รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2561

1. **ชุดโครงการวิจัย** **แผนงานวิจัยการอนุรักษ์ความหลากหลายของทรัพยากรพันธุกรรมพืช**
   Conservation of Plant Genetic Resources Biodiversity
2. **โครงการวิจัย** **เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร**
   Germplasm Conservation Technology for DOA Genebank
3. **ชื่อการทดลอง** **การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrification เพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช**
   Cryopreservation Technique in Taro Germplasm Using Vitrification Method for Genebank Conservation
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง พัฒน์นรี รักษ์คิด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมงาน พัชร ปิริยะวินิตร ปาริฉัตร สังข์สะอาด ทวีป หลวงแก้ว

5. **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 25^0c 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

6. คำนำ

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 เผือกเป็นพืชที่มีอายุหลาย

ปี (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 บำรุงไตและระงับอาการปวด (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) และการเก็บรักษาในสภาพ

เยือกแข็ง (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 วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในสภาพเยือกแข็งมีหลายวิธีได้แก่ 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)

7. 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 กันประมาณ 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 พันธุ์เผือกจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ เผือกไข่ เผือกอ้อย เผือกหอมดอยมูเซอ และเผือกหอมพะเยา โดยคำนวณผลเป็นอัตราการรอดชีวิต (recovery rate)

- เวลาและสถานที่

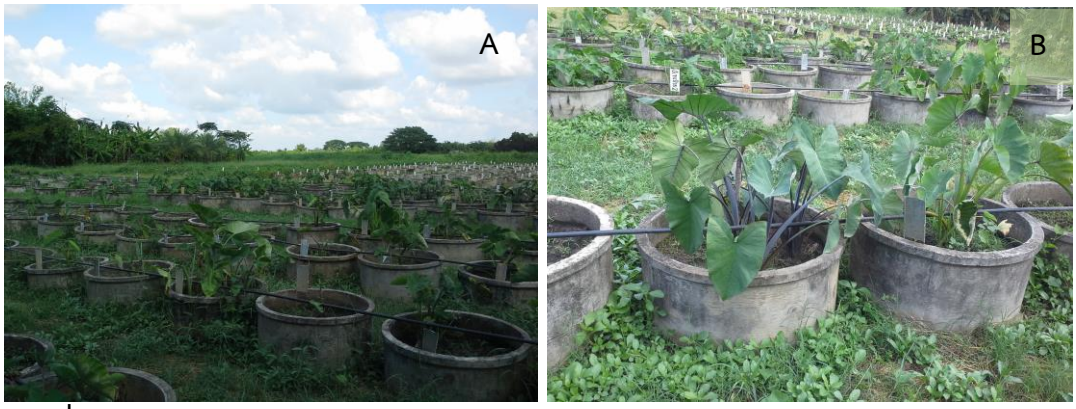
ระยะเวลาดำเนินการทดลอง	เริ่มตั้งแต่ ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2561
สถานที่ดำเนินการ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

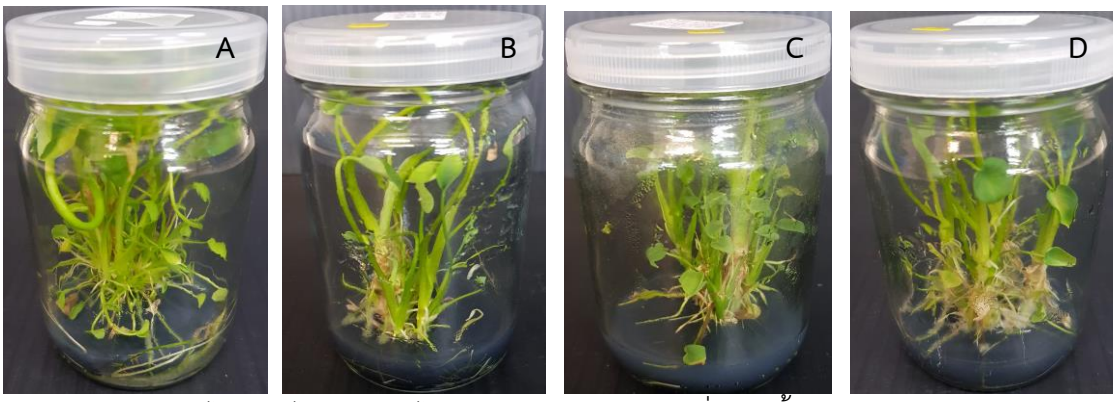
1. ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสูตรต่างๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดเผือก

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 ที่เติม

สารควบคุมการเจริญเติบกลุ่มโตไซโตไคนิน (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	เผือกไข่					เผือกอ้อย			
MS +	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 ที่ระดับความเชื่อมั่น 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	เผือกหอมดอยมูเซอ					เผือกหอมพะเยา			
MS +	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			

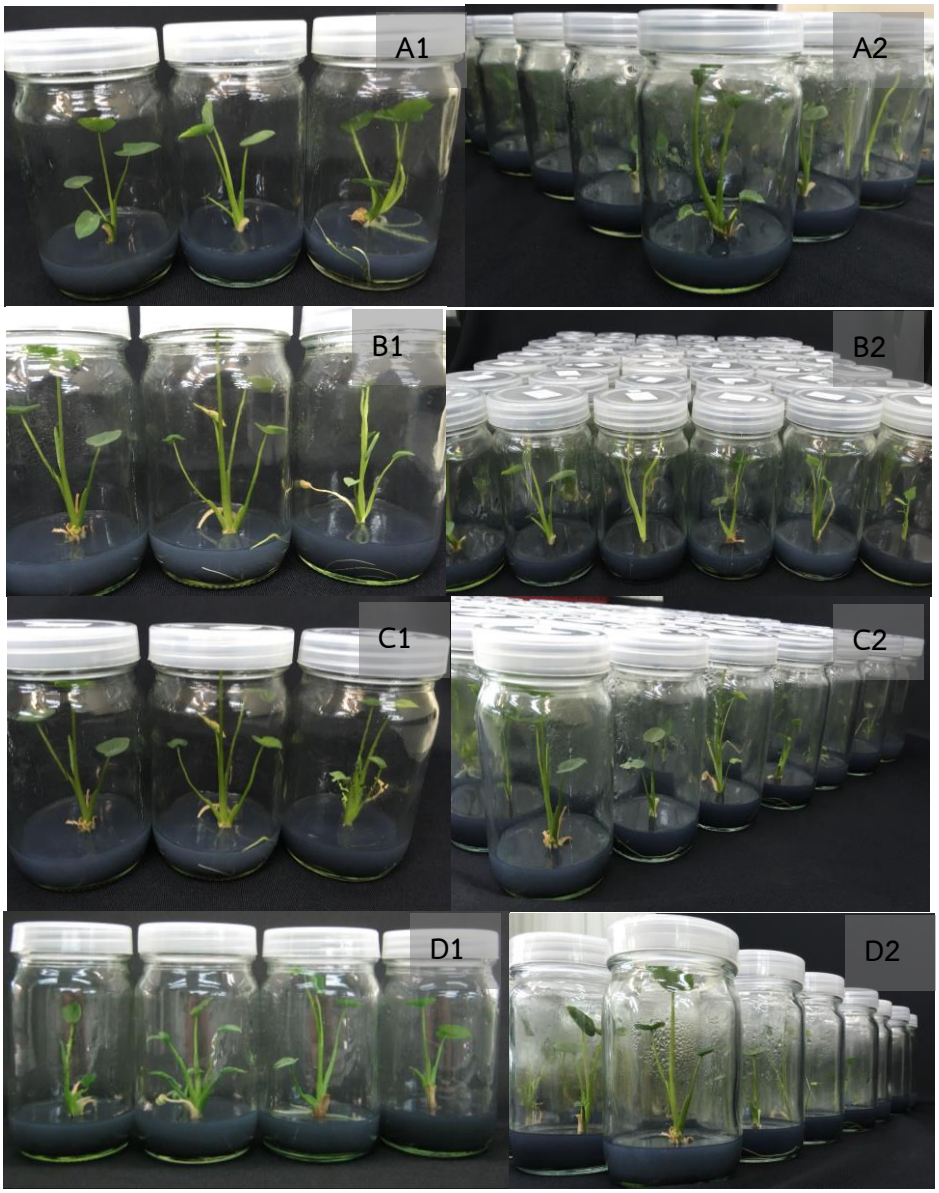
ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกับในแต่ละสูตรอาหารไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ความแตกต่างระหว่างสารกลุ่มไซโตไคนิน (BA) ใช้ตัวอักษร a, b, c

ความแตกต่างระหว่างสารกลุ่มออกซิน (NAA) ใช้ตัวอักษร x, y

ผลการทดลองครั้งนี้พบว่า การตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดเผือกเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากเป็นไปในทิศทางเดียวกันทั้ง 4 พันธุ์ คืออาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 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)



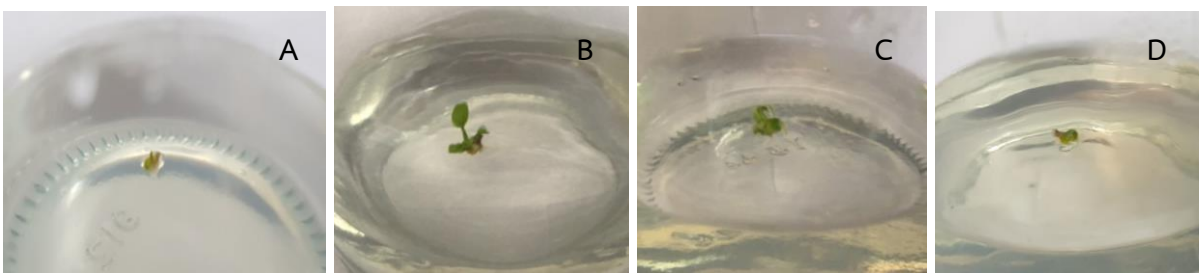
ภาพที่ 3 ต้นเผือกไม่หอม ได้แก่ ต้นเผือกไข่ (A1-2) และ ต้นเผือกอ้อย (B1-2) และ ต้นเผือกหอม ได้แก่ เผือกหอมดอยมูเซอ (C1-2) และ เผือกหอมพะเยา (D1-2) ที่ได้จากการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

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

9. 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

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากผลการทดลองนี้ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์เผือกในสภาพปลอดเชื้อ ได้เทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมเผือกของไทยในสภาพเยือกแข็งเพื่อการอนุรักษ์ระยะยาว และสามารถอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมเผือกของไทยในสภาพเยือกแข็งที่ธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

11. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตรและสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่สนับสนุนงบวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร สถานที่ทำการวิจัย และขอขอบคุณคณะผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่สนับสนุนและร่วมงานวิจัยอย่างเต็มที่

12. เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

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.

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

13. ภาคผนวก

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