธุ์ที่ยังไม่ผ่านและผ่านการลดความชื้นในแต่ละระดับมาบรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟอยด์และปิดผนึกโดยมีการดูดอากาศออกเพื่อให้อยู่ในสภาพสูญญากาศ

การทดสอบความชื้นเมล็ดเชื้อพันธุ์ (ธ.ค. 2558 – มี.ค. 2559)

โดยวิธีอบด้วยความร้อน (Air-Oven Method) ตามวิธีการของสมาคมทดสอบเมล็ดเชื้อพันธุ์นานาชาติ (ISTA), 2014 และประยุกต์ตามคู่มือการจัดการเมล็ดเชื้อพันธุ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์ของ Kameswara *et al*., 2006 และอ้างอิงขั้นตอนการปฏิบัติตามข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และข้าวสาลี มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบ คลุกเคล้าให้ทั่ว โดยไม่ให้เมล็ดถูกอากาศนานเกิน 3 วินาที แล้วสุ่มเมล็ดมาเพื่อบดตัวอย่างละ 1.0-2.0 กรัม

2.. การบดเมล็ด บดเมล็ดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบด แล้วแบ่งตัวอย่างที่บดแล้ว ใส่ในภาชนะอลูมิเนียมกลม ก้นแบน ที่มีฝาปิดพอดี 2 ซ้ำ นำไปชั่งน้ำหนักพร้อมภาชนะ โดยใช้เครื่องชั่งที่อ่านค่าทศนิยมได้ 3 ตำแหน่ง แล้วนำเข้าอบความร้อน

3. การอบตัวอย่าง นำตัวอย่างเข้าตู้อบไฟฟ้า ที่มีช่องระบายลม และสามารถควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ โดยใช้อุณหภูมิในการอบ 130 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ± 6 นาที โดยเอาฝาครอบรองไว้ใต้ภาชนะ เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วรีบปิดฝาทันที และนำออกจากตู้อบเก็บไว้ในโหลดูดความชื้น (Desiccator) ทิ้งไว้ให้เย็น 30-45 นาที แล้วนำออกมาชั่งน้ำหนักของภาชนะพร้อมทั้งเมล็ดและฝาปิดอีกครั้งหนึ่ง

4. การคำนวณผลการทดสอบ เปอร์เซ็นต์ความชื้นของเมล็ดคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และรายงานเพียงทศนิยมตำแหน่งเดียวเท่านั้น โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\frac{M_2 - M_3}{M_2 - M_1} \times 100$$

ซึ่ง M_1 คือ น้ำหนักเป็นกรัมของภาชนะและฝาปิด

M_2 คือ น้ำหนักเป็นกรัมของภาชนะและฝาปิดและเมล็ดก่อนอบ

M_3 คือ น้ำหนักเป็นกรัมของภาชนะและฝาปิดและเมล็ดหลังอบ

การเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์ (เม.ย. 2559 - ก.ค. 2561)

นำเมล็ดเชื้อพันธุ์ระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ต่างๆที่บรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟอยด์และปิดผนึกให้อยู่ในสภาพสูญญากาศไปเก็บรักษาตามสภาวะของอุณหภูมิการเก็บรักษา 4 สภาวะ คือ

สภาวะที่ 1 อุณหภูมิการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28.96±2.02 องศาเซลเซียส)

สภาวะที่ 2 อุณหภูมิการเก็บรักษาที่ 5 องศาเซลเซียส

สภาวะที่ 3 อุณหภูมิการเก็บรักษาที่ -10 องศาเซลเซียส

สภาวะที่ 4 อุณหภูมิการเก็บรักษาที่ -196 องศาเซลเซียส (สภาพเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว)

แต่ละสภาวะการเก็บรักษาวางแผนการทดลองแบบ Split Plot Design จำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วย

- Main plot เป็นระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ 5 ระดับ คือความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เริ่มต้น (18 เปอร์เซ็นต์), 12, 10, 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์

- Sub plot เป็นระยะเวลาในการเก็บรักษา 14 ระดับ คือ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24และ 27 เดือน

เมื่อครบกำหนดอายุการเก็บรักษาทุก 3 เดือน นำเมล็ดเชื้อพันธุ์มาเพาะทดสอบหาความมีชีวิตโดยวิธีเพาะทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ความงอก และทดสอบความแข็งแรงโดยวิธีเร่งอายุเมล็ดพันธุ์

<u>การทดสอบความงอกของเมล็ดเชื้อพันธุ์</u> (เม.ย. 2559 – ก.ค. 2561)

เพาะทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยโดยวิธีใช้ทรายเป็นวัสดุเพาะ ตามวิธีการของสมาคมทดสอบเมล็ดเชื้อพันธุ์นานาชาติ (ISTA, 2014) อ้างตามขั้นตอนการปฏิบัติของข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี และข้าวฟ่าง ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การเตรียมเมล็ดสำหรับเพาะทดสอบ ให้เตรียมเมล็ดที่ใช้ในการทดสอบซ้ำละ 100 เมล็ด

2. การเตรียมวัสดุเพาะ ทรายที่ใช้สำหรับการเพาะทดสอบความงอกนั้น ไม่ละเอียดหรือหยาบเกินไป แต่จะใช้ขนาดที่รอดรูตะแกรงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3 มิลลิเมตร และด้านบนรูตะแกรงขนาด 0.05 มิลลิเมตร ทรายที่ใช้เพาะจะต้องและฆ่าเชื้อเสียก่อนเพื่อฆ่าจุลินทรีย์ เชื้อโรค และเมล็ดอื่นๆที่ติดมา และมีความชื้นประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาบรรจุใส่กล่องเพาะทดสอบความงอก และปาดหน้าทรายให้เรียบสม่ำเสมอพร้อมเจาะหลุมสำหรับหยอดเมล็ด

3. การเพาะเมล็ด นำเมล็ดที่เตรียมมาหยอดลงในหลุมที่เจาะไว้แล้วกลบหน้าด้วยทรายปาดให้เรียบและให้เมล็ดอยู่ลึกประมาณ 1-2 เซนติเมตร จากนั้นปิดฝากล่องเพาะเมล็ด แล้วนำไปเก็บในห้องเพาะทดสอบความงอกอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส

4. ระยะเวลาสำหรับการทดสอบความงอก ประมาณ 7 วัน

5. การประเมินผลการทดสอบความงอก ตรวจสอบความงอกครั้งแรก (First Count) เมื่อต้นกล้าอายุ 4 วัน และตรวจสอบความงอกครั้งสุดท้าย (Final Count) เมื่อต้นกล้ามีอายุ 7 วัน โดยในการประเมินจะนับและแยกส่วนต่างๆหลังการเพาะครบเวลาตามกำหนดดังต่อไปนี้

- ต้นอ่อนปกติ (Normal Seedling) คือต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่มีส่วนประกอบต่างๆครบถ้วน

- ต้นอ่อนผิดปกติ (abnormal Seedling) คือต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่มีส่วนประกอบต่างๆ ไม่สมบูรณ์ หรือขาดหายไป หรือผิดปกติไปจากเดิม

- เมล็ดแข็ง (Hard Seedling) คือเมล็ดที่มีลักษณะแข็ง ผิวเปลือกไม่ดูดน้ำ หลังจากเสร็จสิ้นการทดสอบจะมีลักษณะคงเดิมทุกอย่าง

- เมล็ดสดที่ไม่งอก (Fresh ungerminated seed) คือ เมล็ดที่ดูดน้ำและขยายพองมีขนาดเมล็ดโตขึ้นแต่ไม่มีส่วนใดงอกออกมาเลย

- เมล็ดที่ตาย (Dead seed หรือ Rotten seed) คือ เมล็ดตายที่มีลักษณะเน่าเปื่อย มีราขึ้นและไม่งอก

การประเมินผลจะเริ่มทำในวันนับครั้งแรก โดยบันทึกและนับออกของต้นอ่อนปกติ และเมล็ดที่ตาย ส่วนที่เหลือจะนับไม่เกินวันนับครั้งสุดท้าย หลังจากนั้นนำข้อมูลมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความงอกจากสูตรดังต่อไปนี้

เปอร์เซ็นต์ความงอก = $\frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอกปกติ}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะ}} \times 100$

การตรวจสอบความแข็งแรงโดยเร่งอายุเมล็ดเชื้อพันธุ์ (accelerated aging test) (เม.ย.2559 – ก.ค.2562)

โดยดัดแปลงจากวิธีการทดสอบความแข็งแรงเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวฟ่างของ TeKrony *at al*. (1993) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

นำเมล็ดในแต่ละกรรมวิธีๆ 15 กรัม ใส่ในตะแกรงลวด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร ขาตะแกรงสูง 3.5 เซนติเมตร วางภายในกระป๋องที่บรรจุน้ำ 120 ซีซี. ปิดฝากระป๋องให้สนิทแล้วนำไปเร่งอายุในตู้อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเพาะทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ความงอก ตามวิธีการของสมาคมทดสอบเมล็ดเชื้อพันธุ์นานาชาติ (ISTA, 2014)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ (ส.ค.-ก.ย.2561)

นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเชื้อพันธุ์ และข้อมูลเปอร์เซ็นต์ความงอกหลังการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดเชื้อพันธุ์ มาวิเคราะห์ความแปรปรวนรวม ระหว่าง 4 สภาวะของอุณหภูมิการเก็บรักษา (Combine Analysis of Variance) เพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ (Interaction) ของ 4 ปัจจัยร่วมกัน

- เวลาและสถานที่

เริ่มตุลาคม 2558 - กันยายน 2561

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลการทดลองและวิจารณ์

เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือย

ผลการทดลองพบว่า ในแต่ละสภาพอุณหภูมิการเก็บรักษา (อุณหภูมิห้อง 5 องศาเซลเซียส -10 องศาเซลเซียส และ สภาพเยือกแข็ง) เปอร์เซ็นต์ความชื้นของเมล็ดเชื้อพันธุ์เริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (18, 12, 10, 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์) และระยะเวลาในการเก็บรักษา (0-27 เดือน) มีปฏิสัมพันธ์ (Interaction) กันอย่างมีนัยสำคัญต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือย

การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

เมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28.96±2.02 ℃, ความชื้นสัมพัทธ์ 75.39±5.43 %) ถ้าเมล็ดเชื้อพันธุ์ยังไม่ผ่านกระบวนการลดความชื้น ซึ่งในการทดลองมีความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ 18 เปอร์เซ็นต์ สามารถเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์ได้ไม่ถึง 3 เดือน โดยเมล็ดเชื้อพันธุ์ไม่คงความมีชีวิตอยู่ได้ ขณะที่เมล็ดเชื้อพันธุ์ที่ผ่านการลดความชื้นเหลือ 12 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถเก็บได้ถึง 18 เดือน แต่มีความงอกเหลือเพียง 38 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ดเชื้อพันธุ์ที่ผ่านการลดความชื้นเหลือ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถเก็บได้นานถึง 21 เดือน แต่มีความงอกเหลือเพียง 36 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดเชื้อพันธุ์ที่ผ่านการลดความชื้นเหลือ 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 27 เดือน ยังคงเปอร์เซ็นต์ความงอกไม่แตกต่างจากเปอร์เซ็นต์ความงอกเริ่มต้น โดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 73 และ 67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ดังนั้นถ้าเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยมีความชื้นสูงคือ 10 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ไม่ควรเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง แต่ถ้าสามารถลดความชื้นเมล็ดให้ต่ำ (8 และ 6 เปอร์เซ็นต์) และบรรจุในภาชนะที่ปิดสนิทก่อนนำมาเก็บรักษาจะทำให้สามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นานขึ้น สอดคล้องกับจวง จันทร์ (2529) พบว่าเมล็ดเชื้อพันธุ์ที่ตากหรืออบจนแห้งที่ความชื้นประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ สามารถเก็บไว้ในที่ๆ มีอุณหภูมิสูงถึง 32.22 องศาเซลเซียสได้อย่างปลอดภัย ขณะที่เมล็ดเชื้อพันธุ์ที่มีความชื้นสูงเก็บรักษาไว้ได้เฉพาะในที่ๆ มีอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส และ Jianfang *at al* (1998) ศึกษาระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ป่านงา ถั่วเหลือง และข้าวสาลี ชนิดละ 5 สายพันธุ์ ที่เหมาะสมในสภาพการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (0-35 องศา

เซลเซียส) เฉลี่ย 18 องศาเซลเซียส เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4-5 ปี พบว่า การสูญเสียความมีชีวิตของเมล็ดเชื้อพันธุ์ลดลงตามชนิดพืช พันธุ์และความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ การเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์ในสภาพที่มีความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์สูงจะทำให้เมล็ดสูญเสียความมีชีวิตภายใน 4 ปี แต่การลดความชื้นเมล็ดเชื้อพันธุ์ลงในระดับต่ำๆ ในพืชบางชนิดบางสายพันธุ์จะมีผลทำให้ความมีชีวิตลดลง ระดับความชื้นที่เหมาะสมในการเก็บรักษาข้าวสาลี และงา คือ 7.6-9.7 เปอร์เซ็นต์ และ 1.8-2.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับ วันชัย (2542) พบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญต่ออายุการเก็บรักษาของเมล็ดเชื้อพันธุ์เช่นเดียวกับความชื้นแต่มีบทบาทน้อยกว่าความชื้นในการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความมีชีวิตของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยโดยวิธีการเพาะทดสอบสอบหาเปอร์เซ็นต์ความงอก (Germination Test) หลังผ่านการลดความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ให้อยู่ที่ระดับ 6-12 เปอร์เซ็นต์ และที่ความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เริ่มต้น 18 % ระหว่างการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 27 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (เดือน)	ระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ (%) [1]				
	เริ่มต้น (18%)	12%	10%	8%	6%
0	67a	76a	77a	74a	70a
3	0b	70a	76a	71a	75a
6	0b	57b	64b	71a	73a
9	0b	45c	58c	71a	69a
12	0b	57b	66b	62b	71a
15	0b	47c	60c	78a	72a
18	0b	38c	63c	72a	66a
21	0b	5d	36d	71a	69a
24	0b	1e	20e	74a	73a
27	0b	0e	12e	73a	67a

CV(a)=6.95%, CV(b)=8.51%

เปรียบเทียบทางด้านสดมภ์ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความงอกที่ระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยเดียวกัน และอายุการเก็บรักษา 0-27 เดือน ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 95%

การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

เมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ **5 องศาเซลเซียส** ถ้าเมล็ดเชื้อพันธุ์ยังไม่ผ่านกระบวนการลดความชื้น ซึ่งในการทดลองมีความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ 18 เปอร์เซ็นต์ สามารถเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์ภายในระยะเวลา 27 เดือน แต่หลังจากอายุการเก็บรักษา 21 เดือน เริ่มมีเปอร์เซ็นต์ความงอกลดลง จากความงอกเริ่มต้น 66 เปอร์เซ็นต์ เหลือความงอก 54 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มลดลง ขณะที่เมล็ดเชื้อพันธุ์ที่ผ่านการลดความชื้นทุกระดับ พบว่าภายในระยะเวลาการเก็บรักษา 27 เดือน ยังคงเปอร์เซ็นต์ความงอกไม่แตกต่างจากเปอร์เซ็นต์ความงอกเริ่มต้น โดยที่ระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ 12,10,8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ยังคงเหลือความงอก 73, 71, 73 และ 64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ดังนั้นการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยที่อุณหภูมิ 5 องศา

เซลเซียส ก่อนการเก็บรักษาควรลดความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ให้ต่ำลงตั้งแต่ 12 เปอร์เซ็นต์ลงไป สอดคล้องกับการศึกษาในกลุ่มธัญพืชอื่นๆ ของ Al-Yahya (2001) ที่ศึกษาผลของสภาพการเก็บรักษาต่อความงอกของเมล็ดข้าวสาลีที่ระดับความชื้นในเมล็ด 15, 18, 21 และ 24 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 4, 15, 25 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าที่ระดับความชื้น 15 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้เปอร์เซ็นต์ความงอกลดลงช้าที่สุด และทำให้เปอร์เซ็นต์ความงอกลดลงเร็วที่สุดคือ ที่ระดับความชื้น 24 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความมีชีวิตของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยโดยวิธีการเพาะทดสอบสอบหาเปอร์เซ็นต์ความงอก (Germination Test) หลังผ่านการลดความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ให้อยู่ที่ระดับ 6-12 เปอร์เซ็นต์ และที่ความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เริ่มต้น 18 % ระหว่างการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 27 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (เดือน)	ระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์(%) [1]				
	เริ่มต้น	12%	10%	8%	6%
0	66ab	76a	75ab	75ab	72a
3	62abc	75ab	76a	78a	73a
6	63ab	75ab	73ab	73ab	73a
9	59bc	72ab	67bc	65c	72a
12	64ab	73ab	64c	69bc	74a
15	64ab	68b	71abc	75ab	70a
18	69a	75ab	70abc	71abc	44a
21	70a	71ab	72abc	70bc	75a
24	54c	73ab	70abc	78a	78a
27	43d	73ab	72abc	73ab	72a

CV(a)=5.06%, CV(b)=5.93%

เปรียบเทียบทางด้านสดมภ์ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความงอกที่ระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยเดียวกัน และอายุการเก็บรักษา 0-27 เดือน ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 95%

การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

ที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยที่ระดับความชื้นเมล็ดเชื้อพันธุ์เริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (18), 12, 10, 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ สามารถเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์ได้นาน 27 เดือน (กราฟที่ 1) โดยที่ระดับความชื้นเมล็ดเชื้อพันธุ์ 12, 10, 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเชื้อพันธุ์ไม่แตกต่างกันคือ 73, 70, 74. และ 68 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังไม่แตกต่างจากเปอร์เซ็นต์ความงอกเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา คือ 77, 76, 72 และ 73 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ส่วนที่ระดับความชื้นเมล็ดเชื้อพันธุ์เริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (18 เปอร์เซ็นต์) สามารถเก็บรักษาได้นาน 27 เดือน เช่นกัน แต่มีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำกว่าทุกระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ โดยมีความงอก 66 เปอร์เซ็นต์ ที่อายุการเก็บรักษา 27 เดือน

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความมีชีวิตของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยโดยวิธีการเพาะทดสอบสอบหาเปอร์เซ็นต์ความงอก (Germination Test) หลังผ่านการลดความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ให้อยู่ที่ระดับ 6-12 เปอร์เซ็นต์ และที่ความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เริ่มต้น 18 % ระหว่างการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 27 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษา(เดือน)	ระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ (%) [1]				
	เริ่มต้น	12%	10%	8%	6%
0	71ab	77a	76a	72ab	73ab
3	74a	75ab	75a	75ab	72ab
6	63cd	68cd	76a	72ab	70abc
9	61d	67d	69ab	71ab	68bc
12	53e	64d	66b	71ab	64c
15	70ab	72abc	67b	77a	69abc
18	70ab	76ab	71ab	77a	76a
21	69abc	69bcd	69ab	70b	67bc
24	71ab	72abc	66b	76ab	71abc
27	66bcd	73abc	70ab	74ab	68bc

CV(a)=4.95%, CV(b)=4.95%

เปรียบเทียบทางด้านสดมภ์ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความงอกที่ระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยเดียวกัน และอายุ การเก็บรักษา 0-27 เดือน ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 95%

การเก็บรักษาที่สภาพเยือกแข็ง

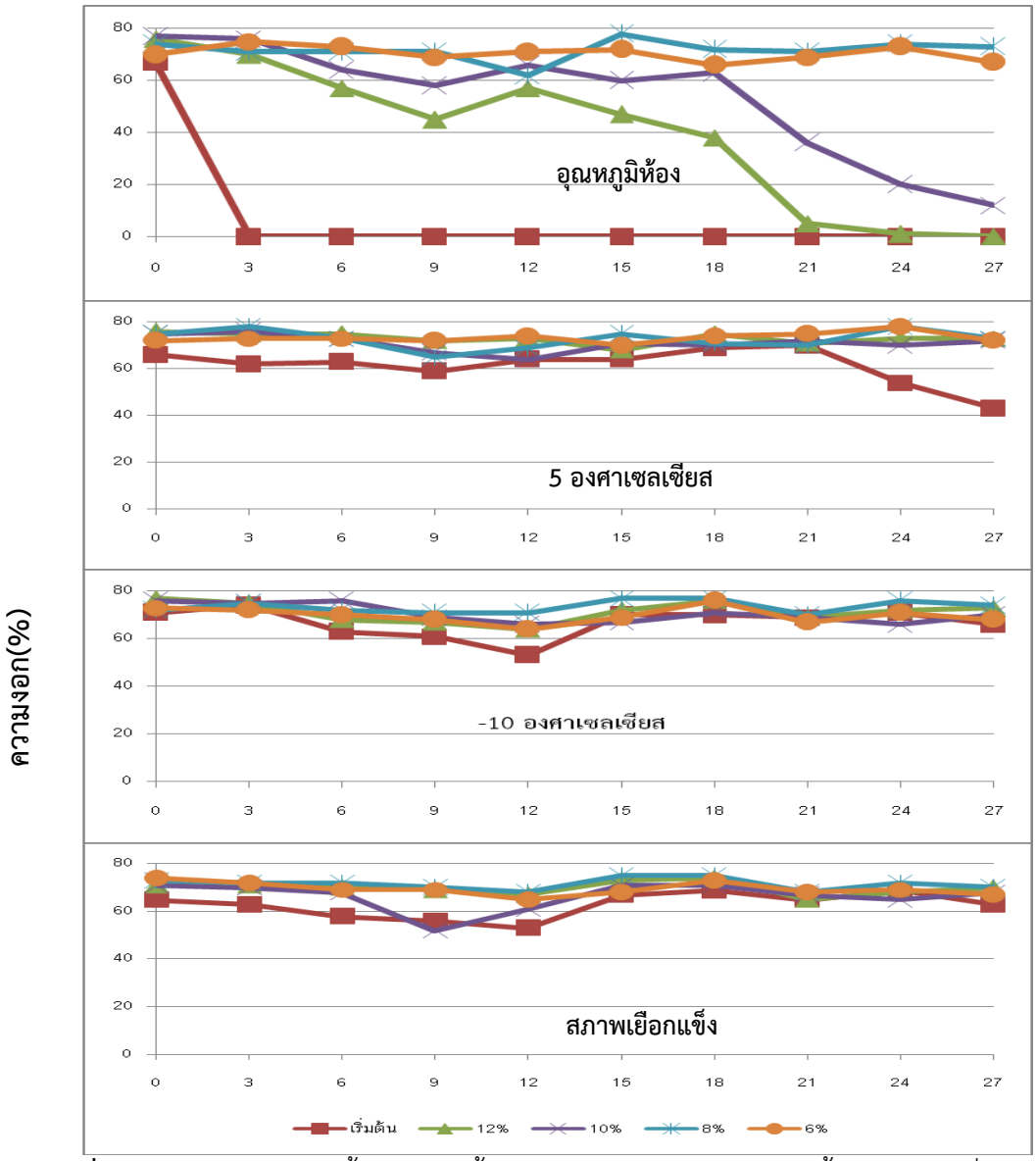
ตารางที่ 4 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความมีชีวิตของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยโดยวิธีการเพาะทดสอบสอบหา เปอร์เซ็นต์ความงอก (Germination Test) หลังผ่านการลดความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ให้อยู่ที่ระดับ 6-12 เปอร์เซ็นต์ และที่ความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เริ่มต้น 18 % ระหว่างการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง เป็นระยะเวลา 27 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษา(เดือน)	ระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์(%) [1]				
	เริ่มต้น	12%	10%	8%	6%
0	65abc	71ab	71ab	73ab	74a
3	63bcd	71ab	70ab	72ab	72ab
6	58de	70ab	68ab	72ab	69abc
9	56e	69ab	52d	70ab	69abc
12	53e	67b	61c	68b	65c
15	67abc	73a	71ab	75a	68abc
18	69a	74a	71a	75a	73a
21	65abc	65b	67ab	68b	68bc
24	69ab	68ab	65bc	72ab	69abc
27	63cd	70ab	68ab	70ab	67bc

CV(a)=5.70%, CV(b)=4.03%

เปรียบเทียบทางด้านสดมภ์ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความงอกที่ระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยเดียวกัน และอายุการเก็บรักษา 0-27 เดือน ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 95%

ที่สภาพเยือกแข็งเมื่อเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยที่ระดับความชื้นเมล็ดเชื้อพันธุ์เริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (18), 12, 10, 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ สามารถเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์ได้นาน 27 เดือน (กราฟที่ 1) โดยที่ระดับความชื้นเมล็ดเชื้อพันธุ์ 12, 10, 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเชื้อพันธุ์ไม่แตกต่างกันคือ 70, 68, 70 และ 67 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังไม่แตกต่างจากเปอร์เซ็นต์ความงอกเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา คือ 71, 71, 73 และ 74 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ส่วนที่ระดับความชื้นเมล็ดเชื้อพันธุ์เริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (18 เปอร์เซ็นต์) สามารถเก็บรักษาได้นาน 27 เดือน เช่นกัน แต่เริ่มมีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำกว่าทุกระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ โดยมีความงอก 63 เปอร์เซ็นต์ ที่อายุ การเก็บรักษา 27 เดือน จากผลการทดลองแสดงว่าเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยสามารถเก็บรักษาได้ในสภาพเยือกแข็งโดยยังคงความมีชีวิตหลังเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 27 เดือน สอดคล้องกับ ภาณี และคณะ (2540ก. และ ข., 2541, 2542 และ2543) ศึกษาในเมล็ดเชื้อพันธุ์พืชผัก พืชพื้นบ้าน และพืชไร่ต่างๆ เช่น พริก มะเขือเทศ ผักกวางตุ้ง ข้าวโพดหวาน ถั่วเขียว ถั่วเหลือง เป็นต้น พบว่าเมล็ดเชื้อพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดหลังการเก็บรักษาใกล้เคียงหรือสูงกว่าเมล็ดเชื้อพันธุ์ปกติ



กราฟที่ 1 ผลของระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ต่อความมีชีวิตของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยเมื่อเก็บรักษาในสภาพต่างๆ โดยวิธีการเพาะทดสอบสอบหาเปอร์เซ็นต์ความงอก

ความแข็งแรงของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือย

ผลการทดลองพบว่า เปอร์เซ็นต์ความชื้นของเมล็ดเชื้อพันธุ์เริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (18, 12, 10, 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์) อุณหภูมิการเก็บรักษา (อุณหภูมิห้อง 5 องศาเซลเซียส -10 องศาเซลเซียส และ สภาพเยือกแข็ง) และระยะเวลาการเก็บรักษา (0-27 เดือน) มีปฏิสัมพันธ์ (Interaction) กันอย่างมีนัยสำคัญต่อความแข็งแรงของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือย

เมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28.96±2.02 °C, ความชื้นสัมพัทธ์ 75.39±5.43 %) ถ้าไม่ผ่านกระบวนการลดความชื้น ซึ่งในการทดลองมีความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เริ่มต้น 18 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อเก็บรักษาภายในระยะเวลา 3 เดือน เมล็ดเชื้อพันธุ์ไม่มีความแข็งแรง โดยเมล็ดเชื้อพันธุ์ไม่คงความมีชีวิตอยู่ได้จากการเพาะทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ความงอกหลังผ่านการเร่งอายุเมล็ดเชื้อพันธุ์ด้วยอุณหภูมิและความชื้นสูง ขณะที่เมล็ดเชื้อพันธุ์ที่ผ่านการลดความชื้นเหลือ 12 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถเก็บได้ถึง 18 เดือน แต่มีความงอกเหลือเพียง 38 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ดเชื้อพันธุ์ที่ผ่านการลดความชื้นเหลือ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถเก็บได้นานถึง 21 เดือน แต่มีความงอกเหลือเพียง 9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดเชื้อพันธุ์ที่ผ่านการลดความชื้นเหลือ 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 27 เดือน ยังคงเปอร์เซ็นต์ความงอกไม่แตกต่างจากเปอร์เซ็นต์ความงอกเริ่มต้น โดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 67 และ 65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยที่ยังไม่ผ่านกระบวนการลดความชื้นกลับมีความมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 27 เดือน แต่มีความงอก 29 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดเชื้อพันธุ์ที่ผ่านการลดความชื้นที่ระดับ 12, 10, 8, และ 6 เปอร์เซ็นต์ ยังคงมีแนวโน้มรักษาระดับเปอร์เซ็นต์ความงอกไว้ได้โดยเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 27 เดือน ยังมีความงอกอยู่ที่ 62, 62, 65 และ 59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (กราฟที่ 1) สำหรับการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส ทุกระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์สามารถเก็บรักษาได้ หลังผ่านการเร่งอายุเมล็ดเชื้อพันธุ์เพื่อทดสอบความแข็งแรงยังคงความงอก 31, 45, 43, 57 และ 59 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลาการเก็บรักษา 27 เดือน แต่ที่ระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มการลดลงของเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำกว่าทุกระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ (กราฟที่ 1) ส่วนการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งสามารถเก็บรักษาที่ทุกระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เช่นกัน โดยจากการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดเชื้อพันธุ์เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 27 เดือน ยังคงเปอร์เซ็นต์ความงอก 37, 44, 42, 56 และ 56 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มการลดลงของเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำกว่าทุกระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ (กราฟที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยก่อนการเก็บรักษา พบว่ามีอิทธิพลต่อความแข็งแรงของเมล็ดเชื้อพันธุ์ขณะที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่างๆ สอดคล้อง กับ Cui *at al* (2012) ศึกษาผลของความแตกต่างความชื้นในเมล็ดเดือยที่มีผลต่อความแข็งแรงของเมล็ดเชื้อพันธุ์ พบว่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นในเมล็ดเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่ออายุการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์ เนื่องจากเมื่อลดความชื้นเมล็ดเชื้อพันธุ์จาก 16.94 เปอร์เซ็นต์ เป็น 14.89 เปอร์เซ็นต์ ค่าเปอร์เซ็นต์ความงอก ดัชนีความงอก ปริมาณโปรตีน (soluble protein) และน้ำตาล (soluble sugar) ยังคงมีค่าสูง ค่าการนำไฟฟ้า และปฏิกิริยาทางเคมีของเอนไซม์อะไมเลส (amylase) ลดลง ฉะนั้นเมื่อต้องการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นระยะนาน ควรมีการลดความชื้นเมล็ดเชื้อพันธุ์ให้อยู่ในระดับ 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เมล็ดลดการเสื่อมสภาพของเมล็ดเชื้อพันธุ์ เนื่องจากเมล็ดที่มีความชื้นสูง จะมีการเผาผลาญอาหารสูงเพิ่มภาวะที่เป็นอันตรายกับตัว รวมทั้งชักนำให้โรคและแมลงเข้าทำลายจึงเสื่อมคุณภาพได้รวดเร็วกว่า แต่ถ้าจะเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส สามารถลดความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ให้อยู่ในระดับตั้งแต่ 12, 10 ,8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ก่อนการเก็บรักษาจะยังสามารถรักษาความแข็งแรงของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยไว้ได้นานภายในระยะเวลา 27 เดือน ส่วนการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส และสภาพเยือกแข็ง เมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยที่มีความชื้นเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์

สามารถเก็บได้นาน 27 เดือน โดยที่สภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส มีความงอกเฉลี่ย 57 และ 59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่สภาพเยือกแข็ง มีความงอกเฉลี่ย 56 และ 56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

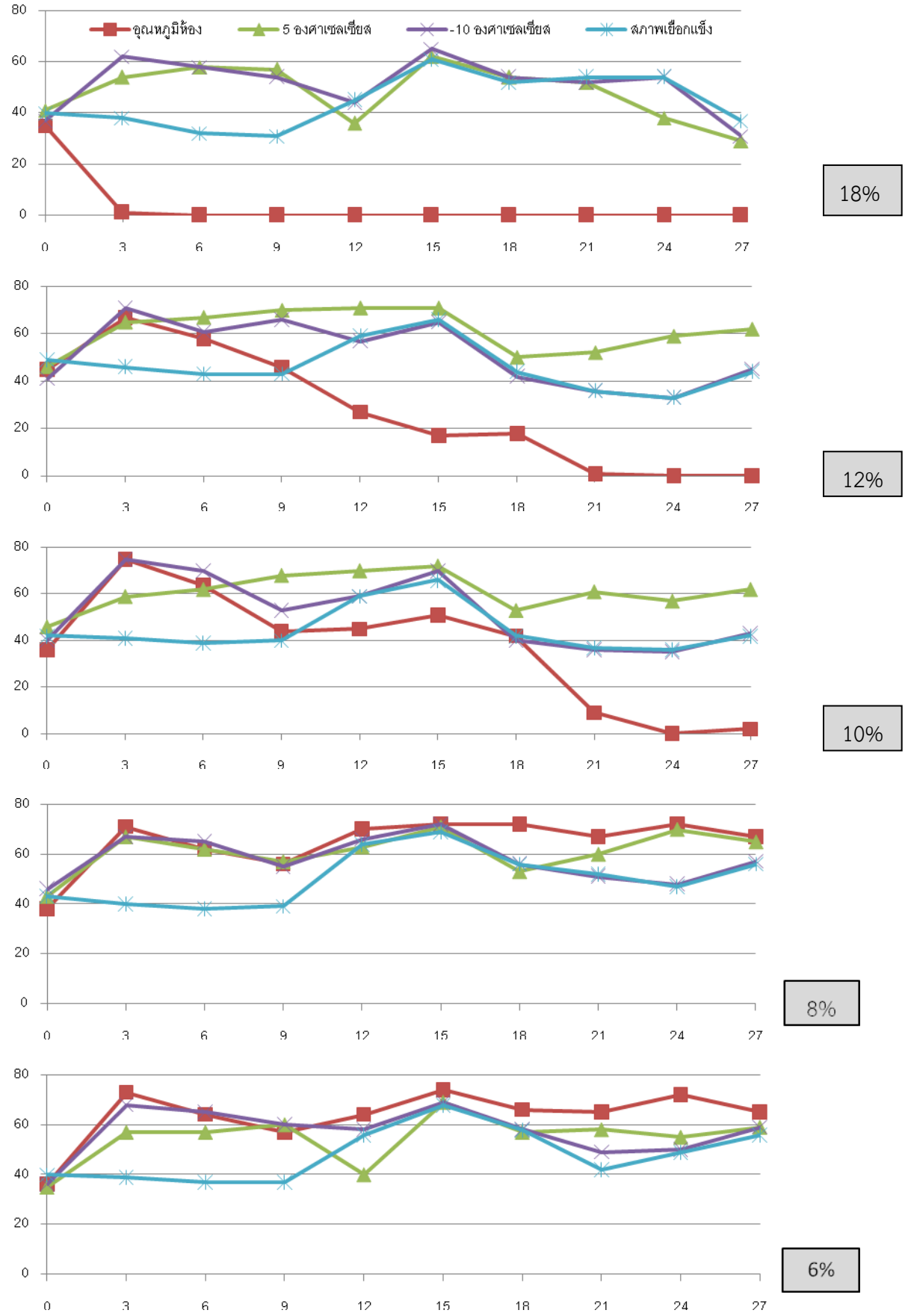
ตารางที่ 5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความแข็งแรงของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือย หลังผ่านการลดความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ให้อยู่ที่ระดับ 6-12 เปอร์เซ็นต์ ก่อนเก็บรักษาที่สภาพอุณหภูมิต่างๆ เป็นระยะเวลา 27 เดือน

สภาพการเก็บรักษา	ระยะเวลาการเก็บรักษา (เดือน)	ระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์[(1)]				
		เริ่มต้น	12%	10%	8%	6%
อุณหภูมิห้อง						
	0	35a	45cd	36d	38d	36e
	3	1b	67a	75a	71a	73ab
	6	0b	58b	64b	62bc	64bcd
	9	0b	46cd	44cd	56c	57d
	12	0b	27d	45cd	70ab	64cd
	15	0b	17e	51c	72a	74a
	18	0b	18e	42cd	72a	66abc
	21	0b	1f	9e	67ab	65a-d
	24	0b	0fg	0g	72a	72abc
	27	0b	0g	2f	67ab	65a-d
5 องศาเซลเซียส						
	0	41c	46e	46f	43e	35c
	3	54ab	65abc	59cde	67ab	57b
	6	58ab	67abc	62bcd	62abc	57b
	9	57ab	70ab	68abc	57cd	60b
	12	36cd	71a	70abc	63abc	40c
	15	62a	71a	72a	71a	69a
	18	54ab	50e	53ef	53d	57b
	21	52b	52def	61b-e	60bcd	58b
	24	38c	59cd	57de	70a	55b
	27	29d	62be	62bcd	65abc	59b
-10 องศาเซลเซียส						
	0	37ef	41def	40c	46d	36f
	3	62ab	71a	75a	67a	68ab
	6	58abc	61bc	70a	65ab	65abc
	9	54bc	66ab	53b	55cd	60bc
	12	44de	57cd	59b	66a	58cd
	15	65a	65abc	70a	72a	69a
	18	54bc	42def	40c	56cd	58cd
	21	52cd	36ef	36c	51cd	49e
	24	54bc	33f	35c	48cd	50de
	27	31f	45d	43c	57bc	59c
สภาพเยือกแข็ง						
	0	40de	49b	42b	43de	40d
	3	38de	46b	41b	40e	39d
	6	32e	43bc	39b	38e	37d
	9	31e	43bc	40b	39e	37d
	12	45cd	59a	59a	64ab	56b
	15	61a	66a	66a	69ab	68a
	18	52bc	44bc	42b	56bc	58b
	21	54ab	36cd	37b	52cd	42cd
	24	54ab	33d	36b	47de	49bc
	27	37de	44bc	42b	56bc	56b

CV(a)=8.27 %, CV(b)=7.95 %

(1)

เปรียบเทียบทางด้านสดมภ์ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความงอกที่ระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยเดียวกัน และอายุการเก็บรักษา 0 - 2 7 เดือน ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 95%



กราฟที่ 2 ผลของระดับความชื้นในเมล็ดต่อความแข็งแรงของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยเมื่อเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่างๆ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ก่อนการเก็บรักษาและอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่อความมีชีวิตและความแข็งแรงของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือย เมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยที่มีความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ สามารถเก็บรักษาได้นาน 27 เดือน เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 5 องศาเซลเซียส -10 องศาเซลเซียส และสภาพเยือกแข็ง นอกจากนี้การเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส สามารถลดความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยให้เหลือ 12 เปอร์เซ็นต์ หรือต่ำกว่าได้โดยยังคงเก็บรักษาได้ภายในระยะเวลา 27 เดือน ดังนั้นในการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยให้มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน หรือในกรณีที่เกษตรกรต้องการเก็บรักษาไว้เพื่อทำพันธุ์ในฤดูปลูกถัดไปและเก็บรักษาพันธุ์ในสภาพอุณหภูมิห้องควรลดความชื้นของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยให้เหลือ 8 เปอร์เซ็นต์ก่อนการเก็บรักษาเพื่อรักษาคุณภาพของเมล็ดเชื้อพันธุ์ก่อนการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ส่วนในด้านการอนุรักษ์เมล็ดเชื้อพันธุ์การเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส สามารถลดความชื้นให้เหลือ 12 เปอร์เซ็นต์ หรือต่ำกว่าก่อนทำการเก็บรักษา ขณะที่การเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 และสภาพเยือกแข็ง ก่อนการเก็บรักษาควรลดความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยให้เหลือ 8 เปอร์เซ็นต์หรือต่ำกว่า

การทดลองที่ 3 : เทคนิคการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์ชมจันทร์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช
: Seed Storage of *Ipomoea alba* L.

ชื่อผู้วิจัย
หัวหน้าการทดลอง : นางอัญชลี แก้วดวง
ผู้ร่วมงาน : 1. นางสาวเสาวณี เดชะคำภู
: 2. นางรัชนก ทองเวียง

บทคัดย่อ

ศึกษาอิทธิพลของความชื้นในเมล็ดพันธุ์และอุณหภูมิในการเก็บรักษา ต่อความงอกและอายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ แบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลอง ตามสภาพอุณหภูมิในการเก็บรักษา ได้แก่ เก็บที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส และสภาพเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบ Split Plot Design จำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยหลัก (main plot) ความชื้นในเมล็ดพันธุ์ 4 ระดับ คือ 6, 8, 10 และ 15.4 (ความชื้นเริ่มต้นก่อนทำการลด) เปอร์เซ็นต์ และปัจจัยรอง (sub plot) คือ ระยะเวลาในการเก็บรักษา 7 ระดับ คือ 0, 3, 6, 9,12, 15 และ 18 เดือน พบว่า ความชื้นเมล็ดและระยะเวลาการเก็บรักษามีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดชมจันทร์ในทุกอุณหภูมิที่เก็บรักษา การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เมล็ดที่ระดับความชื้น 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาได้นาน 18 เดือน มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 77, 82 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่เมล็ดที่ไม่ได้ผ่านการลดความชื้น เก็บรักษาได้นาน 9 เดือน เมื่อนำเมล็ดมาเก็บรักษาที่สภาพอุณหภูมิต่ำลง เมล็ดชมจันทร์ทุกระดับความชื้น สามารถเก็บรักษาได้นาน 18 เดือน และยังคงรักษาความงอกไว้ได้ โดยเมล็ดที่ความชื้น 6, 8, 10 และ 15.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาที่ 5 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 85, 83, 85 และ 49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาที่ -10 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 94, 83, 89 และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาที่ -196 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 83, 75, 75 และ 67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Abstract

Study on influence of seed moisture and storage temperature for seed germination and seed storage period of *Ipomoea alba*. This study was separated into four experiments based on the condition of storage temperature as follows; room temperature, 5 °C, -10 °C and freezing in liquid nitrogen (-196 °C). These experiments were designed in Split Plot Design with 4 replicates, including 2 factors as main plot with 4 level of percent moisture in seed at 6, 8, 10 and 15.4 (start seed humidity) and sub plot with 7 level of period for seed storage at 0, 3, 6, 9, 12, 15 and 18 months. The results showed that seed moisture and period of seed storage affected to the percent of seed germination of *I. alba* in all of storage temperature. The room temperature with 6, 8 and 10 percent of seed moisture (storage for 18 months) showed the seed germination at 77, 82 and 60 %, respectively, while non-reduced seed moisture could be storage about 9 months. The seed moisture not affected to seed germination of *I. alba*, which was kept at low temperature for 18 months. In addition, seed moisture of 6, 8, 10 and 15.4 % at 5 °C, -10 °C and

-196 ℃ exhibited the seed germination as (85, 83, 85 and 49 %), (94, 83, 89 and 78 %) and (83, 75, 75 and 67 %), respectively.

บทนำ

ต้นชมจันทร์ (Moonflower) เป็นพืชจัดอยู่ในวงศ์ Convolvulaceae สกุล Ipomoea มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ipomoea alba* L. ลักษณะเป็นเถาไม้เลื้อยอายุข้ามปี การปลูกจึงต้องทำค้างเพื่อให้ต้นเลื้อยพันขึ้น (Saensouk, 2007) ในต่างประเทศ เช่น ยุโรปและสหรัฐอเมริกา ปลูกเพื่อเป็นไม้ดอกไม้ประดับ แต่ในประเทศไทย มีการปลูกเพื่อนำดอกมารับประทานเป็นอาหาร โดยใช้ดอกตูมมาผัด ทำแกงส้ม หรือลวกจิ้มกับน้ำพริก เป็นต้น ปัจจุบันดอกชมจันทร์เป็นผักที่รู้จักและนิยมบริโภคอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นผักที่มีไขมันต่ำ มีธาตุเหล็ก ฟอสฟอรัส และวิตามินต่างๆ ประกอบกับผลผลิตมีราคาจำหน่ายค่อนข้างสูง และเป็นพืชที่ให้ผลผลิตเร็ว ทำให้เกษตรกรจำนวนมากให้ความสนใจในการปลูกชมจันทร์เป็นการค้า (มนตรี, 2554)

การปลูกและการขยายพันธุ์ต้นชมจันทร์นิยมใช้เมล็ด เมล็ดชมจันทร์ที่เหมาะสมในการนำมาเพาะต้องเป็นเมล็ดที่แก่เต็มที่แล้ว โดยการเก็บเกี่ยวส่วนฝักหรือผลที่เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล แยกเก็บเมล็ดออกจากเปลือกผล นำมาผึ่งในที่ร่มประมาณ 2-3 วัน เพื่อลดความชื้น ได้เมล็ดที่พร้อมเพาะกล้า หากยังไม่นำไปเพาะควรเก็บเมล็ดในถุงปิดสนิท แล้วนำไปแช่ไว้ในตู้เย็น เพื่อป้องกันการสูญเสียความงอก ลักษณะเมล็ดชมจันทร์ มีเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) ค่อนข้างแข็งและหนา หากนำเมล็ดไปเพาะทันที การดูดซึมน้ำและอากาศของเมล็ดเกิดขึ้นน้อย อาจทำให้เมล็ดมีการงอกช้าและเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำ จึงควรปฏิบัติต่อเมล็ดเพื่อช่วยให้มีการดูดซึมน้ำและอากาศได้ดีขึ้นก่อนที่จะนำไปเพาะ ซึ่งสามารถปฏิบัติได้หลายวิธี เช่น การแช่เมล็ดในน้ำ 12-24 ชั่วโมง การใช้กรรไกรขริบเปิดเปลือกหุ้มเมล็ด การลวกด้วยน้ำร้อน และการกะเทาะเมล็ด เป็นต้น

ปัจจัยหลักที่สำคัญปัจจัยหลักที่มีผลต่อการยืดอายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์คือความชื้นในเมล็ดพันธุ์ก่อนเก็บรักษาและอุณหภูมิในการเก็บรักษา การเสื่อมสภาพของเมล็ดพันธุ์จะลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากความชื้นในเมล็ดพันธุ์และอุณหภูมิในการเก็บรักษา และการลดลงของความงอกมีผลเนื่องมากจากปฏิกิริยารีดักชั่น (reduction) ของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส และปริมาณคาร์โบไฮเดรต การเพิ่มขึ้นของความชื้นและอุณหภูมิกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ขบวนการหายใจและการเคลื่อนที่ของสารผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้เกิดการเสื่อมของเมล็ดพันธุ์อย่างรวดเร็ว เมล็ดพันธุ์ที่มีความชื้นสูงจะมีอัตราการสูญเสียความงอกอย่างรวดเร็ว ในขณะที่เมล็ดพันธุ์ที่มีความชื้นต่ำจะมีอัตราการสูญเสียความงอกลดลง (Hlyka and Robinson, 1954) เมล็ดพันธุ์ที่สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานนั้นจะต้องมีความชื้นในเมล็ดต่ำโดยเฉพาะเมล็ดพันธุ์พืชที่มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบอยู่เป็นส่วนใหญ่ควรลดความชื้นภายในเมล็ดให้เหลือประมาณ 8-9 เปอร์เซ็นต์ เพราะเมล็ดที่มีความชื้นสูงมีอัตราการหายใจสูง มีการสะสมความร้อนและความชื้น จนอาจถึงระดับที่เป็นอันตรายต่อความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ได้ (จวงจันทร์, 2529) การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ในระยะยาว 10-20 ปี เมล็ดธัญพืชต้องมีความชื้นไม่เกิน 11 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดพืชน้ำมันและเมล็ดพืชผักต้องมีความชื้นไม่เกิน 9 เปอร์เซ็นต์ (สาวิตรี และ รุจิพร, 2541) ซึ่งสอดคล้องกับ Harrington (1959) รายงานว่าความชื้นที่ปลอดภัยต่อการเก็บรักษาสำหรับเมล็ดที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแป้งควรมีความชื้นต่ำกว่า 8 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ดที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นไขมันควรมีความชื้นต่ำกว่า 6 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้น เพื่อเป็นการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมชมจันทร์ โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความชื้นเมล็ดต่ออายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ในสภาพอุณหภูมิการเก็บรักษาต่างๆ ของธนาคารเชื้อพันธุ์พืช และการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว เพื่อใช้เป็นข้อมูลเทคนิคในการจัดการอนุรักษ์เมล็ดพันธุ์

ชมจันทร์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชให้มีอายุการเก็บรักษายาวนานที่สุด สำหรับใช้เป็นแหล่งฐานพันธุกรรมเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดชมจันทร์
2. เครื่องบด
3. เครื่องชั่งน้ำหนัก
4. ภาชนะอลูมิเนียม (Moisture can) พร้อมฝาปิด
5. ตู้อบความร้อนไฟฟ้าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Hot Air Oven)
6. ห้องลดความชื้นของธนาคารเชื้อพันธุ์พืชอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 15 เปอร์เซ็นต์ (Unheated seed room/seed moisture reduction room)
7. ถุงกระดาษสีน้ำตาล
8. ถุงอลูมิเนียมฟอยล์
9. โถดูดความชื้นที่มีสารดูดความชื้น
10. อุปกรณ์ทดสอบความงอก

วิธีการ

1. แบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลอง ตามอุณหภูมิการเก็บรักษา คือ
   การทดลองที่ 1 อุณหภูมิการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
   การทดลองที่ 2 อุณหภูมิการเก็บรักษาที่ 5 องศาเซลเซียส
   การทดลองที่ 3 อุณหภูมิการเก็บรักษาที่ -10 องศาเซลเซียส
   การทดลองที่ 4 อุณหภูมิการเก็บรักษาที่ -196 องศาเซลเซียส (สภาพเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว)

2. วางแผนการทดลองวางแผนการทดลองแบบ Split Plot Design จำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วย Main plot คือ ระดับความชื้นในเมล็ดพันธุ์ 4 ระดับ คือ
   - 15.4 เปอร์เซ็นต์ (ความชื้นในเมล็ดพันธุ์เริ่มต้น)
   - 10 เปอร์เซ็นต์
   - 8 เปอร์เซ็นต์
   - 6 เปอร์เซ็นต์

   Sub plot คือ ระยะเวลาในการเก็บรักษา 7 ระดับ คือ 0, 3, 6, 9,12, 15 และ 18 เดือน

3. การลดความชื้นเมล็ดพันธุ์ โดยใช้ห้องลดความชื้นของธนาคารเชื้อพันธ์พืชที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 15 เปอร์เซ็นต์ ลดความชื้นให้ได้ระดับที่ 4, 6, และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4. การทดสอบความชื้นเมล็ดพันธุ์ โดยวิธีอบด้วยความร้อน (Air-Oven Method) ตามวิธีการของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (ISTA, 2014) และประยุกต์ตามคู่มือการจัดการเมล็ดพันธุ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์ของ Biodiversity International /ILRI/FAO/CTA, 2006 และอ้างอิงขั้นตอนการปฏิบัติตามผักบุ้ง มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบ คลุกเคล้าให้ทั่ว โดยไม่ให้เมล็ดถูกอากาศนานเกิน 3 วินาที แล้วสุ่มเมล็ดมาเพื่อบดตัวอย่างละ 1.0-2.0 กรัม

4.2 การบดเมล็ด บดเมล็ดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบด แล้วแบ่งตัวอย่างที่บดแล้ว ใส่ในภาชนะอลูมิเนียมกลม ก้นแบน ที่มีฝาปิดพอดี 2 ซ้ำ นำไปชั่งน้ำหนักพร้อมภาชนะ โดยใช้เครื่องชั่งที่อ่านค่าทศนิยมได้ 3 ตำแหน่ง แล้วนำเข้าอบความร้อน

4.3 การอบตัวอย่าง นำตัวอย่างเข้าตู้อบไฟฟ้า ที่มีช่องระบายลม และสามารถควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ โดยใช้อุณหภูมิในการอบ 103 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 ± 1 ชั่วโมง โดยเอาฝาครอบรองไว้ใต้ภาชนะ เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วรีบปิดฝาทันที และนำออกจากตู้อบเก็บไว้ในโหลดูดความชื้น (Desiccator) ทิ้งไว้ให้เย็น 30-45 นาที แล้วนำออกมาชั่งน้ำหนักของภาชนะพร้อมทั้งเมล็ดและฝาปิดอีกครั้งหนึ่ง 13.4.4 การคำนวณผลการทดสอบ เปอร์เซ็นต์ความชื้นของเมล็ดคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และรายงานเพียงทศนิยมตำแหน่งเดียวเท่านั้น โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{ความชื้นเมล็ด (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{M2 - M3}{M2 - M1} \times 100$$

เมื่อ M1 คือ น้ำหนักเป็นกรัมของภาชนะและฝาปิด
M2 คือ น้ำหนักเป็นกรัมของภาชนะและฝาปิดและเมล็ดก่อนอบ
M3 คือ น้ำหนักเป็นกรัมของภาชนะและฝาปิดและเมล็ดหลังอบ

5. การเก็บรักษา นำเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการลดความชื้นในแต่ละระดับมาบรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟอยด์และปิดผนึกโดยมีการดูดอากาศออก และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส และสภาพเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

6. การเก็บข้อมูล โดยเก็บข้อมูลดังต่อไปนี้

6.1 เปอร์เซ็นต์ความงอกเมล็ดพันธุ์ เพาะทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์โดยวิธีเพาะบนกระดาษเพาะ ตามวิธีการของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (ISTA, 2014) อ้างตามขั้นตอนการปฏิบัติของผักบุ้ง ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- นำกระดาษเพาะขนาด 10x16 นิ้ว 3 แผ่น ชุบน้ำสะอาดให้ชุ่ม
- วางกระดาษเพาะ 2 แผ่น แล้วเรียง 5 แถว ๆละ 10 เมล็ด รวม 50 เมล็ด
- ปิดทับด้วยกระดาษอีกแผ่นหนึ่ง
- พับกระดาษจากด้านล่างขึ้นยาวประมาณ 1 นิ้ว และห่างจากเมล็ดประมาณ 1 นิ้ว
- ม้วนกระดาษจากด้านซ้ายไปขวา ให้ด้านที่พับริมอยู่ด้านล่าง
- นำม้วนกระดาษเพาะเมล็ด เก็บไว้ในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิดเพื่อรักษาความชื้น และเก็บรักษาไว้ในสภาพควบคุมอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส
- ระยะเวลาสำหรับการทดสอบความงอก ประมาณ 10 วัน
- การประเมินผลการทดสอบความงอก ตรวจสอบความงอกครั้งแรก (First Count) เมื่อต้นกล้ามีอายุ 4 วัน และตรวจสอบความงอกครั้งสุดท้าย (Final Count) เมื่อต้นกล้ามีอายุ 10 วัน โดยในการประเมินจะนับและแยกส่วนต่างๆหลังการเพาะครบเวลาตามกำหนดดังต่อไปนี้
- ต้นอ่อนปกติ (Normal Seedling) คือต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่มีส่วนประกอบต่างๆครบถ้วน
- ต้นอ่อนผิดปกติ (abnormal Seedling) คือต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่มีส่วนประกอบต่างๆไม่สมบูรณ์หรือขาดหายไป หรือผิดปกติไปจากเดิม

- เมล็ดแข็ง (Hard Seedling) คือเมล็ดที่มีลักษณะแข็ง ผิวเปลือกไม่ดูดน้ำ หลังจากเสร็จสิ้นการทดสอบจะมีลักษณะคงเดิมทุกอย่าง

- เมล็ดสดที่ไม่งอก (Fresh ungerminated seed) คือเมล็ดที่ดูดน้ำและขยายพองมีขนาดเมล็ดโตขึ้นแต่ไม่มีส่วนใดงอกออกมาเลย

- เมล็ดที่ตาย (Dead seed หรือ Rotten seed) คือเมล็ดตายที่มีลักษณะเน่าเปื่อย มีราขึ้นและไม่งอก

การประเมินผลจะเริ่มทำในวันนับครั้งแรก โดยบันทึกและนับออกของต้นอ่อนปกติ และเมล็ดที่ตาย ส่วนที่เหลือจะนับไม่เกินวันนับครั้งสุดท้ายหลังจากนั้นนำข้อมูลมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความงอกจากสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความงอก} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอกปกติ}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะ}} \times 100$$

6.2 การตรวจสอบความแข็งแรงโดยเร่งอายุเมล็ดพันธุ์ (accelerated aging test) ดัดแปลงจากวิธีการทดสอบความแข็งแรงเมล็ดพันธุ์ผักบุ้งของอรพรรณ (2534) โดยมีขั้นตอนคือ นำเมล็ดในแต่ละกรรมวิธีๆ ละ 15 กรัม ใส่ใน chamber ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 100% R.H. แล้วนำไปเร่งอายุในตู้อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเพาะทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ความงอก ตามวิธีการของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (ISTA, 2014)

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาทำการทดลอง 2 ปี เริ่มต้นเดือน ตุลาคม 2559 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2561

ทำการทดลองที่ ห้องปฏิบัติการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืช
กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์
อาคารทรัพยากรพันธุกรรมพืชสิรินธร
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1 การเก็บรักษาเมล็ดชมจันทร์ที่สภาพอุณหภูมิห้อง (1) อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส (2) อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส (3) และที่ -196 องศาเซลเซียส สภาพเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว (4)

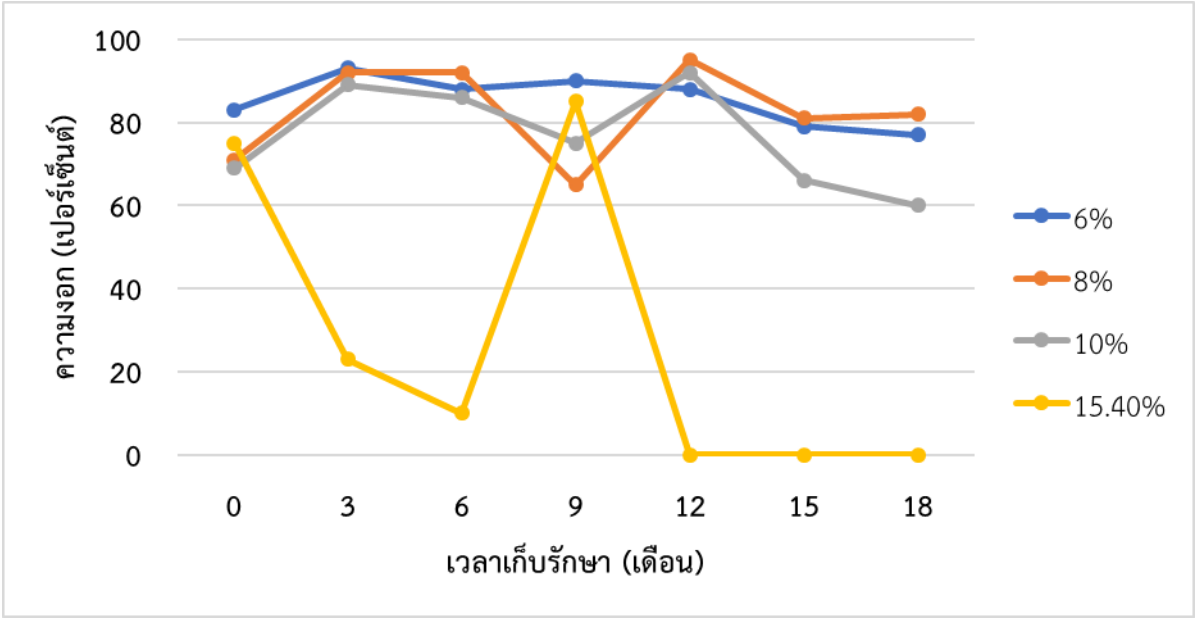
ภาพที่ 2 การทดสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 อุณหภูมิการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

จากการศึกษาผลของความชื้นเมล็ดต่ออายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ในสภาพอุณหภูมิห้อง ประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส โดยใช้เมล็ดที่มีความชื้นของเมล็ดแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 6, 8, 10 และ 15.4 (ความชื้นเริ่มต้นก่อนทำการลด) เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาเป็นเวลา 18 เดือน พบว่า ความชื้นเมล็ดและระยะเวลาการเก็บรักษามีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดชมจันทร์ จากการทดลองครั้งนี้เมล็ดชมจันทร์แต่ละระดับความชื้นมีเปอร์เซ็นต์ความงอกแปรปรวนค่อนข้างสูงคือ มีค่าสูงต่ำสลับกันบางช่วงเวลาเมื่ออายุการเก็บรักษาผ่านไป แต่มีแนวโน้มว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเก็บรักษานานขึ้นทำให้ความงอกของเมล็ดลดต่ำลงด้วย (ภาพที่ 3)

เห็นได้ว่าเมล็ดที่ผ่านกระบวนการลดความชื้น เมื่อนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง สามารถเก็บรักษาได้นานกว่าเมล็ดที่ไม่ได้ผ่านการลดความชื้น เมล็ดที่ระดับความชื้น 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาจนถึง 18 เดือน มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 77, 82 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่เมล็ดที่ไม่ได้ผ่านการลดความชื้น ซึ่งมีความชื้นเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา 15.4 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดชมจันทร์สูญเสียความงอกอย่างรวดเร็วเมื่อเวลาผ่านไป คือ เริ่มต้นเมล็ดมีความงอก 75 เปอร์เซ็นต์ ลดลงเหลือ 23 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อายุการเก็บรักษา 3 และ 6 เดือนตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาที่อายุ 12 เดือน นำเมล็ดมาทดสอบความงอก พบว่าเมล็ดชมจันทร์ไม่สามารถงอกได้ (ตารางที่ 1 และ 2)



ภาพที่ 3 แสดงผลของเปอร์เซ็นต์ความชื้นในเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ที่มีต่อความงอกเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ เมื่อผ่านการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง ที่ระยะเวลาต่างๆ

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดชมจันทร์ที่อายุการเก็บรักษาต่างๆ ในแต่ละระดับความชื้นเมื่อเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง

เวลาเก็บรักษา (เดือน)	ความชื้นของเมล็ด (เปอร์เซ็นต์)			
	6	8	10	15.4
0	83 a	71 b	69 bc	75 a
3	93 a	92 a	89 a	23 b
6	88 a	92 a	86 ab	10 b
9	90 a	65 b	75 abc	85 a
12	88 a	95 a	92 a	0 c
15	79 a	81 ab	66 c	0 c
18	77 a	82 ab	60 c	0 c
ค่าเฉลี่ย	**85**	**82**	**76**	**27**

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันของแต่ละเดือน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความงอกเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ที่ระดับความชื้นและอายุการเก็บรักษาต่างๆ เมื่อเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง

ความชื้นเมล็ด (เปอร์เซ็นต์)	เวลาเก็บรักษา (เดือน)						
	0	3	6	9	12	15	18
6	83 a	93 a	88 a	90 a	88 a	79 a	77 ab
8	71 a	92 a	92 a	65 b	95 a	81 a	82 a
10	69 a	89 a	86 a	75 ab	92 a	66 a	60 b
15.4	75 a	23 b	10 b	85 a	0 c	0 c	0 c
ค่าเฉลี่ย	**74**	**74**	**70**	**76**	**69**	**56**	**55**

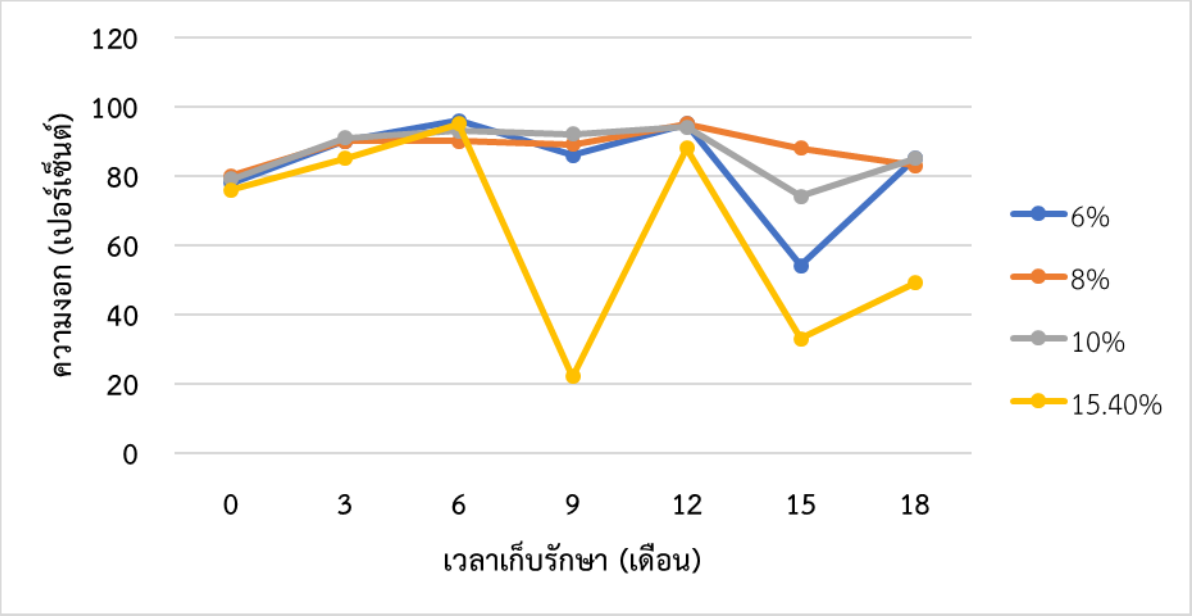
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันของแต่ละเดือน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2 อุณหภูมิการเก็บรักษาที่ 5 องศาเซลเซียส

การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่ามีความสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างระดับความชื้นของเมล็ดและอายุการเก็บรักษา ต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกที่แตกต่างกันทางสถิติของแต่ละระดับความชื้น โดยความงอกของเมล็ดเริ่มต้นจนถึงที่อายุเก็บรักษา 9 เดือน ทุกระดับความชื้นความงอกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ระหว่าง 76-96 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4) และหลังจากการเก็บรักษาที่อายุ 9-18 เดือน เมล็ดที่ระดับความชื้น 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ยังคงมีเปอร์เซ็นต์ความงอกที่ดีและลดลงเพียงเล็กน้อย โดยเมื่อเก็บรักษาจนถึง 18 เดือน มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 85, 83 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และ 4)

ขณะที่เมล็ดชมจันทร์ที่ไม่ผ่านการลดความชื้น ซึ่งยังมีความชื้นค่อนข้างสูงถึง 15.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาที่สภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 9 เดือน เมล็ดมีความงอกลดลงอย่างรวดเร็ว และมีความแปรปรวนของความงอกค่อนข้างสูง เมื่อมีการเก็บรักษานานขึ้น โดยการเก็บรักษาจนถึง 18 เดือน พบว่ามี

เปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำสุดเท่ากับ 49 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเมล็ดที่ระดับความชื้น 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4, ตารางที่ 3 และ 4) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบการเก็บรักษาเมล็ดในสภาพอุณหภูมิห้องกับอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เห็นได้ว่าเมล็ดทุกระดับความชื้นของการเก็บรักษาที่ 5 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดสูงกว่า และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาเมล็ดได้นานกว่าที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 4 แสดงผลของเปอร์เซ็นต์ความชื้นในเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ที่มีต่อความงอกเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ เมื่อผ่านการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดชมจันทร์ที่อายุการเก็บรักษาต่างๆ ในแต่ละระดับความชื้น เมื่อเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

เวลาเก็บรักษา	ความชื้นของเมล็ด (เปอร์เซ็นต์)			
(เดือน)	6	8	10	15.4
0	78 c	80 b	79 bc	76 b
3	90 abc	90 ab	91 ab	85 ab
6	96 a	90 ab	93 a	95 a
9	86 bc	89 ab	92 a	22 d
12	95 ab	95 a	94 a	88 ab
15	54 d	88 ab	74 c	33 cd
18	85 bc	83 b	85 abc	49 c
ค่าเฉลี่ย	**83**	**87**	**86**	**64**

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันของแต่ละเดือน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความงอกเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ที่ระดับความชื้นและอายุการเก็บรักษาต่างๆ เมื่อเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

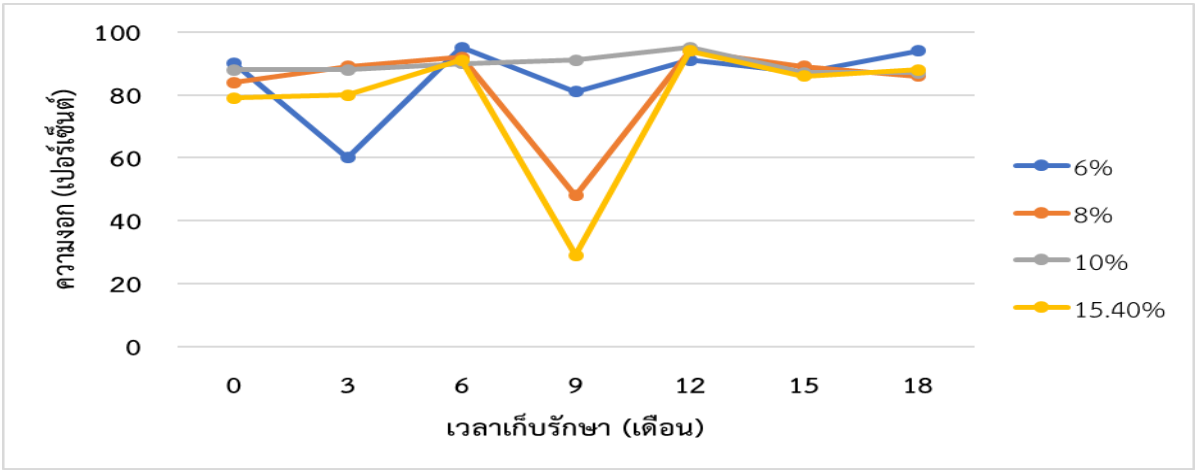
ความชื้นเมล็ด (เปอร์เซ็นต์)	เวลาเก็บรักษา (เดือน)						
	0	3	6	9	12	15	18
6	78 a	90 a	96 a	86 a	95 a	54 c	85 a
8	80 a	90 a	90 a	89 a	95 a	88 a	83 a
10	79 a	91 a	93 a	92 a	94 a	74 b	85 a
15.4	76 a	85 a	95 a	22 b	88 a	33 d	49 b
ค่าเฉลี่ย	**78**	**89**	**93**	**72**	**92**	**61**	**75**

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันของแต่ละเดือน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3 อุณหภูมิการเก็บรักษาที่ -10 องศาเซลเซียส

การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส พบว่ามีความสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างระดับความชื้นของเมล็ดและอายุการเก็บรักษา ต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ พบว่าแต่ละระดับความชื้น มีเปอร์เซ็นต์ความงอกแปรปรวนค่อนข้างสูงคือ มีค่าสูงต่ำสลับกันบางช่วงเวลาเมื่ออายุการเก็บรักษาผ่านไป แต่มีแนวโน้มว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส เมล็ดยังคงรักษาความงอกได้ดีในทุกระดับความชื้นคือ เมล็ดที่มีความชื้น 6, 8, 10 และ 15.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาจนถึง 18 เดือน มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 94, 83, 89 และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 5, ตารางที่ 5 และ 6)

เมื่อเปรียบเทียบการเก็บรักษาเมล็ดในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส กับการเก็บรักษาที่ 5 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เห็นได้ว่าการเก็บรักษาเมล็ดในสภาพอุณหภูมิต่ำที่ -10 องศาเซลเซียส เมล็ดชมจันทร์มีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดสูงกว่า และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาเมล็ดได้นานกว่าที่เก็บไว้ที่ 5 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง (ตารางที่ 1, 3 และ 5)



ภาพที่ 5 แสดงผลของเปอร์เซ็นต์ความชื้นในเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ที่มีต่อความงอกเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ เมื่อผ่านการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดชมจันทร์ที่อายุการเก็บรักษาต่างๆ ในแต่ละระดับความชื้น เมื่อเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

เวลาเก็บรักษา (เดือน)	ความชื้นของเมล็ด (เปอร์เซ็นต์)			
	6	8	10	15.4
0	90 ab	84 c	88 b	79 c
3	60 d	89 abc	88 b	80 c
6	95 a	92 ab	90 b	91 ab
9	81 c	48 d	91 b	29 d
12	91 ab	94 a	95 a	94 a
15	87 bc	89 abc	87 b	86 bc
18	94 a	86 bc	87 b	88 b
ค่าเฉลี่ย	**85**	**83**	**89**	**78**

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันของแต่ละเดือน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

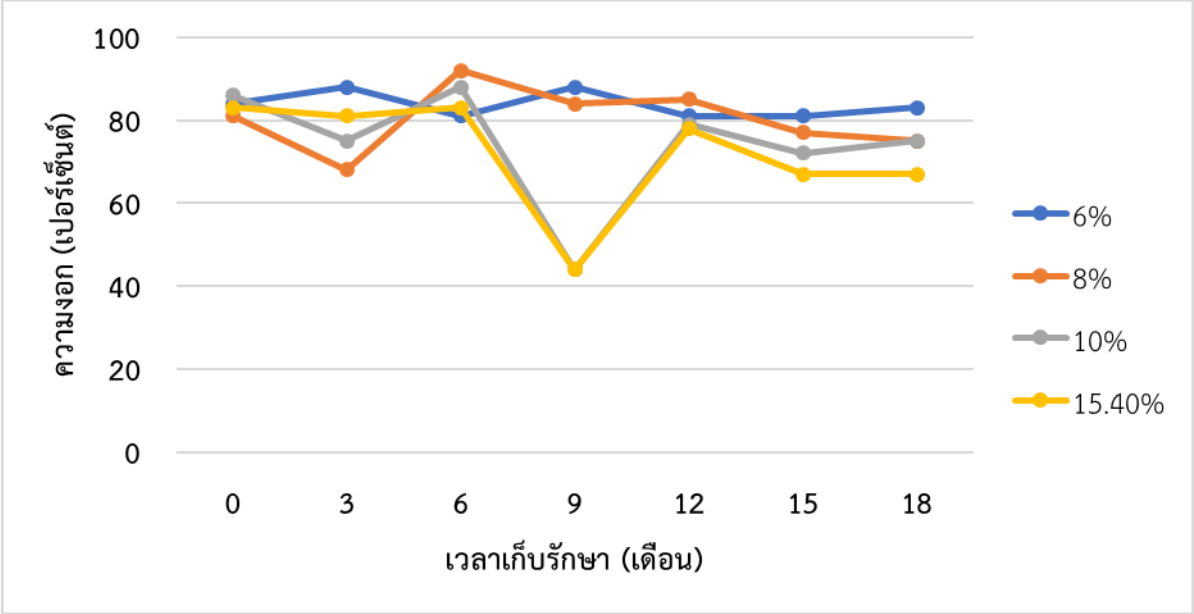
ตารางที่ 6 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความงอกเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ที่ระดับความชื้นและอายุการเก็บรักษาต่างๆ เมื่อเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

ความชื้นเมล็ด (เปอร์เซ็นต์)	เวลาเก็บรักษา (เดือน)						
	0	3	6	9	12	15	18
6	90 a	60 c	95 a	81 b	91 a	87 a	94 a
8	84 ab	89 a	92 a	48 c	94 a	89 a	86 b
10	88 a	88 a	90 a	91 a	95 a	87 a	87 b
15.4	79 b	80 b	91 a	29 d	94 a	86 a	88 b
ค่าเฉลี่ย	**85**	**79**	**92**	**62**	**94**	**87**	**89**

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันของแต่ละเดือน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 4 อุณหภูมิการเก็บรักษาที่ -196 องศาเซลเซียส (สภาพเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว)

การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ที่สภาพเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส พบว่ามีความสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างระดับความชื้นของเมล็ดและอายุการเก็บรักษาคือ เมล็ดที่ระดับความชื้น 6 เปอร์เซ็นต์ความงอกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ยังคงมีความงอกที่ดีและลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเก็บรักษาจนถึง 18 เดือน มีเปอร์เซ็นต์ความงอก 81-88 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดที่ระดับความชื้น 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์ความงอกแตกต่างกันทางสถิติ โดยเมื่อเก็บรักษาจนถึง 18 เดือน มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 75 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเมล็ดที่ระดับความชื้น 15.4 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าจะมีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดที่ต่ำกว่าคือ 67 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6, ตารางที่ 7 และ 8) แต่อยู่ในระดับที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และที่สภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 6 แสดงผลของเปอร์เซ็นต์ความชื้นในเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ที่มีต่อความงอกเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ เมื่อผ่านการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดชมจันทร์ที่อายุการเก็บรักษาต่างๆ ในแต่ละระดับความชื้น เมื่อเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

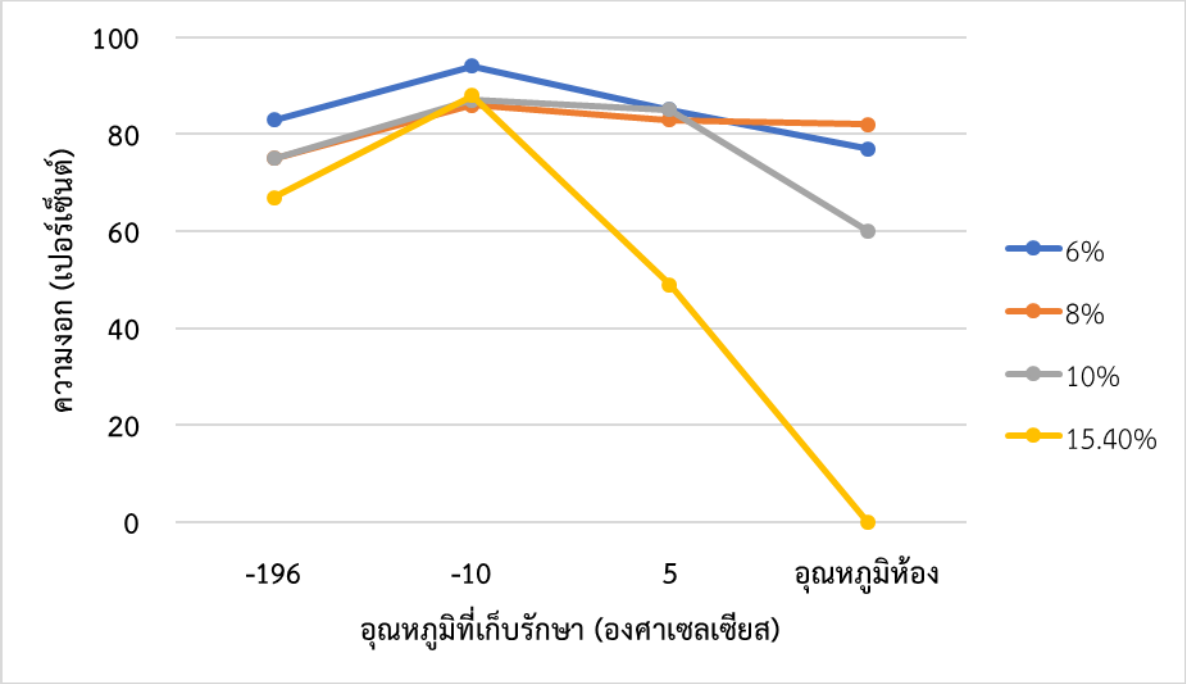
เวลาเก็บรักษา	ความชื้นของเมล็ด (เปอร์เซ็นต์)			
(เดือน)	6	8	10	15.4
0	84 a	81 bc	86 ab	83 a
3	88 a	68 d	75 c	81 a
6	81 a	92 a	88 a	83 a
9	88 a	84 b	44 d	44 c
12	81 a	85 b	79 bc	78 a
15	81 a	77 bcd	72 c	67 b
18	83 a	75 cd	75 c	67 b
ค่าเฉลี่ย	84	80	74	72

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันของแต่ละเดือน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความงอกเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ที่ระดับความชื้นและอายุการเก็บรักษาต่างๆ เมื่อเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

ความชื้นเมล็ด (เปอร์เซ็นต์)	เวลาเก็บรักษา (เดือน)						
	0	3	6	9	12	15	18
6	84 a	88 a	81 b	88 a	81 a	81 a	83 a
8	81 a	68 c	92 a	84 a	85 a	77 ab	75 ab
10	86 a	75 bc	88 ab	44 b	79 a	72 bc	75 ab
15.4	83 a	81 ab	83 b	44 b	78 a	67 c	67 b
ค่าเฉลี่ย	**84**	**78**	**86**	**65**	**81**	**74**	**75**

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันของแต่ละเดือน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบความงอกของเมล็ดชมจันทร์ที่อายุเก็บรักษา 18 เดือน เมื่อความชื้นภายในเมล็ดและอุณหภูมิที่เก็บรักษาเมล็ดมีความแตกต่างกัน

ความชื้นของเมล็ดและอุณหภูมิในการเก็บรักษา เป็นตัวแปรร่วมที่สำคัญในการยืดอายุเก็บรักษาเมล็ดให้ยังคงมีชีวิตได้ยาวนาน สภาพที่เมล็ดมีความชื้นสูงและอุณหภูมิสูง จะมีอัตราการหายใจสูง มีการสะสมความร้อนและความชื้นจนอาจถึงระดับที่เป็นอันตรายต่อความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ได้ (จวงจันทร์, 2529) จึงไม่เป็นผลดีสำหรับการเก็บรักษา จากการศึกษาครั้งนี้เห็นได้ว่าเมล็ดชมจันทร์ที่ไม่ได้ผ่านการลดความชื้น มีความชื้นสูงถึง 15.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาเก็บรักษาที่สภาพอุณหภูมิห้อง ที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูงประมาณ 30 องศาเซลเซียส เมล็ดสูญเสียความงอกอย่างรวดเร็วและเก็บได้นานแค่ 9 เดือน สอดคล้องกับการศึกษาของทิพย์สุคนธ์ และคณะ (2557) พบว่าเมล็ดเก็บเกี่ยวที่ระดับความชื้น 17.01 และ 12.54 เปอร์เซ็นต์ มีความงอก 57.50 และ 56.25 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ เป็นเมล็ดอยู่ในกลุ่ม Orthodox seed คือ เมล็ดที่สามารถลดความชื้นได้ต่ำ

กว่า 10 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่มีกระทบต่อความมีชีวิตของเมล็ด เมื่อลดความชื้นของเมล็ดพันธุ์ชมจันทร์ลงที่ระดับระดับ 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาเก็บรักษาที่สภาพอุณหภูมิห้องเช่นกัน สามารถเก็บรักษาได้นาน 18 เดือน และเมล็ดยังคงมีความงอกค่อนข้างสูงถึง 60-72 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 7)

เมื่อนำเมล็ดชมจันทร์ทั้งที่ผ่านการลดความชื้นและไม่ลดความชื้น มาเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำลงคือที่ 5 องศาเซลเซียส -10 องศาเซลเซียส และที่สภาพเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เห็นได้ว่าเมล็ดทุกระดับความชื้นสามารถเก็บรักษาได้นานกว่า และมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงกว่าเมล็ดที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง แม้ว่าความงอกในแต่ละช่วงเวลาการเก็บรักษาจะมีความแปรปรวนขึ้นลงอยู่บ้าง ซึ่งอาจจะเป็นเพราะลักษณะสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของเมล็ดชมจันทร์ ซึ่งหลังจากการเก็บเกี่ยวเมล็ดจะมีลักษณะที่เป็นเมล็ดแข็ง (hard seed) ซึ่งอาจมีผลต่อการงอกในแต่ละรอบของการเก็บรักษาและการทดสอบ โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส เมล็ดทุกระดับความชื้นยังสามารถมีชีวิต โดยมีความงอกสูงที่สุด 78-94 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือที่ -196 องศาเซลเซียส ความงอก 67-83 เปอร์เซ็นต์ และที่ 5 องศาเซลเซียส เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 49-85 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานาน 18 เดือน

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. ความชื้นของเมล็ดและอุณหภูมิในการเก็บรักษา เป็นตัวแปรร่วมที่สำคัญในการยืดอายุเก็บรักษาเมล็ดให้ยังคงมีชีวิตได้ยาวนาน

2. เมล็ดชมจันทร์ที่ไม่ได้ผ่านการลดความชื้น มีความชื้นสูง เมื่อนำมาเก็บรักษาที่สภาพอุณหภูมิห้อง เมล็ดสูญเสียความงอกอย่างรวดเร็วและมีอายุการเก็บรักษาสั้นกว่าเมล็ดที่ลดความชื้นที่ระดับ 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์

3. เมล็ดชมจันทร์ทั้งที่ผ่านการลดความชื้นและไม่ลดความชื้น เมื่อเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำลงคือ ที่ 5 องศาเซลเซียส -10 องศาเซลเซียส และที่สภาพเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เห็นได้ว่าเมล็ดทุกระดับความชื้นสามารถเก็บรักษาได้นานกว่า และมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงกว่าเมล็ดที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง

การเก็บรักษาเมล็ดชมจันทร์ในสภาพอุณหภูมิต่ำลง เป็นเวลา 18 เดือน เมล็ดทุกระดับความชื้นยังคงสามารถมีชีวิตและมีความงอกที่ดี จึงควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับระยะเวลาการในเก็บรักษาให้นานมากขึ้นจากเดิม

กิจกรรมที่ 2 เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ

การทดลองที่ 1 : การอนุรักษ์พันธุกรรมอ้อยในสภาพเยือกแข็งโดยใช้ปลายยอด

: Conservation of Sugarcane (*Saccharum spp.)* Shoot Tip Using Cryopreservation Technique

ชื่อผู้วิจัย

หัวหน้าการทดลอง **:** ปาริฉัตร สังข์สะอาด

ผู้ร่วมงาน : 1. นางสาวสุกัลยา ศิริฟองนุกูล

: 2. นางรัชนก ทองเวียง

: 3. นายวรกิจ ห้องแซง

: 4. นายกษิดิศ ดิษฐบรรจง

บทคัดย่อ

การศึกษาการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) โดยทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อย 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์อู่ทอง12 ขอนแก่น3 อู่ทอง5 K84-200 และ อ้อยเคี้ยวเมอริชาด โดยเพาะเลี้ยงเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอ่อนอ้อย ใช้ในการศึกษาสูตรอาหารในการ preculture ปลายยอดบนอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.08 และ 0.4 โมลาร์ เป็นเวลา 3-6 วัน ด้วยวิธี vitrification พบว่าสูตรอาหาร preculture ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.4 โมลาร์ มีแนวโน้มอัตราการรอดชีวิตดีกว่า ในส่วนของการศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยในสภาพเยือกแข็งจำนวน 3 เทคนิค ได้แก่ Vitrification, Encapsulation – vitrification และ Encapsulation – dehydration พบว่าการทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยในสภาพเยือกแข็งโดยเทคนิค Vitrification ปลายยอดอ้อยทุกพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่าเทคนิค Encapsulation – vitrification และ Encapsulation – dehydration เมื่อไม่ได้แช่ในไนโตรเจนเหลว (-LN) แต่เมื่อแช่ในไนโตรเจนเหลวยังไม่พบอัตราการรอดชีวิตในทุกเทคนิค

ABSTRACT

The shoot tips of sugarcane were used for cryopreservation technique, which was applied to 5 varieties (K84-200, U-thong12, Khonkan3, U-thong5 and Merichard) , the sugarcane shoot tips were precultured on modified MS medium supplement with different concentration of 0.08M sucrose and 0.4M sucrose for 3 - 6 days by vitrification method, the result was not difference in the survival rate but preculture with 0.4M sucrose the survival rate was better. The part of study on cryopreservation techniques for preserved the sugarcane shoot tips 3 techniques were Vitrification, Encapsulation – vitrification and Encapsulation – dehydration techniques. The vitrification technique showed the higher percentage of the survival rate than Encapsulation – vitrification and Encapsulation – dehydration techniques all of sugarcane varieties after non-liquid nitrogen (-LN). In contrast, the survival rate was not found after cryopreservation.

บทนำ

การปลูกอ้อยเพื่อการค้าโดยทั่วไปทางโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลจะรับซื้อผลผลิตอ้อยจากเกษตรกรตามน้ำหนัก (ตัน) และคุณภาพความหวาน (CCS) และจากสถานการณ์ปัจจุบันได้มีการกำหนดมาตรฐานของน้ำตาลทรายดิบที่ส่งออกไปต่างประเทศ มีการกำหนดปริมาณแป้งปนเปื้อนได้ไม่เกิน 800 ppm. ซึ่งส่งผลกระทบต่อพันธุ์อ้อยที่ปลูกเพราะพื้นที่ปลูกประมาณ 80 % ใช้อ้อยพันธุ์ K 84-200 ที่มีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมทั่วประเทศได้ดี แต่มีปริมาณแป้งในน้ำอ้อยมากกว่า 1,000 ppm. (กนกทิพย์ และ ประชา, 2550) จึงมีการรณรงค์ให้เกษตรกรลด/เลิกปลูก แต่ยังคงมีการใช้พ่อแม่พันธุ์ในการพัฒนาสายพันธุ์อ้อย เกษตรกรจึงได้ปรับเปลี่ยนมาใช้พันธุ์อ้อยที่ให้ผลผลิตต่อไร่และมีค่า CCS สูงกันมากขึ้นตามคำแนะนำ ด้วยเหตุผลนี้เองทำให้สายพันธุ์อ้อยดั้งเดิมที่ทนต่อสภาพแวดล้อมและโรคแมลงได้ดีเริ่มลดพื้นที่ปลูกลง และจากงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ผลผลิตชีวมวลในการนำผลผลิตทางการเกษตรมาใช้ในการผลิตเอทานอล สายพันธุ์อ้อยที่มีค่าเส้นใย (fiber) สูงได้กลับเข้ามามีบทบาทอีกครั้งหนึ่ง งานวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับการรวมรวมพันธุ์อ้อยสายพันธุ์ต่างๆ จึงมีความสำคัญมากขึ้นทั้งในแง่การปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุกรรม เนื่องจากอ้อยเป็นพืชอายุยาว การดูแลรักษาในสภาพแปลงต้องใช้แรงงาน และพื้นที่มาก ทางหน่วยงานของรัฐและเอกชนได้มีการเก็บรวบรวมสายพันธุ์ต่างๆไว้มากมายในสภาพปลอดเชื้อ (*In vitro*) จากการเก็บรวบรวมสายพันธุ์ต่างๆไว้เป็นจำนวนมากนี้เองทำให้งานเก็บรักษาพันธุ์อ้อยโดยวิธีนี้ต้องใช้เวลา และแรงงานมาก เนื่องจากการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารอย่างน้อย 3-4 เดือนครั้ง การเก็บรักษาพันธุกรรมพืชในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) จึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่นำมาใช้เก็บรักษาพันธุกรรมพืชที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส สามารถใช้อนุรักษ์เชื้อพันธ์พืชที่ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและไม่สามารถเก็บเมล็ดได้

หลักการสำคัญของวิธีการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชในสภาพเยือกแข็งที่จะใช้ได้อย่างประสบความสำเร็จ คือ ต้องป้องกันไม่ให้เซลล์กลายเป็นผลึกน้ำแข็ง (ice crystal) ซึ่งจะเป็นอันตรายแก่เซลล์ วิธีป้องกันการกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง เพื่อให้สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธ์พืชในรูปของเซลล์เนื้อเยื่อและอวัยวะพืชในไนโตรเจนเหลว คือ การลดปริมาณน้ำภายในเซลล์หรือทำให้เซลล์สูญเสียน้ำน้อยที่สุด (dehydration) ซึ่งสามารถทำได้โดย การให้อุณหภูมิต่ำอย่างช้า (conventional slow freezing) การให้อุณหภูมิต่ำอย่างง่าย (simple freezing) การทำให้เกิดสภาพแก้วอย่างสมบูรณ์ (complete vitrification) การทำให้แห้ง (air drying) วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในสภาพเยือกแข็งมีหลายวิธี ได้แก่ วิธี vitrification, encapsulation-dehydration และ encapsulation-vitrification ซึ่งใช้พื้นที่น้อย ค่าใช้จ่ายต่ำ ไม่มีปัญหาผลกระทบจากสภาพแวดล้อมในการปลูกและการดูแลรักษาน้อยกว่าการเก็บในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและในสภาพแปลง เป็นการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในระยะยาว (long term) สะดวกในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์พืชระหว่างประเทศ เพราะมีขนาดเล็กและปลอดโรค สำหรับในประเทศไทยงานวิจัยที่ผ่านมามีการใช้เทคนิคการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชในสภาพเยือกแข็งในการเก็บเมล็ดและโปรโตคอมของกล้วยไม้ เอื้องคำ เอื้องเงิน ม้าบิน เขาแกะ และช้างกระ (ศุภกิจ, 2540; วราภรณ์, 2543; Thammasiri, 2000; Thammasiri, 2002) ชิ้นส่วนของปลายยอด (shoot tip) ของพืชที่ใกล้สูญพันธุ์และหายาก เช่น ขนุนไพศาลทักษิณ (Thammasiri, 1999) เป็นต้น

เนื่องจากธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร มีภารกิจในด้านการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชให้เหมาะสมกับชนิดของพืชแต่ละชนิดเพื่อเป็นประโยชน์ในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์ระหว่างหน่วยงาน และนำไปปรับใช้กับพืชชนิดอื่นในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชตามภารกิจของหน่วยงาน

เพื่อศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาปลายยอดอ้อยในสภาพเยือกแข็งเพื่อการอนุรักษ์

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ท่อนพันธุ์อ้อย จำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์อู่ทอง12 ขอนแก่น3 อู่ทอง5 K84-200 และ อ้อยเคี้ยวเมอริชาด

2. ไนโตรเจนเหลว

3. เครื่องแก้วและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง (Cryopreservation)

4. วัสดุปลูกต่างๆ สำหรับปลูกท่อนพันธุ์มันเทศ ได้แก่ กระถาง, กระบะเพาะ, ดินปลูก ทราย เป็นต้น

วิธีการ

- แบบและวิธีการทดลอง

ทำการทดลองการเก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยในสภาพเยือกแข็ง ได้แก่ พันธุ์ K 84-200, อู่ทอง 12, ขอนแก่น 3, อู่ทอง5 และอ้อยเคี้ยวพันธุ์เมอริชาด รวม 5 พันธุ์ จัดเป็น 5 การทดลอง ในแต่ละการทดลองวางแผนการทดลองแบบ RCB 6 ซ้ำ 3 กรรมวิธี ได้แก่ เทคนิค vitrification, เทคนิค encapsulation-vitrification และ เทคนิค encapsulation-dehydration

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

การเตรียมตัวอย่างและชิ้นส่วนพืช คือ นำต้นพันธุ์อ้อยมาปลูกในท่อซีเมนต์เพื่อขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนหน่อ (ปลายยอด) หลังจากนั้นนำปลายยอดอ้อยที่ปลูกในท่อซีเมนต์มาฟอกฆ่าเชื้อและนำมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA (6-benzyladenine) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาล (sucrose) 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น (agar) 6.25 กรัม และน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตรศึกษาวิธีการเก็บชิ้นส่วนพืชในสภาพเยือกแข็ง 3 วิธี ได้แก่

1. เทคนิค vitrification

นำปลายยอดและตาข้างของอ้อยทั้ง 5 พันธุ์ มาปรับสภาพ (preculture) หลังจากนั้นนำ shoot tips มาทำ LS (Glycerol 2 M และ sucrose 0.4 M) ประมาณ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ย้าย shoot tips ไปไว้ใน PVS3 (1 ml.) 50 % sucrose และ 50 % glycerol; Nishizawa et al., 1993) ที่บรรจุอยู่ใน cryotube เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบกำหนดใช้หลอดดูด PVS3 ใน cryotube ออก แล้วใส่ PVS3 เข้าไปใหม่ นำ cryotube ที่บรรจุ shoot tips ไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว (LN) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำตัวอย่างออกมาละลายในน้ำอุ่น 38 ℃ (Thawing) 1-2 นาที ดูดสารละลาย PVS3 ใน cryotube ออก นำชิ้นส่วนของ shoot tips ที่ได้ไปใส่ใน sucrose 1.2 M (US) เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำ shoot tips ที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม sucrose 0.3 M (Regrowth) เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่บรรจุใน 24 Well Cell culture บันทึกเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของปลายยอดและการเจริญเติบโตของต้นอ้อยในแต่ละการทดลองที่อายุ 1 เดือน

2. เทคนิคเทคนิค Encapsulation - vitrification

นำปลายยอดและตาข้างของอ้อยทั้ง 5 พันธุ์ มาปรับสภาพ (preculture) หลังจากนั้นทำ Encapsulation โดยนำปลายยอดใส่ใน alginate 3 % ใช้ปิเปตดูดส่วนของปลายยอดหยดลงในอาหารเหลว MS ที่เติม $CaCl_2$ 100 mM ร่วมกับ sucrose 0.4 M (pH 5.7) ประมาณ 20 นาที จะได้ alginate bead นำ alginate bead ที่ได้มาทำ osmotic dehydration ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม sucrose 0.4 M ร่วมกับ 2 M glyceral (LS) และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 60 นาที นำปลายยอดที่ได้แช่ในสารละลาย PVS3 (1 ml.) (50 %

sucrose และ 50 % glycerol; Nishizawa et al., 1993) ที่บรรจุอยู่ใน cryotube 60 นาที เมื่อครบกำหนดใช้หลอดดูด PVS3 ใน cryotube ออก แล้วใส่ PVS3 เข้าไปใหม่ นำ cryotube ที่มี shoot tips ในถังไนโตรเจนเหลว (LN) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกมาละลายในน้ำอุ่น 38°C (Thawing) 1-2 นาที ดูดสารละลาย PVS3 ใน cryotube ออก นำชิ้นส่วนของ shoot tips ไปใส่ใน sucrose 1.2 M (US) เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำ shoot tips ที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม sucrose 0.3 M (Regrowth) เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่บรรจุใน 24 Well Cell culture บันทึกเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของปลายยอดและการเจริญเติบโตของต้นอ้อยในแต่ละการทดลองที่อายุ 1 เดือน

3. เทคนิค Encapsulation - Dehydration

ดัดแปลงตามวิธีการของ Gupta and Husnara (2009) นำปลายยอดอ้อยทั้ง 5 พันธุ์ มาปรับสภาพ (preculture) ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม sucrose 0.3 M (pH 5. 8) ที่ 25°C (ที่มีแสง 16 ชั่วโมง ที่มืด 8 ชั่วโมง) เป็นเวลา 3 - 6 วัน หลังจากนั้นนำปลายยอดใส่ใน alginate 3 % ใช้ปิเปตดูดส่วนของปลายยอดหยดลงในอาหารเหลว MS ที่เติม $CaCl_2$ 100 mM ร่วมกับ sucrose 0.4 M (pH 5.7*)* ประมาณ 20 นาที จะได้ alginate bead นำ alginate bead ที่ได้มาทำ osmotic dehydration ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม sucrose 0.4 M ร่วมกับ 2 M glyceral (Loading solution, LS) ที่ pH 5.7 และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำ alginate bead มาวางบนกระดาษกรองเพื่อลดความชื้น (air desiccation) ในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำ alginate bead บรรจุในหลอดพลาสติค (cryotube) แช่ในถังไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen; LN) เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำ bead ออกมาละลายในน้ำอุ่น 38°C (Thawing) และทำ Rehydration โดยนำ bead แช่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม sucrose 1.2 M (Unloading solution, US) เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำ bead ที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม sucrose 0.3 M (Regrowth) เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่บรรจุใน 24 Well Cell culture บันทึกเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของปลายยอดและการเจริญเติบโตของต้นอ้อยในแต่ละการทดลองที่อายุ 1 เดือน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา(เริ่มต้น-สิ้นสุด)

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 –กันยายน 2561

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ

อาคารทรัพยากรพันธุกรรมพืชสิรินธร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลการทดลองและวิจารณ์

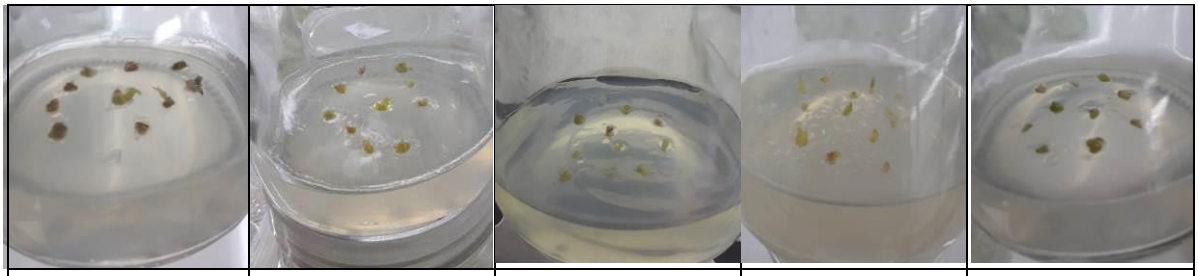
<u>การศึกษาการปรับสภาพปลาย (preculture) ยอดอ้อย</u>

จากการทดลองการปรับสภาพ (preculture) ของอ้อย 5 พันธุ์ (ภาพที่ 1) ได้แก่ อู่ทอง 12, ขอนแก่น 3, อู่ทอง 5, K84-200 และเมอริชาด ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม sucrose 2 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.08 M และ 0.4 M โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD 4 ซ้ำ รวมเป็น 10 กรรมวิธี พบว่า หลังจากตัดปลายยอดอ้อยทั้ง 5 พันธุ์ แล้วมาทำ preculture ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม sucrose ทั้งสองความเข้มข้น พบว่า ปลายยอดอ้อยมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1) ในขั้นตอนต่อไปของเทคนิค encapsulation-dehydration จะทำ alginate bead ในสารละลาย $CaCl_2$ 100 mM ร่วมกับ sucrose 0.4 M และในเทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification จะทำ LS (loading solution) ในสารละลาย Glycerol 2 M และ sucrose 0.4 M

ซึ่งทั้ง 3 เทคนิคนี้จะทำการแช่ในสารละลายที่มี sucrose 0.4 M เป็นส่วนประกอบเช่นเดียวกัน ดังนั้น จากผลการทดลองการปรับสภาพ (preculture) นี้ ในขั้นตอนการศึกษาการเก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค encapsulation-dehydration, vitrification, และ encapsulation-vitrification จะใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม sucrose ที่มีความเข้มข้น 0.4 M ในการปรับสภาพ ซึ่งจะเป็นการเตรียมความพร้อมให้ปลายยอดอ้อยปรับตัวได้ดีกว่าการทำ preculture ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม sucrose ที่มีความเข้มข้น 0.08 M

ตารางที่ 1 การปรับสภาพ (preculture) ของอ้อยพันธุ์อู่ทอง12, ขอนแก่น 3, อู่ทอง 5, K 84-200 และเมอริชาด

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต
1. อู่ทอง 12 + 0.08 M sucrose	95
2. อู่ทอง 12 + 0.4 M sucrose	100
3. ขอนแก่น 3 + 0.08 M sucrose	100
4. ขอนแก่น 3 + 0.4 M sucrose	100
5. อู่ทอง 5 + 0.08 M sucrose	97.5
6. อู่ทอง 5 + 0.4 M sucrose	100
7. K 84-200 + 0.08 M sucrose	100
8. K 84-200 + 0.08 M sucrose	100
9. เมอริชาด+ 0.08 M sucrose	95
10. เมอริชาด+ 0.4 M sucrose	100
F-test	ns
C.V. (%)	4.96



อู่ทอง 12 | **ขอนแก่น 3** | **อู่ทอง 5** | **K 83-200** | **เมอริชาด**

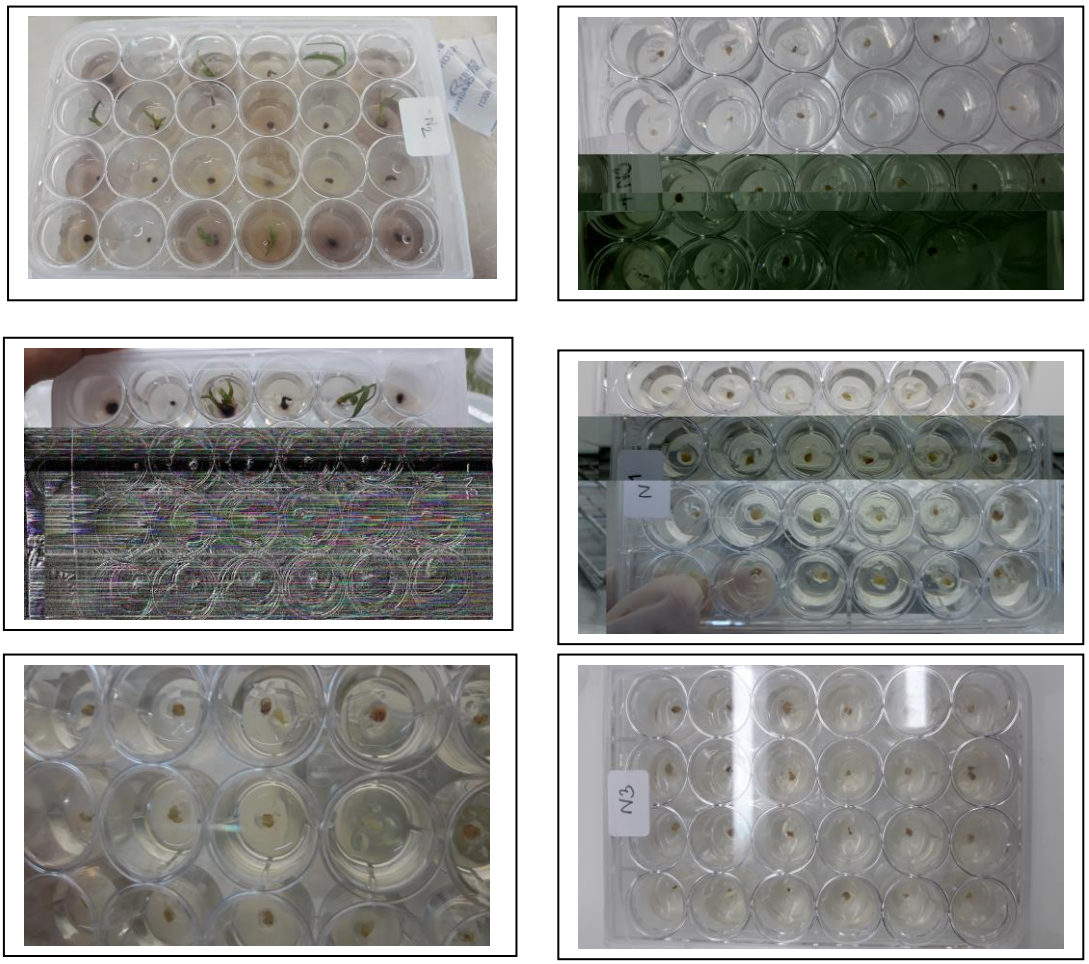
ภาพที่ 1 การปรับสภาพปลายยอดอ้อยพันธุ์อู่ทอง 12, ขอนแก่น, 3 อู่ทอง 5, K84-200 และเมอริชาด

<u>การเก็บรักษาปลายยอดอ้อย พันธุ์อู่ทอง12 ในสภาพเยือกแข็ง</u>

ทำการทดลองเก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยพันธุ์อู่ทอง12 ในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration พบว่าการรอดชีวิตของปลายยอดอ้อยเมื่อไม่ได้แช่เนื้อเยื่อปลายยอดในไนโตรเจนเหลว (-LN) ด้วยเทคนิค vitrification และ encapsulation-vitrification มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 10 และ 6.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเนื้อเยื่อแช่ในไนโตรเจนเหลว (+LN) ยังไม่พบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต ดังตารางที่ 2 (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 2 อัตราการรอดชีวิตของปลายยอดอ้อยพันธุ์อู่ทอง12 ที่เก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration

วิธีการเก็บรักษา	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต		ลักษณะที่พบ
	-LN	+LN	
Vitification	10	0	-
Encapsulation-Vitrification	6.66	0	-
Encapsulation-Dehydration	0	0	-



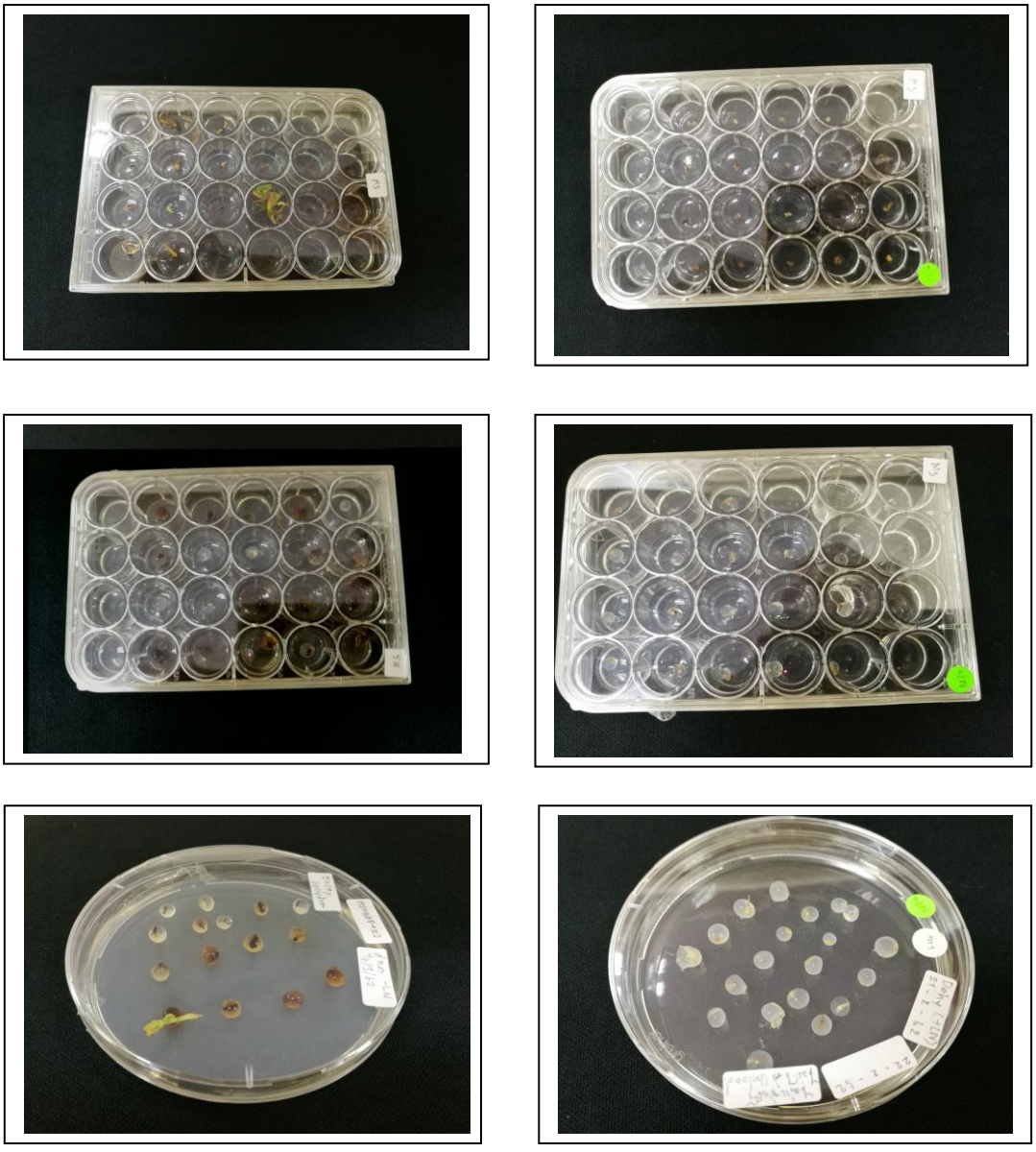
ภาพที่ 2 เก็บรักษาพันธุกรรมพันธุ์อ้อยอู่ทอง12 ในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) 3 เทคนิค

การเก็บรักษาปลายยอดอ้อย พันธุ์ขอนแก่น3 ในสภาพเยือกแข็ง

ทำการทดลองเก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยพันธุ์ขอนแก่น3 ในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration พบว่าทุกวิธีมีอัตราการรอดชีวิตเมื่อไม่ได้แช่เนื้อเยื่อปลายยอดในไนโตรเจนเหลว (-LN) 26.66 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ส่วนเนื้อเยื่อแช่ในไนโตรเจนเหลว (+LN) ยังไม่พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ดังตารางที่ 3 (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 3 อัตราการรอดชีวิตของปลายยอดอ้อยพันธุ์ขอนแก่น3 ที่เก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration

วิธีการเก็บรักษา	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต		ลักษณะที่พบ
	-LN	+LN	
Vitification	41.66	0	-
Encapsulation-Vitrification	30	0	-
Encapsulation-Dehydration	26.66	0	-



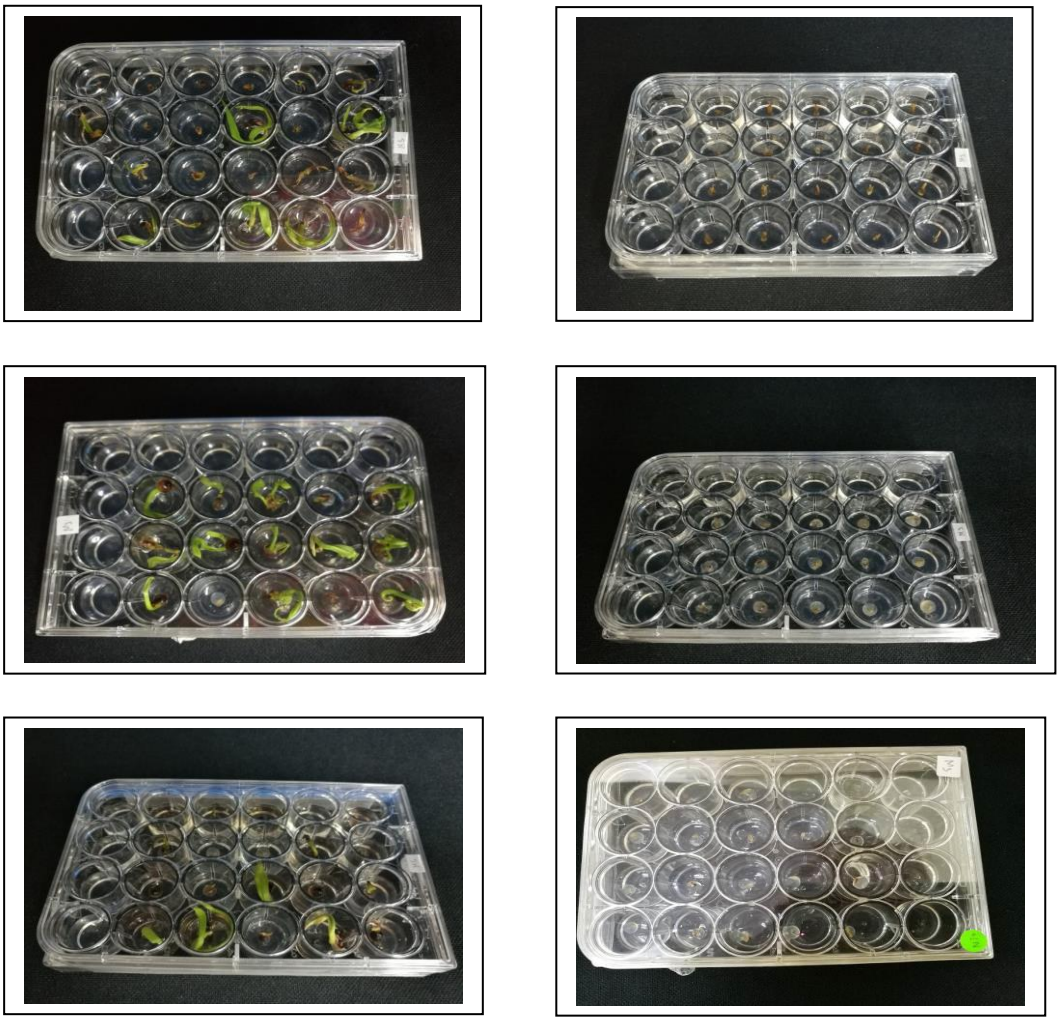
ภาพที่ 3 เก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยพันธุ์ขอนแก่น3 ในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) 3 เทคนิค

การเก็บรักษาปลายยอดอ้อย พันธุ์อู่ทอง5 ในสภาพเยือกแข็ง

ทำการทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยพันธุ์อู่ทอง 5 ในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration พบว่าทุกวิธีมีอัตราการรอดชีวิตเมื่อไม่ได้แช่เนื้อเยื่อปลายยอดในไนโตรเจนเหลว (-LN) 60 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป โดยเทคนิค vitrification มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด 81 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเนื้อเยื่อแช่ในไนโตรเจนเหลว (+LN) ยังไม่พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต แต่พบว่าเนื้อเยื่อมีลักษณะยืดตัวของปลายยอดในช่วงสัปดาห์แรกหลังจากนำออกจากการแช่ในไนโตรเจนเหลว และพบว่าเนื้อเยื่อกลายเป็นสีน้ำตาลหรือขาวซีดในเวลาต่อมา ดัง ตารางที่ 4 (ภาพที่ 4)

ตารางที่ 4 อัตราการรอดชีวิตของปลายยอดอ้อยพันธุ์อู่ทอง 5 ที่เก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration

วิธีการเก็บรักษา	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต		ลักษณะที่พบ
	-LN	+LN	
Vitification	81	0	+LN เนื้อเยื่อยังเขียวในช่วงเดือนแรก
Encapsulation-Vitrification	70	0	
Encapsulation-Dehydration	63	0	



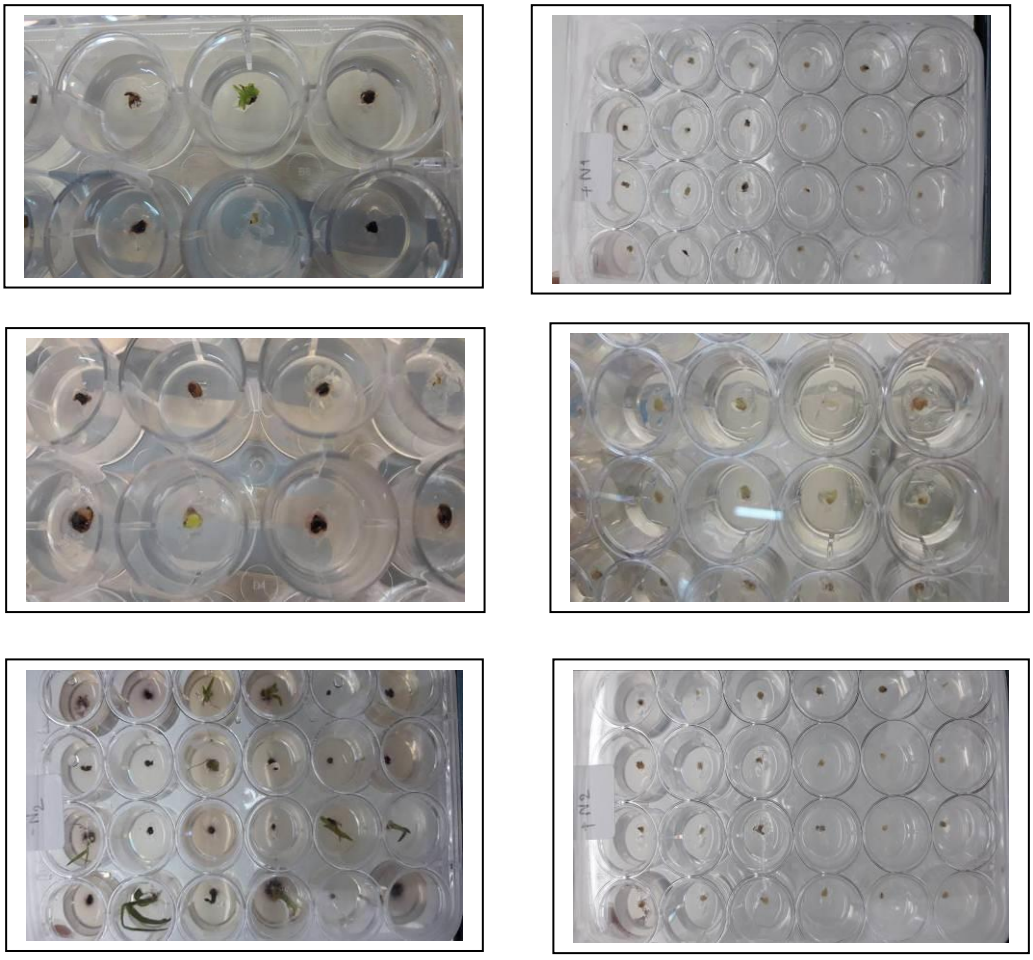
ภาพที่ 4 เก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยพันธุ์อู่ทอง5 ในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) 3 เทคนิค

การเก็บรักษาปลายยอดอ้อย พันธุ์ K84-200 ในสภาพเยือกแข็ง

ทำการทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยพันธุ์ K84-200 ในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration พบว่าทุกวิธีมีอัตราการรอดชีวิตเมื่อไม่ได้แช่เนื้อเยื่อปลายยอดในไนโตรเจนเหลว (-LN) 10 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป โดยเทคนิค vitrification มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด 23.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเนื้อเยื่อแช่ในไนโตรเจนเหลว (+LN) ยังไม่พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ดังตารางที่ 5 (ภาพที่)

ตารางที่ 5 อัตราการรอดชีวิตของปลายยอดอ้อยพันธุ์ K84-200 ที่เก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration

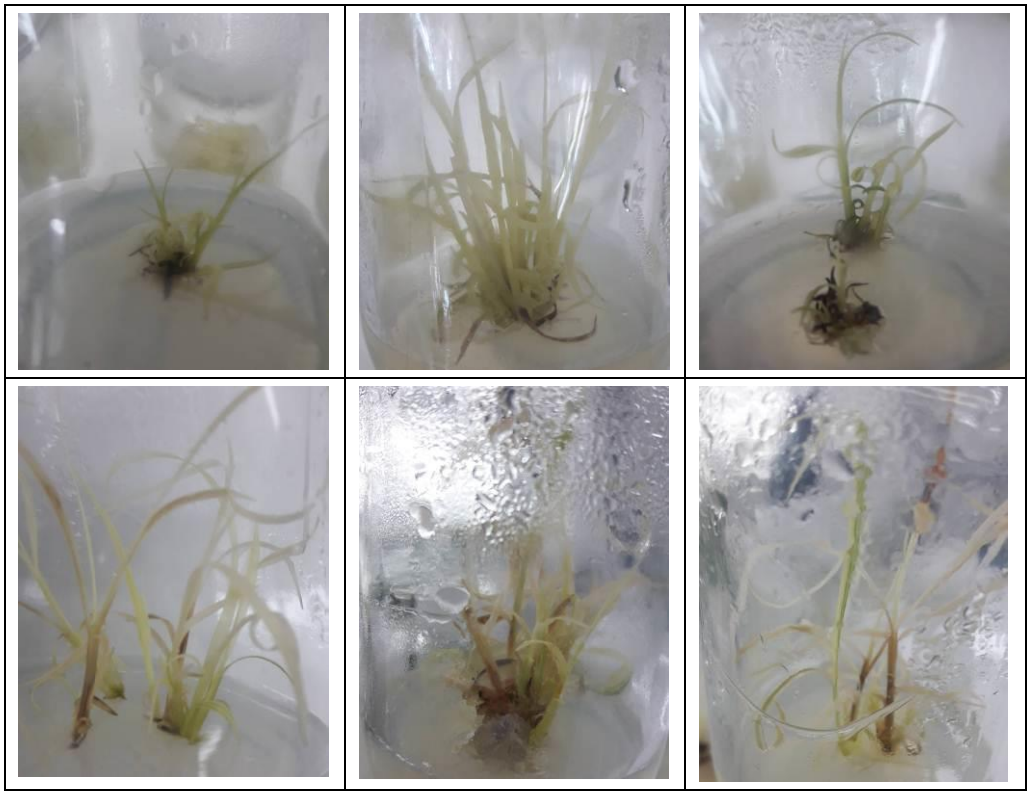
วิธีการเก็บรักษา	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต		ลักษณะที่พบ
	-LN	+LN	
Vitification	23.3	0	-
Encapsulation-Vitrification	16.6	0	-
Encapsulation-Dehydration	10	0	-



ภาพที่ 5 เก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยพันธุ์ K84-200 ในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) 3 เทคนิค

<u>การเก็บรักษาปลายยอด พันธุ์อ้อยเคี้ยวเมอริชาด ในสภาพเยือกแข็ง</u>

การทดลองเก็บรักษาอ้อยเคี้ยวพันธุ์เมอริชาด พบว่า ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีลักษณะซีดขาว (ภาพที่ 6) หลังจากได้มีการปรับสูตรอาหารให้ความเหมาะสมโดยใส่ปุ๋ยกล้วยไม้ (21-21-21) พบว่าหน่ออ่อนที่แตกขึ้นมาใหม่ยังเป็นสีขาวจึงได้ทดลองเพิ่มปริมาณปุ๋ยกล้วยไม้ (21-21-21) 1 กรัม เป็น 2 กรัมต่อลิตร แต่ยังพบว่าต้อนอ่อนยังคงเป็นสีขาว และไม่สามารถหาท่อนพันธุ์ใหม่มาปลูกเพื่อนำหน่อมาใช้ในการทดลองได้ทันเวลา จึงไม่สามารถทดลองการเก็บรักษาอ้อยพันธุ์เมอริชาดได้



ภาพที่ 6 ลักษณะสีต้นของอ้อยเคี้ยวพันธุ์เมอริชาดหลังจากนำมาขยายพันธุ์ในอาหารแข็งสูตร MS

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การ preculture ปลายยอดอ้อย 5 พันธุ์ ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม sucrose ที่มีความเข้มข้น 0.4 M ในการปรับสภาพ เป็นการเตรียมความพร้อมให้ปลายยอดอ้อยปรับตัวได้ดีกว่าการทำ preculture ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม sucrose ที่มีความเข้มข้น 0.08 M

2. การทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยโดยวิธี Vitification มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์ความรอดชีวิตสูงกว่าวิธี Encapsulation-Vitrification และ Encapsulation-Dehydration เมื่อยังไม่ได้แช่ลงในไนโตรเจนเหลว ควรทำการทดลองหาวิธีการที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนในแต่ละเทคนิค เช่น เวลาที่เหมาะสมในการ dehydration, ชนิดของ cryoprotectant เป็นต้น นอกจากนี้อาจหาวิธีใหม่ๆ เช่นการทำ droplet หรือการใช้ cryoplate ในการทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยในสภาพเยือกแข็งให้สำเร็จต่อไป

การทดลองที่ 2 : การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวโดยวิธีชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

: *In vitro* conservation of ChettamuunPhloengDaeng and ChettamuunPhloengKhaw via slow growth technique.

ชื่อผู้วิจัย

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวสุกัลยา ศิริฟองนุกูล

ผู้ร่วมงาน : 1. นางรัชนก ทองเวียง

: 2. นายวรกิจ ห้องแซง

บทคัดย่อ

การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชเจตมูลเพลิงขาวและเจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อ อาหารที่เหมาะสมในชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากสำหรับต้นเจตมูลเพลิงขาว คืออาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5-1.0 มก./ล. และต้นเจตมูลเพลิงแดง คืออาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.0 มก./ล.จากนั้นจึงทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ต้นเจตมูลเพลิงขาวและเจตมูลเพลิงแดงเกิดรากที่สมบูรณ์และเหมาะแก่การย้ายออกปลูกในธรรมชาติได้ พบว่าอาหารสูตร MS และ half-MS สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีและง่ายต่อการย้ายออกปลูกในธรรมชาติได้ง่าย เมื่อทดลองสูตรอาหารเพื่อชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า อาหารสูตรที่สามารถอนุรักษ์ต้นเจตมูลเพลิงขาวและเจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อจากการทดลองนี้ ได้เป็นเวลาอย่างน้อย 7-10 เดือน ได้แก่ อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล sucrose 2-3% ร่วมกับ การเติม mannitol 0-1%

Abstract

In vitro Conservation of Chettamuun Phloeng Khaw (*Plumbago zeylanica* L.) and Chettamuun Phloeng Daeng (*P. indica* L.) were tested. The optimum mediuminducing shoots for Chettamuun Phloeng Khaw was MS medium supplemented with 0.5-1.0 mg/l BA and for Chettamuun Phloeng Daeng was MS medium supplemented with 2.0 mg/l BA. After that, the appropriate formula for inducing the Chettamuun Phloeng Khaw and the Chettamuun Phloeng Daeng to form a complete root and suitable for transplanting in greenhouse were tested. It was found that both of MS and half-MS medium without plant growth regulators could be easily induced root and easily to move to greenhouse, too. When the slow growth experiments were tested, it was found that MS medium containing 2-3% sucrose and 0-1% mannitol was able to conserve the Chettamuun Phloeng Khaw and Chettamuun Phloeng Daeng for at least 7-10 months *in vitro* condition.

บทนำ

เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbagoindica*L.) และเจตมูลเพลิงขาว (*P. zeylanica* L.) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทยที่สำคัญชนิดหนึ่ง อยู่ในวงศ์ PLUMBAGINACEAE เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ใบเดี่ยวรูปมนรี ปลายใบแหลมโคนใบมน มีสีเขียวอมแดงเรียงสลับกัน (alternate) ไปตามข้อต้น ดอกออกเป็นช่อที่ปลายกิ่ง (เจตมูลเพลิงแดง ดอกสีแดง, เจตมูลเพลิงขาว ดอกสีขาว) ในธรรมชาติพบกระจายพันธุ์อยู่ทั่วไปในประเทศเขตร้อน เป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้มานานในหลายประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Chuakul*et al.*, 1994; พเยาว์, 2539) โดยมีสรรพคุณเป็นยาขับประจำเดือน รักษาโรคทางโลหิตในสตรี ออกฤทธิ์ต่อมดลูก แก้ปอดชื้นปอดบวม กระตุ้นการ

ทำงานของลำไส้และกระเพาะอาหาร ช่วยขับน้ำย่อย แก้ปวดข้อ และช่วยระงับอาการปวดฟัน ช่วยลดอาการเหงือกอักเสบ (เพ็ญนภา, 2542) นอกจากนี้ ยังใช้ทาแก้กลากเกลื้อน รับประทานเพื่อขับพยาธิ และแก้ท้องร่วง (วิทย์, 2542) ในรากของเจตมูลเพลิงแดงและพืชชนิดอื่นในสกุลเดียวกันมีสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม naphthoquinone ชื่อ plumbaginสะสมอยู่มากที่สุด มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ เช่นเชื้อแบคทีเรีย (Didry*et al.*, 1994) ต้านเชื้อมาลาเรีย (Nakornchai*et al.*, 1995) ต่อต้านมะเร็ง (Parimala and Sachdanandam, 1993) และยับยั้งการลอกคราบของหนอนผีเสื้อได้ (Kubo *et al*., 1983) เป็นต้น โดยเฉพาะในประเทศไทย ในบัญชียาหลักแห่งชาติได้เพิ่มบัญชียาจากสมุนไพร ซึ่งเป็นยาแผนไทย หรือยาแผนโบราณ และยาพัฒนาจากสมุนไพร ที่สามารถใช้รักษาได้ในโรงพยาบาลต่างๆ (ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ, 2556) มีตำรับยาไทยหลายขนานที่ต้องใช้รากเจตมูลเพลิงแดงและ/หรือเจตมูลเพลิงขาว (จุลพิกัดยาต่างกันที่สี) เป็นส่วนประกอบสำคัญ

การนำรากเจตมูลเพลิงแดงมาใช้เป็นส่วนประกอบในตัวยาแผนไทย หรือการนำไปผลิตสาร plumbagin เพื่อเป็นการค้านั้น จะต้องใช้รากของเจตมูลเพลิงแดงที่มีขนาดเหมาะสมและมีคุณภาพดี ใช้เวลาในการปลูกหลายปีแต่การปลูกในเชิงการค้ายังมีน้อย และมีปริมาณไม่พอใช้ต้องนำเข้าจากประเทศเพื่อบ้าน ประกอบกับเกิดมหาอุทกภัยทำให้พื้นที่ปลูกพืชสมุนไพรต่างๆ ได้รับความเสียหายจำนวนมาก ทำให้มีผู้นิยมขุดเก็บรากออกมาจากป่าเพื่อนำไปใช้ประโยชน์หรือนำไปขายกันมากขึ้น ซึ่งต่อไปในอนาคตอาจทำให้เกิดการสูญพันธุ์ได้ จึงสมควรหาทางอนุรักษ์พืชชนิดนี้โดยการขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมาก อย่างรวดเร็ว และนำกลับคืนสู่ป่า ซึ่งวิธีการอนุรักษ์และขยายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงคือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (รังสฤษดิ์, 2540; อารีย์, 2541)

ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งที่มีอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชและที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชแบบต่างๆ นั้น พืชแต่ละชนิดมีความต้องการปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน สารควบคุมการเจริญเติบโตที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือ สารในกลุ่มออกซิน(Auxin) และไซโตไคนิน(Cytokinin) ซึ่งสารที่นิยมกันมากคือ NAA (naphthalene acetic acid) และ BA (N_6-benzyladenine) นอกจากนี้ สถานที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต่างกันยังส่งผลให้การตอบสนองของเนื้อเยื่อพืชต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้นแตกต่างกันไปด้วย

การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืช (Plant Conservation) โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) ก็คือการเก็บรักษาชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อพืชไว้ในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสังเคราะห์ที่มีธาตุอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของพืช รวมทั้งอาจเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อกระตุ้นให้พืชที่เพาะเลี้ยงเกิดการสร้างยอด และ/หรือ ราก จำนวนมากได้ในหลอดทดลอง ซึ่งจะช่วยลดขนาดพื้นที่ในการเก็บรักษา และยังสามารถรวบรวมเชื้อพันธุกรรมพืชได้มากขึ้น ทำให้ช่วยลดค่าใช้จ่ายและพื้นที่ที่จำเป็นต้องใช้ในการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมได้มาก (Shibli*et al*., 2006)การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชมีความสำคัญต่อชีวิตและความเป็นอยู่ของประชากรในอนาคตเป็นอย่างยิ่ง เพราะเป็นทรัพยากรที่มีค่าและมีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคต ความหลากหลายทางพันธุกรรมของทรัพยากรเหล่านี้อาจจะสูญหายไปเนื่องจากความไม่รู้ของมนุษย์ในการใช้ทรัพยากรเหล่านี้วิทยาการในการจำแนกและการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชจึงมีบทบาทสำคัญที่จะดำรงทรัพยากรนี้ให้ยั่งยืนและถูกต้องตามหลักวิชาการการเก็บรักษาในระยะปานกลาง (Medium term storage)ก็คือการเก็บรักษาชิ้นส่วนหรือเนื้อเยื่อพืชในอาหารสังเคราะห์ที่ควบคุมการเจริญเติบโตซึ่งช่วยลดขนาดพื้นที่ในการเก็บรักษาและรวบรวมได้ ประกอบกับการใช้เทคนิคการชะลอการเจริญ (Minimal growth storage) มาช่วยควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในหลอดทดลองให้ช้าลงเพื่อยืดระยะเวลาการเปลี่ยนอาหารของเนื้อเยื่อพืชไปยังอาหารสังเคราะห์ชุดใหม่ ทำให้ช่วยลดค่าใช้จ่ายและปริมาณงานลงได้มาก (Shibli*et al*., 2006)ซึ่งพบรายงานเกี่ยวข้องดังนี้

สุภาภรณ์ (2546) ศึกษาการขยายพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงโดยใช้ตายอดและตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BA 1-4 มก./ล. พบว่า อาหารสูตรที่เติม BA 3 มก./ล. ให้จำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด โดยลักษณะของยอดที่เกิดมีขนาดเล็กเกาะกันแน่นเป็นกระจุก ยอดเหล่านี้เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มก./ล. พบว่า สามารถชักนำให้มีลักษณะสมบูรณ์ได้ จากนั้นจึงนำไปชักนำให้เกิดรากก่อนนำออกปลูก ซึ่งพบว่า สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีบนอาหารสูตร MS และ half-strength MS แต่รากที่เกิดขึ้นมีลักษณะแตกต่างกันคือ ในอาหารสูตร MS จะมีจำนวนรากน้อยกว่าและมีลักษณะยาว ในขณะที่ร้านที่เกิดในอาหารสูตร half-strength MS มีจำนวนรากที่เกิดใหม่มากกว่าแต่มีขนาดสั้นและมีรากขนเกิดขึ้นค่อนข้างมาก

Gbadamosi and Egunyomi (2010) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเอมบริโอ และชิ้นส่วนตาข้างของเจตมูลเพลิงขาว (*Plumbagozeylanica* L.) โดยเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหาร 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้อาหารสูตร MS เป็นพื้นฐานกับสูตรที่ใช้ธาตุอาหารหลัก NPK ร่วมกับน้ำสกัดจาก *Citrus sinensis*โดยอาหารทั้งสองกลุ่มจะเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA (0.01-0.05 mg/l) ร่วมกับ BAP (2-4.5 mg/l) พบว่า การใช้สูตรอาหาร MS เป็นพื้นฐานนั้นสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากกว่า

รมณีย์ และ ศาลักษณ์ (2547) ศึกษาผลของ mannitolในการเก็บรักษาพันธุ์เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbagoindica* Linn.) โดยเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตาข้าง 1 ตาบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ sucrose 30 ก./ล. เปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารที่เติม mannitolความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 60 ก./ล. และเติมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต (BA 0.5 มก./ล. + IAA 0.16 มก./ล.) หรือไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เก็บรักษาไว้ที่ความเข้มแสง 50 μmol/m^2/s ระยะเวลาให้แสง 12 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสโดยไม่เปลี่ยนอาหาร พบว่า mannitolสามารถชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนที่เจริญจากตาของข้อได้ โดยสูตรอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต ความสูงของต้นจะลดลงถึง 83.1 เปอร์เซ็นต์ และ 93.3 เปอร์เซ็นต์ในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตการเพิ่มจำนวนยอดของต้นอ่อนมีแนวโน้มลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี mannitolความเข้มข้น 40 และ 60 ก./ล. ต้นอ่อนในอาหารที่เติม mannitol 20 ก./ล.สามารถเก็บรักษาได้ถึง 8 เดือนโดยไม่ตายและยังคงมีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง ต้นอ่อนที่ยังคงมีชีวิตในอาหารทุกสูตรสามารถเจริญเติบโตให้ยอดใหม่ได้เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารใหม่

ศิริกุล และคณะ (2548) ศึกษาการเก็บรักษาปลายยอดจำปีสิรินธร (*Magnolia sirindhornias*Noot. &Chalermglin) ในหลอดทดลองระยะปานกลางในสภาพชะลอการเจริญ (minimal growth condition) พบว่า ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ความเข้มข้นของน้ำตาล 2 ชนิดคือ น้ำตาลซูโครส และแมนนิทอล และความเข้มข้นของสารชะลอการเจริญเติบโตแพคโคบิวทาโซล ต่างก็มีผลต่อการเก็บรักษาปลายยอดจำปีสิรินธร โดยความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก 3/4MS น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และสารแพคโคบิวทาโซล 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บรักษาปลายยอดได้นานสูงที่สุดถึง 7 เดือน ตรวจพบการรอดชีวิต 73.3±8.2%

วิธีดำเนินการ

ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการสำนักพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

1.) การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก โดยตัดชิ้นส่วนตายอดและตาข้างจากชิ้นพืชในสภาพปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS+ sucrose 3% ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ชนิดได้แก่ BA(N_6-benzyladenine), Kn (Kinetin)และ TDZ (Thidiazuron)โดยมีรายละเอียดดังนี้

สูตรที่ 1 BA 0.5มก./ล.สูตรที่ 2 BA 1.0มก./ล.

สูตรที่ 3 BA 2.0มก./ล.สูตรที่ 4 Kn0.5มก./ล.

สูตรที่ 5 Kn1.0มก./ล.สูตรที่ 6 Kn2.0มก./ล.

สูตรที่ 7TDZ 0.5มก./ล.สูตรที่ 8TDZ 1.0มก./ล.

สูตรที่ 9TDZ 2.0มก./ล.สูตรที่ 10 ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (Control)

เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 16 ช.ม./วัน อุณหภูมิ 25±2 ซ เป็นเวลา 2 เดือน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design(CRD)ได้ 10ทรีทเมนต์จำนวน 10 ซ้ำ/ทรีทเมนต์ ซ้ำละ 1 ขวด ขวดละ 2 ชิ้นส่วนพืชบันทึกผล จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น จำนวนใบเฉลี่ยต่อชิ้น ความยาวเฉลี่ยของยอด ลักษณะการเกิดยอด เปอร์เซ็นต์การเกิดราก

2.) การชักนำให้เกิดราก

นำยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์ ความสูง 1.5-2.0ซม. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารทดลอง 6 สูตร ได้แก่

สูตรที่ 1 MS(Control)

สูตรที่ 2 ½ MS

สูตรที่ 3 ½ MS+NAA0.25 มก./ล.

สูตรที่ 4 ½ MS+NAA0.50 มก./ล.

สูตรที่ 5 ½ MS+IAA 0.25 มก./ล.

สูตรที่ 6 ½ MS+IAA 0.50มก./ล.

(หมายเหตุ :½ MSคือสูตรอาหาร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลง ½ ของสูตรปกติ)

ทุกสูตรเติมsucrose 3% เลี้ยงในสภาพที่ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 16 ช.ม./วัน อุณหภูมิ 25±2 ซ เป็นเวลา 2 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ/ทรีทเมนต์ ซ้ำละ 1 ขวด ขวดละ 2 ชิ้นส่วนพืชบันทึกผล เปอร์เซ็นต์การเกิดราก ลักษณะของราก จำนวนราก ความยาวเฉลี่ยราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของราก

3.) การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชโดยชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

นำยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์ความยาวประมาณ 1-2 ซ.ม. มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลสองชนิดเพื่อทดลองชะลอการเจริญเติบโตของเชื้อพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ คือ sucrose และ mannitol วางแผนการทดลองแบบ 2x4 factoriain CRD มี 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1) ปริมาณซูโครส 2 ระดับ ได้แก่2% และ 3% และปัจจัยที่ 2) ปริมาณ mannitol 4 ระดับ ได้แก่ 0% 1% 2%และ 4% คิดเป็น 8ทรีทเมนต์คอมบิเนชั่นทรีทเมนต์ละ10 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ขวด ขวดละ 2 ชิ้นส่วนพืช โดยไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

บันทึกผลการทดลองที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 2, 4, 6 และ 8 เดือนโดยไม่เปลี่ยนอาหารใหม่ บันทึกข้อมูล- ระยะเวลา (จำนวนเดือน) ที่เก็บรักษา

- เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เปอร์เซ็นต์จำนวนยอดที่ยังไม่เหลืองทั้งยอด
- ความสูงเฉลี่ยของทรงพุ่ม (เซนติเมตร)
- ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดที่เกิดขึ้นใหม่
- เปอร์เซ็นต์การเกิดราก

<u>เวลาและสถานที่ทำการทดลอง</u>

การทดลองนี้เริ่มต้น เดือน ตุลาคม 2558 สิ้นสุด เดือน กันยายน2561 โดยดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ (บางเขน) สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

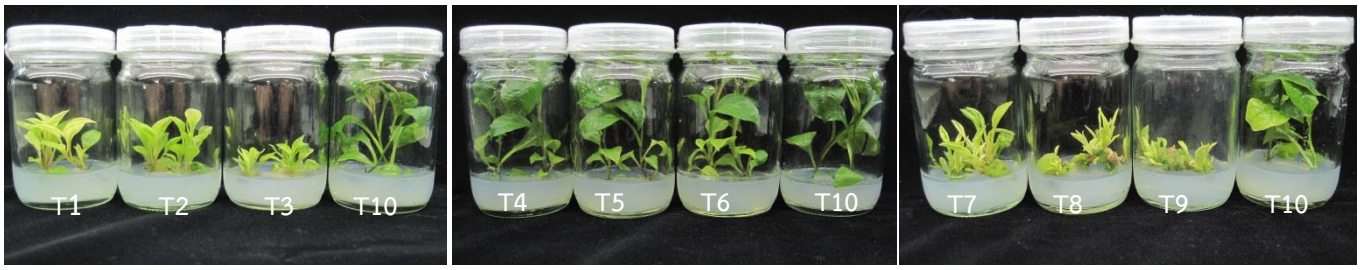
เจตมูลเพลิงขาว

จากการศึกษาสูตรอาหารในการชักนำเจตมูลเพลิงขาวให้เกิดยอดพบว่า สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดจำนวน 8 สูตร (T1-T3,T5-T9)สามารถชักนำให้เกิดยอดในเจตมูลเพลิงขาวได้ดีกว่าสูตรควบคุม(T10) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดย สูตรที่ 1 (MS+BA 0.5 มก./ล.) ชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด มีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 3.25 ยอด รองลงมาได้แก่ สูตรที่ 2 (MS+BA 1.0 มก./ล.) และสูตรที่ 3 (MS+BA 2.0 มก./ล.) โดยให้จำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 3.29 และ 2.20 ยอด เมื่อดูลักษณะความสูงทรงพุ่ม ของเจตมูลเพลิงขาวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม BA (T1-T3) และ TDZ (T7-T9)ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ความสูงและลักษณะการแตกยอดของทรงพุ่มมีความแตกต่างจากต้นเจตมูลเพลิงขาวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม KN (T4-T5) ที่ความเข้มข้นต่างๆ อย่างเห็นได้ชัด โดยเจตมูลเพลิงขาวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม KN จะมีลักษณะแตกยอดและยืดสูงขึ้น ใบแผ่ออก และมีช่วงห่างกันชัดเจน เป็นเป็นสีเขียวเข้ม ส่วนเจตมูลเพลิงขาวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA และ TDZ นั้น ทรงพุ่มมีขนาดสั้นกว่า ใบมีสีอ่อนกว่า และช่วงห่างของใบแต่ละชั้นแคบกว่าจนเห็นเป็นกระจุก นอกจากนี้ มีเพียงอาหารสูตรที่เติม KN (T4-T5) และสูตรควบคุม (T10) สามารถทำให้เจตมูลเพลิงขาวออกรากได้ ตามลำดับ (ตารางที่ 1, ภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการชักนำต้นเจตมูลเพลิงขาวให้เพิ่มจำนวนยอดอย่างรวดเร็วในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 60 วัน

	สูตรอาหาร	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด)	ความสูงทรงพุ่มเฉลี่ย (ซม.)	การเกิดราก (ร้อยละ)
T1	สูตรที่ 1 MS+BA 0.5 มก./ล.	3.25a	2.84de	0
T2	สูตรที่ 2MS+BA 1.0 มก./ล.	2.94a	2.62de	0
T3	สูตรที่ 3MS+BA 2.0 มก./ล.	2.20b	2.23de	0
T4	สูตรที่ 4 MS+KN 0.5 มก./ล.	1.19e	3.73bc	50
T5	สูตรที่ 5MS+KN 1.0 มก./ล.	1.55d	4.06b	67
T6	สูตรที่ 6MS+KN 2.0 มก./ล.	1.94bc	3.09cd	67
T7	สูตรที่ 7 MS+TDZ 0.5 มก./ล.	2.06bc	2.16e	0
T8	สูตรที่ 8MS+ TDZ 1.0 มก./ล.	2.03bc	2.10e	0
T9	สูตรที่ 9MS+ TDZ 2.0 มก./ล.	1.81cd	2.17e	0
T10	สูตรที่ 10สูตรควบคุม (control)	1.08e	6.94a	100
	F-value	**	**	

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



ภาพที่ 1 ต้นเจตมูลเพลิงขาวเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ (T1-T9) เปรียบเทียบกับเจตมูลเพลิงขาวเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรควบคุม (T10)

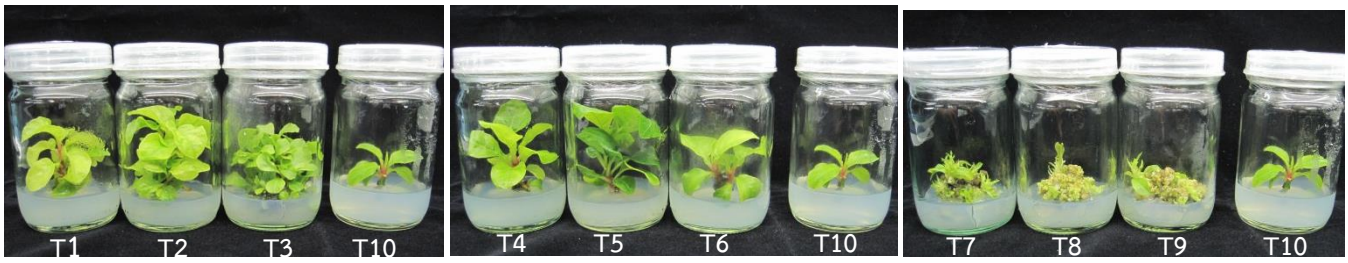
เจตมูลเพลิงแดง

จากการศึกษาสูตรอาหารในการชักนำเจตมูลเพลิงแดงให้เกิดยอด พบว่า สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดจำนวน 9 สูตร (T1-T9) สามารถชักนำให้เกิดยอดในเจตมูลเพลิงแดงได้ดีกว่าสูตรควบคุม (T10) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดย สูตรที่ 3 (MS+BA 2.0 มก./ล.) ชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด มีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 18.01 ยอด รองลงมาได้แก่ สูตรที่ 7 (MS+TDZ0.5มก./ล.) และสูตรที่ 8 (MS+TDZ1.0 มก./ล.) โดยให้จำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 17.14และ 15.67ยอด แต่ลักษณะยอดที่เกิดขึ้นบนอาหารสูตรที่เติม TDZ นั้น ถึงแม้จะมีจำนวนยอดมาก แต่ยอดที่เกิดใหม่ มีขนาดเล็ก ใบเรียวแหลม และมีการเกิด callus ที่ดูเหมือนปุ่ม/ก้อน เกาะกันอยู่หนาแน่นเมื่อดูลักษณะความสูงทรงพุ่ม พบว่า เจตมูลเพลิงแดงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA และ KN (T1-T6) ให้ความสูงของทรงพุ่มแตกต่างจากอาหารที่เติม TDZ (T4-T5) อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง สูตรอาหารที่เติม BA (T1-T3) KN (T4-T5) และสูตรควบคุม (T10) สามารถทำให้เจตมูลเพลิงแดงออกรากได้ (ตารางที่ 2, ภาพที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนยอดเฉลี่ยและความสูงเฉลี่ยทรงพุ่มต้นเจตมูลเพลิงแดงเพาะเลี้ยงบนอาหารทดลองชักนำให้เกิดยอดในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 90 วัน

	สูตรอาหาร	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด)	ความสูงทรงพุ่มเฉลี่ย (ซม.)	การเกิดราก (ร้อยละ)
T1	สูตรที่ 1 MS + BA 0.50 mg/l	3.43c	2.99ab	14.3
T2	สูตรที่ 2 MS + BA 1.00 mg/l	6.50c	3.67a	14.3
T3	สูตรที่ 3 MS + BA 2.00 mg/l	18.01a	2.39bc	0.0
T4	สูตรที่ 4 MS + KN 0.50 mg/l	1.71c	3.06ab	28.6
T5	สูตรที่ 5 MS + KN 1.00 mg/l	1.14c	3.41ab	100.0
T6	สูตรที่ 6 MS + KN 2.00 mg/l	1.57c	3.37ab	57.1
T7	สูตรที่ 7 MS + TDZ 0.50 mg/l	17.14a	0.51d	0.0
T8	สูตรที่ 8 MS + TDZ 1.00 mg/l	15.67ab	0.52d	0.0
T9	สูตรที่ 9 MS + TDZ 2.00 mg/l	7.40bc	0.36d	0.0
T10	สูตรที่ 10 สูตรควบคุม (control)	1.00d	1.49cd	14.3
	F-value	**	**	

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



ภาพที่ 2 ต้นเจตมูลเพลิงแดงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ (T1-T9) เปรียบเทียบกับเจตมูลเพลิงแดงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรควบคุม (T10)

การชักนำให้เกิดราก

เจตมูลเพลิงขาว

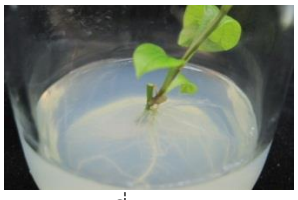
จากการศึกษาสูตรอาหารเพื่อชักนำให้เจตมูลเพลิงขาวเกิดรากในสภาพปลอดเชื้อ มีอาหารที่ใช้ในการทดลองจำนวน 5 สูตร และอาหารสูตรควบคุม (control) 1 สูตร พบว่า ทุกสูตรสามารถชักนำให้เจตมูลเพลิงขาวเกิดรากในสภาพปลอดเชื้อได้ โดยสูตรอาหารที่ชักนำให้เจตมูลเพลิงขาวเกิดรากได้ดีคือ สูตรที่ 1 (MS) สูตรที่ 2 (1/2MS) และสูตรที่ 5 (1/2MS+IAA 0.25 มก./ล.) สามารถชักนำให้เกิดรากได้ร้อยละ 100 ทั้งสามสูตร พบว่าสูตรอาหารที่ใช้ NAA มีอัตราการเกิดรากน้อยกว่าอย่างเห็นได้ชัด และลักษณะรากที่เกิดเป็นรากขนอ่อนบางเกาะรวมกันหลวมๆ และยังพบอีกว่า ยอดเจตมูลเพลิงขาวส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตน้อยมาก และหยุดชะงักการเจริญไปเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เติม NAA เพียงอย่างเดียว ส่วนใหญ่จะเกิดแคลลัสที่บริเวณรอยตัดซึ่งมีทั้ง compact callus และ fiable callus และเกิดรากน้อยมาก (ตารางที่ 3, ภาพที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการชักนำต้นเจตมูลเพลิงขาวให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 60 วัน

สูตรอาหาร	การเกิดราก (ร้อยละ)	จำนวนรากเฉลี่ย (นับได้-เส้น)	ความยาวรากเฉลี่ย (ซม.)
สูตรที่ 1 MS (สูตรควบคุม)	100.0	4.78	3.46
สูตรที่ 2 1/2MS	100.0	5.41	4.62
สูตรที่ 3 1/2MS+NAA 0.25 มก./ล.	29.4	n/a[1]	n/a[1]
สูตรที่ 4 1/2MS+NAA 0. 05 มก./ล.	41.2	n/a[1]	n/a[1]
สูตรที่ 5 1/2MS+IAA 0.25 มก./ล.	100.0	7.95	7.39
สูตรที่ 6 1/2MS+IAA 0.50 มก./ล.	93.8	10.13	4.99

n/a[1] = **no data**

สูตรที่ 1 MS (control)



สูตรที่ 2 1/2MS

สูตรที่ 3 1/2MS+NAA 0.25 มก./ล.

สูตรที่ 4 1/2MS+NAA 0. 50 มก./ล.

สูตรที่ 5 1/2MS+IAA 0.25 มก./ล.

สูตรที่ 6 1/2MS+IAA 0.50 มก./ล.

ภาพที่ 3การทดลองการชักนำต้นเจตมูลเพลิงขาวให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 60 วัน

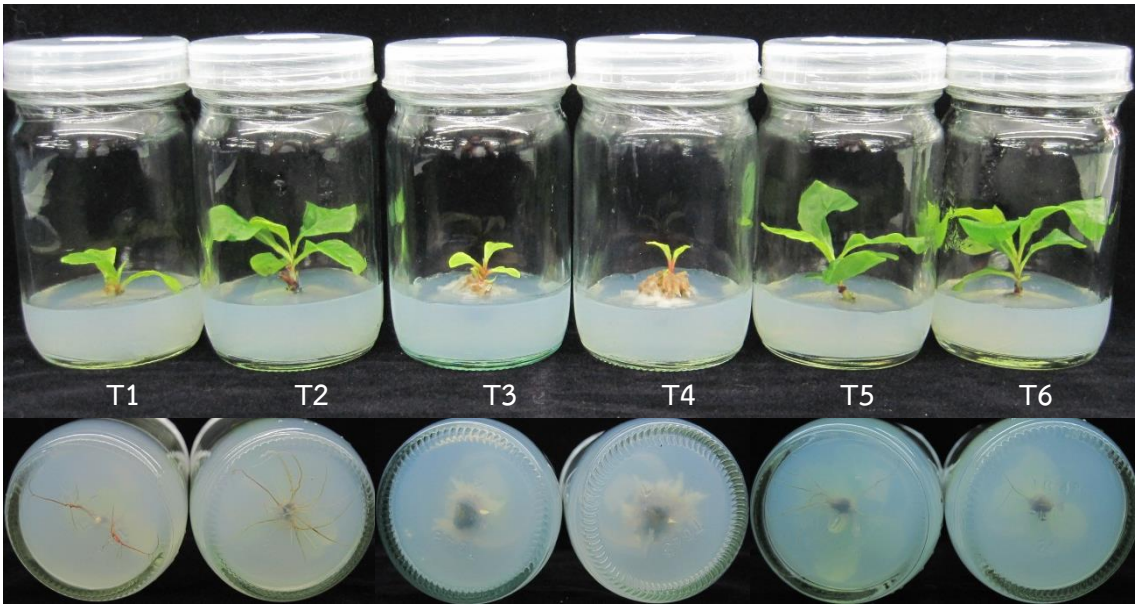
เจตมูลเพลิงแดง

จากการศึกษาสูตรอาหารเพื่อชักนำให้เจตมูลเพลิงแดงเกิดรากในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ทุกสูตรสามารถชักนำให้เจตมูลเพลิงแดงเกิดรากในสภาพปลอดเชื้อได้ โดยสูตรอาหารที่ชักนำให้เจตมูลเพลิงแดงเกิดรากได้ดีที่สุด คือ สูตรที่ 2 (1/2MS) และสูตรที่ 6(1/2MS+IAA 0.50 มก./ล.) สามารถชักนำให้เกิดรากได้ร้อยละ 100 รองลงมาคือสูตรที่ 1 (MS) และสูตรที่ 5 (1/2MS+IAA 0.25 มก./ล.) สามารถชักนำให้เกิดรากได้ร้อยละ 87.5และยังพบว่าสูตรอาหารที่ใช้ NAA ทั้งสองสูตรซึ่งมีอัตราการเกิดรากน้อยกว่า ลักษณะรากที่เกิดเป็นรากขนอ่อนฟูเกาะรวมกันทำให้ไม่สามารถนับเป็นจำนวนและวัดความยาวรากได้(ตารางที่ 4, ภาพที่ 4)

ตารางที่ 4 ร้อยละการเกิดรากของเจตมูลเพลิงแดงเพาะเลี้ยงบนอาหารทดลอง เป็นเวลา 60 วัน

สูตรอาหาร	การเกิดราก (ร้อยละ)	จำนวนรากเฉลี่ย (นับได้-เส้น)	ความยาวรากเฉลี่ย (ซม.)
สูตรที่ 1 MS (สูตรควบคุม)	87.5	4.38	2.11
สูตรที่ 2 1/2MS	100.0	5.00	2.24
สูตรที่ 3 1/2MS+NAA 0.25 มก./ล.	75.0	n/a[1]	n/a[1]
สูตรที่ 4 1/2MS+NAA 0.50 มก./ล.	62.5	n/a[1]	n/a[1]
สูตรที่ 5 1/2MS+IAA 0.25 มก./ล.	87.5	6.25	2.96
สูตรที่ 6 1/2MS+IAA 0.50 มก./ล.	100.0	8.16	2.32

n/a[1] = no data



ภาพที่ 4ต้นเจตมูลเพลิงแดงเพาะเลี้ยงบนอาหารทดลองสูตรชักนำให้เกิดราก 6 สูตร (T1-T6) เป็นเวลา 60 วัน

การเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโต (minimal growth storage)

เจตมูลเพลิงขาว

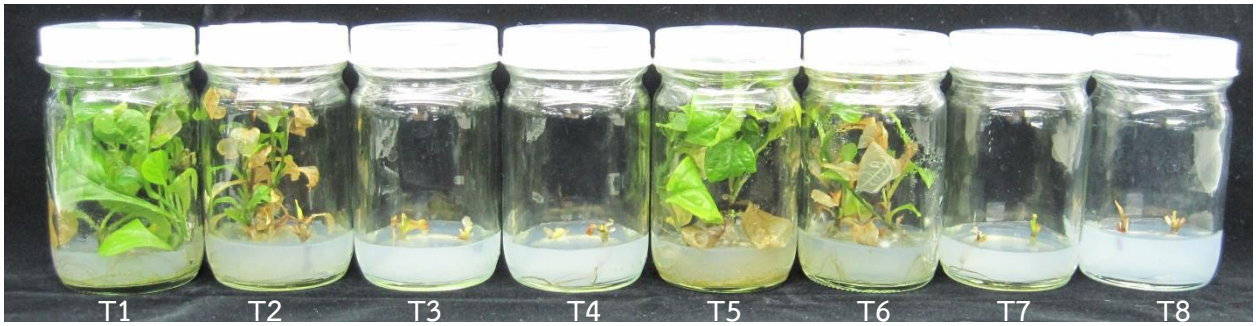
การทดลองสูตรอาหารเพื่อชะลอการเจริญเติบโตของต้นเจตมูลเพลิงขาวในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า สูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงเจตมูลเพลิงขาวเพื่อชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อได้เป็นเวลานานที่สุดโดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหาร ได้แก่ อาหารทดลองสูตรMS+2%sucrose+0%manitol(T1) โดยสามารถยืดเวลาเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลาเฉลี่ย 7 เดือน รองลงมา ได้แก่ สูตร MS+2%sucrose+1%manitol(T2) สูตรMS+3%sucrose+1%manitol (T6) และสูตรMS+3%sucrose+0%manitol(T5) ตามลำดับ (6.8, 6.2 และ 6.1 เดือน ตามลำดับ) เจตมูลเพลิงขาวที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของ mannitolสูงขึ้น มีอัตราการเจริญเติบโตช้าหรือหยุดชะงัก และมีอัตราการรอดชีวิตน้อยมาก (ตารางที่ 5, ภาพที่ 5)

ตารางที่ 5ผลการเพาะเลี้ยงต้นเจตมูลเพลิงขาวในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารทดลองชะลอการเจริญเติบโตจำนวน 8 สูตร

	สูตรอาหาร	ระยะเวลาเฉลี่ย* (เดือน)	จำนวนยอดเกิดใหม่เฉลี่ย** (ยอด)	การเกิดราก (ร้อยละ)
T1	MS+2%sucrose+0%manitol	7.0a	1.0	100
T2	MS+2%sucrose+1%manitol	6.8a	1.2	100
T3	MS+2%sucrose+2%manitol	4.9bc	0.8	80
T4	MS+2%sucrose+4%manitol	3.2d	0.6	20
T5	MS+3%sucrose+0%manitol	6.1ab	1.0	90
T6	MS+3%sucrose+1%manitol	6.2ab	1.0	100
T7	MS+3%sucrose+2%manitol	4.6c	0.7	80
T8	MS+3%sucrose+4%manitol	2.4d	0.1	20

*ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** คำนวณค่าเฉลี่ยในภาพรวมของเดือนสุดท้ายที่เก็บข้อมูลได้ในแต่ละสูตรอาหาร



ภาพที่ 5ต้นเจตมูลเพลิงขาวเพาะเลี้ยงบนอาหารทดลองสูตรชะลอการเจริญเติบโต 8 สูตร (T1-T8) เป็นเวลา 7 เดือน

เจตมูลเพลิงแดง

การทดลองสูตรอาหารเพื่อชะลอการเจริญเติบโตของต้นเจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงเจตมูลเพลิงแดงเพื่อชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อได้เป็นเวลานานที่สุดโดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหาร ได้แก่ อาหารทดลองสูตร MS+2%sucrose+0%manitol(T1) และ สูตร MS+3%sucrose+0%manitol(T5) โดยสามารถยืดเวลาเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลาเฉลี่ย 10 เดือน รองลงมา

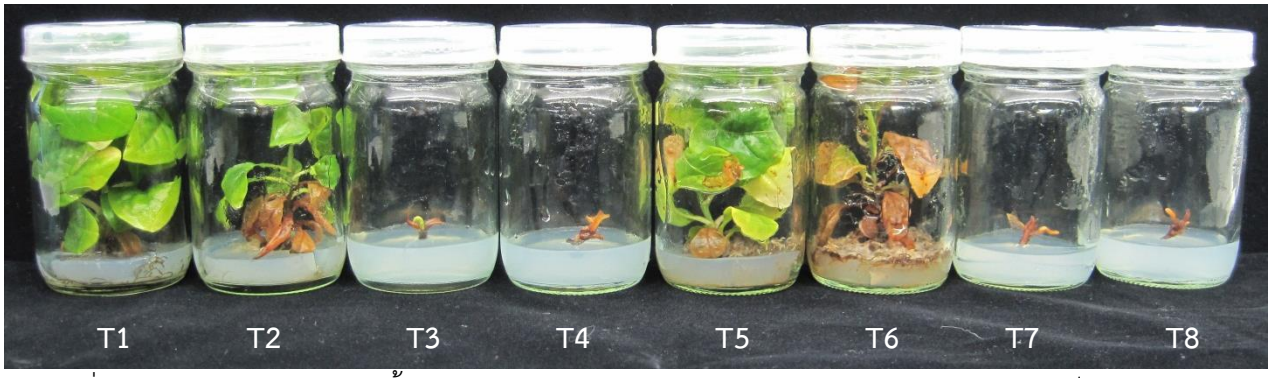
ได้แก่ สูตร MS+2%sucrose+1%manitol(T2) สามารถยืดอายุการเก็บรักษาเฉลี่ยได้ 7.7 เดือน และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 6)

ตารางที่ 6ผลการเพาะเลี้ยงต้นเจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารทดลองชะลอการเจริญเติบโตจำนวน 8 สูตร

	สูตรอาหาร	ระยะเวลาเฉลี่ย* (เดือน)	จำนวนยอดเกิดใหม่เฉลี่ย** (ยอด)	การเกิดราก (ร้อยละ)
T1	MS+2%sucrose+0%manitol	10.0a	1.1	100
T2	MS+2%sucrose+1%manitol	7.7a	1.0	90
T3	MS+2%sucrose+2%manitol	4.4b	0.7	0
T4	MS+2%sucrose+4%manitol	2.4b	0.8	20
T5	MS+3%sucrose+0%manitol	10.0a	1.0	100
T6	MS+3%sucrose+1%manitol	4.4b	1.0	40
T7	MS+3%sucrose+2%manitol	4.1b	1.1	10
T8	MS+3%sucrose+4%manitol	3.2b	0.9	10

* ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** คำนวณค่าเฉลี่ยในภาพรวมของเดือนสุดท้ายที่เก็บข้อมูลได้ในแต่ละสูตรอาหาร



ภาพที่ 6ต้นเจตมูลเพลิงแดงเพาะเลี้ยงบนอาหารทดลองสูตรชะลอการเจริญเติบโต 8 สูตร (T1-T8) เป็นเวลา10เดือน

วิจารณ์ผลการทดลอง

การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก

จากการทดลองสูตรอาหารเพื่อชักนำให้ต้นเจตมูลเพลิงขาวและเจตมูลเพลิงแดงเกิดยอดจำนวนมากในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า การเพาะเลี้ยงเจตมูลเพลิงขาวและเจตมูลเพลิงแดงในอาหารสังเคราะห์ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA KN และ TDZ (T1-T9)สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต(control: T10) เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 3 ชนิด เป็นสารในกลุ่มของไซโตไคนิน(cytokinin) ที่สามารถกระตุ้นการเกิดยอดหรือชักนำการสร้างตาข้างรวมทั้งเกิด callus ไปพร้อมกันได้ (รังสฤษดิ์, 2540) สอดคล้องกับรายงานของ Sivanesan and Jeong (2009) ที่พบว่า เมื่อนำชิ้นส่วน shoot tip และ node ของเจตมูลเพลิงขาวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA หรือ KN ความเข้มข้น 0.3-3 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากกว่าสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับรายงานของ สุภาภรณ์ (2546) ที่ได้นำชิ้นส่วนตายอดและตาข้างของเจตมูลเพลิงแดงมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1-4 มก./ล. พบว่าสามารถกระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชสร้าง organogenic callus ได้ดี และสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้

จำนวนมากอย่างไรก็ตาม ยอดของต้นเจตมูลเพลิงขาว และเจตมูลเพลิงแดงที่เกิดขึ้นบนอาหารที่เติม BA และ KN เป็นยอดที่มีลักษณะเป็นต้นใหม่สมบูรณ์กว่าอาหารที่เติม TDZ

การชักนำให้เกิดราก

จากการศึกษาสูตรอาหารเพื่อชักนำให้เจตมูลเพลิงขาว และเจตมูลเพลิงแดงให้เกิดรากในสภาพปลอดเชื้อ มีอาหารที่ใช้ในการทดลองจำนวน 5 สูตร และอาหารสูตรควบคุม (control) 1 สูตร พบว่า ทุกสูตรสามารถชักนำให้พืชทั้งสองชนิดเกิดรากในสภาพปลอดเชื้อได้ โดยรากที่เกิดบนอาหารสูตร MS half-MS และ half-MS ที่เติม IAA นั้น มีลักษณะเป็นเส้นยาวและแข็งแรง มีรากแขนงพอสมควรทำให้การนำออกปลูกทำได้ง่าย เพราะสามารถล้างทำความสะอาดได้ง่ายและต้นพืชไม่ชอกช้ำมากเกินไป ในขณะที่อาหารสูตร half-MS ที่เติม NAA นั้น พบว่า ยอดเจตมูลเพลิงขาวมีการเจริญเติบโตช้าและแคระแกร็น เกิดรากน้อยและส่วนใหญ่จะเกิดแคลลัสที่บริเวณรอยตัด ซึ่งมีทั้ง compact callus และ fiable callusส่วนต้นเจตมูลเพลิงแดงบนอาหารสูตรเดียวกันนี้ให้ผลคล้ายกัน แต่ปรากฏรากขนอ่อนสั้นๆ เกาะเป็นกระจุกกันมากกว่าและมีลักษณะฉ่ำน้ำ ทำให้ไม่สามารถนำออกปลูกในธรรมชาติได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ สุภาภรณ์ (2546) ซึ่งเพาะเลี้ยงยอดเจตมูลเพลิงแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5-2 มก./ล. พบว่า เกิด callus สีเทา มีลักษณะฉ่ำน้ำบริเวณโคนต้นและเกิดรากจำนวนน้อยขนาดสั้นมาก เช่นเดียวกับ รศนา และสุภาวรรณ (2543) รายงานผลการเพาะเลี้ยงเจตมูลเพลิงแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA พบว่า เกิด callus สีเทาเป็นปุยขนาดใหญ่ มียอดและรากงอกออกมาจาก callus ลักษณะลำต้นและก้านใบมีสีแดง ขนาดเล็ก ไม่ค่อยเจริญเติบโต

การชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

จากการเพาะเลี้ยงเจตมูลเพลิงขาวและเจตมูลเพลิงแดงบนอาหารทดลองเพื่อชะลอการเจริญเติบโตทั้ง 8 สูตร พบว่า เจตมูลเพลิงขาวและเจตมูลเพลิงแดงสามารถคงมีชีวิตอยู่ในอาหารทดลองได้โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหารใหม่ได้เป็นเวลานานที่สุด โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในเจตมูลเพลิงขาว ได้แก่ อาหารสูตร MS+2%sucrose+0%manitol (T1) ที่ระยะเวลาเฉลี่ย 7.0 เดือน อาหารสูตรMS+2%sucrose+1%manitol (T2)ที่ระยะเวลาเฉลี่ย 6.8 เดือน อาหารสูตร MS+3%sucrose+1%manitol (T6) ที่ระยะเวลาเฉลี่ย 6.2 เดือน และอาหารสูตร MS+3%sucrose+0%manitol (T5) ที่ระยะเวลาเฉลี่ย 6.1 เดือน และในเจตมูลเพลิงแดง ได้แก่ อาหารสูตร MS+2%sucrose+0%manitol (T1) และ MS+3%sucrose+0%manitol (T5) ที่ระยะเวลาเฉลี่ย 10 เดือน และอาหารสูตร MS+2%sucrose+1%manitol (T2) ที่ระยะเวลาเฉลี่ย 7.7 เดือน จากผลการทดลองเจตมูลเพลิงแดงนั้นสามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรทดลองเพื่อการชะลอการเจริญเติบโตสูตรที่ไม่เติม mannitol ได้นานกว่าเจตมูลเพลิงขาว ในขณะที่ในสูตรอาหารที่เติม mannitol 1% นั้นสามารถเพาะเลี้ยงได้นานเป็นเวลาใกล้เคียงกัน และเมื่อความเข้มข้นของ mannitolเพิ่มสูงขึ้น พบว่า ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเจตมูลเพลิงขาวและเจตมูลเพลิงแดงไปในทิศทางเดียวกันคือ ลดการเจริญเติบโตจนถึงกับหยุดชะงัก และสามารถเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อได้นานเพียง 2-4 เดือนเท่านั้น ต่างจากรายงานของ รมณีย์ และ ศาลักษณ์ (2547) ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงต้นเจตมูลเพลิงแดงในอาหารสูตร MS + 3%sucrose+2%manitol ได้นานถึง 8 เดือน โดยไม่มีการตายและยังคงมีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรงอย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงเพื่อชะลอการเจริญเติบโตนั้น สูตรอาหารที่ใช้เพียง sucrose หรือ mannitolหรือ sorbitol อย่างใดอย่างหนึ่งเพียงชนิดเดียวไม่เหมาะสมต่อการชะลอการเจริญเติบโต (Nasiruddin and Rafiul Islam, 2018) จึงควรมีการศึกษาความเหมาะสมของปริมาณสารดังกล่าวในการใช้ร่วมกันในสูตรอาหารเพื่อชะลอการเจริญเติบโตของพืชต่อไป

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองนี้ การเพาะเลี้ยงต้นเจตมูลเพลิงขาวและเจตมูลเพลิงแดงเพื่อการอนุรักษ์ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อให้ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก การชักนำให้เกิดราก และการชะลอการเจริญเติบโตในหลอดทดลอง ให้ผลดังนี้

1. อาหารที่เหมาะสมในชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากสำหรับต้นเจตมูลเพลิงขาว คืออาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5-1.0 มก./ล. และต้นเจตมูลเพลิงแดง คืออาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.0 มก./ล.

2. อาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ต้นเจตมูลเพลิงขาวและเจตมูลเพลิงแดงเกิดรากที่สมบูรณ์และเหมาะแก่การย้ายออกปลูกในธรรมชาติได้ คืออาหารสูตร MS และ half-MS

3. อาหารสูตรที่สามารถอนุรักษ์ต้นเจตมูลเพลิงขาวและเจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อจากการทดลองนี้ ได้เป็นเวลาอย่างน้อย 7-10 เดือน ได้แก่ อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล sucrose 2-3% ร่วมกับ การเติม mannitol 0-1%

อย่างไรก็ตาม เป้าหมายการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อนั้น เพื่อการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชในสภาพหลอดทดลองโดยพืชที่อนุรักษ์ควรมีสภาพสมบูรณ์ระหว่างการเพาะเลี้ยงจึงควรมีการศึกษาทบทวนหาสูตรอาหารที่เหมาะสมโดยอาจเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสูตรอาหาร/ชนิดของสารที่ใช้ในสูตรอาหาร/ชนิดของสูตรอาหาร ฯลฯ เพิ่มเพื่อประสิทธิภาพสูงสุดในการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชเจตมูลเพลิงขาวและเจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อ

การทดลองที่ 3 : การอนุรักษ์ดองดึงโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

: Conservation of Gloriosa lily(*Gloriosasuperba* L.)bySlow Growth Technique.

ชื่อผู้วิจัย

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวสุพินญา บุญมานพ

ผู้ร่วมงาน : 1. นางสาวปาริฉัตร สังข์สะอาด

: 2. นางสาวภัทรียา สุทธิเชื้อนาค

บทคัดย่อ

ดองดึง อยู่ในวงศ์ Liliaceaeเป็นไม้พื้นบ้านในแถบเอเชีย ประเทศไทยพบแถบชายทะเลมากกว่าแหล่งอื่นๆ (ทางภาคใต้และภาคตะวันออก) เหง้าดองดึงมีสารอัลคาลอยด์หลายชนิด ชนิดที่พบว่ามีปริมาณมาก ได้แก่ โคลชิซิน(colchicine) จึงเป็นที่ต้องการ เนื่องจากถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ และในทางการเกษตร ทำให้ปริมาณที่มีในธรรมชาติลดน้อยลง เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์จึงถูกจัดในบัญชีแดง (red list) ของ IUCN จึงจำเป็นอย่างมากสำหรับการศึกษาวิธีการอนุรักษ์ดองดึงโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า การขยายปริมาณเหง้าของดองดึงในสภาพปลอดเชื้อสามารถทำได้โดยใช้ชิ้นส่วนของยอดดองดึงในอาหารสังเคราะห์สูตรMS + NAA4mg/l +BA4 mg/lและการเก็บรักษาเหง้าดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ (การชะลอการเจริญเติบโต) สามารถเก็บรักษาได้นานสูงสุด9เดือน แม้ไม่มีการ subculture เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรสังเคราะห์½MS + 20 m/l ในสภาพปลอดเชื้อ

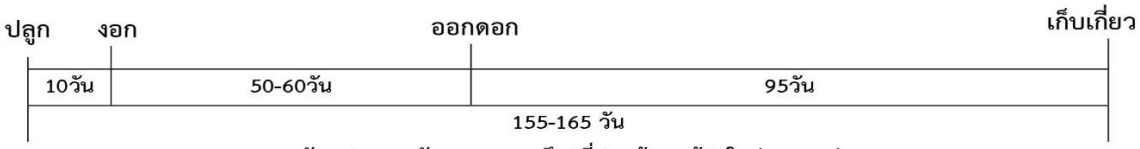
คำสำคัญ : ดองดึง, การอนุรักษ์, การชะลอการเจริญเติบโต

บทนำ

ดองดึง *Gloriosasuperba* L. เป็นพืชสมุนไพรที่สำคัญชนิดหนึ่งและจัดอยู่ในแพทย์แผนโบราณของไทย ชื่อเรียกพื้นบ้านของประเทศไทย เช่น พันมหา หัวขวาน ว่านก้ามปู มะขาโก้ง (เสงี่ยม, 2522) ชื่อสามัญ Glory lily, Climbing lily, Superb lily, Turk's cap, Flame lily หรือ Gloriosa lily (สมสุข, 2534)อยู่ในวงศ์ Liliaceae (Backer และ Brink, 1965)มีถิ่นกำเนิดอยู่ในป่าของทวีปแอฟริกา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Gloriosarothchildiana*ในทวีปเอเชีย เช่น ประเทศอินเดีย ศรีลังกา ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย และประเทศแถบอินโดจีนพบเพียงชนิดเดียว คือ *G. superba* L. จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีหัว/เหง้าอยู่ใต้ดิน (rhizome)เป็นไม้พื้นบ้านในแถบเอเชีย ประเทศไทยพบเห็นพืชชนิดนี้ตามข้างทาง โดยเฉพาะแถบชายทะเลจะพบมากกว่าแหล่งอื่นๆ (ทางภาคใต้และภาคตะวันออก ดังแสดงในรูปที่ 1 และ2 ตามลำดับ) และสภาพธรรมชาติทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (รูปที่ 3) เป็นพืชล้มลุกประเภทไม้เลื้อย มีอายุหลายปี (หลายฤดู) ดอกดองดึง มีสีสันสวยงาม เด่นสะดุดตา และดอกทยอยบานจากล่างขึ้นสู่ยอด (รูป 1-2 และ4) ช่วงการออกดอกใช้เวลาประมาณ 2-3 เดือน จากคุณสมบัติดังกล่าว จึงถูกจัดเป็นไม้ดอกไม้ประดับได้ไม่แพ้ไม้ดอกชนิดอื่นๆ จัดเป็นพืชสมุนไพรที่ส่วนต่างๆ สามารถรักษาโรคได้หลายชนิด เนื่องจากในเมล็ด และเหง้าดองดึงมีสารอัลคาลอยด์หลายชนิด ชนิดที่พบว่ามีปริมาณมาก ได้แก่ โคลชิซิน(colchicine) ที่ได้จากส่วนของเมล็ดใช้รักษาโรคไขข้ออักเสบ โรคมะเร็ง (กรมวิชาการเกษตร,2542) ทางด้านการเกษตรใช้โคลชิซินในการปรับปรุงพันธุ์พืช เพราะมีคุณสมบัติในการกระตุ้นเซลพืชให้เกิดโพลีพลอย์ (polyploid) (Eigsti et al, 1949; Bunyapraphatsaya, 1991) ดองดึง จึงจัดเป็นพืชสมุนไพรเชิงพาณิชย์ที่มีการใช้งานที่หลากหลายของยาเกิดการแสวงหาผลประโยชน์ทั้งในด้านสมุนไพร และด้านไม้ดอกไม้ประดับ โดยการปลูกลงกระถาง จำนวน 5-10 เหง้า และทำค้างเพื่อให้ต้นดองดึงเกาะเกี่ยวและเกิดช่อออกดอกที่สวยงาม จึงทำให้พืชท้องถิ่นชนิดนี้เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของดองดึงเป็นไม้ดอกกึ่งไม้เลื้อย รากเป็นระบบรากฝอย (fibrous root) เกิดบริเวณโคนต้นเหง้าดองดึงแบบแผ่กระจายไปทุกทิศทาง ใบ มีสีเขียวเป็นมัน ลักษณะเป็นใบเดี่ยว (simple) ไม่มีก้านใบ (sessile leaf) ไม่มีกาบใบหุ้ม (leaf sheath) รูปใบยาวปลายใบแหลม รูปคล้ายทวน(lanceolate) โคนกว้างสอบแคบไปหาปลาย ใบยาว ประมาณ 12 ซม. ปลายใบเรียวแคบยาวม้วนเป็นเส้นเปลี่ยนรูปร่างเพื่อเป็นมือเกาะ (tendril) เพื่อใช้พยุงลำต้นในการเลื้อยไปตามค้างหรือหลักเกาะ มีเส้นกลางใบชัดเจน การเรียงตัวของเส้นใบเป็นแบบเส้นขนาน การเรียงตัวของใบเป็นแบบ alternate สลับกับการเรียงตัวแบบ opposite และแบบ spiral ซึ่งแต่ละต้นมีเรียงตัวของใบไม่เหมือนกัน ใบตรงตำแหน่งที่เกิดดอก มีการจัดเรียงแบบ alternate (พรพรหม และคณะ, 2536) ต้นที่มีอายุ 3ปี จะมีลำต้นมีความสูงประมาณ 1-3 เมตร เมื่อต้นมีความสูงประมาณ 75-100 ซม. แตกกิ่งแขนง 3-5 แขนงแต่ละแขนงเกิดดอก และติดฝักขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของดิน และการผสมติดของเกสรตัวเมียและอับละอองเรณู (กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช, 2542) ลักษณะดอกเป็นดอกเดี่ยว (solilary flower) ออกตามซอกใบ (leaf axil) กลีบดอก (perianth) มี 6 กลีบ ไม่ซ้อนกัน ค่อนข้างแข็งและเปราะ ปลายเรียวแหลม ขอบกลีบพลิ้วเป็นเกลียวคลื่น เมื่อดอกบานกลีบดอกจะโค้งงอกลับขึ้นไปด้านบน โคนกลีบและขอบกลีบเป็นสีเหลือง ปลายกลีบมีสีแดง มีเกสรตัวผู้ 6 อัน มีก้านเกสรตัวผู้ที่ปลายแตรติดอยู่ที่หลังของอับเกสรเพียงจุดเดียว เกสรตัวเมียอยู่ตรงกลางดอกมีก้านเกสรตัวเมียยาว 4-5 ซม.ทำมุมฉากกับรังไข่ (รูป 1-2 และ4) ตำแหน่งของรังไข่เป็นระบบ superior ovaryการบานของดอกปกติจะบานจากด้านล่างขึ้นบน และตำแหน่งของยอดเกสรตัวเมียอยู่สูงกว่าตัวผู้ในดอกเดียวกัน ทำให้การผสมเกสรตัวเมียนั้นจะต้องได้รับละอองเกสรตัวผู้จากดอกอื่น แต่มีโอกาสที่จะผสมตัวเองในดอกเดียวกัน เนื่องจากมีช่วงเวลาพร้อมผสมที่เหลื่อม (overlap) (พรพรหม และคณะ, 2536) ลักษณะฝักเป็นแบบแคบซูล มี 3 พู (กระเปาะ) ฝักมีผิวมัน เมล็ดลักษณะกลม เมื่อเมล็ดอ่อนมีสีขาว แล้วค่อยเปลี่ยนเป็นส้ม และเมื่อถึงระยะสุกแก่จะมีสีแสดแดง (รูปที่ 5) ผิวเมล็ดเรียบเป็นมัน (นันทิรา, 2533)

การขยายพันธุ์ สามารถขยายพันธุ์ดองดึงได้ 3 วิธี คือ เมล็ด เหง้า และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเพาะ**เมล็ด**นั้นใช้ระยะเวลา7-10 วัน เมล็ดเริ่มงอก ช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตทาง-ลำต้น ใช้เวลาประมาณ 6-8 เดือน การสร้างเหง้า (อายุ 8 เดือนการเจริญเติบโตทางลำต้นจะเหี่ยว และฟุบ จึงจะสามารถเก็บเหง้าได้) หลังจากนั้นนำเหง้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดไปลงปลูก 2-3 ครั้ง ซึ่งเป็นระยะเวลาปกติของการปลูกดองดึงจากเมล็ดจึงจะให้ช่อดอกและผลิตเหง้าพันธุ์ได้ โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 2½-3 ปี (เกศรินทร์,2526) การแยก**เหง้า** เป็นวิธีนิยมมากกว่าการเพาะเมล็ดเนื่องจากให้ดอกเร็วกว่า ต้นที่ได้มีลักษณะคงเดิมเหมือนต้นแม่พันธุ์ และเป็นการประหยัดท่อนพันธุ์ที่ใช้ เพราะดองดึงมีจุดเจริญสองจุดอยู่ตรงปลายทั้งสองด้านของเหง้า ซึ่งมีลักษณะเป็นตุ่มขาวๆ ซึ่งหากตุ่มนี้หักหรือหลุดไปเหง้านั้นจะไม่งอกอีกทำให้ใช้ส่วนนี้ขยายพันธุ์อีกไม่ได้ เมื่อตัดแบ่งเหง้าโดยตัดห่างจากจุดเจริญ 3 นิ้ว ควรใช้ปูนแดงทาปิดปากแผล เพื่อกันเชื้อราไม่ให้เข้าทำลายบริเวณปากแผล ในการปลูกขยายวางเหง้าในแนวราบกับดินให้จุดเจริญอยู่ด้านบน แล้วจึงใช้ดินกลบ รดน้ำให้ชุ่มหลักจากนั้น 9-10 วัน ลำต้นใต้ดินของดองดึงจึงงอกโผล่พ้นดิน การขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้จะใช้ 1 เหง้าปลูกได้ 2 ต้น ดองดึงจะให้ดอกภายใน 2-3 เดือน และดอกจะทะยอยบานติดต่อกันในระยะเวลาประมาณ 2-3 เดือน นับระยะเวลาการปลูกด้วยเหง้าจนถึงติดฝักและเก็บเกี่ยวใช้เวลาประมาณ 7 เดือน (กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช, 2542) **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง**เพื่อเพิ่มปริมาณให้มากในระยะเวลาอันสั้น โดยใช้ส่วนขยายพันธุ์คือ ส่วนที่เป็นจุดเจริญ (เหง้า และยอด) ละอองเกสร รังไข่ และเมล็ด เมื่อได้ต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและนำต้นกล้าออกปลูกในโรงเรือนเพาะชำ จะใช้เวลาประมาณ 2ปี จึงจะให้ดอก และเหง้าได้ (เกศรินทร์, 2526)



แผนผัง แสดงการพัฒนาของดองดึง (ที่ปลูกด้วยเหง้า) ในช่วงเวลาต่างๆ

รูปที่ 1 ดองดึงในสภาพธรรมชาติ แถบชายทะเลทางภาคใต้ของประเทศไทย

รูปที่ 2 ดองดึงในสภาพธรรมชาติ แถบชายทะเลทางภาคตะวันออกของประเทศไทย

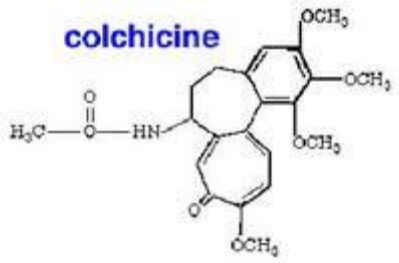
รูปที่ 3 ดองดึงในสภาพธรรมชาติ แถบเชิงเขาภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทย

รูปที่ 4 ลักษณะ เหง้า ต้น ดอก

รูปที่ 5 ลักษณะผลดองดึง (สดสีแสดแดง และเมล็ดดองดึงที่แกะเปลือกเมล็ดออก)

โคลชิซิน เป็นสารอัลคาลอยด์ที่สามารถจับ (bind) กับโปรตีนชื่อ ทิวบูลิน (tubulin) ดังแสดงในรูปที่ 6 ได้จึงมีคุณสมบัติยับยั้งระบบการขนส่งภายในเซลล์ (cellular transport system) หลายระบบ จึงทำให้มีการใช้โคลชิซินในการรักษาโรคต่างๆ เช่น อาการปวดจากโรคไขข้ออักเสบเฉียบพลัน (acute gouty arthritis) ส่วนใหญ่

โคลชิซินสกัดได้จากเมล็ดและหัว(corm) ของพืชชนิดหนึ่งที่ชื่อ *Colchicum autumnale* L. และยังพบได้ในพืชสกุล Colchicum ชนิดอื่นๆ (Boye and Brossi, 1992) โคลชิซินมีสูตรทางเคมีวา $C_{22}H_{25}O_6N$ (Anderson, 1949)ทั้งนี้การผลิตสารโคลชิซีนจากต้น *C. autumnale*L. ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองในแถบยุโรปและอเมริกาเท่านั้นจึงทำให้มีราคาสูง ปัญหาสำคัญของการผลิตสารโคลชิซินจากดองดึงนั้นอยู่ที่การขยายพันธุ์ดองดึงให้มีปริมาณมาก สามารถทำได้ 2 วิธีคือ เพาะเมล็ด และเหง้าใต้ดิน โดยมีข้อเสียคือการเพาะเมล็ดใช้ระยะเวลานานเนื่องจากดองดึงเป็นพืชพื้นเมืองมีวงชีวิตในรอบปี สามารถงอกได้ 1 ครั้ง แต่การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดเป็นการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ สามารถผสมข้ามได้ทำให้ต้นที่ได้จากเมล็ดมีความแปรปรวนของพันธุ์ มีผลทำให้ปริมาณสารโคลชิซินในแต่ละต้นไม่สม่ำเสมอกัน ส่วนการขยายพันธุ์ด้วยเหง้าใต้ดินนั้นมีปัญหาจากการพักตัวของพืชเองและพบว่าต้นดองดึงที่เกิดจากเหง้าเมื่อมีการเคลื่อนย้ายไปปลูกในวัสดุปลูกใหม่จะทำให้ชะงักการเจริญเติบโต จึงทำให้การย้ายปลูกไม่ประสบความสำเร็จ แต่หากนำเหง้าใต้ดินขึ้นมาพักให้เกิดยอดก่อนแล้วจึงทำลงปลูกก็จะสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ (กรมวิชาการเกษตร,2542)



รูปที่ 6โคลชิซิน(ที่มา http://raphiphan.tripod.com/Chapter2.htm)

พรพรหม และคณะ (2536) พบว่า ดองดึงเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีลำต้นใต้ดินแบบ tuber อายุหลายฤดูและลำต้นเหนือดินอายุสั้นเพียงฤดูเดียว ระบบรากฝอย การเรียงตัวของใบก่อนออกดอกเป็นแบบสลับ แบบวนรอบ และแบบตรงข้าม ใบเรียงตัวเป็นวงตรงจุดแตกแขนง รูปร่างใบเป็นแบบ lanceolateปลายใบเปลี่ยนรูปเป็นมือเกาะ ดอกเป็นดอกเดี่ยวสมบูรณ์เพศ รังไข่มี 3 carpels มีเกสรตัวผู้ 6 อัน กลีบดอก 6 กลีบ มีสีเหลืองที่โคนกลีบส่วนปลายกลีบมีสีแดง ผลเป็นแบบ septicidal capsule ยาว 4-7 เซนติเมตร เมล็ดเมื่อสุกมีสีแดง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-7 มิลลิเมตร ลักษณะทางกายวิภาค รากมี xylem เป็นแบบ polyarch เกิดสลับกับ phloem มี pith ที่ราก ลำต้นพบชั้นของ epidermis ซึ่งมี cuticle ห่อหุ้มอยู่มากทางผนังด้านนอก, collenchymasที่มี chloroplast 1-2 ชั้น, annular collenchymas5-6 ชั้น และถัดเข้ามาเป็นกลุ่มท่อลำเลียงอยู่อย่างกระจัดกระจายภายใน parenchyma ใบพบ cuticle เคลือบอยู่บน epidermis ทั้งด้านบนและล่าง มี spongy mesophyll และท่อลำเลียงอยู่ตรงกลาง ส่วนที่เป็นเส้นกลางใบพบท่อลำเลียงพวก xylem fiber และ phloem fiber ในหัวดองดึงพบเม็ดแป้งหลายชนิด ได้แก่ inulin, triticumและ simple ในหัวที่อายุน้อยพบเม็ดแป้งชนิด inulin มาก ส่วนหัวที่มีอายุมากพบเม็ดแป้งชนิด triticumมากและ พรพรหมและคณะ (2537) ได้ทำการศึกษาต่อ พบว่า หัวดองดึงจะเกิดและเจริญเติบโตไปพร้อมๆ กับการเจริญเติบโตของลำต้นเหนือดิน ส่วนของหัวจะหยุดการเจริญเติบโต และเข้าสู่ระยะพักตัวเมื่ออายุ 90 วันหลังงอก ส่วนลำต้นเหนือดินจะหยุดการเจริญเติบโตทางด้านความสูงเมื่ออายุ 70 วัน และพักตัวเมื่ออายุ 120 วันหลังงอก สำหรับอิทธิพลของชีพจักรต่อการให้ผลผลิต พบว่า หัวพันธุ์ดองดึงที่ผ่านรอบของชีพจักรมาหลายรอบจะให้ผลผลิตน้ำหนักเมล็ดแห้งต่อต้นมากกว่าหัวดองดึงที่มีน้ำหนักเท่ากันแต่มีจำนวนรอบของชีพจักรน้อยกว่า สำหรับข้อมูลด้านการผลผลิตเมล็ดพันธุ์ตามรายงานการทดลองของสมสุข และปราโมทย์ (2541) พบว่า การเจริญเติบโต และผลผลิตของดอกดองดึง เช่น จำนวนดอก จำนวนฝัก น้ำหนักฝักน้ำหนักเมล็ด และน้ำหนักเหง้าที่

ปลูกในช่วงเวลาต่างๆให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติยกเว้นดอกดึงที่ปลูกในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ มีนาคม และเมษายน จะให้ผลดีกว่าเดือนอื่นๆ การพัฒนาของดอกพบว่า ระยะเวลาจากดอกตูมจนถึงดอกบาน ใช้เวลาประมาณ 9 วันและระยะเวลาจากดอกบานถึงฝักแก่ประมาณ 84 วันแต่ละดอกที่อยู่บนกิ่งแขนงเดียวกันจะทยอยบานจากดอกล่างขึ้นบน ห่างกันดอกละประมาณ 3 วัน ทั้งนี้ข้อมูลด้านความงอกของเมล็ดดองดึงปราโมทย์และคณะ (2530) ทำการศึกษาพบว่า การนำเหง้าแช่น้ำก่อนปลูกจะให้เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงกว่าการแช่ด้วยจิบเบอเรลลิค แอสิค และโปแตสเซี่ยมไนเตรท อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเหง้าดองดึงที่เก็บเกี่ยวในเดือนกันยายนจะงอกได้เร็วกว่าเก็บในช่วงเวลาอื่นๆซึ่งเหมาะสำหรับการนำไปใช้เพื่อการขยายพันธุ์ ซึ่งเป็นช่วงที่แก่เต็มที่ คุณภาพและความแข็งแรงของเหง้า และเมื่อคำนึงถึงลักษณะของเหง้าที่ใช้ พบว่าเหง้าขนาดเล็กด้านยาวจะให้เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงสุด

เกศรินทร์ (2527) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง เพื่อเร่งการขยายพันธุ์ พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายเหง้าดองดึงทั้งสองข้างในอาหารสูตร MS และอาหารสูตร MS+BA 0.05 ppm+NAA 0.05 ppm เกิดเจริญเติบโตและได้ต้นที่สมบูรณ์ได้ดีที่สุด และเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS+BA 10 ppm เกิดยอดใหม่เพิ่มจำนวนมากที่สุด และในอาหาร MS ยอดเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้มากที่สุด สอดคล้องกับงานของ Hassan and Roy (2005) เมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของยอด และตาข้าง ในอาหารสูตรMS+BA 1.5 ppm+NAA 0.5 ppm สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ 92% และในปี 2529 วราภรณ์ ได้ทำการศึกษาพบว่า เมื่อนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS+NAA 1ppm + kinetin 0.1-2 ppmรากที่เกิดขึ้นจะมีขนาดใหญ่ สั้นและมีจำนวนมาก และการใช้ BA2 ppm +NAA 1 ppm สามารถชักนำเนื้อเยื่อให้เกิดรากได้ สอดคล้องกับงานของ ศุภฤกษ์ และคณะ (2545) ซึ่งพบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหง้าดองดึง ในอาหารสูตรดัดแปลง MS+2,4-D 0.5 และ 1 ppm และอาหารสูตร MS+2,4-D1ppm+ BA 1ppmรวมทั้งอาหารสูตร MS+2,4-Dppm+kinetin1ppm สามารถชักนำเหง้าดองดึงให้เกิดแคลลัสได้ดี และสามารถใช้เพิ่มปริมาณแคลลัสได้ ส่วนอาหารสูตรMS, ½MS และ ¼MSใช้เก็บรักษาแคลลัสดองดึงได้นานถึง 3 เดือน และสามารถนำแคลลัสที่เก็บรักษาไว้นั้นไปเพิ่มปริมาณได้ทั้งนี้บุญยืน และชยันต์ (2535) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของดองดึง (*G.superb* Linn.) ในอาหารสูตร MS ที่มีฮอร์โมนระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า เนื้อเยื่อจากส่วนของยอดและก้านใบสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มี NAA (Naphthalene acetic acid) 4 ppm + น้ำมะพร้าว 5% หรือ NAA 1 ppm ร่วมกับ BA (Benznylamino purine) 1 ppm + น้ำมะพร้าว 5% การเจริญของอวัยวะเหล่านี้สิ้นสุดลงทั้งในอาหารเดิมและอาหารใหม่ ส่วนเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีฮอร์โมนของ NAA, BA, GA_3 (Gibberellic acid) และ 2,4-D (Dichlorophenoxy acetic acid) ในระดับความเข้มข้นต่างๆ เมล็ดไม่สามารถงอกได้เลยในทุกความเข้มข้นของฮอร์โมน เนื้อเยื่อจากลำต้นใต้ดิน (ไรโซมหรือเหง้า) เป็นส่วนที่ดีที่สุดของเนื้อเยื่อที่นำไปเลี้ยง ซึ่งสามารถเจริญเป็นต้นขนาดเล็กได้ ลำต้นใต้ดินมีการตอบสนองได้ดีในอาหารที่มี NAA, BA และ 2iP ส่วนในอาหารที่มี 2,4-D ไม่มีการตอบสนองเลยต่อมาในปี 2544 จารุวรรณ ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยบางประการที่มีต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า การนำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร BA 4ppm+ NAA 1ppmสามารถชักนำให้เมล็ดเกิดต้นได้ดีที่สุด 20% และการนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร BA 4ppm+ NAA 4ppm เกิดต้นได้ 100% และในอาหารที่มี BA 4ppm ชักนำให้เกิดต้นได้ 83% และพบว่าเมล็ดสามารถงอกได้ในปริมาณต่ำ การเพาะเลี้ยงเหง้าสามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ และการเพาะเลี้ยงแคลลัสสามารถชักนำให้เกิดต้นได้

รมณีย์ และ ศาลักษณ์ (2547) พบว่า manninol สามารถชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนที่เจริญจากตาของข้อได้ โดยเฉพาะความสูงของต้นจะลดลงถึง 83.1% ในอาหารที่มีสารความควบการเจริญเติบโต และ 93.3% ในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวนยอดของต้นอ่อนมีแนวโน้มลดลงเมื่อ

เลี้ยงในอาหารที่มีmannitol ความเข้มข้น 40 และ60 g/l ต้นอ่อนในอาหารที่เติม mannitol 20 g/l สามารถเก็บรักษาได้ถึง 8 เดือนโดยไม่มีการตาย และต้นอ่อนยังคงมีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง ต้นอ่อนที่ยังคงมีชีวิตในอาหารทุกสูตรสามารถเจริญเติบโตให้ยอดใหม่ได้เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ศิริกุล (2548) พบว่า การเก็บรักษาปลายยอดจำปีสิรินธร (*Magnolia sirindhorniae*Noot. &Chalermglin)ในสภาพปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 25± 20C ความเข้มแสง 40 μmol m-2 s-1 แสง 16 hr./day ได้ศึกษาผลของ 1) ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก 3 ระดับคือ MS, 3/4 MS และ 1/2MS 2) ความเข้มข้นของน้ำตาล 2 ชนิดได้แก่ Sucrose 20 และ 30 g/l ใช้ร่วมกับMannitol 0, 10 และ 20 g/l 3) ความเข้มข้นของสารชะลอการเจริญPaclobutrazolที่ระดับ 0, 10 และ 20 mg/l พบว่าทุกปัจจัยมีผลต่อการเก็บรักษาปลายยอดจำปีสิรินธรโดยความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก 3/4 MS Sucrose 20 g/l และการเติมPaclobutrazolที่ระดับ 10 mg/l ใช้เก็บรักษาปลายยอดได้นาน 7 เดือนซึ่งพบว่ามีการรอดชีวิต 73.3±8.2% การเจริญบน regeneration medium ได้ต้นที่มีลักษณะแข็งแรงเป็นปกติ

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง แต่ปัจจุบันทรัพยากรธรรมชาติถูกทำลายลงอย่างน่าเป็นห่วง ทำให้มีการขาดแคลนพรรณพืชต่าง ๆ สาเหตุหลักเนื่องมาจากพื้นที่แหล่งอาศัยหรือแหล่งกระจายพันธุ์ที่เกิดอยู่ในพื้นที่ป่าตามธรรมชาติถูกบุกรุกทำลายจากมนุษย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม การถูกจำกัดการกระจายพันธุ์จากปัจจัยธรรมชาติเอง และจากการถูกคุกคามโดยมนุษย์เก็บไปใช้ประโยชน์โดยขาดความรู้ขาดจิตสำนึก และขาดการอนุรักษ์ที่เหมาะสม ซึ่งเป็นข้อกังวลของนักพฤกษศาสตร์ นักอนุรักษ์ ในภาพรวมว่าดองดึงเป็นพืชชนิดหนึ่งที่ใกล้จะสูญพันธุ์ในปี 2020 และได้รับการยืนยันโดย International Union for Conservation of Nature (IUCN) (Ade and Rai, 2009; Singh et al, 2013) จากปัญหาดังกล่าวจึงมีความจำเป็นเร่งด่วนในการอนุรักษ์พืชในและนอกแหล่งกำเนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการขยายพันธุ์ดองดึงโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อตอบสนองความต้องการที่มากขึ้นของโรงงานอุตสาหกรรมทั้งใน และต่างประเทศ เพื่อแก้ไขปัญหาการขยายพันธุ์ดองดึงดังกล่าว จึงได้ทำการศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์ดองดึงในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการอนุรักษ์ และเพื่อเป็นประโยชน์เบื้องต้นในการวิจัยด้านการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชและการวิจัยประยุกต์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

การอนุรักษ์ดองดึงโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

วิธีดำเนินการ:

<u>อุปกรณ์และ วิธีการ</u>

-รวบรวมข้อมูล และรวมรวบต้นดองดึง ในพื้นที่ธรรมชาติมาปลูกในโรงเรือนทดลอง

- นำเมล็ดดองดึง และยอดดองดึงจากต้นที่เพาะเลี้ยงในโรงเรือ เข้าห้องทดลองปฏิบัติการเพื่อดำเนินการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ดังนี้

วิธีการดำเนินการวิจัย

8.1 การขยายพันธุ์ดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ

นำเมล็ด/ยอด/ตาข้าง ดองดึงที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาเลี้ยงลงบนสูตรอาหารสังเคราะห์ MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (NAA) ที่ระดับความเข้มข้น 1และ 4mg/l ร่วมกับกลุ่มไซโตไคนิน(BA) 4 mg/l เพื่อชักนำการเกิดต้น ชักนำแคลลัสให้เกิดต้น BA 4 mg/l

8.2 การเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโต (slow growth)

นำเหง้าดองดึงที่ได้จากการขยายในสภาพปลอดเชื้อทดสอบสูตรอาหารเพื่อชะลอการเจริญเติบโตของพืช (slow growth) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD)9 ทรีตเม้นต์ ประกอบด้วย

1. อาหารสูตรสังเคราะห์ MS(control)
2. อาหารสูตรสังเคราะห์ MS + 10 m/l

3. อาหารสูตรสังเคราะห์ MS + 20 m/l
4. อาหารสูตรสังเคราะห์ ½MS
5. อาหารสูตรสังเคราะห์ ½MS + 10 m/l
6. อาหารสูตรสังเคราะห์ ½MS + 20 m/l
7. อาหารสูตรสังเคราะห์ ¼MS
8. อาหารสูตรสังเคราะห์ ¼MS + 10 m/l
9. อาหารสูตรสังเคราะห์ ¼MS + 20 m/l

มีจำนวนทรีตเม้นต์ทั้งสิ้น 9 ทรีตเม้นต์ ๆ ละ 15 ซ้ำ โดยไม่เปลี่ยนอาหารใหม่(subculture) จนกว่าจะพบว่าเหง้าดองดึงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเกินกว่า 50 % ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดในทรีตเม้นต์นั้น ๆ โดยข้อมูลที่บันทึกเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

เวลาและสถานที่

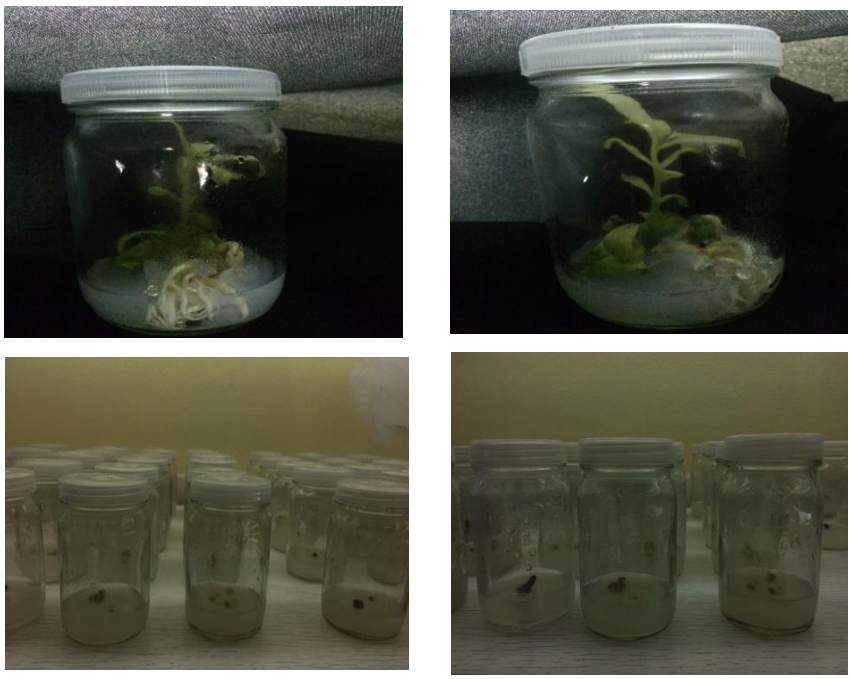
ระบุเวลา : ตุลาคม 2559– กันยายน 2561

สถานที่ทำการทดลอง : ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์(บางเขน)สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลการทดลองและวิจารณ์

9.1 การขยายพันธุ์ดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ

การขยายปริมาณดองดึงโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดของดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดในอาหารสูตรสังเคราะห์ 2 สูตร คือ อาหารสูตรสังเคราะห์ MS + NAA 1mg/l +BA4 mg/l และ MS + NAA4mg/l +BA4 mg/lพบว่า อาหารสูตรสังเคราะห์MS + NAA4mg/l +BA4 mg/lมีการขยายเหง้าดองดึงในปริมาณที่เพิ่มขึ้น และเหง้าดองดึงที่มีลักษณะสีขาว-เขียว ในสภาพปลอดเชื้อ (รูปที่ 7 และ8) และแยกเหง้าดองดึงเพื่อการทดลองการเก็บรักษาดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ



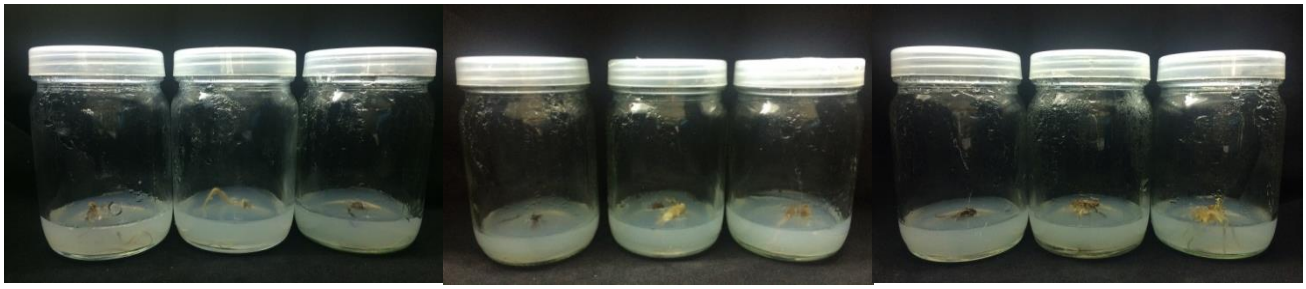
รูปที่ 7 การขยายเหง้าดองดึงเพื่อเตรียมลงอาหารในการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

รูปที่ 8 เหง้าดองดึงที่มีสีขาว-เขียวก่อนการแยกเหง้าลงอาหารในการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

9.2 การเก็บรักษาเหง้าดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ

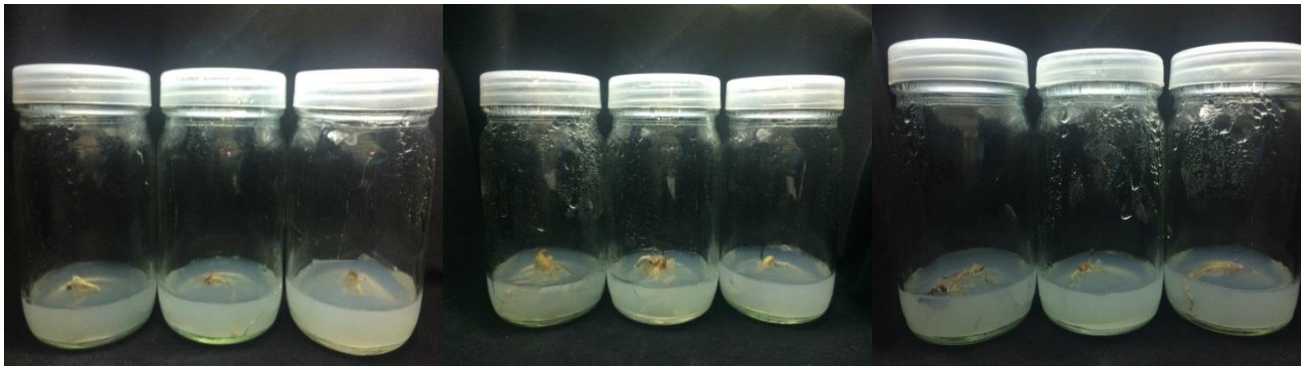
การทดลองเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโต (slow growth) สภาพปลอดเชื้อ พบว่าชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (เหง้าดองดึง) ดังแสดงในรูปที่ 9 รากมีการเจริญด้านความยาว และมีสีขาว-เขียวบริเวณราก ทั้งนี้การเก็บรักษาเหง้าดองดึงที่อายุการเก็บรักษา 3, 6 และ 9 เดือน (รูปที่ 10, 11 และ12 ตามลำดับ) มีการเจริญเติบโตที่ล่าช้า จำนวนเหง้าและความยาวเพิ่ม แต่ไม่มีการเจริญเติบโตด้านยอด สอดคล้องกับการทดลองการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพูสีไทยในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโตของ วรินทร์พร และปิยะวดี (2557) ที่สามารถเก็บรักษาได้นาน 6 เดือนและสนธิชัย (2548) ในการเก็บรักษาพืชวงศ์ขิง (ขิง ไพล และขมิ้นอ้อย) ในขณะที่การเก็บรักษาบนอาหารสูตรสังเคราะห์ ¼ MS ร่วมกับmannitol(0, 10 และ 20 g/l)สรุปโดยรวมเหง้าดองดึงสามารถเก็บรักษาได้ที่อายุ 9 เดือน ทั้งนี้รากมีสีขาว-เขียวและรากมีจำนวนเพิ่มขึ้นในบางกรรมวิธี

รูปที่ 9 การชะลอการเจริญเติบโตเหง้าดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ



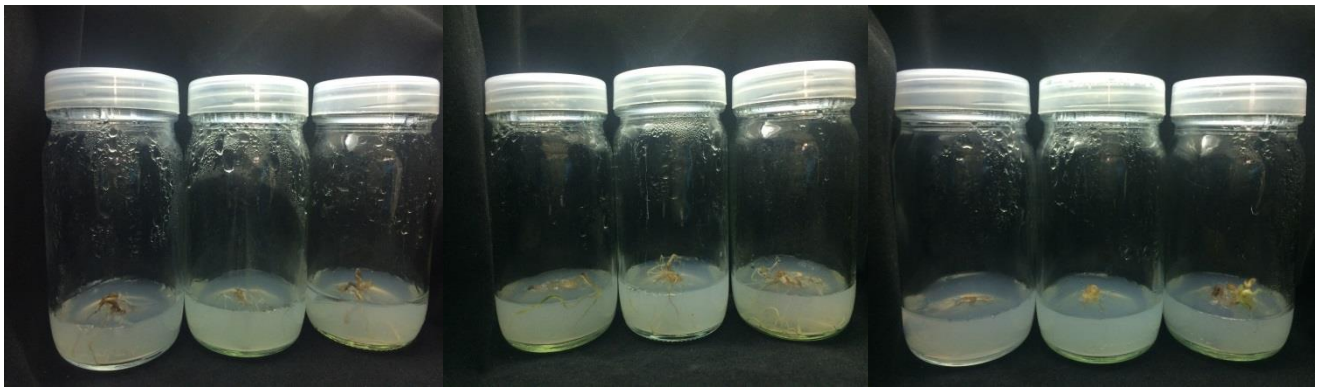
MSfull-strength+Mannitol (0, 10, 20g/L) MShalf-strength+Mannitol (0, 10, 20g/L) MSone-fourth strength+Mannitol (0,10, 20g/L)

รูปที่10 การชะลอการเจริญเติบโตเหง้าดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ ที่อายุการเก็บรักษา 3 เดือน



MSfull-strength+Mannitol (0, 10, 20g/L) MShalf-strength+Mannitol (0, 10, 20g/L) MSone-fourth strength+Mannitol (0,10, 20g/L)

รูปที่ 11 การชะลอการเจริญเติบโตเหง้าดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ ที่อายุการเก็บรักษา 6 เดือน



MSfull-strength+Mannitol (0, 10, 20g/L) MShalf-strength+Mannitol (0, 10, 20g/L) MSone-fourth strength+Mannitol (0,10, 20g/L

รูปที่ 12 การชะลอการเจริญเติบโตเหง้าดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ ที่อายุการเก็บรักษา 9 เดือน

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ:

1. การขยายปริมาณเหง้าดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ สามารถทำได้โดยใช้ส่วนยอดของดองดึง

2. เหง้าดองดึงสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตรสังเคราะห์ อาหารสูตรสังเคราะห์MS + NAA4mg/l +BA4 mg/l

3. การอนุรักษ์เหง้าดองดึงโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ สามารถเก็บรักษาได้นาน 9เดือน แม้ไม่มีการ subculture เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรสังเคราะห์ ½MS + 20 m/lและควรมีการศึกษาเพื่อชักนำให้เจริญเติบโตทางลำต้นต่อไปซึ่งจะเป็นผลดีต่อการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

การทดลองที่ 4 : เทคนิคการเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโตของมันเทศ (*Ipomoea batatas*) เพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

: Preservation of Sweet potato (*Ipomoea batatas*) by Slow growth techniques for Gene bank

ชื่อผู้วิจัย

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวปาริฉัตร สังข์สะอาด

ผู้ร่วมงาน : 1. นางสาวสุพินญา บุญมานพ

: 2. นายพิทยา วงษ์ช้าง

: 3. นางสาวพัฒน์นรี รักษ์คิด

: 4. นางสาวภัทรียา สุทธิเชื้อนาค

บทคัดย่อ

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพชะลอการเจริญเติบโต เป็นวิธีการหนึ่งที่จะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมมันเทศในสภาพปลอดเชื้อ โดยทดลองเก็บรักษาพันธุ์มันเทศ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ พจ.265-1 พจ.0106-6 พจ.65-3 และ พจ.284-17 ด้วยวิธีการลดความเข้มข้นธาตุอาหารหลักร่วมกับปริมาณน้ำตาล (1/2MS และ 1/4 MS ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร) การใช้สารควบคุมแรงดันออสโมซิส (manitol 0, 1, 2, 3, และ 4 เปอร์เซ็นต์) การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต (ABA 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) และการใช้สารชะลอการเจริญเติบโต (ancymidol 0, 5, 10, 15, และ 20 ไมโครโมล) พบว่า มันเทศทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถเก็บรักษาในอาหารสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร สูตรอาหาร MS ที่เติม ABA 2-6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ สูตรอาหาร MS ที่เติม ancymidol 10 ไมโครโมล ได้นาน 9 เดือนขึ้นไป ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม manitol 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถเก็บรักษาได้ 6 เดือน

ABSTRACT

The preservation of plant genetic resources by slow growth technique is a useful method for *In vitro* conservation of sweet potato genotypes. Four genotypes were used (PJ265-1, PJ0106-6, PJ65-3 and PJ284-17) with 4 experiments are induce the concentrations of MS salts and sucrose (1/2MS, 1/4 MS and 30, 60, 90 g/L), the osmoticum control by manitol concentrations 0, 1, 2, 3 and 4 %), using of growth regulator (ABA 0, 2, 4, 6, 8 and 10 mg/L) and using of growth retardants (ancymidol 0, 5, 10, 15 and 20 µ). The survival (%) was evaluated every three months, the four genotypes of sweet potato was obtained over nine months by using 1/2MS medium plus 30 mg/L of sucrose, MS medium plus ABA 2-6 mg/L and MS medium plus ancymidol 10 µ. By the way MS medium plus manitol 1% could be stored for six months.

บทนำ

ธนาคารเชื้อพันธุ์พืชกรมวิชาการเกษตร มีภารกิจหลักในการรวบรวมอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ทั้งพืชปลูก พืชพื้นเมือง และพืชป่า ที่อาจเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เนื่องจากภัยธรรมชาติ การระบาดของโรคและแมลง การปลูกพืชพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูงทดแทนพันธุ์ดั้งเดิม และเป็นแหล่งความหลากหลายของพันธุกรรมพืชซึ่งเป็นฐานในการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ โดยการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์นั้นนอกจากการเก็บรักษาในรูปของเมล็ดพันธุ์ (seed bank) ยังมีการเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อซึ่งใช้เก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชที่ต้องใช้ส่วนขยายพันธุ์อื่นๆ เช่น หน่อ หัว ท่อนพันธุ์ ได้แก่ กล้วย มันสำปะหลัง ฯลฯ พืชที่เมล็ดไม่สามารถลดความชื้นให้ต่ำได้ (recalcitrant seed) หรือพืชพันธุ์ป่าที่ผลิตเมล็ดได้น้อย รวมทั้งพืชหายากใกล้สูญพันธุ์ ซึ่งพืชแต่ละชนิด แต่ละพันธุ์ต้องมีการศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาที่เหมาะสมเพื่อการอนุรักษ์ได้ยาวนาน และมีคุณค่า การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อในปัจจุบันในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชทั่วไปนิยมเก็บรักษาในสภาพหลอดทดลองโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (*in vitro* culture) โดยการลดการเจริญเติบโตให้ช้าลง (slow growth) ซึ่งจะช่วยยืดระยะเวลาการเปลี่ยนถ่ายอาหาร จัดเป็นการเก็บรักษาในระยะปานกลาง เป็น active collection สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างรวดเร็ว เช่น ในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์ หรือขยายพันธุ์ เป็นต้น และการเก็บในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) การเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชในระยะยาวก็เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ต้องทำการศึกษาพัฒนาต่อไป

มันเทศ เป็นพืชหัวอาหารอีกชนิดหนึ่ง มีความสำคัญเป็นอันดับ 7 ของโลก รองจากข้าวสาลี ข้าว ข้าวโพด มันฝรั่ง ข้าวบาร์เลย์ และมันสำปะหลัง เป็นพืชที่มีประโยชน์ในการบริโภค เป็นอาหารของทั้งมนุษย์และสัตว์ รับประทานได้ทั้งหัว เถา ใบ และยอดอ่อน แป้งมันเทศใช้ประกอบอาหารชนิดต่างๆ ทั้งคาวและหวาน ใช้แทนมันฝรั่งได้ เป็นพืชที่มีคุณค่าสูงทั้งหัวและใบ โดยเฉพาะเนื้อมันเทศสีเหลืองและสีส้มมีสารเบต้าแคโรทีนสูง และมันเทศเนื้อสีม่วงมีสารแอนโทไซยานินสูง เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้มันเทศยังเป็นพืชพลังงานทดแทนได้เช่นเดียวกับมันสำปะหลัง นับได้ว่าเป็นพืชที่มีศักยภาพสูงอีกพืชหนึ่ง สำหรับพันธุ์มันเทศทาง ศวพ.พิจิตร มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง มีการปลูกอนุรักษ์ไว้มากกว่า 200 สายพันธุ์ ในสภาพแปลงปลูก ซึ่งเสี่ยงต่อการสูญหายของพันธุ์ได้จากการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมในปัจจุบัน ดังนั้นการศึกษาเทคนิคในการอนุรักษ์พันธุ์มันเทศในสภาพปลอดเชื้อในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชจึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการเก็บรักษาพันธุ์ เพื่อเป็นการพัฒนาเทคนิคการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ในอนาคต

เพื่อศึกษาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาพันธุกรรมองุ่นที่รวบรวมได้ในประเทศไทยในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อการอนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ต้นพันธุ์มันเทศ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ พจ.265-1 พจ.0106-6 พจ.65-3 และ พจ.284-17
2. อาหารสังเคราะห์สูตร MS
3. เครื่องแก้วและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
4. วัสดุปลูกต่างๆ สำหรับปลูกองุ่น ได้แก่ กระถาง, วงบ่อ, ดินปลูก เป็นต้น

วิธีการ

1. รวบรวมพันธุ์มันเทศ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์มันเทศสีม่วง มันเทศสีเหลือง มันเทศสีส้ม และมันเทศสีขาว ปลูกเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (พจ.265-1 พจ.0106-6 พจ.65-3 และ พจ.284-17)

2. เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศในสูตรอาหาร MS ดัดแปลง เพื่อขยายจำนวนต้นให้เพียงพอต่อการทดลองสำหรับการเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโต

3. ตัดชิ้นส่วนปลายยอดหรือตาข้างสำหรับการทดลองดังนี้

3.1 การศึกษาการลดความเข้มข้นธาตุอาหารหลักร่วมกับปริมาณน้ำตาล
วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ทำการทดลอง 3 ปัจจัย จำนวน 10 ซ้ำ
3.1.1 พันธุ์มันเทศ 4 พันธุ์
3.1.2 ธาตุอาหารหลัก MS ดัดแปลง 2 สูตร ได้แก่ 1/2MS และ 1/4 MS
3.1.3 ปริมาณน้ำตาล 3 ระดับ ได้แก่ 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร

3.2 การศึกษาการใช้สารควบคุมแรงดันออสโมซิส
วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ทำการทดลอง 2 ปัจจัย จำนวน 10 ซ้ำ
3.2.1 พันธุ์มันเทศ 4 พันธุ์
3.2.2 ความเข้มข้น Manitol 5 ระดับ ได้แก่ 0, 1, 2, 3, และ 4 เปอร์เซ็นต์

3.3 การศึกษาการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator)
วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ทำการทดลอง 2 ปัจจัย จำนวน 10 ซ้ำ
3.3.1 พันธุ์มันเทศ 4 พันธุ์
3.3.2 ความเข้มข้น ABA 6 ระดับ ได้แก่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.4 การศึกษาการใช้สารชะลอการเจริญเติบโต (growth retardants)
วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ทำการทดลอง 2 ปัจจัย จำนวน 10 ซ้ำ
3.4.1 พันธุ์มันเทศ 4 พันธุ์
3.4.2 ความเข้มข้น ancymidol 5 ระดับ ได้แก่ 0, 5, 10, 15, และ 20 ไมโครโมล

4. นำต้นอ่อนที่ผ่านการเก็บรักษานำออกปลูกเพื่อติดตามผลการรอดชีวิต

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา(เริ่มต้น-สิ้นสุด)

เริ่มต้น ตุลาคม 2558 –กันยายน 2561

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ
อาคารทรัพยากรพันธุกรรมพืชสิรินธร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการรวบรวมพันธุ์มันเทศ จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ พจ.265-1 พจ.0106-6 พจ.65-3 และ พจ.284-17 จาก ศวพ.พิจิตร ศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาพันธุ์ในสภาพชะลอการเจริญเติบโตในสูตรอาหารต่างๆ

<u>การศึกษาการลดความเข้มข้นธาตุอาหารหลักร่วมกับปริมาณน้ำตาล</u>

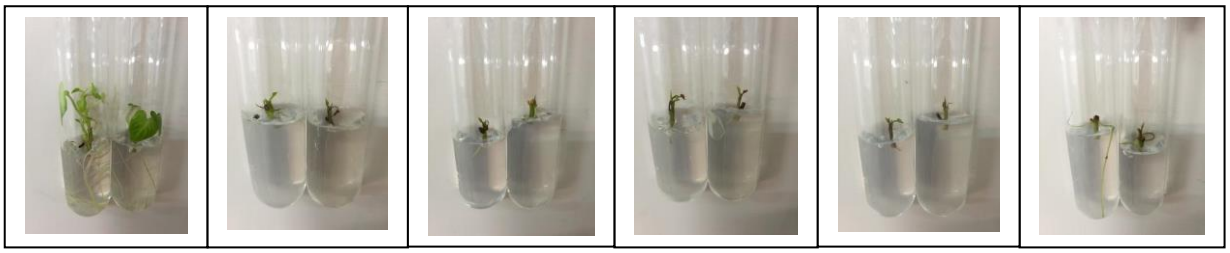
ความสูงของต้นอ่อนมันเทศ เมื่อทำการเก็บรักษาในอาหาร MS (1/2MS และ 1/4 MS) ร่วมกับปริมาณน้ำตาล 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 9 เดือน ความสูงของต้นที่เก็บรักษาในอาหาร 1/2MS และ 1/4 MS ร่วมกับปริมาณน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร คือ จะมีความสูงกว่าที่เติมน้ำตาลในปริมาณ 30 และ 90 กรัมต่อลิตร และพบว่าการเติมปริมาณน้ำตาลมากขึ้นทำให้การแตกยอด การแตกราก จำนวนตาข้าง มีมากขึ้นด้วย แต่ความแข็งแรงกลับลดลง

การศึกษาการใช้สารควบคุมแรงดันออสโมซิส

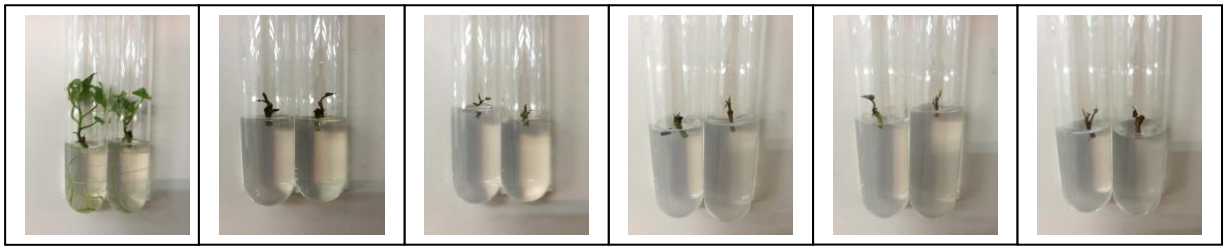
ความสูงของต้นอ่อนมันเทศ เมื่อทำการเก็บรักษาในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมแรงดันออสโมซิส manitol 0, 1, 2, 3, และ 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามันเทศทุกพันธุ์เก็บรักษาได้เป็นเวลา 6 เดือน โดยพันธุ์ พจ. 65-3 มีความสูงของต้นในทุกความเข้มข้นของ manitol ไม่แตกต่างกัน รวมทั้งการแตกยอด การแตกราก และจำนวนตาข้าง แต่ที่ความเข้มข้น 3% มีความแข็งแรงต่ำที่สุด ส่วนพันธุ์อื่นๆ สามารถผลได้แค่ที่ความเข้มข้น 1% ซึ่งอาจเกิดจากต้นที่นำมาใช้ทำการทดลองไม่แข็งแรง

การศึกษาการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator)

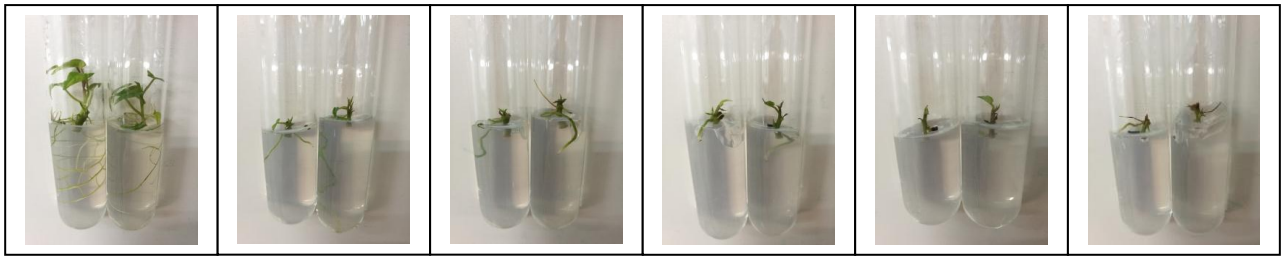
ความสูงต้นอ่อนมันเทศ เมื่อทำการเก็บรักษาในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ABA 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม ABA 2-6 มิลลิกรัมต่อลิตร ต้นอ่อนมันเทศมีความสูงไมต่างกัน รวมทั้งการแตกยอด การแตกราก และจำนวนตาข้าง และยังมีความแข็งแรงสามารถย้ายเนื้อเยื่อและทำการเก็บรักษาต่อไปได้ ดังภาพที่ 1-4



ภาพที่ 1 มันเทศพันธุ์ พจ.625-1 ที่เก็บรักษาในอาหารสูตร อาหาร MS ที่เติม ABA 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 เดือน



ภาพที่ 2 มันเทศพันธุ์ พจ.0106-6 ที่เก็บรักษาในอาหารสูตร อาหาร MS ที่เติม ABA 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 เดือน



ภาพที่ 3 มันเทศพันธุ์ พจ.65-3 ที่เก็บรักษาในอาหารสูตร อาหาร MS ที่เติม ABA 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 เดือน

ภาพที่ 4 มันเทศพันธุ์ พจ.284-17 ที่เก็บรักษาในอาหารสูตร อาหาร MS ที่เติม ABA 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 เดือน

การศึกษาการใช้สารชะลอการเจริญเติบโต (growth retardants)

ความสูงต้นอ่อนมันเทศ เมื่อทำการเก็บรักษาในอาหาร MS ที่เติมสารชะลอการเจริญเติบโต ancymidol 0, 5, 10, 15, และ 20 ไมโครโมล พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม ancymidol 5 ไมโครโมล มีความสูงเฉลี่ยสูงที่สุดในทุกสูตรอาหาร รวมทั้งมีการแตกยอด การแตกราก และจำนวนตาข้างสูง แต่พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม ancymidol 10 ไมโครโมล มีความแข็งแรงมากกว่า ทั้งนี้อาจมีความแตกต่างกันบ้างในบางสายพันธุ์

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

มันเทศทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ พจ.265-1 พจ.0106-6 พจ.65-3 และ พจ.284-17 สามารถเก็บรักษาในอาหารสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร สูตรอาหาร MS ที่เติม ABA 2-6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ สูตรอาหาร MS ที่เติม ancymidol 10 ไมโครโมล ได้นาน 9 เดือนขึ้นไป ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม manitol 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถเก็บรักษาได้ 6 เดือน และควรทำการศึกษาต่อในเทคนิคการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) เพื่อเป็นอีกวิธีการเก็บรักษาในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

การทดลองที่ 5 : การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrificationเพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

: **Cryopreservation Technique in Taro Germplasm Using Vitrification Method for Genebank Conservation**

ชื่อผู้วิจัย

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวพัฒน์นรี รักษ์คิด

ผู้ร่วมงาน : 1. นางสาวปาริฉัตร สังข์สะอาด

: 2. นางสาวพัชร ปิริยะวินิตร

: 3. นายทวีป หลวงแก้ว

บทคัดย่อ

เผือกมีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หรือตอนใต้ของเอเชียกลาง ซึ่งประเทศไทยมีการปลูกเผือกอยู่ทั่วไปทุกภาคของประเทศ ปัจจุบันศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร กรมวิชาการเกษตรได้รวบรวมพันธุ์เผือกไว้ในสภาพแปลงปลูก เทคนิคการอนุรักษ์ในสภาพเยือกแข็งเป็นเทคนิคที่ช่วยในการประหยัดและลดขั้นตอนการปลูกต้นเผือกจำนวนมาก จึงได้ดำเนินการทดลองการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมเผือกในสภาพเยือกแข็ง การทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร 12 สูตร ได้แก่ MS ที่เติม BA 0, 3, 5 และ 7 มก/ล. ร่วมกับ NAA 0, 1 และ 2 มก/ล. นาน 16 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสำหรับการชักนำให้เกิดยอดของเผือกชนิดไม่หอม ได้แก่ เผือกไข่ และเผือกอ้อย คือ MS ที่เติม BA 5 มก/ล. ร่วมกับ NAA 2 มก/ล. ทำให้ได้ปริมาณยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 10.25 และ 9.19 ยอด/ชิ้นส่วน ตามลำดับ ในขณะที่สูตรอาหารที่เหมาะสมของเผือกชนิดหอม ได้แก่ เผือกหอมดอยมูเซอ และเผือกหอมพะเยา คือ MS ที่เติม BA 5 มก/ล. ร่วมกับ NAA 1 มก/ล ทำให้ได้ปริมาณยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 10.04 และ 9.57 ยอด/ชิ้นส่วน ตามลำดับ การทดลองเก็บรักษาปลายยอดเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrification พบว่า สาร cryoprotectant ที่เหมาะสำหรับการเก็บรักษาปลายยอดเผือก คือ สาร PVS3 และเวลาที่เหมาะสมในการแช่คือ 30 นาที ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตของเผือกไข่ เผือกอ้อย เผือกหอมดอยมูเซอ และเผือกหอมพะเยา คือ 49.5, 64.1, 52.7 และ 59.5% ตามลำดับ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 4 สัปดาห์

คำสำคัญ: การอนุรักษ์ในสภาพปลอดเชื้อ การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

Abstract

Southeast Asia or South of Central Asia is a source of the origin of taro. Thailand is a one of taro planting country that can be found in all regions. Currently, the taro genetic resources of Thailand were collected into field crops at Phichit Agricultural Research and Development Center, Department of Agriculture. Cryopreservation is currently considered the only safe and cost-effective option for the long term conservation of vegetatively propagated crops and reduces the cultural process of large amount of taro number per crop. Therefore, this research tried to apply cryopreservation technique to conserve taro germplasm. The apical meristem of were cultured on 12 different MS media supplemented with combination of various concentration of BA (0, 3, 5 and 7 mg/l) and NAA (0, 1 and 2 mg/l). The results indicated that after 16 weeks cultured, the highest shoot number of ‘Phueak Khai’ (10.25 shoots per

explant) and ‘Phueak Aoi’ (9.19 shoots per explant) on MS medium supplemented with 5 mg/l BA and 2 mg/l NAA, whereas, ‘Pheuak Hom Doi Moo Ser’ and ‘Pheuak Hom Phayao’ showed the highest shoot number on MS medium contained 5 mg/l BA and 1 mg/l NAA at 10.04 and 9.57 shoots per explant, respectively. The taro shoots were investigated for cryopreservation using vitrification method. Shoot tips were dehydrated at 25^{0}c by PVS3 solution for 30 minutes as suitable techniques for cryopreservation of shoot tips of taro. After 4 weeks, ‘Pheuak Kai’, ‘Pheuak Aoi’, ‘Pheuak Doi Moo Ser’ and ‘Pheuak Hom Phayao’ were cultured on MS medium showed the high recovery rate as 49.5, 64.1, 52.7 และ 59.5%, respectively.

Keywords: *In vitro* conservation, micropropagation

บทนำ

เผือกเป็นพืชหัวเศรษฐกิจที่มีศักยภาพในการส่งออกอีกพืชหนึ่ง คนไทยนิยมบริโภคเผือกเพราะมีกลิ่นหอมและรสชาติดี หัวเผือกมีส่วนประกอบพวกแป้งและแร่ธาตุต่างๆ ส่วนใบก็ประกอบด้วยโปรตีนและแร่ธาตุเช่นกันซึ่งใบสามารถนำไปใช้เลี้ยงอาหารสัตว์ได้อีกด้วย ปัจจุบันเผือกหอมกำลังเป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศ เช่น ประเทศออสเตรเลีย ฮ่องกง ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ และมาเลเซีย โดยส่งออกทั้งในรูปหัวเผือก ก้านใบ และใบ เช่นในปี 2543 ประเทศไทยมีการส่งออกหัวเผือกประมาณ 1,039 ตัน คิดเป็นมูลค่า 14.8 ล้านบาท ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงการใช้ประโยชน์ได้ทั้งหัว ก้านใบ และใบเผือก รวมทั้งตลาดภายในและต่างประเทศ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวและพืชไร่บางชนิดแล้วเผือกจัดเป็นพืชที่น่าสนใจของเกษตรกรอีกพืชหนึ่ง (นิรนาม, 2557)

เผือกมีถิ่นกำเนิด (Source of Origin) ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หรือตอนใต้ของเอเชียกลางซึ่งอาจมีการพัฒนามาเป็นพืชปลูกก่อนข้าว ประเทศไทยมีการปลูกเผือกอยู่ทั่วไปทุกภาคของประเทศ มีพื้นที่ปลูกเผือกทั้งประเทศปีละประมาณ 41,394 ไร่ ผลผลิตประมาณ 102,126 ตัน ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 2 - 2.5 ตันต่อไร่ จัดเป็นประเทศที่มีการผลิตเผือกสูงเป็นลำดับที่ 5 ของโลก เผือกจัดอยู่ในวงศ์ Araceae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Colocacia esculenta* (L.) Schott ชื่อสามัญคือ Taro, Old Cocoyam, Dasheen และ Eddoe เผือกเป็นพืชที่มีอายุหลายปี (perennial) แต่ปกติปลูกและเก็บเกี่ยวในปีเดียว เป็นพุ่มต้นตรง ไม่มีเนื้อไม้ต้นสูง 0.4 – 2 เมตร ระบบรากพิเศษเป็นรากฝอยอยู่ตื้นๆ ลำต้นใต้ดินสะสมอาหารมีลักษณะเป็นหัวขนาดใหญ่หนักได้ถึง 4 กิโลกรัม รูปทรงกระบอกหรือกลม มีขนาดได้ถึง 30 x 15 เซนติเมตร ปกติเปลือกด้านนอกมีสีน้ำตาล มีตาด้านข้างอยู่เหนือรอยแผล เจริญเติบโตเป็นหัวย่อย หน่อหรือไหล แผ่นใบใหญ่เป็นรูปหัวใจยาว 20 – 50 เซนติเมตร ช่อดอกแบบช่อเชิงลด แกนกลางช่ออวบใหญ่ มีกาบหุ้มดอกล้อมรอบ ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียมีขนาดเล็กอยู่แยกกันบนแกนกลางช่อ เผือกแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ The dasheen type มีหัวหลักขนาดใหญ่และหัวย่อยเล็กๆ อีก 2 – 3 หัว หัวใหญ่ใช้รับประทาน ส่วนหัวเล็กมักใช้ทำพันธุ์ เผือกประเภทนี้ได้แก่ เผือกหอม ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกกันโดยทั่วไป และ The eddoe type มีหัวหลักขนาดเล็กล้อมรอบด้วยหัวย่อยขนาดเล็ก ทุกหัวรับประทานและใช้ทำพันธุ์ได้ เผือกประเภท eddoe type ทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ดีกว่า dasheen type (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.), 2544)

คุณค่าทางอาหารของเผือก หัวเผือกเมื่อรับประทานดิบหรือสุกไม่ดีพอจะมีรสเฝื่อนและมีอาการระคายเคืองในปากและคอ รสเฝื่อนจะลดลงหรือหมดไปเมื่อทำให้สุกหรือเมื่อผ่านการหมัก ส่วนต่างๆ ของต้นเผือก เช่น หัว หัวย่อย ไหล ใบและก้านใบ เมื่อต้มสุกรับประทานได้ หัวเผือกจัดเป็นอาหารที่ย่อยง่าย ไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ เมื่อบดละเอียดจึงเหมาะใช้เลี้ยงเด็กทารก เม็ดแป้งมีขนาดเล็ก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 – 6.5 µm. (มาลินี และคณะ, มปป.) ส่วนที่รับประทานได้ของหัวเผือกหนัก 100 กรัม ประกอบด้วย น้ำ 70 กรัม โปรตีน 2.1 กรัม

คาร์โบไฮเดรต 26.8 กรัม ไขมัน 0.1 กรัม แคลเซียม 84 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 54 มิลลิกรัม วิตามินบี1 0.15 มิลลิกรัม วิตามินบี2 0.04 มิลลิกรัม ไนอะซีน 1 มิลลิกรัม เส้นใย 1.5 กรัม วิตามินซี 15 มิลลิกรัม ค่าพลังงานโดยเฉลี่ย 117 กิโลแคลอรี่ ใบมีโปรตีน 4.2 กรัม สรุปได้ว่าเผือกเป็นพืชที่มีสารอาหารต่างๆ เช่น คาร์โบไฮเดรตสูง มีโปรตีน แคลเซียม ฟอสฟอรัส นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณทางยา ช่วยในการบำรุงธาตุ แก้อักเสบ แก้ท้องเสีย บำรุงไต และระงับอาการปวด (นิรนาม, 2539) แหล่งพันธุกรรม มีการเก็บรวบรวมเชื้อพันธุ์เผือกเช่น The National University of Malasia, The Philippine Root Crop Research and Training Center และที่ The Bubai Research Station ในปาปัวนิวกินี ซึ่งมีเป้าหมายเพื่อรวบรวม อนุรักษ์ และใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์เผือก โดยมีเป้าหมายได้แก่ การเพิ่มผลผลิต ลดรสเฝื่อน ยืดอายุการเก็บเกี่ยว การเกิดหน่อที่เหมาะสม ความต้านทานต่อเชื้อ Phytophthora, Pythium ปรับปรุงคุณภาพในการนำมาประกอบอาหาร และการปรับตัวเข้ากับสภาพดินเลวได้ดี ทั้งนี้การแลกเปลี่ยนสายพันธุ์ดีสามารถแลกเปลี่ยนต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อ (Wang, 1983)

ปัจจุบันศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร ได้รวบรวมพันธุ์เผือกจากภูมิภาคต่างๆ ทั่วประเทศ และจากต่างประเทศเพื่อปลูกศึกษาพันธุ์ และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้จำนวน 450 สายพันธุ์ จำแนกเป็นเผือกไทย จำนวน 400 สายพันธุ์ เผือกจากต่างประเทศ จำนวน 50 สายพันธุ์ เผือกไทยจำแนกเป็นชนิดหอมจำนวน 257 สายพันธุ์ และชนิดไม่หอม จำนวน 143 สายพันธุ์ (ทรงพล, 2548) โดยแบ่งออกเป็นเผือกพันธุ์เพาะปลูก (cultivar) หรือเผือกชนิดหัวเดี่ยวใหญ่ (dasheen) จำนวน 235 พันธุ์ และพันธุ์ป่า (wild form) หรือชนิดมีหัวย่อยขนาดเล็ก (eddoe) จำนวน 65 พันธุ์

การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชที่ไม่สามารถเก็บรักษาในรูปเมล็ดได้นั้น ธนาคารเชื้อพันธุ์พืชทั่วโลกนิยมเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโต (Slow growth) และการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง (Cryopreservation) การเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชในสภาพเยือกแข็งเป็นการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในระยะยาว (Long term storage) โดยการปรับสภาพเนื้อเยื่อพืชให้เหมาะสมก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส จึงเป็นการประหยัดพื้นที่ แรงงาน และการดูแลรักษาได้มากกว่าการเก็บรักษาในสภาพแปลงปลูก หรือห้องควบคุมอุณหภูมิและการชะลอการเจริญเติบโตในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทั้งยังเป็นการสะดวกในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์พืช เพราะมีขนาดเล็กและปลอดโรคประเทศไทยโดยกรมวิชาการเกษตรได้มีการรวบรวมและอนุรักษ์พันธุกรรมเผือกในสภาพแปลงอนุรักษ์ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร โดยดำเนินงานวิจัยภายใต้โครงการความร่วมมือระหว่างประเทศ เพื่อพัฒนาการผลิตเผือกในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และภาคพื้นแปซิฟิก (Taro Network for Southeast Asia and Oceania) โดยเริ่มต้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541-2544 ปัจจุบันยังคงมีการรวบรวม ศึกษาลักษณะ และอนุรักษ์ในสภาพแปลงปลูกได้จำนวน 250 ตัวอย่าง ซึ่งการอนุรักษ์ในสภาพนี้จะต้องใช้เนื้อที่ และแรงงานจำนวนมาก รวมทั้งเสี่ยงต่อการสูญหายของเชื้อพันธุกรรมเมื่อประสบกับภัยพิบัติธรรมชาติ หากไม่มีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมเหล่านี้สำรองไว้ ดังนั้นธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตรจึงเห็นควรเร่งให้มีการศึกษาเทคนิคการอนุรักษ์พันธุกรรมเผือกในสภาพเยือกแข็งให้เหมาะสมกับตัวอย่างพันธุ์เผือกของไทยที่ได้อนุรักษ์ไว้ในสภาพแปลงปลูก โดยประสานการทำงานร่วมกันระหว่างสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพและศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนในอนาคต

การเก็บรักษาพันธุกรรมพืชในระยะยาว (Long term storage) โดยการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (Cryopreservation) โดยการนำชิ้นส่วน หรือเนื้อเยื่อพืชมาแช่ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชระยะยาวที่มีประสิทธิภาพ และเสียค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาเฉลี่ยต่อตัวอย่างน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเก็บรักษาแบบอื่น (Engelmann, 2000) ซึ่งสามารถใช้อนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชที่ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และไม่สามารถเก็บรักษาเมล็ดได้ ตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์จะหยุดลงทำให้เกิดการพักตัว วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในสภาพ

เยือกแข็งมีหลายวิธีได้แก่ วิธี Vitrification, Droplet-vitrification, Encapsulation-dehydration และ Encapsulation-vitrification เป็นต้น (Reed, 2008)

การประสบความสำเร็จในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในสภาพเยือกแข็งขึ้นอยู่กับปัจจัยและขั้นตอนต่างๆ ของแต่ละวิธีการที่ใช้ งานวิจัยการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพเยือกแข็งที่ผ่านมาเช่น Matsumoto *et al.* (1995) ได้ทำการเก็บรักษาชิ้นส่วนวาซาบิโดยวิธี Encapsulation-vitrification พบว่าการแช่ apical meristem ของวาซาบิในสารละลาย PVS2 ที่เวลา 30 และ 100 นาที สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตจาก 30 เป็น 95 เปอร์เซ็นต์ และการเก็บรักษาปลายยอดของส้มด้วยวิธี Encapsulation-vitrification เมื่อแช่ปลายยอดส้มในสารละลาย PVS_2 ที่เวลา 60-180 นาที สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตจาก 30 เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (Wang *et al*., 2002) Kim *et al.* (2006) รายงานว่าการเก็บรักษาปลายยอดมันฝรั่งด้วยวิธี Droplet-vitrification โดยแช่ใน sucrose 0.8 M ให้ผลการมีชีวิตรอดสูงกว่าที่แช่ใน sucrose 0.3 และ 1.2 M ซึ่งขั้นตอนการละลายน้ำแข็งเป็นส่วนสำคัญในการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืช และในการเก็บรักษาปลายยอดของ *Kaempferia galangal* L. ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่ใกล้สูญพันธุ์ มาเก็บรักษาด้วยวิธี Vitrification โดยการแช่ใน Loading solution และสารละลาย PVS_2 อย่างละ 20 นาที จะทำให้มีอัตราการรอดชีวิต 50-60 เปอร์เซ็นต์ (Preetha *et al*., 2013)

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ต้นเผือก 4 พันธุ์ได้แก่ เผือกไข่ เผือกอ้อย เผือกหอมดอยมูเซอ และเผือกหอมพะเยา
2. สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ และคลอร็อกซ์
3. สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Murashige and Skoog (MS)
4. สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มออกซิน คือ 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) และกลุ่มไซโตไคนิน คือ 6-Benzylaminopurine (BA)
5. สารเคมีสำหรับการอนุรักษ์ในสภาพเยือกแข็ง เช่น กลีเซอรอล dimethyl sulfoxide (DMSO) ethylene glycol เป็นต้น
6. อุปกรณ์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น จานแก้ว ปากคีบ มีดผ่าตัด เป็นต้น
7. ไนโตรเจนเหลว และถังบรรจุ
8. วัสดุเพาะปลูก เช่น กระถาง ดินผสม หินเพอร์ไลท์ เม็ดดินเผา และพีทมอส เป็นต้น

- วิธีการ

1. รวบรวมพันธุ์เผือกชนิดหอม และไม่หอมอย่างละ 2 สายพันธุ์ รวม 4 สายพันธุ์ จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร เพื่อใช้ในการทดลอง ได้แก่ เผือกไข่ เผือกอ้อย เผือกหอมดอยมูเซอ และเผือกหอมพะเยา

2. การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเผือก

ทำความสะอาดชิ้นส่วนของต้นเผือกด้วยน้ำสบู่ แล้วล้างน้ำสบู่ออกให้หมด แช่ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 1 นาที ตัดชิ้นส่วนตายอด (apical bud) ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ 30% หยดสาร Tween 20 1-2 หยด ฟอกนาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ลอกชิ้นส่วนรอบนอกของตาเผือกออก และตัดให้มีขนาดประมาณ 0.5 ซ.ม. เลี้ยงบนอาหารสูตร MS

3. ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสูตรต่างๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (apical meristem)

ต้นเผือกที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อ (จากข้อ 2) และเพาะเลี้ยงจนได้เป็นต้นที่สมบูรณ์ ตัดให้มีขนาดเท่าๆ กัน ประมาณ 0.8 ซม. เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ จำนวน 12 สูตร ได้แก่ อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบกลุ่มโตไซโตไคนิน (BA) ความเข้มข้น 4 ระดับคือ 0, 3, 5 และ 7 มก/ล. ร่วมกับกลุ่มออกซิน (NAA) ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 0, 1 และ 2 มก./ล.

วางแผนการทดลองแบบ 4x3 Factorial in CRD จำนวน 4 ซ้ำ ใช้สิ่งทดลองคืออาหารทั้ง 12 สูตรข้างต้น โดยปัจจัยที่ 1 คือระดับความเข้มข้นของ BA จำนวน 4 ระดับได้แก่ 0, 3, 5 และ 7 มก/ล. ปัจจัยที่ 2 คือ ระดับความเข้มข้นของ NAA จำนวน 3 ระดับได้แก่ 0, 1 และ 2 มก./ล. เก็บข้อมูลโดยการนับจำนวนยอดและตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

4. ศึกษาการเก็บรักษาปลายยอดเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrification

4.1 ตัดปลายยอด (shoot tip) ขนาด 1.5-2 ม.ม. preculture ใน petri dish ที่มีอาหาร MS + sucrose 0.3 M + วุ้น 0.8% เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด 1 คืน

4.2 นำปลายยอดแช่ในสาร loading solution (glycerol 2 M + sucrose 0.4 M เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.3 ศึกษาการ dehydration โดยเปรียบเทียบการในแช่สาร PVS2 (glycerol 30% + ethylene glycol 15% + dimethyl sulphoxide 15% + sucrose 40%) และ PVS3 (glycerol 50% + sucrose 50%) และเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการแช่ที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 10, 20 และ 30 นาที

4.4 นำ cryotube ที่มีปลายยอดไปแช่ในไนโตรเจนเหลวนาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ cryotube ที่แช่ในไนโตรเจนเหลวละลายผลึกน้ำแข็ง (Thawing) ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 1-2 นาที

4.5 นำชิ้นส่วนปลายยอดมาล้างสารละลาย cryoprotectant ด้วยสาร Unloading Solution (sucrose 1.2 M) นาน 10-15 นาทีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.6 เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดเผือกบนอาหาร MS ที่เติม sucrose 0.3 M เป็นเวลา 1 วัน แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม sucrose 0.1 M เป็นเวลา 10 วัน

4.7 ย้ายชิ้นส่วนปลายยอดไปเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

4.8 รวบรวม บันทึกข้อมูลและสรุปผลการทดลอง

ศึกษาชนิดของสาร cryoprotectant ได้แก่ PVS2 และ PVS3 และเปรียบเทียบระยะเวลาในการแช่สาร cryoprotectant ได้แก่ 0, 10, 20 และ 30 นาที โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลองได้แก่ พันธุ์เผือก จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ เผือกไข่ เผือกอ้อย เผือกหอมดอยมูเซอ และเผือกหอมพะเยา โดยคำนวณผลเป็นอัตราการรอดชีวิต (recovery rate)

- เวลาและสถานที่

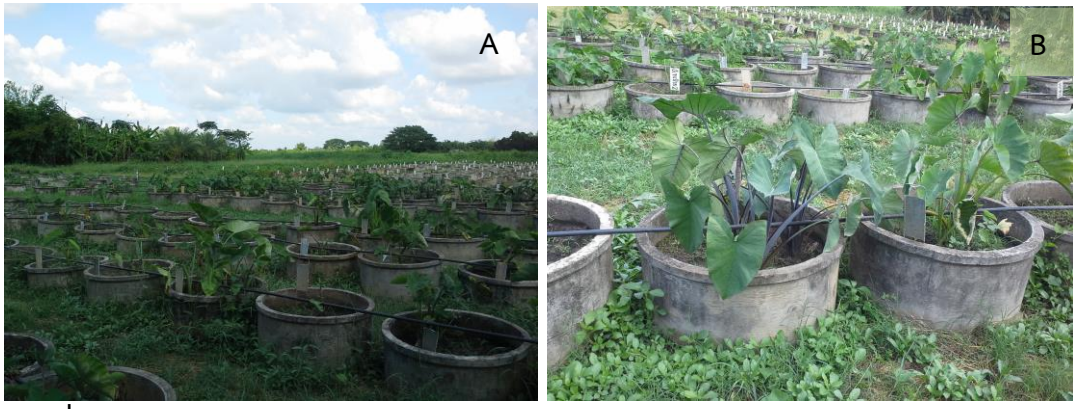
ระยะเวลาดำเนินการทดลอง เริ่มตั้งแต่ ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2561

สถานที่ดำเนินการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

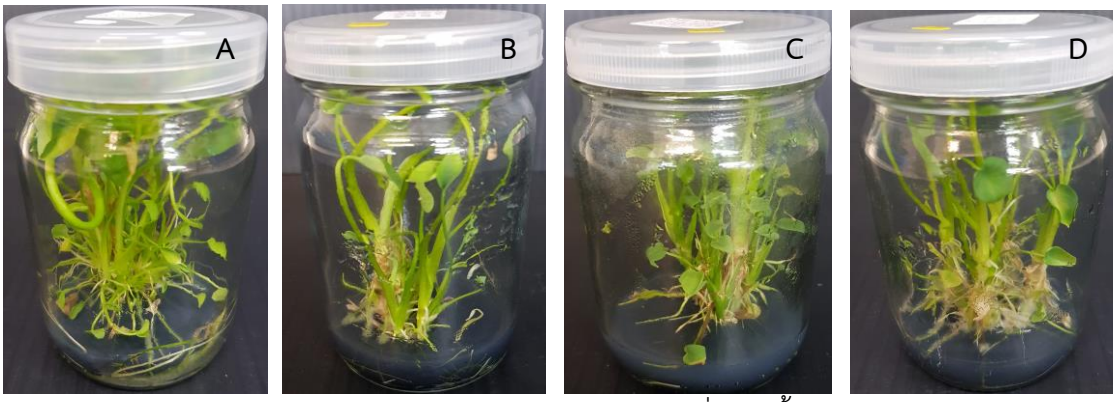
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสูตรต่างๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดเผือก

นำต้นเผือกจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ เผือกไข่ เผือกอ้อย เผือกหอมดอยมูเซอ และเผือกหอมพะเยา ที่ได้จากแปลงรวบรวมพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร (ศวพ.พิจิตร) (ภาพที่ 1) มาฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตายอด (apical bud) ด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ 30% หยดสาร Tween 20 1-2 หยด ฟอกนาน 15 นาที เมื่อได้ชิ้นส่วนเผือกทั้ง 4 พันธุ์ ที่ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต นาน 4 เดือน จนเป็นต้นที่สมบูรณ์แล้ว จึงตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดต้นเผือกขนาดประมาณ 0.8 ซม. เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ จำนวน 12 สูตร ได้แก่ อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบกลุ่มโตไซโตไคนิน (BA) ความเข้มข้น 4 ระดับคือ 0, 3, 5 และ 7 มก/ล. ร่วมกับกลุ่มออกซิน (NAA) ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 0, 1 และ 2 มก./ล. เพื่อศึกษาการชักนำให้เกิดยอด (multiple shoots)



ภาพที่ 1 สภาพแปลงรวบรวมพันธุ์เผือก (A) และ ลักษณะการปลูกในบ่อซีเมนต์ (B) ณ ศวพ.พิจิตร



ภาพที่ 2 ลักษณะของเผือกไม่หอม ได้แก่ เผือกไข่ (A) และเผือกอ้อย (B) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ร่วมกับ BA 5 mg/l และ NAA 2 mg/l และ เผือกหอม ได้แก่ เผือกหอมดอยมูเซอ (C) และ เผือกหอมพะเยา (D) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ร่วมกับ BA 5 mg/l และ NAA 1 mg/l เป็นเวลา 4 เดือน

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของเผือกทั้ง 4 พันธุ์ (เผือกไข่ เผือกอ้อย เผือกหอมดอยมูเซอ และเผือกหอมพะเยา) บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 12 สูตร เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของเผือกทั้ง 4 พันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นระดับต่างๆ นาน 3-4 สัปดาห์ จะเริ่มมีการพัฒนาไปเป็น Multiple shoots ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับการทดลองของ Hutami และ Purnamaningsih (2013) สาร BA

(6-Benzylaminopurine) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเผือกเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก (Chung and Goh, 1994) (ตารางที่ 1-2) และ (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลของสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิดยอดของต้นเผือกไม่หอม ได้แก่ เผือกไข่และเผือกอ้อย เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน

	เผือกไม่หอม								
สูตรอาหาร MS +	เผือกไข่					เผือกอ้อย			
	NAA (มก./ล.)					NAA (มก./ล.)			
BA (มก./ล.)	0	1	2	mean		0	1	2	mean
0	1.45 b x	1.91 c x	1.71 c x	1.69 c		1.45 b x	1.21 c x	1.63 b x	1.43 c
3	6.17 a x	4.89 b x	5.88 b x	5.65 b		4.63 a x	3.68 b x	3.05 b x	3.79 b
5	8.34 a x	9.57 a x	10.25 a x	9.39 a		5.77 a x	8.37 a x	9.19 a x	7.78 a
7	7.97 a x	7.39 ab x	6.97 ab x	7.44 a		6.52 a x	6.42 ab x	7.35 a x	6.76 a
mean	5.98	5.94	6.20	6.04		4.59	4.92	5.31	4.94
CV (%)	15.66					16.98			

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกับในแต่ละสูตรอาหารไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื้อมั่น 95 %
ความแตกต่างระหว่างสารกลุ่มไซโตไคนิน (BA) ใช้ตัวอักษร a, b, c
ความแตกต่างระหว่างสารกลุ่มออกซิน (NAA) ใช้ตัวอักษร x, y

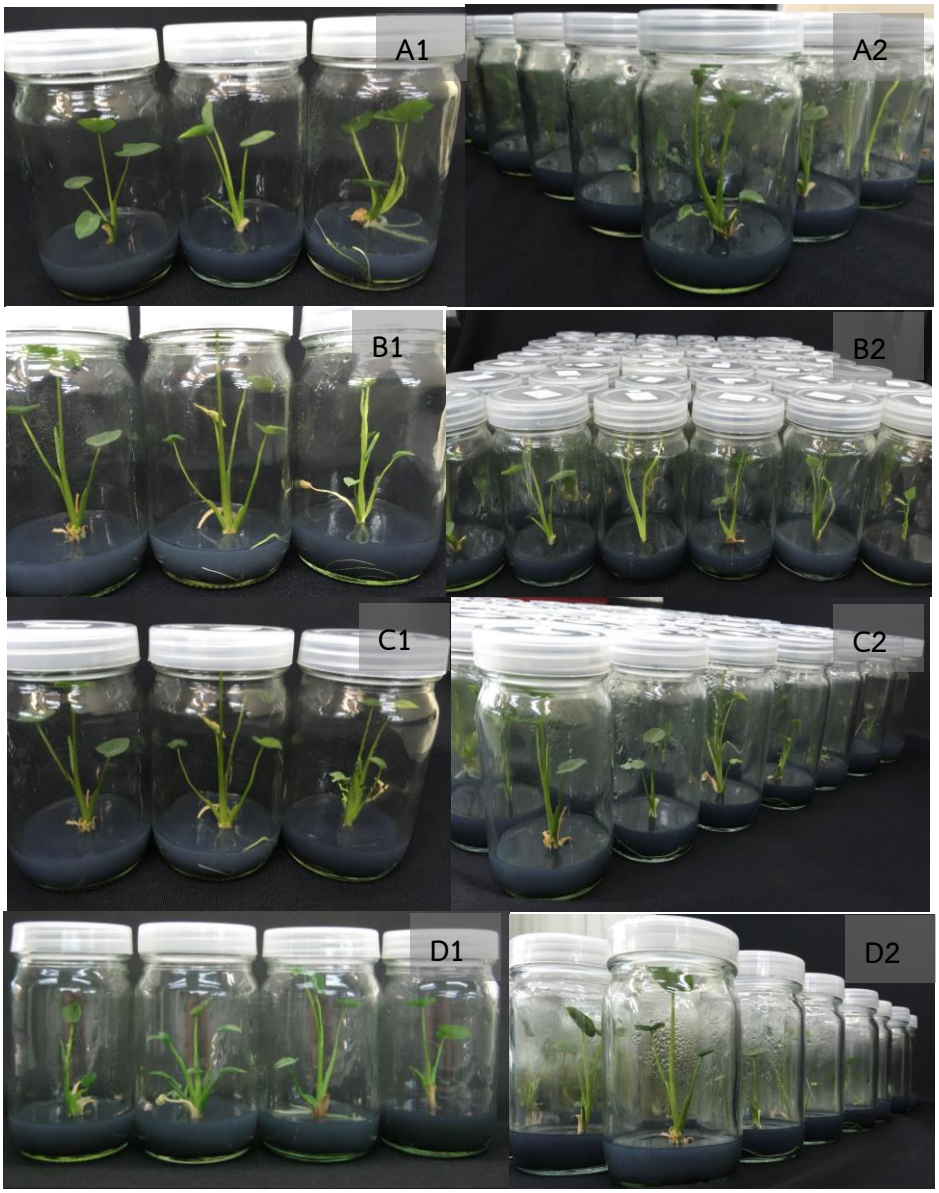
ตารางที่ 2 ผลของสูตรอาหาร MS ร่วมกับการเติม BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิดยอดของต้นเผือกหอม ได้แก่ เผือกหอมดอยมูเซอและเผือกหอมพะเยา เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน

	เผือกหอม								
สูตรอาหาร MS +	เผือกหอมดอยมูเซอ					เผือกหอมพะเยา			
	NAA (มก./ล.)					NAA (มก./ล.)			
BA (มก./ล.)	0	1	2	mean		0	1	2	mean
0	2.30 b x	1.88 b x	1.62 b x	1.94 c		1.71 b x	1.83 c x	1.45 c x	1.66 c
3	6.11 a x	5.21 a x	6.40 a x	5.91 b		4.79 a x	5.24 b x	4.24 b x	4.75 b
5	8.69 a x	10.04 a x	9.72 a x	9.48 a		8.12 a x	9.57 a x	8.76 a x	8.82 a
7	6.61 a x	5.84 a x	6.91 a x	6.45 b		6.84 a x	6.20 ab x	5.98 ab x	6.34 b
mean	5.93	5.74	6.16	5.94		5.37	5.71	5.11	5.39
CV (%)	17.79					18.80			

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกับในแต่ละสูตรอาหารไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื้อมั่น 95 %
ความแตกต่างระหว่างสารกลุ่มไซโตไคนิน (BA) ใช้ตัวอักษร a, b, c
ความแตกต่างระหว่างสารกลุ่มออกซิน (NAA) ใช้ตัวอักษร x, y

ผลการทดลองครั้งนี้พบว่า การตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดเผือกเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากเป็นไปในทิศทางเดียวกันทั้ง 4 พันธุ์ คืออาหารสูตร MS ที่เติมสาร

ควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอด คือไม่มีปฏิสัมพันธ์ต่อกัน ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เพียงอย่างเดียวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ทั้ง 3 ระดับคือ 0, 1 และ 2 มก./ล. ไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนยอดเผือกทั้ง 4 พันธุ์ ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เพียงอย่างเดียว ที่ระดับความเข้มข้นทั้ง 4 ระดับคือ 0, 3, 5 และ 7 มก./ล. มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนยอดเผือกทั้ง 4 พันธุ์ โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 5 มก./ล. ทำให้เพิ่มปริมาณยอดของเผือกไข่ เผือกอ้อย เผือกหอมดอยมูเซอ และเผือกหอมพะเยา ได้มากที่สุดเฉลี่ย 9.39, 7.78, 9.48 และ 8.82 ยอด ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดเผือกพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมาก (Vaurasi and Kant, 2016; Acedo *et al*., 2018)



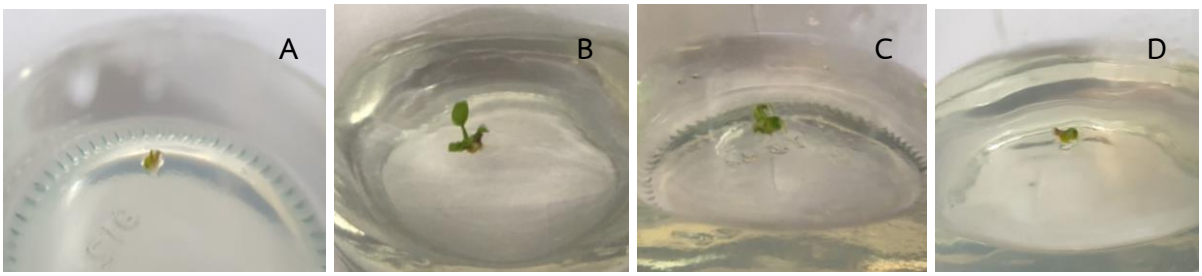
ภาพที่ 3 ต้นเผือกไม่หอม ได้แก่ ต้นเผือกไข่ (A1-2) และ ต้นเผือกอ้อย (B1-2) และ ต้นเผือกหอม ได้แก่ เผือกหอมดอยมูเซอ (C1-2) และ เผือกหอมพะเยา (D1-2) ที่ได้จากการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากของเผือกชนิดไม่หอม ได้แก่เผือกไข่ และเผือกอ้อย คือ MS ที่เติม BA 5 มก/ล. ร่วมกับ NAA 2 มก/ล. ทำให้ได้ปริมาณยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 10.25 และ 9.19 ยอด ตามลำดับ ในขณะที่สูตรอาหารที่เหมาะสมของเผือกชนิดหอม ได้แก่

เผือกหอมดอยมูเซอร์ และเผือกหอมพะเยา คือ MS ที่เติม BA 5 มก/ล. ร่วมกับ NAA 1 มก/ล ทำให้ได้ปริมาณยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 10.04 และ 9.57 ยอด ตามลำดับ สอดคล้องกันกับการทดลองของ Nath และคณะ (2012) ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดเผือกเป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มก/ล. ร่วมกับ NAA 1 มก/ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 3.66 ยอด/ชิ้นส่วน และการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน Meristem domes ของเผือกบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มก/ล. ร่วมกับ NAA 2 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 5.9 ยอด/ชิ้นส่วน (Ko *et al*., 2008)

2. ศึกษาการเก็บรักษาปลายยอดเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrification

การทดลองเก็บรักษาปลายยอดเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrification โดยตัดปลายยอดเผือกขนาด 1.5-2 ม.ม. Preculture 1 คืน แช่ในสาร loading solution นาน 20 นาที แล้วทำการศึกษาเปรียบเทียบสาร Cryoprotectant (PVS2 และ PVS3) และเวลาที่ใช้ในการแช่ที่เหมาะสม (0, 10, 20 และ 30 นาที) ก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลวนาน 24 ชม. หลังจากล้างชิ้นส่วนปลายยอดด้วยสาร unloading solution แล้วนำปลายยอดเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม sucrose 0.3 M นาน 1 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม sucrose 0.1 M นาน 10 วัน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน เพื่อตรวจนับอัตราการรอดชีวิต



ภาพที่ 4 ชิ้นส่วนปลายยอดเผือกที่มีเจริญเติบโตหลังการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrification ของเผือกไข่ (A) เผือกอ้อย (B) เผือกหอมดอยมูเซอ (C) เผือกหอมพะเยา (D)

จากการทดลองพบว่า เนื้อเยื่อปลายยอดเผือกขนาด 1.5-2 ม.ม. ที่ไม่ได้แช่สาร PVS2 และ PVS3 เมื่อผ่านการ Preculture แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม sucrose 0.3 M นาน 1 วัน แล้วจึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม sucrose 0.1 M นาน 10 วัน พบว่ามีอัตราความมีชีวิตรอด 100% (ตารางที่ 5) แต่เมื่อนำปลายยอดเผือกทั้ง 4 พันธุ์ ที่ผ่านการแช่ในสาร Cryoprotectant ทั้ง PVS2 และ PVS3 ทำให้มีอัตราความมีชีวิตต่ำลง การแช่ชิ้นส่วนปลายยอดเผือกลงในสาร PVS2 และ PVS3 ที่ระยะเวลา 20 และ 30 นาที ทำให้ปลายยอดเผือกมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าแช่เป็นเวลา 0 และ 10 นาที สอดคล้องกันกับการทดลองของ Sant และคณะ (2008) ที่ได้ทำการอนุรักษ์ชิ้นส่วนปลายยอดเผือกด้วยวิธี droplet vitrification พบว่าเวลาที่ใช้ในการแช่ปลายยอดในสาร PVS2 ที่เหมาะสมคือช่วงเวลา 20-40 นาที ซึ่งสาร Cryoprotectant ที่เหมาะสำหรับการเก็บรักษาปลายยอดเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrification คือ สาร PVS3 และเวลาที่เหมาะสมในการแช่คือ 30 นาที ทำให้มีอัตราการมีชีวิตรอดของเผือกไข่ เผือกอ้อย เผือกหอมดอยมูเซอ และเผือกหอมพะเยา คือ 49.5, 64.1, 52.7 และ 59.5% ตามลำดับ สาร PVS2 มีส่วนประกอบของ DMSO ซึ่งอาจมีผลต่อความเป็นพิษกับเนื้อเยื่อพืช (Takagi *et al*., 1997) จึงทำให้อัตราความมีชีวิตรอดต่ำกว่าการใช้สาร PVS3

ตารางที่ 3 ผลของชนิดสาร Cryoprotectant (PVS2 และ PVS3) และเวลาที่ใช้ในการแช่ (0, 10, 20 และ 30 นาที) ที่มีต่ออัตราการรอดชีวิต (%) หลังแช่ในไนโตรเจนเหลวของเผือก 4 พันธุ์

พันธุ์	+PVS2				+PVS3				-PVS2	-PVS3
	0	10	20	30	0	10	20	30		
เผือกไข่	0	10	29.8	39.6	0	10	29.8	49.5	100	100
เผือกอ้อย	0	12.8	51.8	51.8	0	25.6	51.8	64.1	100	100
เผือกหอมดอยมูเซอ	0	10.6	31.6	31.6	0	21.1	42.2	52.7	100	100
เผือกหอมพะเยา	0	0	39.6	19.8	0	10	19.8	59.5	100	100

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากของเผือกชนิดไม่หอม ได้แก่เผือกไข่ และเผือกอ้อย คือ MS ที่เติม BA 5 มก/ล. ร่วมกับ NAA 2 มก/ล. ทำให้ได้ปริมาณยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 10.25 และ 9.19 ยอด ตามลำดับ ในขณะที่สูตรอาหารที่เหมาะสมของเผือกชนิดหอม ได้แก่ เผือกหอมดอยมูเซอร์ และเผือกหอมพะเยา คือ MS ที่เติม BA 5 มก/ล. ร่วมกับ NAA 1 มก/ล ทำให้ได้ปริมาณยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 10.04 และ 9.57 ยอด ตามลำดับ

2. สาร Cryoprotectant ที่เหมาะสำหรับการเก็บรักษาปลายยอดเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrification คือ สาร PVS3 และเวลาที่เหมาะสมในการแช่คือ 30 นาที ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตของเผือกไข่ เผือกอ้อย เผือกหอมดอยมูเซอร์ และเผือกหอมพะเยา คือ 49.5, 64.1, 52.7 และ 59.5% ตามลำดับ

3. **ข้อเสนอแนะ** ควรทำการศึกษาการ Regeneration หลังจากการแช่ปลายยอดเผือกใน Liquid Nitrogen เพิ่มเติม เพื่อการใช้ประโยชน์ต่อไป

ชื่อการทดลองที่ 6 : การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชสกุลกลอยในรูปหัวจิ๋วในสภาพปลอดเชื้อ

ชื่อผู้วิจัย

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวภัทรียา สุทธิเชื้อนาค

ผู้ร่วมงาน : 1. นางสาวสุพินญา บุญมานพ

บทคัดย่อ

การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชสกุลกลอยในสภาพปลอดเชื้อมีหลายรูปแบบ วิธีการหนึ่งที่น่าสนใจคือ การอนุรักษ์ในรูปหัวจิ๋ว โดยทำการศึกษาพืชสกุลกลอยที่ใช้หัวในการบริโภค 5 ชนิด ได้แก่ กลอย มันจาวมะพร้าว มันนก มันอ้อน และมันเหน็บ ปลูกเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลกลอยทั้ง 5 ชนิด พบว่า สูตร MS + BA 20mg/l + NAA 4 mg/l + ผงถ่าน จะให้ต้นที่แข็งแรง และมีจำนวนยอดมากกว่า เหมาะที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต้นให้เพียงพอสำหรับใช้ในการทดลองหาสูตรชักนำให้เกิดหัวจิ๋ว

คำสำคัญ: การชักนำให้เกิดหัวในสภาพปลอดเชื้อ การอนุรักษ์พันธุกรรมพืช พืชสกุลกลอย

บทนำ

พืชสกุลกลอย (*Dioscorea*) เป็นพืชที่มีการแพร่กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย มีการนำมาใช้ประโยชน์ตามภูมิปัญญาท้องถิ่น ทั้งที่ใช้เป็นอาหาร และยารักษาโรค ส่วนใหญ่จะเก็บจากป่าหรือสภาพธรรมชาติ มีบ้างที่ปลูกแซมใต้ต้นไม้ตามหัวไร่ปลายนา ดังนั้นเมื่อพื้นที่ป่าถูกทำลายมากขึ้นและพื้นที่เมืองขยายตัว พืชสกุลนี้จึงค่อยสูญหายไปก่อนที่เราจะได้รู้จักและนำมาใช้ประโยชน์อย่างจริงจัง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพจึงได้เก็บรวบรวมพืชสกุลกลอยจากแหล่งต่างๆมาปลูกรวบรวม เพื่อศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยาและจำแนกชนิดพันธุ์ โดยมีเป้าหมายเพื่ออนุรักษ์พันธุกรรมพืชหัวพื้นเมืองในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช เบื้องต้นได้ศึกษาเทคนิคการเก็บเป็น germplasm เนื่องจากไม่มีเมล็ดพันธุ์ให้เก็บ ซึ่ง Okoli, 1991 ได้กล่าวว่า เป็นการเก็บรวบรวมพันธุ์ที่ปลอดภัย อีกทั้งเป็นวิธีการเก็บสำรองพันธุ์ที่ดี

แต่จากการเกิดมหาอุทกภัยในปี 2554 ทำให้ได้ทราบว่าไม่ได้เป็นตามคำกล่าวนั้นเลยกล่าวคือ การที่น้ำท่วมขังในแปลงรวบรวมพันธุ์สูงกว่าครึ่งเมตรเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน เมื่อน้ำลดจะมีเพียงชนิดพันธุ์ที่มีการลงหัวเร็วเท่านั้นที่รอดชีวิต ส่วนต้น germplasm ในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อน้ำท่วมขังห้องปฏิบัติการทำให้ไม่มีไฟฟ้าควบคุมอุณหภูมิและแสงสว่างต้นเหล่านั้นก็ตายหมด จึงจำเป็นต้องหาวิธีการเก็บรักษาพันธุกรรมที่ปลอดภัยกว่าโดยชักนำให้เกิดหัว (tuber) ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งการเก็บรักษาหัวพันธุ์ในช่วงวิกฤติที่ไม่มีไฟฟ้า โอกาสที่จะรอดชีวิตน่าจะสูงกว่าการเก็บแบบ germplasm

วิธีดำเนินการ

1. รวบรวมพันธุ์พืชสกุลกลอยที่ใช้หัวในการบริโภค 5 ชนิด ได้แก่ กลอย มันจาวมะพร้าว มันนก มันอ้อน และมันเหน็บ ปลูกเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสกุลกลอยในสูตรอาหาร MSดัดแปลง เพื่อขยายจำนวนต้นให้เพียงพอต่อการทดลองการเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโต และการชักนำให้เกิดหัวจิ๋ว

3. ตัดชิ้นส่วนตาข้างสำหรับการทดลองดังนี้

3.1 การศึกษาความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักร่วมกับปริมาณน้ำตาล วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ทำการทดลอง 3 ปัจจัย จำนวน 10 ซ้ำ

3.1.1 พันธุ์พืชสกุลกลอย 5 ชนิด

3.1.2 ธาตุอาหารหลัก MSดัดแปลง 2 สูตร ได้แก่ ½ MS และ ¼ MS

3.1.3 ปริมาณน้ำตาล 3 ระดับ ได้แก่ 10 50 และ 100 กรัมต่อลิตร

3.2 การศึกษาการใช้สารชะลอการเจริญเติบโต (growth regulator) วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ทำการทดลอง 2 ปัจจัย จำนวน 10 ซ้ำ

3.2.1 พันธุ์พืชสกุลกลอย 5 ชนิด

3.2.2 ความเข้มข้นของ อาล่าร์-85 5 ระดับ ได้แก่ 0 10 50 100 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. นำต้นอ่อนที่ผ่านการเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ ออกปลูก เพื่อดูอัตราการรอดชีวิต

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. รวบรวมพันธุ์พืชสกุลกลอยที่ใช้หัวในการบริโภค 5 ชนิด

2. นำชิ้นส่วนตาข้างพันธุ์พืชสกุลกลอยทั้ง 5 ชนิด เพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อขยายปริมาณต้น เพื่อใช้ในการทดลองศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโต และการชักนำให้เกิดหัวจิ๋ว 2 เทคนิค

3. บันทึกข้อมูลการรอดชีวิตและการเจริญเติบโต และนำต้นอ่อนพืชสกุลกลอยออกปลูกในสภาพโรงเรือน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินการทดลอง	เริ่มตั้งแต่ ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2561
สถานที่ดำเนินการ	ห้องปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (บางเขน)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ทำการฟอกฆ่าเชื้อจากตาข้างของกลอย (Dioscorea alata) ด้วย Clorox ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ที่ความเข้มข้น 10% 10นาที ได้ต้นที่ยังมีชีวิต และปลอดเชื้อ 20% นำต้นที่ได้มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA 5mg/l เพื่อให้เจริญเติบโต จนมีใบ2-3ใบ จึงตัดข้อลงเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเพื่อเพิ่มปริมาณต้น พบว่าเมื่อเลี้ยงไปสัก1-2 สัปดาห์ อาหารจะเริ่มเปลี่ยนสีเข้มขึ้น จึงทดลองย้ายลงอาหารสูตรเดิม แต่ใส่ผงถ่าน โดยทดลองเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างสูตรที่มีผงถ่านกับไม่มีผงถ่านสูตรที่ใส่ผงถ่าน ใบจะมีขนาดใหญ่กว่า แต่ลำต้นจะไม่ยืดตัวให้ข้อเพิ่ม ซึ่งไม่ช่วยในการขยายเพิ่มปริมาณสำหรับใช้ในการทดลอง จึงทดลองเลี้ยงกลอยในอาหารสูตร MS + BA 10mg/l + NAA 4 mg/l + ผงถ่าน และสูตร MS + BA 20mg/l + NAA 4 mg/l + ผงถ่าน พบว่า สูตร MS + BA 20mg/l + NAA 4 mg/l + ผงถ่าน จะให้ต้นที่แข็งแรง และมีจำนวนยอดมากกว่า เหมาะที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต้นให้เพียงพอสำหรับใช้ในการทดลองหาสูตรชักนำให้เกิดหัวจิ๋ว อยู่ระหว่างเพิ่มปริมาณต้นกลอยด้วยอาหารสูตร MS + BA 20 mg/l + NAA 4mg/l + ผงถ่าน (รูปภาพที่ 2.6.1)

รูปภาพที่ 2.6.1 ภาพการทดลองเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างสูตรที่มีผงถ่านกับไม่มีผงถ่าน

ทำการทดลองชักนำให้เกิดหัวจิ๋วโดยศึกษาความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ร่วมกับปริมาณน้ำตาล วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ทำการทดลอง 3 ปัจจัย จำนวน 3 ซ้ำ (เนื่องจากยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณต้นกลอยได้พอสำหรับ 10ซ้ำ)ปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง 3 ปัจจัย ได้แก่

1. พันธุ์พืชสกุลกลอย 5 ชนิด
2. ธาตุอาหารหลัก MSดัดแปลง 2 สูตร คือ 1/2 MS และ 1/4 MS
3. ปริมาณน้ำตาล 3ระดับ คือ 10, 50 และ100 กรัม/ลิตร

พันธุ์พืชสกุลกลอย 5ชนิด ได้แก่ กลอย มันจาวมะพร้าว มันนก มันอ้อนและมันเหน็บนอกจากนี้ยังได้ทดลองตัดหัวจิ๋ว (microfiber) ของมันจาวที่เกิดในขวดเพาะเลี้ยง ใส่ในขวดที่นึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อทดลองเก็บในสภาพปลอดเชื้อโดยไม่มีอาหาร ว่าจะสามารถเก็บได้นานกี่เดือน (รูปภาพที่ 2.6.2)

รูปภาพที่ 2.6.2 การทดลองชักนำให้เกิดหัวจิ๋วโดยศึกษาความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ร่วมกับปริมาณน้ำตาล

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ทำการฟอกฆ่าเชื้อจากตาข้างของกลอย (Dioscorea alata) ด้วย Clorox ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ที่ความเข้มข้น 10% 10นาที ได้ต้นที่ยังมีชีวิต และปลอดเชื้อ 20% นำต้นที่ได้มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA 5mg/l เพื่อให้เจริญเติบโต จนมีใบ2-3ใบ จึงตัดข้อลงเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเพื่อเพิ่มปริมาณต้น พบว่าเมื่อเลี้ยงไปสัก1-2 สัปดาห์ อาหารจะเริ่มเปลี่ยนสีเข้มขึ้น จึงทดลองย้ายลงอาหารสูตรเดิม แต่ใส่ผงถ่าน โดยทดลองเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างสูตรที่มีผงถ่านกับไม่มีผงถ่านสูตรที่ใส่ผงถ่าน ใบจะมีขนาดใหญ่กว่า แต่ลำต้นจะไม่ยืดตัวให้ข้อเพิ่ม ซึ่งไม่ช่วยในการขยายเพิ่มปริมาณสำหรับใช้ในการทดลอง จึงทดลองเลี้ยงกลอยในอาหารสูตร MS + BA 10mg/l + NAA 4 mg/l + ผงถ่าน และสูตร MS + BA 20mg/l + NAA 4 mg/l + ผงถ่าน พบว่า สูตร MS + BA

20mg/l + NAA 4 mg/l + ผงถ่าน จะให้ต้นที่แข็งแรง และมีจำนวนยอดมากกว่า เหมาะที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต้นให้เพียงพอสำหรับใช้ในการทดลองหาสูตรชักนำให้เกิดหัวจิ๋ว อยู่ระหว่างเพิ่มปริมาณต้นกลอยด้วยอาหารสูตร MS + BA 20 mg/l + NAA 4mg/l + ผงถ่าน

ทำการทดลองชักนำให้เกิดหัวจิ๋วโดยศึกษาความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ร่วมกับปริมาณน้ำตาลวางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ทำการทดลอง 3 ปัจจัย จำนวน 3 ซ้ำ (เนื่องจากยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณต้นกลอยได้พอสำหรับ 10ซ้ำ)ปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง 3 ปัจจัย ได้แก่

4. พันธุ์พืชสกุลกลอย 5 ชนิด
5. ธาตุอาหารหลัก MSดัดแปลง 2 สูตร คือ 1/2 MS และ 1/4 MS
6. ปริมาณน้ำตาล 3ระดับ คือ 10, 50 และ100 กรัม/ลิตร

พันธุ์พืชสกุลกลอย 5ชนิด ได้แก่ กลอย มันจาวมะพร้าว มันนก มันอ้อนและมันเหน็บนอกจากนี้ยังได้ทดลองตัดหัวจิ๋ว (microfiber) ของมันจาวที่เกิดในขวดเพาะเลี้ยง ใส่ในขวดที่นึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อทดลองเก็บในสภาพปลอดเชื้อโดยไม่มีอาหาร ว่าจะสามารถเก็บได้นานกี่เดือน

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

กิจกรรมที่ 1 เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

การทดลองที่ 1 ศึกษาวิธีการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ เพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

โดยสรุป

1. ที่อุณหภูมิ 5°C และ -10°C ของการเก็บรักษามีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดผักและความแข็งแรงมากกว่าเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25°C

2. สำหรับวิธี Control แสดงผลมีเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงสูงสุดตามด้วยวิธี SSAAT, AAT และ CD ตามลำดับ

3. เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ไม่สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25°C ระยะเวลานานเกิน 21 เดือน

4. สำหรับเมล็ดพันธุ์ผักทั้ง 5 ชนิด สามารถเก็บรักษาในอุณหภูมิ -10°C และ 5°C ได้ดีกว่า 25°C และสามารถเก็บรักษาได้นานกว่า 33 เดือน

สำหรับการทดลองวิธีการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ ในสภาพปลอดเชื้อ (-196°C) การเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง (-196°C) โดยวิธี Encapsulation – dehydration ทดลองที่ห้องปฏิบัติการโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พระราชวัง สวนจิตรลดา ซึ่งมีงานวิจัยร่วมกับธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร สำหรับผลการทดลองพบว่าเมล็ดพันธุ์ผัก ทั้ง 5 ชนิดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาทดสอบการรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวมีอัตราการรอดชีวิตเป็น 100% ทุกการทดลอง โดยที่เมล็ดพันธุ์ผักสามารถงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์บนอาหาร MS เป็นเวลา 14 วัน แสดงว่าระยะเวลาในการแช่สาร loading solution ที่เวลา 10 และ 20 นาที และระยะเวลาในการใช้ silica gel เป็นเวลา 14 และ 21 ชั่วโมง ไม่ทำให้เมล็ดพันธุ์ผักทั้ง 5 ชนิดได้รับความเสียหาย พบว่ามีค่าความงอกของ**ผักกาดหอม ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้** มีความงอกถึง 100% ใน **ผักกาดขาวปลี** และ**ผักกาดเขียวกวางตุ้ง** มีความงอก 60 - 90.9% และ และ 25 – 91.60 % ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเมล็ดผักสามารถรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวและสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าปกติได้การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ผักในสภาพเยือกแข็งเป็นทางเลือกหนึ่งในการเก็บรักษาพันธุ์ผัก ซึ่งอาจช่วยลดต้นทุนในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์โดยไม่ต้องนำเมล็ดเพื่อออกปลูกขยาย

การทดลองที่ 2 เทคนิคการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

ระดับความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ก่อนการเก็บรักษาและอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่อความมีชีวิตและความแข็งแรงของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือย เมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยที่มีความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์ 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ สามารถเก็บรักษาได้นาน 27 เดือน เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 5 องศาเซลเซียส -10 องศาเซลเซียส และสภาพเยือกแข็ง นอกจากนี้การเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส สามารถลดความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยให้เหลือ 12 เปอร์เซ็นต์ หรือต่ำกว่าได้โดยยังคงเก็บรักษาได้ภายในระยะเวลา 27 เดือน ดังนั้นในการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยให้มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน หรือในกรณีที่เกษตรกรต้องการเก็บรักษาไว้เพื่อทำพันธุ์ในฤดูปลูกถัดไปและเก็บรักษาพันธุ์ในสภาพอุณหภูมิห้องควรลดความชื้นของเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยให้เหลือ 8 เปอร์เซ็นต์ก่อนการเก็บรักษาเพื่อรักษาคุณภาพของเมล็ดเชื้อพันธุ์ก่อนการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ส่วนในด้านการอนุรักษ์เมล็ดเชื้อพันธุ์การเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส สามารถลดความชื้นให้เหลือ 12 เปอร์เซ็นต์ หรือต่ำกว่าก่อนทำการเก็บรักษา ขณะที่การเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 และสภาพเยือกแข็ง ก่อนการเก็บรักษาควรลดความชื้นในเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยให้เหลือ 8 เปอร์เซ็นต์หรือต่ำกว่า

การทดลองที่ 3 เทคนิคการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์ชมจันทร์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

4. ความชื้นของเมล็ดและอุณหภูมิในการเก็บรักษา เป็นตัวแปรร่วมที่สำคัญในการยืดอายุเก็บรักษาเมล็ดให้ยังคงมีชีวิตได้ยาวนาน

5. เมล็ดชมจันทร์ที่ไม่ได้ผ่านการลดความชื้น มีความชื้นสูง เมื่อนำมาเก็บรักษาที่สภาพอุณหภูมิห้อง เมล็ดสูญเสียความงอกอย่างรวดเร็วและมีอายุการเก็บรักษาสั้นกว่าเมล็ดที่ลดความชื้นที่ระดับ 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์

6. เมล็ดชมจันทร์ทั้งที่ผ่านการลดความชื้นและไม่ลดความชื้น เมื่อเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำลงคือ ที่ 5 องศาเซลเซียส -10 องศาเซลเซียส และที่สภาพเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เห็นได้ว่าเมล็ดทุกระดับความชื้นสามารถเก็บรักษาได้นานกว่า และมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงกว่าเมล็ดที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง

7. การเก็บรักษาเมล็ดชมจันทร์ในสภาพอุณหภูมิต่ำลง เป็นเวลา 18 เดือน เมล็ดทุกระดับความชื้นยังคงสามารถมีชีวิตและมีความงอกที่ดี จึงควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับระยะเวลาการในเก็บรักษาให้นานมากขึ้นจากเดิม

กิจกรรมที่ 2 เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ

การทดลองที่ 1 การอนุรักษ์พันธุกรรมอ้อยในสภาพเยือกแข็งโดยใช้ปลายยอด

1. การ preculture ปลายยอดอ้อย 5 พันธุ์ ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม sucrose ที่มีความเข้มข้น 0.4 M ในการปรับสภาพ เป็นการเตรียมความพร้อมให้ปลายยอดอ้อยปรับตัวได้ดีกว่าการทำ preculture ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม sucrose ที่มีความเข้มข้น 0.08 M

2. การทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยโดยวิธี Vitification มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์ความรอดชีวิตสูงกว่าวิธี Encapsulation-Vitrification และ Encapsulation-Dehydration เมื่อยังไม่ได้แช่ลงในไนโตรเจนเหลว ควรทำการทดลองหาวิธีการที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนในแต่ละเทคนิค เช่น เวลาที่เหมาะสมในการ dehydration, ชนิดของ cryoprotectant เป็นต้น นอกจากนี้อาจหาวิธีใหม่ๆ เช่นการทำ droplet หรือการใช้ cryoplate ในการทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยในสภาพเยือกแข็งให้สำเร็จต่อไป

การทดลองที่ 2 การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวโดยวิธีชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

จากการทดลองนี้ การเพาะเลี้ยงต้นเจตมูลเพลิงขาวและเจตมูลเพลิงแดงเพื่อการอนุรักษ์ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อให้ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก การชักนำให้เกิดราก และการชะลอการเจริญเติบโตในหลอดทดลอง ให้ผลดังนี้

4. อาหารที่เหมาะสมในชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากสำหรับต้นเจตมูลเพลิงขาว คืออาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5-1.0 มก./ล. และต้นเจตมูลเพลิงแดง คืออาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.0 มก./ล.

5. อาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ต้นเจตมูลเพลิงขาวและเจตมูลเพลิงแดงเกิดรากที่สมบูรณ์และเหมาะแก่การย้ายออกปลูกในธรรมชาติได้ คืออาหารสูตร MS และ half-MS

6. อาหารสูตรที่สามารถอนุรักษ์ต้นเจตมูลเพลิงขาวและเจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อจากการทดลองนี้ ได้เป็นเวลาอย่างน้อย 7-10 เดือน ได้แก่ อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล sucrose 2-3% ร่วมกับ การเติม mannitol 0-1%

อย่างไรก็ตาม เป้าหมายการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อนั้น เพื่อการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชในสภาพหลอดทดลองโดยพืชที่อนุรักษ์ควรมีสภาพสมบูรณ์ระหว่างการเพาะเลี้ยงจึงควรมีการศึกษาทบทวนหาสูตรอาหารที่เหมาะสมโดยอาจเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสูตรอาหาร/ชนิดของสารที่ใช้ในสูตรอาหาร/ชนิดของสูตร

อาหาร ฯลฯ เพิ่มเพื่อประสิทธิภาพสูงสุดในการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชเจตมูลเพลิงขาวและเจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อ

การทดลองที่ 3 การอนุรักษ์ดองดึงโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

1. การขยายปริมาณเหง้าดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ สามารถทำได้โดยใช้ส่วนยอดของดองดึง

2. เหง้าดองดึงสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตรสังเคราะห์ อาหารสูตรสังเคราะห์ MS + NAA4mg/l +BA4 mg/l

3. การอนุรักษ์เหง้าดองดึงโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ สามารถเก็บรักษาได้นาน 9 เดือน แม้ไม่มีการ subculture เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรสังเคราะห์ ½MS + 20 m/lและควรมีการศึกษาเพื่อชักนำให้เจริญเติบโตทางลำต้นต่อไปซึ่งจะเป็นผลดีต่อการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

การทดลองที่ 4 เทคนิคการเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโตของมันเทศ (*Ipomoea batatas*) เพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

มันเทศทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ พจ.265-1 พจ.0106-6 พจ.65-3 และ พจ.284-17 สามารถเก็บรักษาในอาหารสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร สูตรอาหาร MS ที่เติม ABA 2-6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ สูตรอาหาร MS ที่เติม ancymidol 10 ไมโครโมล ได้นาน 9 เดือนขึ้นไป ส่วนสูตรอาหาร MS ที่เติม manitol 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถเก็บรักษาได้ 6 เดือน และควรทำการศึกษาต่อในเทคนิคการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) เพื่อเป็นอีกวิธีการเก็บรักษาในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

การทดลองที่ 5 การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrificationเพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

1. สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากของเผือกชนิดไม่หอม ได้แก่เผือกไข่ และเผือกอ้อย คือ MS ที่เติม BA 5 มก/ล. ร่วมกับ NAA 2 มก/ล. ทำให้ได้ปริมาณยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 10.25 และ 9.19 ยอด ตามลำดับ ในขณะที่สูตรอาหารที่เหมาะสมของเผือกชนิดหอม ได้แก่ เผือกหอมดอยมูเซอร์ และเผือกหอมพะเยา คือ MS ที่เติม BA 5 มก/ล. ร่วมกับ NAA 1 มก/ล ทำให้ได้ปริมาณยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 10.04 และ 9.57 ยอด ตามลำดับ

2. สาร Cryoprotectant ที่เหมาะสำหรับการเก็บรักษาปลายยอดเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrification คือ สาร PVS3 และเวลาที่เหมาะสมในการแช่คือ 30 นาที ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตของเผือกไข่ เผือกอ้อย เผือกหอมดอยมูเซอร์ และเผือกหอมพะเยา คือ 49.5, 64.1, 52.7 และ 59.5% ตามลำดับ

3. **ข้อเสนอแนะ** ควรทำการศึกษาการ Regeneration หลังจากการแช่ปลายยอดเผือกใน Liquid Nitrogen เพิ่มเติม เพื่อการใช้ประโยชน์ต่อไป

การทดลองที่ 6 การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชสกุลกลอยในรูปหัวจิ๋วในสภาพปลอดเชื้อ

ทำการฟอกฆ่าเชื้อจากตาข้างของกลอย (Dioscorea alata) ด้วย Clorox ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ที่ความเข้มข้น 10% 10นาที ได้ต้นที่ยังมีชีวิต และปลอดเชื้อ 20% นำต้นที่ได้มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS + BA 5mg/l เพื่อให้เจริญเติบโต จนมีใบ2-3ใบ จึงตัดข้อลงเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเพื่อเพิ่มปริมาณต้น พบว่าเมื่อเลี้ยงไปสัก1-2 สัปดาห์ อาหารจะเริ่มเปลี่ยนสีเข้มขึ้น จึงทดลองย้ายลงอาหารสูตรเดิม แต่ใส่ผงถ่าน โดยทดลองเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างสูตรที่มีผงถ่านกับไม่มีผงถ่านสูตรที่ใส่ผงถ่าน ใบจะมีขนาดใหญ่กว่า แต่ลำต้นจะไม่ยืดตัวให้ข้อเพิ่ม ซึ่งไม่ช่วยในการขยายเพิ่มปริมาณสำหรับใช้ในการทดลอง จึงทดลองเลี้ยงกลอยในอาหารสูตร MS + BA 10mg/l + NAA 4 mg/l + ผงถ่าน และสูตร MS + BA 20mg/l + NAA 4 mg/l + ผงถ่าน พบว่า สูตร MS + BA

20mg/l + NAA 4 mg/l + ผงถ่าน จะให้ต้นที่แข็งแรง และมีจำนวนยอดมากกว่า เหมาะที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต้นให้เพียงพอสำหรับใช้ในการทดลองหาสูตรชักนำให้เกิดหัวจิ๋ว อยู่ระหว่างเพิ่มปริมาณต้นกลอยด้วยอาหารสูตร MS + BA 20 mg/l + NAA 4mg/l + ผงถ่าน

ทำการทดลองชักนำให้เกิดหัวจิ๋วโดยศึกษาความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ร่วมกับปริมาณน้ำตาลวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD ทำการทดลอง 3 ปัจจัย จำนวน 3 ซ้ำ (เนื่องจากยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณต้นกลอยได้พอ) ปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง 3 ปัจจัย ได้แก่

7. พันธุ์พืชสกุลกลอย 5 ชนิด
8. ธาตุอาหารหลัก MSดัดแปลง 2 สูตร คือ 1/2 MS และ 1/4 MS
9. ปริมาณน้ำตาล 3ระดับ คือ 10, 50 และ100 กรัม/ลิตร

พันธุ์พืชสกุลกลอย 5ชนิด ได้แก่ กลอย มันจาวมะพร้าว มันนก มันอ้อนและมันเหน็บนอกจากนี้ยังได้ทดลองตัดหัวจิ๋ว (microfiber) ของมันจาวที่เกิดในขวดเพาะเลี้ยง ใส่ในขวดที่นึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อทดลองเก็บในสภาพปลอดเชื้อโดยไม่มีอาหาร ว่าจะสามารถเก็บได้นานกี่เดือน

เอกสารอ้างอิง

กนกทิพย์ เลิศประเสริฐรัตน์ และ ประชา ถ้ำทอง. 2550. ศึกษาปริมาณแป้งในอ้อยพันธุ์รับรอง พันธุ์แนะนำ และโคลนดีเด่น. รายงาน ผลงานวิจัยและพัฒนาด้านพืชและเทคโนโลยีการเกษตร การทดลองสิ้นสุดปีงบประมาณ 2550. หน้า 23.

กรมวิชาการเกษตร. 2542. ดองดึง (*Gloriosa superb* Linn.) ไม้ดอกสารพัดประโยชน์. กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ: 30 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร. 2556. พืชอาหารพื้นบ้าน กลุ่มชาติพันธุ์ตะวันตก. บ.ทูเกทเตอร์ จำกัด, กรุงเทพฯ, 160 หน้า.

กิ่งกาญจน์ พิชญกุล และปาริฉัตร สังข์สะอาด. 2553. การศึกษาเทคโนโลยีการอนุรักษ์และเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชหายากในสภาพปลอดเชื้อและสภาพเยือกแข็ง : กล้วยไม้ป่าใกล้สูญพันธุ์ (สกุลหวาย). *ใน* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 เล่ม2, สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ, หน้า 213-242.

เกศรินทร์ ภูมิศรีแก้ว. 2527. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง (*Gloriosa superb* Linn.) เพื่อเร่งการขยายพันธุ์. ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ: 79 หน้า.

จวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2529. เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์. ครั้งที่ 2. กลุ่มหนังสือเกษตร, กรุงเทพฯ.

จวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2529. เทคโนโลยีเมล็ดเชื้อพันธุ์. กรุงเทพฯ : กลุ่มหนังสือเกษตร.

จารุวรรณ นกไม้. 2544. อิทธิพลของปัจจัยบางประการที่มีต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น: 72 หน้า.

จิราภรณ์ ชัยสิริเจริญกุล. 2552. องค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างของลูกเดือยและผลของกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อนต่อคุณสมบัติทางเคมีและเคมีกายภาพของแป้งเดือย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

เต็ม สมิตินันทน์. 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์ - ชื่อพื้นเมือง). กรมป่าไม้ กรุงเทพฯ. 379 หน้า.

ทรงพล สมศรี. 2548. แสดงผลเปรียบเทียบพันธุ์ "โครงการการปรับปรุงพันธุ์พืชสวน". นสพ. กสิกร ปีที่ 78 ฉบับที่ 5 กรมวิชาการเกษตร แหล่งข้อมูล: http://www.agric-prod.mju.ac.th/web- veg/article/new145.html. สืบค้น: 27 พฤษภาคม 2557

ทิพย์สุคนธ์ บุญยืน เยาวภา จิระเกียรติกุล และ ภาณุมาศ ฤทธิไชย. 2557. พัฒนาการของเมล็ดดอกพระจันทร์ (Ipomoea alba L.). ว.แก่นเกษตร 42 (2): 181-188.

นิรนาม. 2539. *เรื่องที่ 5 พืชหัว: เผือก*. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เล่มที่ 5. เขตดุสิต, กรุงเทพฯ. 181 หน้า.

นิรนาม. 2557. *เผือก*. ฐานความรู้ด้านพืช กรมวิชาการเกษตร. แหล่งข้อมูล:http://www.doa.go.th/pl_data/TARO/STAT/st1.html. สืบค้น: 25 เมษายน 2557

บุญยืน กิจวิจารณ์ และชยันต์ พิเชียรสุนทร. 2535. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น: 48 หน้า.

ปราโมทย์ เกิดศิริ, นพรัตน์ หยีดจันทร์ และ สมสุข ศรีจักรวาฬ. 2530. ศึกษาเบื้องต้นการงอกของดองดึง. ว.วิทยาศาสตร์เกษตร, 20 (2): หน้า 130-137.

ปรียา พวงสำลี. 2542. **การขยายพันธุ์และการเพาะเลี้ยงรากของเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ**. รายงานการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ปาริฉัตร สังข์สะอาด (ก), กิ่งกาญจน์ พิชญกุล และพัชร ปิริยะวินิตร. 2553. การศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชสวนในสภาพปลอดเชื้อ (TC) และสภาพเยือกแข็ง (Cryopreservation) : กล้วย, *ใน* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 เล่ม2, สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ, หน้า 262-281.

ปาริฉัตร สังข์สะอาด (ข), กิ่งกาญจน์ พิชญกุล และเสาวณี เดชะคำภู. 2553. การศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชหายาก/ใกล้สูญพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ (TC) และสภาพเยือกแข็ง (Cryopreservation) : กล้วยไม้เอื้องเงินหลวง เอื้องสายหลวง เอื้องแซะหอม, *ใน* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 เล่ม2, สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ, หน้า 243-261.

พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. 2539. **สมุนไพร: แก้ไขปรับปรุงใหม่จากตำราวิทยาศาสตร์สมุนไพร**. บริษัท ที.พี.พริ้นท์ , กรุงเทพฯ.

พรพรรณ สุขุมพินิจ. 2549. การเก็บรักษาเอื้องแซะหลวงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาวิชาพืชสวน. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

พรพรหม พรหมเมศร์, ชัยฤกษ์ สงวนทรัพยากร, ยิ่งยง ไพสุขศานติวัฒนา และนิรันดร์ จันทวงศ์. 2536. การศึกษาทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของดองดึง. *ใน* การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31: สาขาพืช 3-6 กุมภาพันธ์ 2536. กรุงเทพฯ: หน้า 420-427.

พรพรหม พรหมเมศร์, ชัยฤกษ์ สงวนทรัพยากร, ยิ่งยง ไพสุขศานติวัฒนา และนิรันดร์ จันทวงศ์. 2537. การศึกษาการเกิดของหัวดองดึงและอิทธิพลของชีพจักรต่อการให้ผลผลิต. *ใน* การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 32: สาขาพืช 3-5 กุมภาพันธ์ 2537. กรุงเทพฯ: หน้า 567-575.

พัชราวดี วัฒนกิจ, วราพร วีระพลากร, พนิดา วงษ์แหวน และยุพา มงคลสุข. 2544. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเทศ, น. 383-390 *ใน* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาพืช สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร 5-7 กุมภาพันธ์ 2544, กรุงเทพฯ.

เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. 2542. **การแพทย์แผนไทยสายใยแห่งชีวิตและวัฒนธรรม เล่มที่ 2**. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, กรุงเทพฯ.

ภาณี ทองพำนัก, มณฑา วงศมณีโรจน, บัวหลวง จอยปอย และพีระศักดิ์ ศรีนิเวศน. 2540ข. การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์พืชภายใต้สภาพเย็นยิ่งยวด. การประชุมวิชาการครั้งที่ 14 เรื่องเทคนิคและวิธีการทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกทดลอง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นครปฐม.

ภาณี ทองพำนัก, มณฑา วงศ์มณีโรจน์, บัวหลวง จ้อยปอย และพีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2540ก.การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์พืชภายใต้สภาพเย็นยิ่งยวด. รายงานวิจัยเบื้องต้น โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี งานเก็บรักษาพันธุกรรมพืช กิจกรรมปลูกรักษา. ธันวาคม 2540.

มณฑา วงศ์มณีโรจน์. 2540. การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ, น. 31-39 *ใน* เอกสารประกอบการอบรมทางวิชาการ เรื่อง เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขั้นสูง. ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

มนตรี แก้วดวง สายันต์ ตันพานิช เรวัตร จินดาเจี่ย และ ประยุทธ กาวิละเวส. 2554. อิทธิพลของวันปลูกต่อการให้ผลผลิตดอกชมจันทร์. ว.วิทยาศาสตร์เกษตร 42 3/1 (พิเศษ): 67-70.

มาลินี พิทักษ์, สมศรี บุญเรือง และรังสิมันตุ์ สัมฤทธิ์. มปป. การปลูกเผือก. กลุ่มพืชไร่ กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร แหล่งข้อมูล: http://www.baabjomyut.com. สืบค้น: 27 พฤษภาคม 2557

รมณีย์ เจริญทรัพย์และ ศาลักษณ์ พรรณศิริ. 2547. การเก็บรักษาพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อ : ผลของ mannitol ต่อการเจริญของเนื้อเยื่อที่เก็บรักษา. การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 : สาขาพืช-สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร. หน้า 553-559.

รมณีย์ เจริญทรัพย์ และศาลักษณ์ พรรณศิริ. 2547. **การเก็บรักษาพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อ: ผลของmannitolต่อการเจริญของเนื้อเยื่อที่เก็บรักษา**. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42: สาขาพืช สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร, หน้า 553-559

รศนา ชุมแสง และสุภวรรณ สุขสว่าง. 2543. การคัดเลือกต้นเจตมูลเพลิงแดงที่มีการสร้างสารในปริมาณสูงและการขยายพันธุ์. โครงงานนักศึกษา. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : หลักการและเทคนิค. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 น.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและเทคนิค**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 219 หน้า.

วรรณา เลิศวิจิตรจรัส. 2545. การเก็บรักษาตายอดกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์วอเตอร์โอมายที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยมหิดล.

วราภรณ์ ฉลองกิตติศักดิ์. 2529. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดองดึง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วราภรณ์ บุตรเรืองศักดิ์. 2543. การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์กล้วยไม้ช้างกระ (*Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridley) ในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี Vitrification. โครงการพิเศษหลักสูตรวิทยศาสตรบัณฑิต (พฤกษศาสตร์) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

วัชรี กัลยาลัง อาภารัตน์ มหาขันธ์ และอุษา กลิ่นหอม. 2550. การศึกษาเทคนิค Cryopreservation ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสาหร่ายสกุล *Arthrospira* และ *Spirulina*. การประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 3 วันที่ 21-23 มีนาคม 2550 ณ อาคารมหามกุฏ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2542. เทคโนโลยีเมล็ดเชื้อพันธุ์พืชไร่. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2542. **พจนานุกรมสมุนไพรไทย**. อักษรพิทยา. กรุงเทพฯ. 233 น.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2552. **ย่อเภสัชกรรมไทยและสรรพคุณสมุนไพร**. พิมพ์ครั้งที่ 3. ศิลป์สยายบรรจุภัณฑ์และการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 224 น.

ศิริกุล เกษา พัชรา ลิมปนะเวช สุมิตรา คงชื่นสิน ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์ และพรชัย จุฑามาศ. 2548. **การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์จำปีสิรินธร *Magnolia sirindhorniae*Noot. &Chalermglinในหลอดทดลอง โดยการเก็บรักษาในภาวะชะลอการเจริญและการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว**.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สาขาวิชาพฤกษศาสตร์, ภาควิชาพฤกษศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ศิริกุลเกษา. 2548. การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์จำปีสิรินธร*Magnolia sirindhorniae*Noot. &Chalermglinในหลอดทดลองโดยการเก็บรักษาในภาวะชะลอการเจริญและการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศุภกิจ ยงวิฑิตสถิต. 2540. การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์กล้วยไม้ในไนโตรเจนเหลว โครงการพิเศษหลักสูตรวิทยศาสตรบัณฑิต (พฤกษศาสตร์) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ศุภฤกษ์ กุลปภังกร, บัวทิพย์ อุบลประเสร็ฐ, อัมรัตน์ โกมลมาศ, ทรงศักดิ์ จันทร์อุดม, ประพฤติ พรหมสมบูรณ์, สุธัญญา พรหมสมบูรณ์, อนุสสรณ์ วิเศษสิงห์ และ นันทพร พึ่งสังวร. 2545. การศึกษาความหลากหลายและการอนุรักษ์สายพันธุ์ดองดึง ในภาคตะวันออกของประเทศไทย. คณะเกษตรศาสตร์บางพระ, สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล, ชลบุรี:107 หน้า.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.). 2544. *PROSEA ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 9 พืชที่ให้คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช้เมล็ด*. พิมพ์ครั้งที่ 1. สหมิตรพริ้นติ้ง, กรุงเทพฯ. 299 หน้า.

สมเกียรติ ฐิตะฐาน. 2547. สถานภาพองค์ความรู้ด้านการผลิต การตลาด และการแปรรูปเดือย. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 68 หน้า.

สมสุข ศรีจักรวาฬ, ปราโมทย์ เกิดศิริ. 2541.การพัฒนาของดอกดองดึงเมื่อปลูกในช่วงเวลาต่าง ๆ. วารสารวิชาการเกษตร. 16 (1):หน้า 42-48.

สาวิตรี ณ นคร และรุจิพร จาระพงศ์. 2541. การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ (ออนไลน์ 18 มีนาคม 2541) (อ้างเมื่อ 2 กุมภาพันธ์ 2559). จาก http://www.doea.go.th/ LIBRARY/ html/detail/Seed/MainSeed.htm

สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช. 2556. แหล่งรวบรวมและอนุรักษ์พันธุกรรมพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 209 น.

สุภาภรณ์ ธาตรีโรจน์. 2546. **การขยายพันธุ์เจตมูลเพลิงแดงโดยการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในสภาพปลอดเชื้อ**. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. ภาควิชาพืชสวน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 28 น.

อรพรรณ ศังขจันทรานนท์. 2534. พัฒนาการและความสามารถในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ผักบุ้งจีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช**. อติสรรค์, กรุงเทพฯ. 133 น.

Acedo, V.Z., O.P. Damasco, A.C. Laurena, P.C. Sta Cruz, L.O. Namuco and A.G. Lalusin. 2018. Shoot tip splitting for rapid micropropagation of Philippine taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott). *International Journal of Advance Agricultural Research*. 6: 38-46.

Ade, R. and M.K. Rai. 2009. Review: Current Advances in Gloriosa superb L. Biodiversitas. 10(4): 210-214.

Al-yahya S.A. 2001. Effect of Storage Condition on Germinatuon in Wheat. Journal of Agronomy and Crop Science. 186(4): 273-279.

Anderson, H.T. 1949. The Plant Alkaloids. J.&A. Churchill Ltd., London.

Backer, A.C., and B.C., Bakhuizen Van Den Brink. 1965. Flora of Java. Vol. 2.The Netherlands. N.V.P. Noordhoff Groningen: 641 p.

Bailly, C. 2004. Active Oxygen species and antioxidants in Seed Biology. Seed Sci Res.14: 93-107.

Boye, O. and A. Brossi.1992. Tropolonic*Colchicum* alkaloids and alloongeners, p. 125-174.*In*: Brossi A and Cordell GA (Eds.). The Alkaloids. Academic Press, New York.

Bunyapraphatsara, N., S. Khongchuensin, C. Sagwansupayakorn, C. Sakulmeerit, T. Tipayasak and Y. Sri-ngen-ngaam. 1991. Colchicine content of the seeds of *Gloriosasuperba* L. Cultivated in Thailand, pp. 126-134. *In* J.M. Pezzuto, A.D. Kingkorn, H.H. S. Fong, and G.A.

Cordell (eds.). Progress on terrestrial and marine natural products of medicinal and biological intersest. American Botanical Council, Chicago.

Chenglian, H., Z. Yunlan, T. Mei, H. Xiaorong and J. Chaoyu. 1998. The effect of Low Water Content on Seed Longevity. CABI,USA.

Chiang, W., C-H. Cheng, M-T. Chiang and K-T. Chung. 2002. Effects of dehulled adlay on the culture count of some microbiota and their metabolism in the tract of rats. J. Agric. Food Chem. 48: 829-832.

Chuakul, W., P. Saralamp and P. Supataramanich. 1994. **Pharmacognostic characters of *Plumbagoindica*Linn.**Mahidol J. Pharm. Sci. 21: 126-132.

Chung R.C. and C.J. Goh. 1994. High frequency direct shoot regeneration from corm axillary buds and rapid clonal propagation of taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta* (L.) Schott (Araceae)). *Plant Sci*. 104: 93-100.

Coursey, D.G. 1967. Yams, London, Longmans, 230 p.

Cui, X., H. Wang, F. Zhao. 2012. Effect of Different Moisture Content on Seed Vigor of *Coix lacryma-jobi* L.. CNKI J. 3: 212:225.

Degras, L. 1986. L'igname, Techniques Agricoles et Productions Tropicales, Ed.G.P. Maisonneuve et Larose & Agrnce de Cooperation Culturelle et Technique, 409 p.

Didry, N., L. Dubrevil and M. Pinkas. 1994. **Activity of anthroquinonic and naphthoquinonic compounds on oral bacteria**. Pharmazie. 49: 681-683.

Eigsti, O.J., Jr., Dustin and G.M., Grosvenor. 1949. On the discovery of the action of colchicines on mistosis. Science 110: 692.

Ellis, R.H., T.D. Hong and E.H. Roberts. 1985. Handbook of seed Technology for Genebanks, vol.1 Principle and Methodology. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.

Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm a review. Euphytica, 57:227-243.

Engelmann, F. 2000. *Development of cryopreservation techniques*. pp. 8-20. In Englemann, F. and Takagi, H. (eds.) Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm Current Research Progress and Application. IPGRI, Rome.

Escobar, R., Mafla, G. & Roca, W. (1992) Cryopreservation of shoot tips for long term conservation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genetic resources. Proc. of BIOCILA Symposium "Biotechnology for Crop Improvement in Latin America", Caracas. Venezuela, November 1992.

Gbadamosi, I.T. and A. Egunyomi. 2010. **Micropropagation of *Plumbagozeylanica*L. (Plumbaginaceae) in Ibadan, Southwestern, Nigeria.** J. Med.Plant. Res. 4(4): 293-297.

Guo, X.D., D.F. Ma, H.M. Li and J. Tang. 1997 Sweet potato breeding and artificial seeds conservation in China. Pp. 119-130 *in* Proceedings of MAFF-PRCRTC International Workshop. MAFF, Tsukuba.

Gupta, S. and Husnara. 2009. Cryopreservation of *in vitro* explants using encapsulation-dehydration technique. Laboratory manual for international training course on in vitro and cryopreservation techniques for conservation of plant genetic resources. November 9-12, 2009. NBPGR, New Delhi, India.

Harrington, J.F. 1972. Seed storage and longevity. Seed Biology. 3: 145-246.

Harrington, J.F. and J.E. Douglas. 1970. Seed Storage and packing, 221p.

Hassan, S.A.K.M. and S.K. Roy. 2005. Micropropagation of Gloriosasuperba L. Through High Frequency Shoot Proliferation. Plant Tissue Cult. 15(1): 67-74.

Hirai, D. and A. Sakai. 2003. Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by optimizing conditions for osmoprotection. Plant cell Rept. 21 : 961-966.

Hirai, D., K. Shirai, S. Shirai and A. Sakai. 1998. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (Fragaria x ananassa Duch.) by encapsulation-vitrification. Euphytica. 101(1) : 109-115.

Hlyka, I., and A.D. Robinson. 1954. In "Storage of Cereal Grains and their Products" (J.A. Anderson and A.W. Alcock, eds.), pp.1-45. Amer. Ass. Cereal Chem., St Paul, Minnesota.

Hutami, S. and R. Purnamaningsih. 2013. Shoot multiplication of taro (*Colocasia esculenta* var. *Antiquorum*) through *in vitro* culture. pp. 35-40. *In: Proceeding International Conference 2013 The 4th Green Technology Facculty of Science and Technology Islamic of University State Maulana Malik Ibrahim Malang*. Indonesia.

International Rules for Seed Testing. 2014. Published by the International Seed Testing Association (ISTA). Chapter 5 : Germination Test 5-25.

International Seed Testing Association (ISTA).1995. Handbook of vigour Test Methods, 3rd ed. Zurich, Switzerland. pp.117.

ISTA. 2014. International Rules for Seed Testing. The International Seed Testing Association, Switzerland.

IUCN. 1980. The Word Conservation Strategy. IUCN, Gland, Switzerland.

J.S.Siemonsma and Kasem Piluek (Editors). 1994. Plant Resources of South –East Asia. No.8. Vegetables. Prosea Foundation, Bogor, Indonesia. 412pp.

Jianfung, C., M. Rongyin, L. Lingzhi and D. Yiying. 1998. Optimum moisture Contents of Seeds Stored at Ambient temperatures. CABI, USA.

Jianhua, Z.and MCDonald, M.B. The saturated salt accelerated aging test for small-seeded crops. Seed Science and Technology, 1996, vol. 25, no.1, p. 123-131.

Kameswara Rao, N., H. Jean, D. M. Ehsan, G. Ghosh, N. David and L. Michael. 2006. Manual of Seed handling in Genebanks. Handbooks for Genebanks No.8. Bioversity International, Rome, Italy. 147p.

Kapoor, N., A. Arya., MA. Siddiqui, A. Amir and H. Kumar. 2010. Seed deterioration in chickpea (*Cicerarietinum* L.) under accelerated aging. Asain J. Plant Sci. 9(3): 158-162.

Kim. H.H., J.W. Yoon, Y.E. Park, E.G. Cho, J.K. Sohn, T.S. Kim and F. Engelmann. 2006. Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification. *CryoLett*. 27: 223-234.

Ko, C.Y., J.P. Kung and R. Mc Donald. 2008. *In vitro* micropropagation of white dasheen (*Colocasia esculenta*). *African Journal of Biotechnology*. 7(1): 41-43.

Kubo, I., M. Uchida and J. A. Klocke. 1983. **An insect ecdysis inhibitor from the African medicinal plant, *Plumbagocapensis* (Plumbaginaceae)**. Agric. Biol. Chem. 47: 911-913.

Lambardi, M., C. Benelli and A. De Carlo. 2005. Cryopreservation as atool for the long-term conservation of woody plant germplasm : development of the technology at the CNR/IVALSA institute of Florence. The role of Biotechnology. Villa Gualino, Turin, Italy 5-7 March, 2005. 181-182.

Leunufna, S. and ERJ. Keller. 2003. Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.) Plant Cell Reports. 21: 1159-1166.

Martin, F.W. and Degras, L. 1978. Tropical yams and their potential. Part 6. Minor cultivatied *Dioscorea* species. USDA agriculture handbook no.538. 23 p.

Matsumoto, T., A. Sakai, C. Takahashi and K. Yamada. 1995. Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of wasabi (Wasabia japonica) by encapsulation-vitrification method. Cryo-Letters. 16 (4) ; 189-196.

McDonald MB. 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. Seed Science Tecnology.27: 177-237.

McDonald, M.B.Seed deterioration : Physiology, repair and assessment. Seed Science and Technology, 1999, vol.27, no.1, p.177-237.

Meriaux, B. ; Ladonne, F.and Fourgereux, J-A.2004. Accelerated aging test for wheat (Triticum aestivum) : Reproducibility of two aging methods. In : International Seed Testing Association Symposium Abstracts. (270, 13th-24th May,2004, Budapest, Hungary). p.83.

Mitchell, S.A. Asemota, H.N. and Ahmad, Mh. 1995. Effects of explants source, culture medium strength and growth regulators on the *in vitro* propagation of three Jamaican yams (*D. cayenensis, D. trifida* and *D. rotundata*) J.Sci.Food Agric. 67: 173-180.

Montero, M.E.M., J. Martines and F. Engelmann . 2008. Cryopreservation of sugarcane somatic emcryos. Cryo-Letter. 29(3) : 229-242.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Nakornchai, S., S. Anantavara and S. Yodsnaha. 1995. **Synergism between tetracycline and naphthoquinone antimalarial drug against chloroquine resistant *Plumbago falciparum.***Mahidol University Annual Research Abstracts. 23: 296-297.

Nasiruddin, M. and AKM Rafiul Islam. 2018. *In vitro* slow-growth conservation for two genotypes of *Solanumtuberosum L.* Bangladesh J. Bot. 47(3): 369-380.

Nath, V.S., M.S. *alias* Sankar, V.M. Hegde, M.L. Jeeva, R.S. Misra and S.S. Veena. 2012. A simple and efficient protocol for rapid regeneration and propagation of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott.) in vitro from apical meristems. *International Journal of Plant Developmental Biology*. 6(1): 64-66.

Ng, NQ. and IO. Daniel. 2000. Storage of pollens for long term conservation of yam genetic resources. In: Cryopreservation of tropical plant germplasm, Eds. Engelmann, F. and H. Takagi. JIRCAS/IPGRI, Rome, Italy. PP. 136-139.

Ng, SYC. and N.Q. Ng, 1997. Germplasm conservation in food yams (Dioscorea spp.) L Constraints, Application and Future Prospects, In: conservation of plant genetic resources *in vitro*. Vol.I: General Aspects. Science Publishers Inc. U.S.A. pp. 257-286.

Okoli, OO. 1991. Yam germplasm diversity : uses and prospects for crop improvement in Africa. In: Crop Genetic Resources of Africa, Vol.II. Nigeria. pp. 109-117.

Parimala, R. and P. Sachdanandam. 1993. **Effect of plumbagin on some glucose metabolizing enzymes studied in rats in experimental hepatoma**. Mol. Cell. Biochem. 125: 59-63.

Paulet, F., F. Engelmann and J. C. Glaszmann. 1997. Cryopreservation of apices of in vitro plantlets of sugarcane (Saccharum sp. Hybrids) using Encapsulation/Dehydration. Plant Cell Reports. 12: 525-529.

Philip, K. N. 2000. In vitro conservation of sweet potato (*Ipomoea batatas*, (L) Lam using slow growth media. Thesis master, University of Nairobi.

Preetha, T.S., A.S. Hemanthakumar and P.N. Krishnan. 2013. Shoot tip Cryopreservation by Vitrification in *Kaempferia galangal* L. An endangered, over exploited medicinal plant in Tropical Asia. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 8(3): 19-23.

PROSEA. 2001. ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 10ธัญพืช. สหมิตรพริ้นติ้ง นนทบุรี. 257 หน้า.

Ramanatha Rao V. 2010. *The Global Diversity of Taro: Ethnobotany and Conservation*. Biodiversity International, Rome, Italy. 212 pp.

Reed, B.M. 2008. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, Springer, New York. 542 pp.

Ribeiro, F.C. and Carvalho, N.M.2001. The saturated salt accelerated aging (SSAA) method seems to act tolerantly on carrot (*Daucus carota* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.) and broccoli (*Brassica oleraceae ver*. Italica Plenck) seeds germination. In : Congress of International Seed Testing Association, 26, Angers Abstracts, pp. 41-42.

Royal Botany Gardens .2008. Seed Information Database. Available Source: Http:// www. kew.org/science-conservation/research-data/resources/databases, May, 2008.

Sakai, A., S. Kobayashi and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of novel orange (Citrus Sinensis Osb. Var. brasilrensis Tanaka) by Vitrification. Plan Cell Rep. 9: 30-33.

Sant, R., B. Panis, M. Taylor and A. Tyagi. 2008. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 92: 107-111.

Sarkar, D., S. K.,Chakrabarti, P. S., Naik. 2001. Slow-growth conservation of potato microplants : efficacy of ancymidol for long-term storage *in vitro*. Euphytica, 117:133-142.

Shibli, R. A., M. A. Shatnawi, W. S. Subaih and M. M. Ajlouni. 2006. ***In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: A Review**. World J. Agric. Sci. 2(4): 372-382.

Simpson BB. 1986. Economic Botany Plants in Our World. McGraw-Hill Book Company Singapore. 640 p.

Singh, D., M. Mishra and A.S. Yadav. 2013. *Gloriosa superba* Linn: An Important Endangered Medicinal Plant and Their Conservation Strategies. International Journal of Botany and Research. 3(1): 19-26.

Sivanesan, I. and B. R. Jeong. 2009. Micropropagation of *Plumbagozeylanica*L. Afr. J. Biotechnol. Vol. 8(16): 3761-3768.

Steiner, A. and Stahl, M. 2002. Vigour rating of rye varietal categories (*Secale cereal* L.) using controlled deterioration testing. Seed Science and Technology.vol.30, no.1, p.219-222.

Surapon, S. 2007. The Family Convolvulaceae in Muang District, Nong Khai Province, Thailand. Khon Kaen Research Journal. 12(3): 237-243.

Takagi, H., N. Tien Thinh, O.M. Islam and T. Senboku. 1997. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Reports*. 16: 594-599.

Tang, Sh.H, M. Sun, K.P. Li and Q.T. Zhang. 1994. Studies on artificial seed of *Ipomoea batatas*, L. Lam. Acta Agronomica Sinica 20(6):746-750 (in Chinese with English summary)

TeKrony D.J., A.E. Ibrahim, D.M. TeKrony and D.B. Egli. 1993. Accelerated Aging Techniques for Evaluating Sorghum Seed Vigor. Journal of Seed Technology. 17: 29-37.

Thammasiri, K. 2000. Cryopresrvation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vitrification. Cryo-Letters. 21 : 237-244.

Thammasiri, K. 2002. Preservation of seeds of some Thai orchid species by vitrification. Proceedings of the World Orchid Conference. 16 : 248-251.

Vaurasi, V. and R. Kant. 2016. Effects of salinity and plant growth media on *in vitro* growth and development of taro (*Colocasia esculenta* L.) varieties. *Acta Horticulturae et Regiotecturae*. 1: 17-20.

Wang, J.-K. 1983. *Taro, a review of Colocacia esculenta and its potentials*. University of Hawaii Press, Hawaii. 400 pp.

Wang, Q, O. Batuman, P. Li, M.B. Joseph and R. Gafny. 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: 135-142.

ภาคผนวก

กิจกรรมที่ 1 เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

ชื่อการทดลองที่ 1 : ศึกษาวิธีการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง ผักคะน้า และผักกาดฮ่องเต้ เพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

Lettuce 5°C

ANALYSIS OF VARIANCE FOR %G

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	91	30	2.41 ns
METHOD (M)	3	2803	934	74.10 **
ERROR (a)	9	113	13	
TIME (T)	11	1492	136	4.17 **
MxT	33	4547	138	4.24 **
ERROR (b)	132	4288	32	
TOTAL	191	13334		

** = significant at 1% level; ns = not significant

CV(a) = 4.63 CV(b) = 7.26

ตารางที่ 1 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดผักกาดหอมที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซนเซียส

MxT TABLE OF MEANS FOR %G (%) BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE
(AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
0 m	95 a	98 a-d	91 abc	99 a	96
3 m	94 a	100 ab	97 ab	99 a	97
6 m	92 ab	99 ab	74 d	98 a	91
9 m	95 a	100 a	94 abc	98 a	97
12 m	96 a	100 a	97 a	98 a	98
15 m	95 a	98 a-d	92 abc	72 b	89
18 m	94 a	94 cd	89 bc	99 a	94
21 m	95 a	98 a-d	88 c	96 a	94
24 m	84 b	94 cd	91 abc	99 a	92
27 m	91 ab	96 bcd	92 abc	99 a	94
30 m	91 ab	99 abc	96 ab	100 a	96
33 m	84 b	93 d	98 a	99 a	94
M-MEAN	92	98	92	96	94

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 2 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอกของวิธีทดสอบความแข็งแรงด้วยวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดหอมที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซนเซียส โดยเก็บข้อมูลระยะเวลา 33 เดือน

ANALYSIS OF VARIANCE FOR V
BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	3	1	1.90 ns
METHOD (M)	3	113	38	78.49 **
ERROR (a)	9	4	0.48	
TIME (T)	11	137	12	21.37 **
MxT	33	251	8	13.03 **
ERROR (b)	132	77	0.58	
TOTAL	191	585		

** = significant at 1% level; ns = not significant

CV(a) = 3.14 CV(b) = 3.45

ตารางที่ 3 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความแข็งแรงด้วยวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดหอมเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซนเซียส

Lettuce -10°C

ANALYSIS OF VARIANCE FOR %G

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine(Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	129.63	43.21	<1
METHOD (M)	3	1881.42	627.14	6.53 *
ERROR (a)	9	864.11	96.01	
TIME (T)	11	2146.11	195.10	3.83 **
MxT	33	6227.12	188.70	3.71 **
ERROR (b)	132	6715.99	50.88	
TOTAL	191	17964.38		

** = significant at 1% level; * = significant at 5% level\\

CV(a) = 12.48 CV(b) = 9.09

ตารางที่ 4 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดผักกาดหอมเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซนเซียส

MxT TABLE OF MEANS FOR %G (%) BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE

(AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
0 m	91.30 c	95.67 a	64.04 e	99.38 ab	87.60
3 m	99.27 ab	99.94 a	97.53 abc	92.41 b	97.29
6 m	95.59 abc	99.75 a	97.53 abc	98.78 ab	97.91
9 m	94.40 abc	96.74 a	98.49 ab	96.28 ab	96.48
12 m	94.18 abc	98.34 a	88.82 cd	99.94 a	95.32
15 m	94.81 abc	98.16 a	91.78 bcd	98.34 ab	95.77
18 m	92.13 bc	97.26 a	74.46 e	100.00 a	90.96
21 m	93.48 abc	95.89 a	79.62 de	97.36 ab	91.59
24 m	91.76 c	78.18 b	95.23 abc	98.54 ab	90.92
27 m	96.81 abc	97.14 a	99.27 a	94.55 b	96.94
30 m	99.49 a	97.27 a	94.78 abc	99.13 ab	97.67
33 m	98.75 abc	98.64 a	97.20 abc	94.80 b	97.35
M-MEAN	95.16	96.08	89.90	97.46	94.65

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 5 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอกของวิธีทดสอบความแข็งแรงด้วยวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดหอมที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซนเซียส โดยเก็บข้อมูลระยะเวลา 33 เดือน

ANALYSIS OF VARIANCE FOR V

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	24.81	8.27	1.60 ns
METHOD (M)	3	96.23	32.08	6.21 *
ERROR (a)	9	46.49	5.17	
TIME (T)	11	51.33	4.67	1.20 ns
MxT	33	478.70	14.51	3.74 **
ERROR (b)	132	512.57	3.88	
TOTAL	191	1210.13		

** = significant at 1% level; * = significant at 5% level

ns = not significant

CV(a) = 10.23 CV(b) = 8.86

ตารางที่ 6 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความแข็งแรงด้วยวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดหอมเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

MxT TABLE OF MEANS FOR V BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE

(AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
0 m	10.51 b	21.35 a	9.77 d	16.45 ab	14.52
3 m	14.14 ab	14.24 bcd	18.38 a	13.79 b	15.14
6 m	15.34 a	13.92 bcd	18.38 a	14.58 b	15.56
9 m	13.52 ab	15.80 bc	13.36 bc	13.65 b	14.08
12 m	13.35 ab	13.96 bcd	12.59 bcd	14.97 b	13.72
15 m	13.50 ab	15.63 bc	11.11 cd	16.11 ab	14.09
18 m	13.14 ab	15.99 bc	10.61 cd	16.68 ab	14.10
21 m	13.65 ab	17.87 ab	11.25 cd	15.87 ab	14.66
24 m	13.08 ab	11.13 d	15.54 ab	14.00 b	13.44
27 m	13.82 ab	14.48 bcd	14.07 bc	13.49 b	13.96
30 m	14.69 a	12.82 cd	13.50 bc	14.74 b	13.94
33 m	13.52 ab	15.12 bc	13.71 bc	19.13 a	15.37
M-MEAN	13.52	15.19	13.52	15.29	14.38

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 7 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของความแข็งแรงด้วยวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดหอมที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

Lettuce 25°C

ANALYSIS OF VARIANCE FOR %G

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	96	32	2.14 ns
METHOD (M)	3	9880	3293	220.71 **
ERROR (a)	9	134	15	
TIME (T)	11	225525	20502	709.48 **
MxT	33	18545	562	19.45 **
ERROR (b)	132	3815	29	
TOTAL	191	257994		

** = significant at 1% level; ns = not significant

CV(a) = 10.58 CV(b) = 14.71

ตารางที่ 8 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ความงอก ของเมล็ดผักกาดหอมที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

MxT TABLE OF MEANS FOR %G (%)

BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
0 m	94 a	99 a	94 a	100 ab	97
3 m	93 a	100 a	94 a	100 a	97
6 m	95 a	98 a	99 a	98 ab	97
9 m	90 a	96 ab	36 b	97 b	80
12 m	68 b	91 bc	4 c	81 c	61
15 m	59 b	85 c	6 c	99 ab	62
18 m	24 c	12 d	0 d	16 d	13
21 m	0 d	8 d	0 d	0 e	2
24 m	0 d	0 e	0 d	0 e	0
27 m	0 d	0 e	0 d	0 e	0
30 m	0 d	0 e	0 d	0 e	0
33 m	0 d	0 e	0 d	0 e	0
M-MEAN	43	49	28	49	42

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 9 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอกของวิธีทดสอบความแข็งแรงด้วยวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดหอมที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซนเซียส โดยเก็บข้อมูลระยะเวลาจนถึง 33 เดือน

ANALYSIS OF VARIANCE FOR V

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	3	± 1	2.07 ns
METHOD (M)	3	652	217	536.20 **
ERROR (a)	9	4	0.41	
TIME (T)	11	18671	1697	925.63 **
MxT	33	1680	51	27.76 **
ERROR (b)	132	242	1.83	
TOTAL	191	21252		

** = significant at 1% level; ns = not significant

CV(a) = 5.87 CV(b) = 12.41

ตารางที่ 10 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความแข็งแรงด้วยวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดหอมเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

MxT TABLE OF MEANS FOR V

BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
0 m	13 a	25 a	17 a	17 a	18
3 m	13 a	14 c	13 b	14 ab	14
6 m	14 a	14 c	19 a	14 ab	15
9 m	13 a	18 b	5 c	14 b	12
12 m	10 b	13 c	1 d	11 c	9
15 m	8 b	12 c	1 d	16 ab	9
18 m	3 c	2 d	0 e	2 d	2
21 m	0 d	1 e	0 e	0 e	0
24 m	0 d	0 f	0 e	0 e	0
27 m	0 d	0 f	0 e	0 e	0
30 m	0 d	0 f	0 e	0 e	0
33 m	0 d	0 f	0 e	0 e	0
M-MEAN	6	8	5	7	7

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 11 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของความแข็งแรงที่ดำเนินการด้วยวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดหอมที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

% G Chinese Cabbage 5°C

ANALYSIS OF VARIANCE FOR %G BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	137	46	1.17 ns
METHOD (M)	3	4988	1663	42.82 **
ERROR (a)	9	349	39	
TIME (T)	11	1877	171	6.16 **
MxT	33	3452	105	3.78 **
ERROR (b)	132	3658	28	
TOTAL	191	14461		

** = significant at 1% level; ns = not significant

CV (a) = 10.17 CV (b) = 8.62

ตารางที่ 12 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ความงอก ของเมล็ดผักกาดขาวปลีที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

MxT TABLE OF MEANS FOR %G (%)

BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
0 m	73 bc	88 ab	80 a	89 ab	83
3 m	85 a	88 ab	71 ab	77 c	80
6 m	83 ab	89 ab	68 ab	82 abc	81
9 m	62 c	88 ab	68 ab	83 abc	75
12 m	74 abc	87 ab	74 ab	77 c	78
15 m	67 c	87 ab	68 ab	81 abc	76
18 m	28 d	80 b	70 ab	84 abc	66
21 m	62 c	85 ab	72 ab	81 abc	75
24 m	61 c	78 b	61 b	76 c	69
27 m	84 ab	83 ab	64 b	90 a	80
30 m	73 bc	92 a	72 ab	81 abc	79
33 m	64 c	81 b	74 ab	79 bc	74
M-MEAN	68	86	70	82	76

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 13 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอกของวิธีทดสอบความแข็งแรงด้วยวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดขาวปลีที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซนเซียส โดยเก็บข้อมูลระยะเวลา 33 เดือน

% G Chinese Cabbage -10°C

ANALYSIS OF VARIANCE FOR %G BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	17	6	<1
METHOD (M)	3	2180	727	21.86 **
ERROR (a)	9	299	33	
TIME (T)	11	5478	498	19.97 **
MxT	33	10495	318	12.75 **
ERROR (b)	132	3292	25	
TOTAL	191	21761		

** = significant at 1% level

CV (a) = 9.00 CV (b) =7.84

ตารางที่ 14 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ความงอก ของเมล็ดผักกาดขาวปลีที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

MxT TABLE OF MEANS FOR %G (%)

BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
0 m	91 c	83 cd	69 cd	84 ab	82
3 m	98 b	90 bc	72 cd	86 a	86
6 m	100 a	96 a	74 c	83 ab	88
9 m	64 ef	85 cd	93 b	84 ab	81
12 m	73 de	94 ab	75 c	81 ab	81
15 m	59 f	83 cd	65 cd	76 ab	71
18 m	33 g	84 cd	73 cd	80 ab	68
21 m	73 de	87 bcd	71 cd	77 ab	77
24 m	57 f	91 abc	60 d	82 ab	72
27 m	78 d	86 cd	70 cd	76 ab	77
30 m	78 d	89 bcd	100 a	81 ab	87
33 m	79 d	79 d	71 cd	73 b	75
M-MEAN	74	87	74	80	79

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 15 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอกของวิธีทดสอบความแข็งแรงด้วยวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดขาวปลีที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

% G Chinese Cabbage 25°C

ANALYSIS OF VARIANCE FOR %G

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	61	20	1.11 ns
METHOD (M)	3	6580	2193	118.55 **
ERROR (a)	9	167	19	
TIME (T)	11	27848	2532	137.42 **
MxT	33	4993	151	8.21 **
ERROR (b)	132	2432	18	
TOTAL	191	42080		

** = significant at 1% level; ns = not significant

CV (a) = 8.93 CV (b) = 8.69

ตารางที่ 16 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ความงอก ของเมล็ดผักกาดขาวปลีที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

MxT TABLE OF MEANS FOR %G (%)

BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
0 m	84 a	89 a	79 ab	81 b	83
3 m	85 a	86 ab	73 bc	92 a	84
6 m	70 b	78 c	83 a	75 bc	77
9 m	64 bc	79 bc	66 c	75 bc	71
12 m	59 bc	71 c	63 c	63 d	64
15 m	66 b	77 c	45 d	63 d	63
18 m	54 c	56 d	24 e	49 e	46
21 m	63 bc	57 d	17 e	47 e	46
24 m	43 d	54 d	21 e	42 ef	40
27 m	40 d	54 d	18 e	67 cd	45
30 m	39 d	48 d	8 f	35 f	33
33 m	13 e	51 d	5 f	33 f	26
M-MEAN	57	67	42	60	56

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 17 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอกของวิธีทดสอบความแข็งแรงด้วยวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดขาวปลีที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

V Chinese Cabbage 5, -10, 25°C

COMBINED ANALYSIS OF VARIANCE FOR V

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
COMBINE (C)	2	1716	858	557.81 **
REPS WITHIN C	9	14	2	
METHOD (M)	3	936	312	214.61 **
CxM	6	228	38	26.15 **
POOLED ERROR (a)	27	39	1	
TIME (T)	11	1785	162	88.68 **
CxT	22	1336	61	33.19 **
MxT	33	843	26	13.95 **
CxMxT	66	812	12	6.72 **
POOLED ERROR (b)	396	725	2	
TOTAL	575	8434		

** = significant at 1% level

BARTLETT'S TEST FOR HOMOGENEITY OF VARIANCES

ERROR (a) : CHI-SQUARE = 0.99 ns

ERROR (b) : CHI-SQUARE = 3.27 ns

CV (a) =5.21 CV (b) =7.37

ตารางที่ 18 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนรวมของความแข็งแรง ของเมล็ดผักกาดขาวปลีที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5, -10 และ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

CxMxT TABLE OF MEANS FOR V BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
5 C					
0 m	10.20 bc	21.99 a	15.62 a	14.40 ab	15.55
3 m	12.20 ab	13.94 bc	10.57 bcd	10.92 e	11.91
6 m	13.37 a	12.47 c	11.50 bc	14.08 abc	12.86
9 m	9.86 bc	12.56 c	10.27 bcd	11.92 b-e	11.15
12 m	11.61 ab	13.71 bc	11.80 b	11.73 cde	12.21
15 m	10.43 bc	13.97 bc	9.17 d	14.62 a	12.05
18 m	4.27 d	13.88 bc	11.09 bcd	14.26 abc	10.87
21 m	10.01 bc	15.62 b	10.19 bcd	13.65 a-d	12.37
24 m	8.89 c	12.12 c	8.90 d	11.45 de	10.34
27 m	12.23 ab	12.30 c	9.35 cd	12.86 a-e	11.68
30 m	10.85 bc	12.99 c	11.53 bc	11.87 b-e	11.81
33 m	12.06 ab	11.69 c	11.15 bcd	13.51 a-d	12.10
C=-10 C					
0 m	12.90 bc	18.59 a	12.04 bc	14.12 a	14.41
3 m	14.68 b	13.60 bcd	10.99 bcd	11.95 ab	12.81
6 m	23.25 a	13.93 bcd	13.19 b	14.06 a	16.11
9 m	10.46 def	11.98 d	13.13 b	13.46 ab	12.26
12 m	10.92 c-f	15.32 bc	11.69 bc	12.39 ab	12.58
15 m	9.63 ef	12.97 bcd	8.59 e	12.63 ab	10.96
18 m	5.47 g	14.65 bc	11.24 bcd	12.80 ab	11.04
21 m	12.39 bcd	15.48 b	10.10 cde	13.89 ab	12.97
24 m	9.14 f	13.54 bcd	9.05 de	11.97 ab	10.93
27 m	12.23 cd	12.72 cd	10.17 cde	11.41 b	11.63
30 m	11.66 cde	11.47 d	16.16 a	12.38 ab	12.92
33 m	11.83 cde	11.63 d	8.45 e	12.33 ab	11.06
C=25 C					
0 m	11.65 abc	21.79 a	15.32 a	12.85 a	15.40
3 m	12.85 a	12.81 b	10.87 b	12.84 a	12.34
6 m	12.51 a	11.10 bc	13.67 a	11.70 ab	12.25
9 m	10.14 bcd	11.24 bc	9.94 b	11.28 abc	10.65
12 m	9.61 cd	11.36 bc	9.71 b	9.39 c	10.01
15 m	11.98 ab	12.70 b	6.01 c	10.16 bc	10.21
18 m	8.57 d	9.89 c	3.59 d	7.51 d	7.39
21 m	9.74 cd	10.99 bc	2.49 d	7.16 d	7.59
24 m	5.71 e	7.73 d	3.01 d	6.05 de	5.63
27 m	5.69 e	7.69 d	2.57 d	9.47 c	6.35
30 m	5.73 e	6.89 d	1.12 e	5.01 e	4.69
33 m	1.82 f	7.31 d	0.73 e	4.74 e	3.65
M-MEAN	10.46	12.91	9.58	11.58	11.13

In a column under each C, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 19 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของความแข็งแรงด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงต่างๆทั้ง 4 วิธี ของเมล็ดผักกาดขาวปลีที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5, -10 และ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

Flowering white cabbage

COMBINED ANALYSIS OF VARIANCE FOR %G

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
COMBINE (C)	2	13793	6897	252.32 **
REPS WITHIN C	9	246	27	
METHOD (M)	3	4906	1635	36.99 **
CxM	6	7539	1257	28.42 **
POOLED ERROR (a)	27	1194	44	
TIME (T)	11	19840	1804	45.26 **
CxT	22	15363	698	17.52 **
MxT	33	14065	426	10.69 **
CxMxT	66	15336	232	5.83 **
POOLED ERROR (b)	396	15781	40	
TOTAL	575	108063		

** = significant at 1% level

BARTLETT'S TEST FOR HOMOGENEITY OF VARIANCES

ERROR (a) : CHI-SQUARE = 1.38 ns

ERROR (b) : CHI-SQUARE = 2.58 ns

CV. (a) = 8.66 CV. (b) = 8.26

ตารางที่ 20 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนรวมของเปอร์เซ็นต์ความงอก ของเมล็ดผักกาดเขียวกวางตุ้งที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5, -10 และ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

CxMxT TABLE OF MEANS FOR %G (%) BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
5 C					
0 m	99 a	99 ab	99 a	100 a	99
3 m	95 abc	100 a	98 a	100 ab	98
6 m	96 abc	98 ab	96 a	100 ab	98
9 m	98 ab	99 ab	98 a	99 ab	98
12 m	84 d	99 ab	95 a	100 ab	95
15 m	96 abc	97 ab	97 a	99 ab	97
18 m	89 cd	79 c	98 a	99 ab	91
21 m	92 bcd	100 ab	96 a	97 ab	96
24 m	90 cd	96 b	98 a	99 ab	96
27 m	98 ab	96 b	99 a	95 b	97
30 m	87 cd	30 d	99 a	99 ab	79
33 m	96 abc	99 ab	95 a	96 b	97
C=-10 C					
0 m	96 bc	99 a	79 cd	100 a	94
3 m	100 a	99 a	97 ab	99 a	99
6 m	97 bc	99 a	94 ab	97 a	97
9 m	99 ab	100 a	94 ab	100 a	98
12 m	95 bc	100 a	95 ab	98 a	97
15 m	95 bc	98 a	98 ab	99 a	97
18 m	93 c	98 a	98 a	99 a	97
21 m	92 c	99 a	89 bc	100 a	95
24 m	91 c	97 a	97 ab	99 a	96
27 m	95 bc	98 a	98 a	97 a	97
30 m	95 bc	99 a	72 d	100 a	91
33 m	92 c	97 a	98 a	98 a	96
C=25 C					
0 m	100 a	99 a	96 ab	100 a	99
3 m	100 a	97 a	99 a	100 a	99
6 m	99 abc	98 a	98 a	92 cd	97
9 m	95 b-e	97 a	95 ab	95 bc	96
12 m	93 cde	93 ab	89 b	95 bc	92
15 m	99 ab	98 a	89 b	99 ab	96
18 m	96 bcd	86 b	72 c	87 cde	86
21 m	86 ef	94 ab	47 d	88 cde	79
24 m	92 de	88 b	43 de	80 e	76
27 m	94 cde	88 b	40 de	45 f	67
30 m	89 def	2 d	40 de	83 de	53
33 m	79 f	74 c	30 e	79 e	65
M-MEAN	94	91	87	95	92

In a column under each C, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 21 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของของเปอร์เซ็นต์ความงอกด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงต่าง ของเมล็ดผักกาดเขียวกวางตุ้งที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5, -10 และ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

COMBINED ANALYSIS OF VARIANCE FOR V

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
COMBINE (C)	2	474	237	369.92 **
REPS WITHIN C	9	6	1	
METHOD (M)	3	183	61	55.21 **
CxM	6	243	41	36.63 **
POOLED ERROR (a)	27	30	1	
TIME (T)	11	1004	91	86.67 **
CxT	22	739	34	31.89 **
MxT	33	1477	45	42.49 **
CxMxT	66	941	14	13.54 **
POOLED ERROR (b)	396	417	1	
TOTAL	575	5514		

** = significant at 1% level

BARTLETT'S TEST FOR HOMOGENEITY OF VARIANCES

ERROR (a) : CHI-SQUARE = 0.73 ns

ERROR (b) : CHI-SQUARE = 0.38 ns

CV. (a) = 4.41 CV. (b) = 4.41

ตารางที่ 22 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนรวมของค่าความแข็งแรงด้วยวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดเขียวกวางตุ้งที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5, -10 และ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

CxMxT TABLE OF MEANS FOR V BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
5 C					
0 m	14.06 bc	22.63 a	19.38 a	16.66 ab	18.18
3 m	14.58 abc	17.33 b	15.27 bc	14.17 c	15.34
6 m	16.24 a	13.58 d	14.56 bc	16.57 ab	15.24
9 m	15.65 ab	14.14 cd	14.74 bc	14.84 bc	14.84
12 m	13.33 c	15.11 cd	15.35 bc	16.07 abc	14.96
15 m	15.68 ab	15.15 cd	13.58 c	16.50 ab	15.23
18 m	13.79 bc	13.72 d	16.06 b	17.70 a	15.32
21 m	15.51 ab	17.53 b	14.66 bc	16.32 ab	16.00
24 m	13.46 c	15.89 bc	15.48 bc	16.11 abc	15.24
27 m	16.18 a	15.12 cd	15.63 bc	14.32 c	15.31
30 m	13.67 bc	4.95 e	15.49 bc	16.84 ab	12.74
33 m	15.06 abc	14.95 cd	13.84 c	17.66 a	15.38
C=-10 C					
0 m	13.56 d	24.46 a	13.77 bcd	16.66 a	17.11
3 m	16.27 b	16.41 bc	16.42 a	13.96 b	15.76
6 m	24.06 a	13.96 d	15.78 ab	15.84 ab	17.41
9 m	15.25 bcd	14.13 d	13.70 cd	16.94 a	15.00
12 m	14.68 bcd	16.22 bc	14.64 a-d	15.40 ab	15.24
15 m	15.82 b	15.67 bcd	13.31 d	15.86 ab	15.16
18 m	13.76 cd	16.77 bc	15.30 abc	16.62 a	15.61
21 m	15.75 bc	17.65 b	13.09 d	16.70 a	15.80
24 m	13.74 cd	15.38 cd	15.73 ab	15.08 ab	14.98
27 m	15.47 bcd	15.75 bcd	15.67 abc	15.60 ab	15.62
30 m	15.29 bcd	15.62 bcd	10.71 e	17.12 a	14.68
33 m	14.77 bcd	15.49 cd	15.69 abc	15.18 ab	15.28
C=25 C					
0 m	14.20 cd	24.41 a	18.71 a	16.69 a	18.50
3 m	17.18 ab	15.72 bc	16.46 bc	14.21 cd	15.89
6 m	17.83 a	13.89 cd	17.16 ab	13.98 cde	15.71
9 m	15.24 bc	13.82 cd	14.95 c	14.64 bcd	14.66
12 m	14.86 c	14.34 cd	14.59 cd	15.87 abc	14.92
15 m	15.44 bc	16.65 b	12.90 de	16.20 ab	15.30
18 m	15.40 bc	15.28 bcd	11.64 e	14.40 bcd	14.18
21 m	14.87 c	14.35 cd	6.71 f	13.62 def	12.38
24 m	14.46 c	13.87 cd	6.58 f	12.11 f	11.76
27 m	15.12 c	13.31 d	6.39 f	7.14 g	10.49
30 m	14.23 cd	0.26 f	5.87 f	12.13 f	8.12
33 m	12.60 d	11.07 e	4.31 g	12.37 ef	10.09
M-MEAN	15.20	15.13	13.73	15.22	14.82

In a column under each C, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 23 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของความแข็งแรงด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงต่างๆ ของเมล็ดผักกาดเขียวกวางตุ้งที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5, -10 และ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

% G Chinese kale 5, -10, 25°C

COMBINED ANALYSIS OF VARIANCE FOR %G

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
COMBINE (C)	2	23903	11952	221.12 **
REPS WITHIN C	9	486	54	
METHOD (M)	3	26986	8995	234.95 **
CxM	6	4774	796	20.78 **
POOLED ERROR (a)	27	1034	38	
TIME (T)	11	82003	7455	226.15 **
CxT	22	22562	1026	31.11 **
MxT	33	10555	320	9.70 **
CxMxT	66	6178	94	2.84 **
POOLED ERROR (b)	396	13054	33	
TOTAL	575	191536		

** = significant at 1% level

BARTLETT'S TEST FOR HOMOGENEITY OF VARIANCES

ERROR (a) : CHI-SQUARE = 1.18 ns

ERROR (b) : CHI-SQUARE = 2.27 ns

CV. (a) = 9.26 CV. (b) = 8.63

ตารางที่ 24 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนรวมของเปอร์เซ็นต์ความงอกที่ทดสอบด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงต่างๆ ของเมล็ดผักคะน้าที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5, -10 และ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

CxMxT TABLE OF MEANS FOR %G (%) BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
5 C					
0 m	91 b-e	96 bcd	96 a	97 abc	95
3 m	95 bc	97 abc	96 a	99 ab	97
6 m	94 bcd	100 a	95 a	99 ab	97
9 m	94 bcd	100 ab	91 a	96 abc	95
12 m	100 a	94 cde	92 a	99 a	96
15 m	96 b	84 fg	80 b	94 bcd	89
18 m	87 c-f	90 def	70 bc	87 def	83
21 m	92 b-e	83 fg	37 d	93 cde	76
24 m	85 def	66 h	63 c	80 fg	74
27 m	78 f	74 gh	67 bc	70 g	72
30 m	91 b-e	78 gh	68 bc	83 fg	80
33 m	83 ef	86 efg	61 c	84 ef	79
C=-10 C					
0 m	93 b-e	95 cde	92 ab	100 a	95
3 m	100 a	96 bcd	94 ab	97 bc	97
6 m	98 abc	100 ab	78 cde	98 abc	93
9 m	99 ab	100 a	98 a	99 ab	99
12 m	98 abc	98 abc	87 bc	97 bc	95
15 m	97 abc	95 cde	75 def	94 bcd	90
18 m	84 e	84 f	86 bcd	93 cd	87
21 m	95 bcd	89 def	63 fg	85 de	83
24 m	87 de	79 f	49 g	87 de	76
27 m	92 cde	79 f	69 ef	81 e	80
30 m	92 cde	84 f	64 f	83 e	81
33 m	84 e	87 ef	67 ef	84 e	80
C=25 C					
0 m	96 ab	92 c	91 a	100 a	95
3 m	99 a	99 ab	90 a	99 ab	97
6 m	98 ab	99 a	95 a	96 bc	97
9 m	94 b	99 a	89 a	96 bc	94
12 m	99 ab	94 bc	67 b	95 c	89
15 m	99 ab	81 d	62 b	86 d	82
18 m	79 c	78 de	30 c	77 d	66
21 m	81 c	66 ef	11 d	53 e	53
24 m	59 d	61 f	4 e	60 e	46
27 m	63 d	44 g	2 ef	24 g	33
30 m	65 d	40 g	0 f	38 f	36
33 m	33 e	38 g	0 f	17 g	22
M-MEAN	88	84	66	84	81

In a column under each C, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 25 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอกด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงวิธีต่างๆ ของเมล็ดคะน้าที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5, -10 และ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

V Chinese kale 5°C

ANALYSIS OF VARIANCE FOR V

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	3	1	<1
METHOD (M)	3	155	52	43.01 **
ERROR (a)	9	11	1	
TIME (T)	11	2643	240	305.75 **
MxT	33	753	23	29.05 **
ERROR (b)	132	104	1	
TOTAL	191	3670		

** = significant at 1% level

CV. (a) = 5.03 CV. (b) = 5.03

ตารางที่ 26 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนรวมของค่าความแข็งแรงที่ทดสอบด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักคะน้าที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

MxT TABLE OF MEANS FOR V

BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
0 m	11.91 c	23.33 a	18.74 a	16.23 b	17.55
3 m	15.41 b	17.11 b	17.82 abc	14.17 c	16.13
6 m	17.70 a	9.90 de	17.90 ab	13.80 c	14.82
9 m	17.85 a	14.08 c	16.55 bc	18.36 a	16.71
12 m	19.40 a	17.84 b	16.14 c	19.03 a	18.10
15 m	19.15 a	9.72 e	8.73 d	9.15 d	11.69
18 m	10.02 d	9.57 ef	6.70 e	9.52 d	8.95
21 m	10.09 d	8.37 f	3.72 g	9.12 d	7.82
24 m	9.27 de	6.72 g	7.01 e	7.24 ef	7.56
27 m	7.35 f	6.74 g	6.65 e	7.05 f	6.95
30 m	14.44 b	11.11 d	6.77 e	7.75 ef	10.02
33 m	8.69 e	8.62 ef	5.08 f	8.31 de	7.68
M-MEAN	13.44	11.93	10.98	11.64	12.00

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 27 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของความแข็งแรงด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงต่างๆ ของเมล็ดผักคะน้าที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

V Chinese kale -10°C

ANALYSIS OF VARIANCE FOR V

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	13	4	4.76 *
METHOD (M)	3	151	50	53.34 **
ERROR (a)	9	8	1	
TIME (T)	11	2565	233	207.42 **
MxT	33	610	18	16.45 **
ERROR (b)	132	148	1	
TOTAL	191	3496		

** = significant at 1% level; * = significant at 5% level

CV. (a) = 4.96 CV. (b) = 4.96

ตารางที่ 28 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าความแข็งแรงที่ทดสอบด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักคะน้าที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

MxT TABLE OF MEANS FOR V

BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
0 m	13.16 c	22.32 a	17.77 a	16.66 b	17.48
3 m	19.11 ab	18.57 b	17.70 a	13.77 c	17.29
6 m	18.27 ab	9.92 d	13.81 b	12.25 c	13.56
9 m	18.85 ab	13.94 c	18.15 a	19.10 a	17.51
12 m	17.12 b	19.24 b	15.44 b	18.15 ab	17.49
15 m	19.40 a	17.83 b	9.77 c	9.58 d	14.15
18 m	9.07 de	8.54 de	8.92 c	9.70 d	9.06
21 m	9.76 d	9.30 de	6.17 d	8.22 de	8.36
24 m	8.96 de	8.03 ef	5.40 d	7.88 e	7.57
27 m	8.34 de	7.06 f	6.25 d	8.01 e	7.41
30 m	14.17 c	8.64 de	6.01 d	7.54 e	9.09
33 m	8.13 e	8.57 de	9.40 c	7.26 e	8.34
M-MEAN	13.69	12.66	11.23	11.51	12.27

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 29 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของความแข็งแรงด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงต่างๆ ของเมล็ดผักคะน้าที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

V Chinese kale 25°C

ANALYSIS OF VARIANCE FOR V

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	2.57	0.86	<1
METHOD (M)	3	1352.14	450.71	153.95 **
ERROR (a)	9	26.35	2.93	
TIME (T)	11	7904.74	718.61	364.86 **
MxT	33	1311.06	39.73	20.17 **
ERROR (b)	132	259.98	1.97	
TOTAL	191	10856.84		

** = significant at 1% level

CV. (a) = 10.10 CV. (b) = 8.28

ตารางที่ 30 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าความแข็งแรงที่ทดสอบด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักคะน้าที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

MxT TABLE OF MEANS FOR V

BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
0 m	13.31 b	22.52 a	17.62 a	16.59 a	17.51
3 m	18.98 a	18.67 b	16.59 ab	14.03 b	17.07
6 m	18.56 a	9.87 d	18.16 a	12.72 b	14.83
9 m	18.01 a	13.91 c	14.73 b	18.18 a	16.21
12 m	19.07 a	17.76 b	10.71 c	17.80 a	16.33
15 m	19.37 a	9.95 d	6.09 d	7.92 c	10.83
18 m	8.67 c	8.44 de	3.01 e	7.72 c	6.96
21 m	8.18 c	6.70 ef	1.10 f	5.02 d	5.25
24 m	6.14 d	6.09 f	0.42 g	5.51 d	4.54
27 m	5.70 d	4.00 g	0.18 gh	2.30 f	3.05
30 m	9.51 c	3.94 g	0.01 h	3.44 e	4.23
33 m	3.24 e	3.77 g	0.01 h	1.33 g	2.09
M-MEAN	12.40	10.47	7.39	9.38	9.91

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 31 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของความแข็งแรงด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงต่างๆ ของเมล็ดผักคะน้าที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

Green Park tsai 5°C

ANALYSIS OF VARIANCE FOR %G

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine(Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	157	52	1.57 ns
METHOD (M)	3	2727	909	27.20 **
ERROR (a)	9	301	33	
TIME (T)	11	3774	343	14.71 **
MxT	33	5584	169	7.26 **
ERROR (b)	132	3078	23	
TOTAL	191	15621		

** = significant at 1% level; ns = not significant

CV(a) = 7.69 CV(b) = 6.42

ตารางที่ 32 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ความงอกที่ทดสอบด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงต่างๆ ของเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

MxT TABLE OF MEANS FOR %G (%)

BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
0 m	98 ab	99 a	95 a	100 a	98
3 m	98 ab	97 abc	92 ab	97 a-e	96
6 m	99 a	99 ab	88 b	98 abc	96
9 m	89 cd	97 abc	91 ab	97 a-d	94
12 m	84 d	97 abc	86 b	90 e	89
15 m	94 bc	97 abc	91 ab	97 a-e	95
18 m	94 bc	92 c	70 c	93 de	87
21 m	95 bc	96 abc	51 d	93 de	84
24 m	85 d	94 bc	89 ab	98 a-d	91
27 m	89 cd	94 bc	95 a	99 ab	94
30 m	94 bc	60 d	87 b	95 b-e	84
33 m	90 cd	92 c	90 ab	94 cde	92
M-MEAN	93	93	85	96	92

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 33 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอกด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

ANALYSIS OF VARIANCE FOR V

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	0	0	<1
METHOD (M)	3	58	19	16.85 **
ERROR (a)	9	10	1	
TIME (T)	11	255	23	41.74 **
MxT	33	316	10	17.25 **
ERROR (b)	132	73	1	
TOTAL	191	712		

** = significant at 1% level

CV(a) = 4.60 CV(b) = 4.60

ตารางที่ 34 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าความแข็งแรงที่ทดสอบด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงต่างๆ ของเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

MxT TABLE OF MEANS FOR V

BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
0 m	13.86 a-d	24.27 a	18.46 a	16.50 a	18.27
3 m	13.98 a-d	14.31 bcd	13.68 bcd	13.78 b	13.94
6 m	15.17 a	14.07 bcd	13.97 bc	14.32 b	14.38
9 m	13.06 b-e	13.89 cd	14.34 b	14.23 b	13.88
12 m	12.01 e	14.20 bcd	12.58 de	13.29 b	13.02
15 m	14.28 abc	13.86 cd	11.49 ef	14.16 b	13.45
18 m	14.14 a-d	15.49 b	11.05 f	13.91 b	13.65
21 m	14.47 ab	14.75 bc	7.25 g	14.09 b	12.64
24 m	12.22 e	13.55 cd	12.67 cde	13.90 b	13.09
27 m	12.81 de	13.93 cd	13.58 bcd	13.99 b	13.58
30 m	13.65 bcd	9.38 e	12.44 de	13.64 b	12.28
33 m	12.98 cde	13.20 d	12.79 cde	14.59 b	13.39
M-MEAN	13.55	14.58	12.86	14.20	13.80

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 35 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของความแข็งแรงด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

Green Park tsai-10°C

ANALYSIS OF VARIANCE FOR %G

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine(Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	280	93	1.81 ns
METHOD (M)	3	1564	521	10.08 **
ERROR (a)	9	466	52	
TIME (T)	11	4448	404	8.97 **
MxT	33	14248	432	9.58 **
ERROR (b)	132	5951	45	
TOTAL	191	26956		

** = significant at 1% level; ns = not significant

CV(a) = 9.69 CV(b) = 9.02

ตารางที่ 36 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ความงอกที่ทดสอบด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงต่างๆ ของเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

MxT TABLE OF MEANS FOR %G (%)

BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
0 m	95 bcd	96 ab	79 cd	99 a	92
3 m	100 a	95 ab	99 a	98 ab	98
6 m	100 ab	82 c	86 bcd	91 bc	90
9 m	49 e	95 ab	99 a	97 abc	85
12 m	94 cd	99 a	91 bc	91 bc	94
15 m	93 cd	94 ab	81 cd	97 abc	91
18 m	97 abc	94 ab	90 bcd	94 abc	93
21 m	98 abc	95 ab	77 d	89 c	89
24 m	87 d	22 d	89 bcd	96 abc	74
27 m	93 cd	91 bc	94 ab	98 ab	94
30 m	96 a-d	98 ab	90 bcd	94 abc	94
33 m	100 a	91 bc	89 bcd	97 abc	94
M-MEAN	92	88	89	95	91

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 37 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอกด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

ANALYSIS OF VARIANCE FOR V

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine(Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	6	2	1.17 ns
METHOD (M)	3	80	27	15.79 **
ERROR (a)	9	15	2	
TIME (T)	11	532	48	10.28 **
MxT	33	544	16	3.50 **
ERROR (b)	132	621	5	
TOTAL	191	1799		

** = significant at 1% level; ns = not significant

CV(a) = 6.61 CV(b) = 10.45

ตารางที่ 38 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าความแข็งแรงที่ทดสอบด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงต่างๆ ของเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

MxT TABLE OF MEANS FOR V

BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
0 m	13.34 a	23.43 a	12.87 ab	16.53 a	16.54
3 m	14.82 a	14.98 bc	14.33 a	13.74 ab	14.47
6 m	11.89 a	11.63 c	13.03 ab	10.28 b	11.71
9 m	14.11 a	13.34 bc	14.81 a	14.21 ab	14.12
12 m	13.61 a	14.45 bc	12.98 ab	13.14 ab	13.54
15 m	15.04 a	13.83 bc	10.12 b	14.65 a	13.41
18 m	14.98 a	15.72 bc	13.03 ab	14.02 ab	14.44
21 m	14.78 a	15.92 b	11.40 ab	12.98 ab	13.77
24 m	12.56 a	3.65 d	5.18 c	13.53 ab	8.73
27 m	13.54 a	13.24 bc	12.42 ab	14.07 ab	13.32
30 m	13.95 a	13.90 bc	12.85 ab	13.83 ab	13.63
33 m	14.32 a	13.09 bc	12.88 ab	14.48 a	13.69
M-MEAN	13.91	13.93	12.16	13.79	13.45

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 39 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของความแข็งแรงด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

Green Park tsai 25°C

ANALYSIS OF VARIANCE FOR %G

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	222	74	2.14 ns
METHOD (M)	3	20460	6820	197.22 **
ERROR (a)	9	311	35	
TIME (T)	11	66593	6054	186.91 **
MxT	33	11478	348	10.74 **
ERROR (b)	132	4275	32	
TOTAL	191	103339		

** = significant at 1% level; ns = not significant

CV (a) = 11.00% CV (b) = 10.51%

ตารางที่ 40 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ความงอกที่ทดสอบด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงต่างๆ ของเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

MxT TABLE OF MEANS FOR %G (%)

BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
0 m	97 a	100 a	39 c	98 ab	84
3 m	97 a	100 a	93 a	99 a	97
6 m	97 a	94 b	93 a	88 c	93
9 m	98 a	95 b	91 a	93 bc	94
12 m	75 c	89 b	66 b	86 c	79
15 m	87 b	90 b	47 c	58 d	70
18 m	75 c	42 d	24 d	61 d	51
21 m	77 bc	55 cd	7 e	39 ef	44
24 m	40 e	42 d	8 e	47 de	34
27 m	61 d	66 c	3 ef	36 ef	41
30 m	47 e	59 c	3 ef	28 f	34
33 m	23 f	62 c	1 f	13 g	25
M-MEAN	73	74	39	62	62

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 41 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอกด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

ANALYSIS OF VARIANCE FOR V

BASED ON VALUES TRANSFORMED TO Arcsine (Sqr(X/100))

SV	DF	SS	MS	F
REPLICATION (R)	3	13	4	2.85 ns
METHOD (M)	3	1663	554	354.33 **
ERROR (a)	9	14	2	
TIME (T)	11	4052	368	161.43 **
MxT	33	1251	38	16.61 **
ERROR (b)	132	301	2	
TOTAL	191	7294		

** = significant at 1% level; ns = not significant

CV (a) = 8.43 % CV (b) = 8.43 %

ตารางที่ 42 ตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความแข็งแรงที่ทดสอบด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงต่างๆ ของเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

MxT TABLE OF MEANS FOR V

BASED ON BACKTRANSFORMED SCALE (AVE. OVER 4 REPS)

	METHOD (M)				
TIME (T)	AAT	SSAAT	CD	Control	T-MEAN
0 m	13.69 ab	24.35 a	6.20 c	16.20 a	15.11
3 m	14.00 ab	14.37 b	13.75 a	14.07 ab	14.04
6 m	15.40 a	13.43 b	14.33 a	13.07 b	14.06
9 m	14.51 ab	13.45 b	12.90 a	13.26 b	13.53
12 m	10.80 cd	12.82 b	9.95 b	12.78 b	11.59
15 m	13.16 abc	13.78 b	5.75 c	8.70 c	10.35
18 m	11.04 cd	6.07 d	3.41 d	8.78 c	7.32
21 m	11.94 bc	7.93 c	0.92 ef	5.75 d	6.63
24 m	4.23 f	5.64 d	1.16 e	6.71 d	4.44
27 m	8.82 d	9.35 c	0.37 fg	5.08 de	5.90
30 m	6.74 e	8.54 c	0.38 fg	3.87 e	4.88
33 m	3.34 f	8.50 c	0.10 g	1.92 f	3.47
M-MEAN	10.64	11.52	5.77	9.18	9.28

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ตารางที่ 43 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของความแข็งแรงด้วยวิธีทดสอบความแข็งแรงวิธีต่างๆ ของเมล็ดผักกาดฮ่องเต้ที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซนเซียส เป็นระยะเวลา 33 เดือน

ชื่อการทดลองที่ 2 เทคนิคการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือยในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

การเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง

Analysis of Variance for Germination Test

SV	DF	SS	MS	F
Replication (R)	3	34	11	1.35^{ns}
Moisture (M)	4	73740	18435	2198.62**
Error(a)	12	101	8	
Time (T)	9	14465	1607	130.42**
MxT	36	19112	531	43.08**
Error(b)	135	1664	12	
Total	199	109115		

C.V. (a)= 6.95%, C.V.(b)= 8.51%

การเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

Analysis of Variance for Germination Test

SV	DF	SS	MS	F
Replication (R)	3	114	38	4.96^{ns}
Moisture (M)	4	1753	438	56.95**
Error(a)	12	92	8	
Time (T)	9	329	37	3.37**
MxT	36	1080	30	2.76**
Error(b)	135	1465	11	
Total	199	4834		

C.V. (a)= 2.2%, C.V.(b)= 2.0%

การเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

Analysis of Variance for Germination Test

SV	DF	SS	MS	F
Replication (R)	3	74	25	3.27^{ns}
Moisture (M)	4	345	86	11.41*
Error(a)	12	91	8	
Time (T)	9	784	87	11.21**
MxT	36	472	13	1.69*
Error(b)	135	1048	8	
Total	199	1813		

C.V. (a)= 4.95%, C.V.(b)= 4.95%

การเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง

Analysis of Variance for Germination Test

SV	DF	SS	MS	F
Replication (R)	3	23	8	<1
Moisture (M)	4	675	169	16.12**
Error(a)	12	126	10	
Time (T)	9	681	76	14.27**
MxT	36	445	12	2.33**
Error(b)	135	716	5	
Total	199	2667		

C.V. (a)= 5.70%, C.V.(b)= 4.03%

Combined Analysis of Variance for AA Test

SV	DF	SS	MS	F
Storage(S)	3	25138	8379	424.56**
Rep Within S	12	237	20	
Moisture (M)	4	26066	6516	485.93**
SxM	12	43833	3653	272.38**
Pooled Error(a)	48	48	644	13
Time (T)	9	12502	1389	116.49**
SxT	27	12507	463	38.84**
MxT	36	14192	394	33.06**
SxMxT	108	16753	155	13.01**
Pooled Error(b)	540	6440	12	
Total	799	158312		

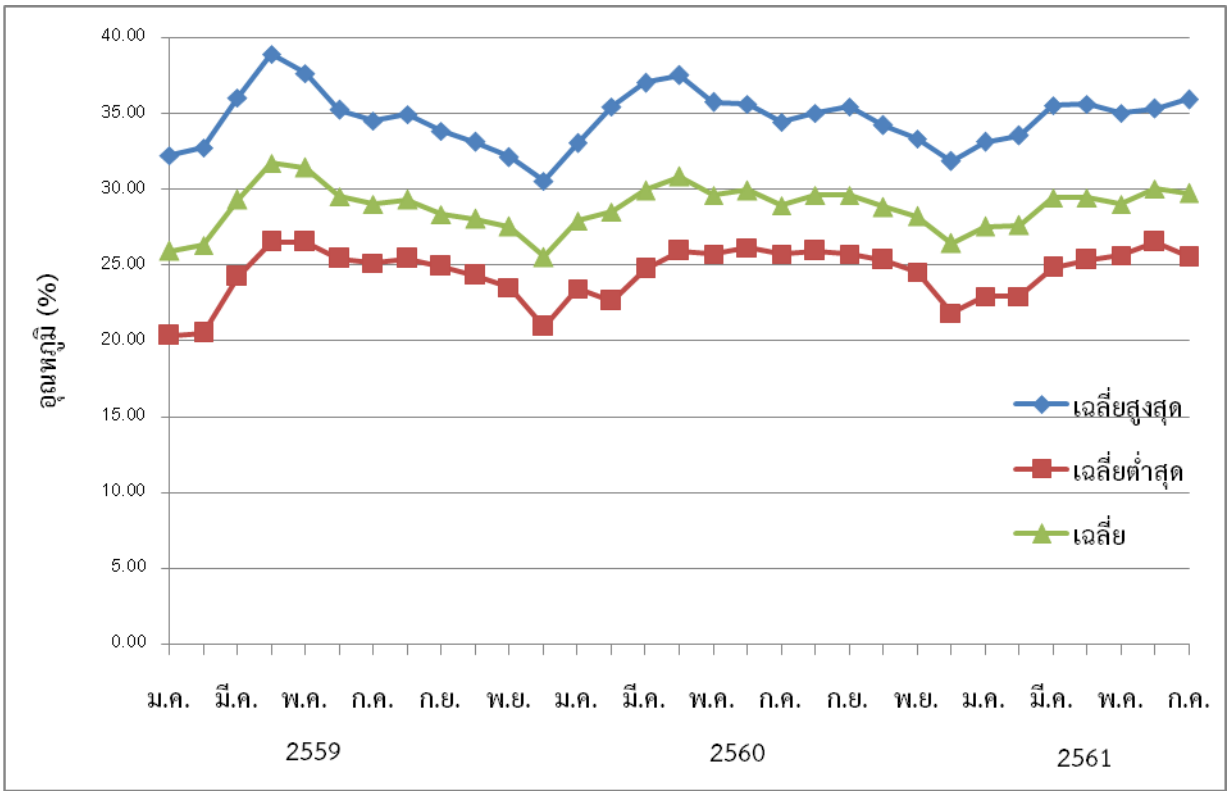
C.V. (a)= 8.27%, C.V.(b)= 7.95%

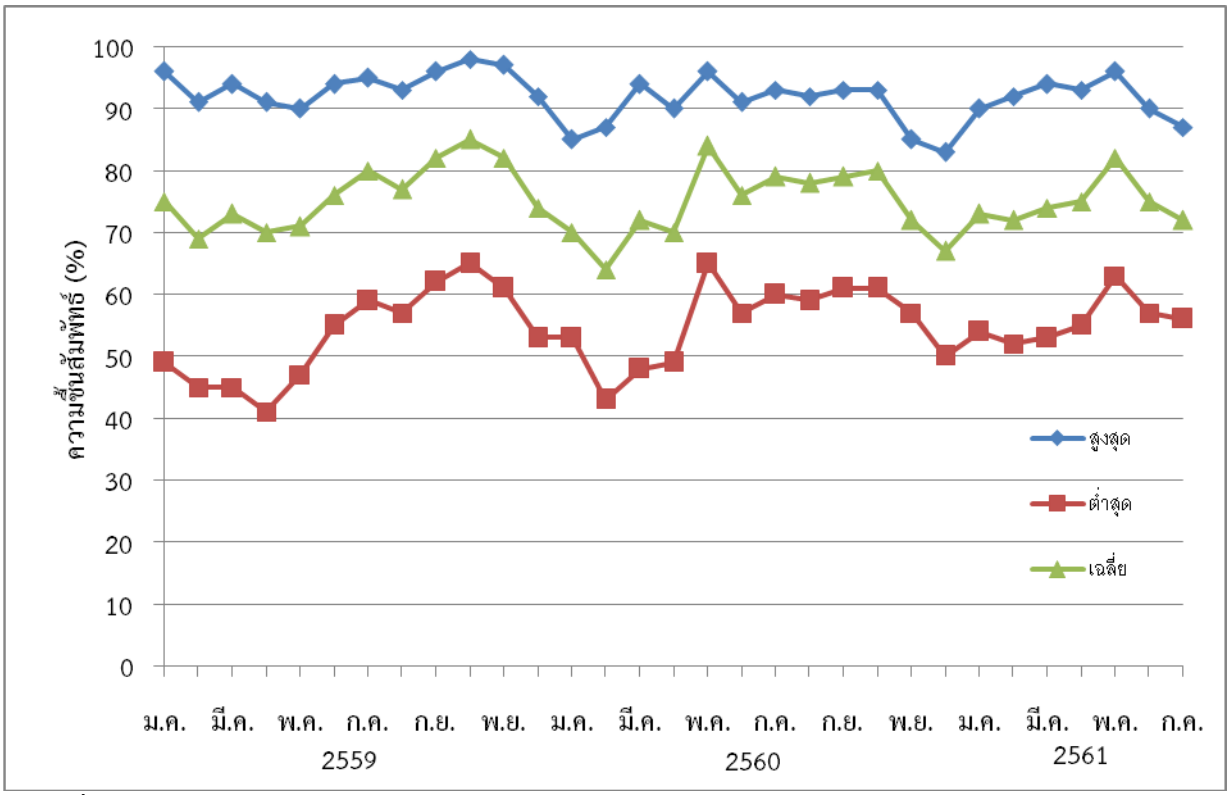
* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,

**= แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

^{ns}= ไม่แตกต่างทางสถิติ

กราฟแสดงสภาพภูมิอากาศระหว่างการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์เดือย





แหล่งที่มา: สถานีอุตุนิยมวิทยาปทุมธานี กรมอุตุนิยมวิทยา

กิจกรรมที่ 2 เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ

ชื่อการทดลองที่ 1 การอนุรักษ์พันธุกรรมอ้อยในสภาพเยือกแข็งโดยใช้ปลายยอด

สูตรอาหาร MS

องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์พื้นฐานสูตร MS

Macronutrient	mg/L
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Micronutrient	
H_3Bo_3	6.2
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3
KI	0.83
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0. 25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
$CoCl_2\ 6H_2O$	0.025
Fe-EDTA	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.85
Na_2EDTA	37.25

ที่มา Murashige and Skoog (1962)

ชื่อการทดลองที่ 2 การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชเจตมูลเพลิงแดงและเจตมูลเพลิงขาวโดยวิธีชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

ส่วนประกอบ	มิลลิกรัมต่อลิตร
Macronutrients	
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
$CaCl_2.2H_2O$	440.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00
KH_2PO_4	170.00
Micronutrients	
KI	0.83
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.7H_2O$	6.90
$ZnSO_4.7H_2O$	6.14
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.25
Organic compounds	
myo-inositol	100.00
glycine	2.00
nicotinic acid	0.50
pyridoxine-HCl	0.50
thiamine-HCl	0.50
Other	
sucrose	30,000.00
pH	5.70-5.80

ชื่อการทดลองที่ 4 เทคนิคการเก็บรักษาในสภาพชะลอการเจริญเติบโตของมันเทศ (*Ipomoea batatas*) เพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

สูตรอาหาร MS

องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์พื้นฐานสูตร MS

Macronutrient	**mg/L**
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Micronutrient	
H_3Bo_3	6.2
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3
KI	0.83
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.6
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0. 25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
$CoCl_2\ 6H_2O$	0.025
Fe-EDTA	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.85
Na_2EDTA	37.25

ที่มา Murashige and Skoog (1962)

ชื่อการทดลองที่ 5 การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrificationเพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

ตารางภาคผนวกที่ 1 ข้อมูลวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดของเผือกไข่ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการเติมฮอร์โมน BA และ NAA เป็นเวลานาน 4 เดือน โดยใช้ค่า Transformed to Log(X+1)

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	11	2.45121090	0.22283735	14.26 **
AUX (NAA)	2	0.00164182	0.00082091	<1
CYTO (BA)	3	2.40458704	0.80152901	51.29 **
CxA	6	0.04498203	0.00749701	<1
ERROR	36	0.56259755	0.01562771	
TOTAL	47	3.01380845		

** = ต่างกันทางสถิติโดยเทียบกับ LSD $_{.01}$

ns = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 2 ข้อมูลวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดของเผือกอ้อยที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการเติมฮอร์โมน BA และ NAA เป็นเวลานาน 4 เดือน โดยใช้ค่า Transformed to Log(X+1)

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	11	2.40887295	0.21898845	6.64 **
AUX (NAA)	2	0.00747353	0.00373676	<1
CYTO (BA)	3	2.27983160	0.75994387	23.04 **
CxA	6	0.12156782	0.02026130	<1
ERROR	36	1.18751403	0.03298650	
TOTAL	47	3.59638698		

** = ต่างกันทางสถิติโดยเทียบกับ LSD $_{.01}$

ns = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 3 ข้อมูลวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดของเผือกหอมดอยมูเซอร์ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการเติมฮอร์โมน BA และ NAA เป็นเวลานาน 4 เดือน โดยใช้ค่า Transformed to Log(X+1)

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	11	1.94841274	0.17712843	5.61 **
AUX (NAA)	2	0.01670246	0.00835123	<1
CYTO (BA)	3	1.86116786	0.62038929	19.65 **
CxA	6	0.07054243	0.01175707	<1
ERROR	36	1.13643798	0.03156772	
TOTAL	47	3.08485072		

** = ต่างกันทางสถิติโดยเทียบกับ LSD $_{.01}$

ns = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 4 ข้อมูลวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดของเผือกหอมพะเยาที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการเติมฮอร์โมน BA และ NAA เป็นเวลานาน 4 เดือน โดยใช้ค่า Transformed to Log(X+1)

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	11	2.15785437	0.19616858	9.60 **
AUX (NAA)	2	0.01740182	0.00870091	<1
CYTO (BA)	3	2.12458525	0.70819508	34.66 **
CxA	6	0.01586731	0.00264455	<1
ERROR	36	0.73559132	0.02043309	
TOTAL	47	2.89344570		

** = ต่างกันทางสถิติโดยเทียบกับ $LSD_{.01}$

ns = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ