บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

1. **การเก็บรักษายอดจำปีสิรินธรในหลอดทดลองระยะปานกลางในภาวะชะลอการเจริญ (minimal growth condition)**

การทดลองแบ่งเป็น 3 ชุด ได้แก่ การทดลองเพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาล และความเข้มข้นของสารชะลอการเจริญ โดยในแต่ละชุดการทดลองจะบันทึกผลทุกเดือน โดยไม่เปลี่ยนอาหารใหม่จนกว่าจะพบว่ายอดจำปีสิรินธรมีสีเหลืองทั้งยอดเกินครึ่งของจำนวนยอดทั้งหมดในการทดลองนั้นๆ จึงทำให้ในแต่ละชุดการทดลองมีระยะเวลาการเก็บรักษาแตกต่างกัน ตามที่ได้แสดงไว้ในบทที่ 4 ผลการทดลอง และเพื่อติดตามผลว่ายอดจำปีสิรินธรภายหลังการเก็บรักษายังคงมีชีวิตและสามารถกลับไปเจริญเติบโตตามปกติ จึงได้นำยอดจำปีสิรินธรที่ผ่านการทดลองเก็บรักษาและยังคงมีสีเขียว (คะแนนความแข็งแรง) อยู่ในระดับต่างๆ (ภาพที่ 1) ย้ายมาเลี้ยงใน regeneration medium เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตภายหลังการเก็บรักษาด้วย

1.1 **ผลของความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก (macronutrients) ในอาหารที่เก็บรักษา**

การเก็บรักษายอดจำปีสิรินธรในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักเปรียบเทียบกัน 3 ระดับ คือ MS, 3/4MS และ 1/2MS ทั้งนี้ใช้ micronutrients ตามปกติของสูตร MS

แม้ว่าการลดองค์ประกอบธาตุอาหารหลักลงเหลือเพียงครึ่งหนึ่งจะสามารถลดการเจริญและลดการเพิ่มจำนวนยอดของ *Ipsea malabarica* ลงในการเก็บรักษาเป็นเวลา 20 เดือน (Martin and Pradeep, 2003) และช่วยให้เก็บรักษา *Eucalyptus grandis* ได้นานถึง 10 เดือน (Watt *et al.*, 2000) แต่ในกรณีของจำปีสิรินธร แม้ปลายยอดที่เก็บรักษาในสูตรอาหาร 1/2MS ในระยะเดือนแรกและเดือนที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่คะแนนความแข็งแรงอยู่ในระดับต่ำ คือมีค่า 2.08±0.24 คะแนน ในเดือนที่ 2 และบริเวณรอบๆ ฐานของยอดจำปีสิรินธรเกิดสีน้ำตาลจำนวนมาก ความสูงเฉลี่ยและจำนวนใบลดลงตามลำดับ และในเดือนที่ 3 คะแนนความแข็งแรงเหลือ 1.08±0.14 คะแนน ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำลงเหลือเพียง 40.0±9.0 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) การเกิดสีน้ำตาลบริเวณรอบๆ ฐานจากการปล่อย phenolic compound จากเนื้อเยื่อพืชทำให้เป็นอุปสรรค์ต่อการดูดซึมสารอาหาร และเป็นพิษต่อพืช พืชลดการเจริญและความแข็งแรงลง เช่นเดียวกับการเก็บรักษาปลายยอดของต้น *Enset ventricosum* (Negash *et al.*, 2001) ปลายยอดที่เก็บรักษาในอาหาร MS ซึ่งเป็นสูตรที่มีธาตุอาหารครบถ้วน ยอดจำปีสิรินธรสามารถใช้ในการเจริญอย่างรวดเร็ว ใน

เดือนแรก โดยปกติแล้วยอดจำปีสิรินธรจำเป็นที่จะต้องได้รับธาตุอาหารเพียงพอและเปลี่ยนอาหารทุกเดือน (ศิริกุล เกษา และคณะ, 2547) เมื่อไม่เปลี่ยนอาหารใหม่ธาตุอาหารไม่เพียงพอยอดจำปีสิรินธรจะเริ่มอ่อนแอลงในเดือนที่ 2 และมีอาการเหี่ยวอย่างชัดเจนในเดือนที่ 3 คือ ยอดจำปีสิรินธรจะมีลักษณะสีเหลืองทั้งยอด และความสูงเฉลี่ยลดลง ความจำกัดของสารอาหารทำให้คะแนนความแข็งแรงลดลงอย่างชัดเจนเหลือ 1.27±0.14 คะแนน และมีอัตราการรอดชีวิตต่ำลงเหลือ 36.6±8.9 เปอร์เซ็นต์ จึงจะเห็นได้ว่า MS มีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตทำให้อาหารถูกใช้หมดเร็ว สังเกตได้จากปริมาณอาหารวุ้นที่ลดลง ตรงกับรายงานของ Adelbegrh และคณะ (1997) ที่เลี้ยงกล้วยไม้ *Cattleya* ที่เป็นพืชโตช้าบนอาหาร MS มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูง 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มความสูงและขนาดต้นได้ในช่วง 2 เดือนแรก แต่เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์ และมีการเจริญลดลงด้วยในเดือนที่ 3 การลดองค์ประกอบธาตุอาหารหลักให้ต่ำลงจากความต้องการตามปกติของพืชสามารถยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อเยื่อ *Colocasia esculenta* ได้นานถึง 8 เดือน โดยไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารและพบว่าอัตราการเจริญไม่เปลี่ยนแปลง (Bessembinder *et al.*, 1993) จากการทดลองกับจำปีสิรินธรพบว่า ยอดจำปีสิรินธรที่เก็บรักษาโดยเลี้ยงบนสูตรอาหาร 3/4MS ซึ่งเป็นสูตรที่ลดองค์ประกอบธาตุอาหารหลักเหลือ 3/4ส่วนสามารถเก็บรักษาได้นานกว่าการเลี้ยงบน MS และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต รวมทั้งคะแนนความแข็งแรงอยู่ในเกณฑ์ดีกว่า กล่าวคือ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในเดือนที่ 3 ยังสูงถึง 73.3±8.2 เปอร์เซ็นต์ และในเดือนที่ 4 ลดลงเหลือ 43.3±9.2 เปอร์เซ็นต์ ด้วย คะแนนความแข็งแรงสูงถึง 2.08±0.24 คะแนน ซึ่งอยู่ในระดับที่เชื่อมั่นได้ว่าจะสามารถนำไปเลี้ยงให้กลับมีการเจริญเป็นปกติได้ ความสูงเฉลี่ยและจำนวนใบเฉลี่ยค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ในเดือนที่ 2 และ 3 และจะคงที่ในเดือนที่ 4 เป็นเพราะยอดจำปีสิรินธรมีอัตราการเจริญช้ากว่าสูตรอาหาร MS และสังเกตว่าอาหารยังมีปริมาณลดลงน้อยกว่าการเลี้ยงบนอาหาร MS และเกิดสีน้ำตาลบริเวณส่วนฐานของยอดจำปีสิรินธร น้อยกว่า 1/2MS และสามารถเก็บรักษาได้นานที่สุดถึง 4 เดือน (ตารางที่ 2)

การเจริญของตาข้างพบน้อยมากในทุกการทดลองแม้แต่ในอาหาร MS ซึ่งเฉลี่ยแล้วมีจำนวนตาข้างที่มีการเจริญอย่างมากที่สุดเพียง 0.2±0.07 ตา เท่านั้นในเดือนที่ 2 แต่ยอดมีอาการเหี่ยวเหลืองอมน้ำตาล ส่วนในอาหาร 3/4MS พบว่ามีจำนวนตาข้างที่เจริญเพิ่มขึ้นในเดือนที่ 3 และมากขึ้นต่อเนื่องในเดือนที่ 4 จำนวนใบเฉลี่ยจึงมีค่าสูงกว่าใน การทดลองอื่นๆ ในขณะที่ความสูงเฉลี่ยเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนคงที่ 1.28±0.08 เซนติเมตร ยอดยังมีสีเขียวด้วยคะแนน 2.08±0.24 คะแนน ในขณะที่ยอด ในอาหาร 1/2MS มีอาการเหลืองโคนเป็นสีน้ำตาลมาก ใบร่วง และมีจำนวนตาข้างที่มีการเจริญลดลงมากที่สุด (ตารางที่ 2) สอดคล้องกับผลการศึกษาศึกษาการเก็บรักษาปลายยอดของต้น *Enset*

ventricosum ด้วยอาหารสูตร MS และ1/2MS พบว่าจำนวนตาข้างที่เกิดมีจำนวนลดลงตามระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักที่ลดลง เมื่อเลี้ยงเป็นเวลานาน 2 เดือน (Negash *et al.*, 2001)

จากการนำข้อมูลค่าต่างๆ ที่บันทึกได้จากการทดลองเก็บรักษาปลายยอดในอาหาร 3/4MS ตั้งแต่เดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 4 ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือประมาณครึ่งหนึ่งมาคำนวนเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อพิจารณาความแตกต่างในแง่มุมต่างๆ ของยอดที่นำมาเก็บรักษาในการทดลองนี้ ซึ่งสามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานานที่สุดว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่ต่างกันทางสถิติหรือไม่ พบว่ายิ่งเวลาการเก็บรักษามากขึ้นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตยิ่งต่ำลงและเริ่มต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 4 เดือน ด้วยปริมาตรอาหารประมาณ 20 มิลลิลิตร ในขวดเพาะเลี้ยง จากคะแนนความแข็งแรงของยอด พบว่าใน 2 เดือนแรกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เริ่มมีคะแนนความแข็งแรงลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเดือนที่ 3 และลดลงอีกระดับหนึ่งในเดือนที่ 4 แต่ค่าคะแนนความแข้งแรงก็ยังเกิน 2 คะแนน ซึ่งหมายถึงยอดยังคงมีสีเขียวอมเหลือง ส่วนความสูง จำนวนใบและจำนวนตาข้างที่มีการเจริญ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงจนแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งหมายถึงความสามารถในการชะลอการเจริญของยอดจำปีสิรินธรได้ในระดับคงที่ (ตารางที่ 3)

การรอดชีวิดของยอดจำปีสิรินธรภายหลังการเก็บรักษาในอาหารที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก ทั้ง 3 ระดับ

จากการนำยอดจำปีลิรินธรภายหลังการเก็บรักษาในอาหารทั้ง 3 สูตร มาเลี้ยงบน regeneration medium ประกอบด้วย MS ร่วมกับ IBA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ศิริกุล เกษา และคณะ, 2547) เป็นเวลานาน 2 เดือน พบว่ายอดจำปีสิรินธรที่เหลือรอดชีวิตหลังการเก็บรักษาในอาหารสูตร MS และ 3/4MS ทั้งหมดสามารถกลับมาเจริญเติบโตได้อีกครั้งใน regeneration medium (ตารางที่ 4) ยกเว้นยอดที่เก็บรักษาใน 1/2MS ซึ่งมีคะแนนความแข็งแรงหลังการเก็บรักษาเพียง 1.08±0.15 คะแนน เมื่อนำมาเลี้ยงใน regeneration medium เป็นเวลา 2 เดือน มีอัตราการรอดชีวิต 75.0±13.10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความแข็งแรงของยอดเมื่อเลี้ยงบน regeneration medium ครบ 2 เดือน แล้วพบว่าทุกการทดลองยอดมีลักษณะแข็งแรงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนความสูงและจำนวนใบ พบว่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นยอดที่ผ่านการเก็บรักษาในอาหาร 3/4MS ยังคงอยู่ในสภาวะชะลอการเจริญแม้จะย้ายมาลี้ยงใน regeneration medium แล้วความสูงและจำนวนใบที่เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในขณะที่จำนวนตาข้างที่มีการเจริญไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่เป็นที่สังเกตว่ายอดที่ผ่านการเก็บรักษาในอาหาร 3/4MS เพียงการทดลองเดียวที่มีรากเกิดขึ้นที่ฐานของยอดเฉลี่ย 1.38±0.18 ราก/ยอด ซึ่งอาจเป็นเพราะอาหาร 3/4MS มีระดับเกลือ

แอมโมเนียมต่ำกว่า MS จึงมีผลให้เกิดรากได้ดีกว่า เช่นเดียวกับการทดลองใน philodendron ที่นำยอดมาเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดรากโดยใช้อาหาร MS, 3/4MS และ 1/2MS พบว่าธาตุอาหาร 3/4MS และ 1/2MS สามารถเพิ่มจำนวนรากได้ดีกว่าสูตรอาหาร MS (Sriskandarjhi and Skirvin, 1991) แต่ในกรณีของจำปีสิรินธร อาหาร 1/2MS อาจไม่เพียงพอทำให้ไม่พบการเกิดราก

1.2 ผลของความเข้มข้นและชนิดของน้ำตาลในอาหารที่ใช้ในการเก็บรักษา

การเก็บรักษายอดจำปีสิรินธรในอาหารที่มีน้ำตาล 2 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ได้แก่ sucrose 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ใช้ร่วมกับ mannitol 0 ,10 และ 20 กรัมต่อลิตร

จากการทดลองในข้อ 1.1 ที่พบว่าอาหาร 3/4MS ให้ผลดีที่สุดในการเก็บรักษายอดจำปีสิรินธร ในการศึกษาผลของความเข้มข้นและชนิดของน้ำตาล sucrose และ mannitol จึงเลือกอาหาร 3/4MS มาใช้ในการทดลองการเติม mannitol 10 และ 20 กรัมต่อลิตร โดยใช้ร่วมกับ sucrose 20 และ 30 กรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์และคะแนนความแข็งแรงลดลงตามระดับ mannitol ที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 5) เนื่องจาก mannitol เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่มีไว้เป็นพลังงานสำรองที่พืชสะสมไว้ทดแทนการขาด sucrose พืชสามารถสร้าง mannitol ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยจะเปลี่ยนจาก mannose ที่มีพลังงานต่ำ กลายเป็น mannitol ที่มีพลังงานสูง นอกจากนี้ mannitol มีผลต่อการเกิด osmotic stress ภายในเซลล์ (Vinocur and Altman, 2005) หากเติม mannitol ที่ระดับความเข้มข้นสูงย่อมส่งผลต่อค่า osmotic potential ของอาหารให้ลดต่ำลง ซึ่งจากการเปรียบเทียบค่า osmotic potential ในอาหารที่เติม mannitol 10 กรัมต่อลิตร มีค่า –0.44 MPa ส่วน sucrose 10 กรัมต่อลิตร มีค่า –0.36 MPa และหากเพิ่ม mannitol เป็น 30 กรัมต่อลิตร มีค่า osmotic potential -0.73 MPa ส่วน sucrose 30 กรัมต่อลิตร มีค่า -0.51 MPa (Vitova *et al.*, 2002) จะเห็นว่ายิ่งค่า osmotic potential ที่เกิดจาก mannitol ติดลบมากกว่า sucrose ที่มีความเข้มข้นเท่ากันเมื่อนำไปใช้ร่วมกันค่า osmotic potential ของสารละลายจะยิ่งสูง ซึ่งมีผลต่อการแพร่ของน้ำเข้าสู่เซลล์พืช พืชจึงนำน้ำไปใช้ได้ยากในภาวะที่พืชขาดน้ำ mannitol ที่พืชเปลี่ยนจาก mannose จะสะสมในชั้น mesophyll มาก พืชจึงอยู่ในภาวะ osmotic stress มากขึ้น (Guicherd *et al.*,1997) และยิ่งกว่านั้นจะกระตุ้นให้พืชสร้าง ethylene สูงขึ้น ทำให้ใบร่วงและเข้าสู่สภาวะเสื่อมถอย (Sarkar *et al.*, 1999) สังเกตจากการเกิดสีน้ำตาลที่ส่วนฐานของยอดจำปีสิรินธรที่เกิดมากตั้งแต่เดือนแรก ทำให้ความแข็งแรงและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำลำต้นเหี่ยวชัดเจน ในสภาพธรรมชาติจำปีสิรินธรอาศัยในป่าพรุน้ำจืดที่มีน้ำไหลผ่าน ธาตุอาหารที่ได้น่าจะจึงมีความเข้มข้นไม่สูงมากเหมาะต่อการเจริญเติบโตของพืชชนิดนี้ ดังนั้นการเติม sucrose เพียงอย่างเดียวสามารถเก็บรักษาได้ดีกว่าการเติม mannitol ร่วมด้วย และจากการทดลองพบว่า sucrose

30 กรัมต่อลิตร สามารถเก็บรักษายอดจำปีสิรินธรได้นาน 4 เดือน (ตารางที่ 5) ซึ่งตรงกับรายงานของ Tahtamouni และคณะ (2001) ที่เก็บรักษาปลายยอดของ *Pyrus syriaca* Boiss. ที่มีน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร เก็บรักษาได้นาน 4 เดือน แต่หากเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นเป็น 60, 90 และ 120 กรัมต่อลิตร จะเกิดสภาวะ stress ทันทีสังเกตจากการเกิดสีน้ำตาลที่ส่วนฐานของยอด จากการทดลองการเก็บรักษาปลายยอดจำปีสิรินธรในครั้งนี้พบว่าการลดน้ำตาล sucrose เหลือ 20 กรัมต่อลิตร ให้ผลดีกว่า 30 กรัมต่อลิตรและทำให้สามารถเก็บรักษายอดได้นาน 6-7 เดือน (ตารางที่ 5) โดยที่ 5 เดือนแรกคะแนนความแข็งแรงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในขณะที่การเจริญด้านความสูงและจำนวนใบถูกชะลอให้คงที่ตั้งแต่เดือนที่ 2 จนถึงเดือนที่ 7 คะแนนความแข็งแรงเริ่มลดลงโดยมีความแตกต่างทางสถิติในเดือนที่ 6 แต่ก็ยังมีสีเขียวด้วย คะแนน 2.09±0.06 คะแนน อัตราการรอดชีวิตสูงถึง 73.3±8.21 เปอร์เซ็นต์ และตกต่ำลงอีกระดับหนึ่งในเดือนที่ 7 (ตารางที่ 6) ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานการเก็บรักษาปลายยอด coffee (*Coffea* spp.) ที่เก็บรักษาได้ 6-7 เดือน โดยใช้ sucrose 20 กรัมต่อลิตร เช่นกัน (Desbrunaisl *et al.*,1992)

การเติม mannitol ทุกระดับความเข้มข้นร่วมกับ sucrose 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ไม่พบการเจริญของตาข้างเพราะยอดจำปีสิรินธรมีระดับความแข็งแรงต่ำ ส่วนการเติม sucrose 20 กรัมต่อลิตร มีจำนวนตาข้างเพิ่มขึ้นค่อนข้างช้าและคงที่ (ตารางที่ 5) เพราะแหล่งพลังงานมีจำกัดทั้งนี้ไม่ต่างจากการใช้ sucrose 30 กรัมต่อลิตร มากนัก แต่ในรายงานที่ทดลองใน coffee (*Coffea* spp.) พบว่าหากแหล่งพลังงานมีมากขึ้นโดยการเติม sucrose 30 กรัมต่อลิตร การเพิ่มจำนวนตาข้างก็เพิ่มขึ้นด้วย (Desbrunaisl *et al.*, 1992)

การรอดชีวิตของยอดจำปีสิรินธรภายหลังการเก็บรักษาในอาหารที่มีน้ำตาล 2 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

ยอดจำปีสิรินธรที่เก็บรักษาในอาหารที่เติม mannitol 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ sucrose 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ไม่สามารถรอดชีวิตได้เลยเมื่อย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร regeneration medium เพราะผลของสภาพความแข็งแรงที่ลดลงมากจากการเลี้ยงบนอาหารที่ก่อให้เกิด osmotic stress สูงเกินไป ส่วนการเติม mannitol 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ sucrose 20 และ30 กรัมต่อลิตร และการเติม sucrose 20 และ 30 กรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวในอาหารเก็บรักษา ยอดสามารถกลับมาเจริญเติบโตได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นในเวลา 2 เดือน (ตารางที่ 7) แสดงว่า osmotic stress ในระดับดังกล่าวระหว่างการเก็บรักษาเป็นภาวะที่ยอดจำปีสิรินธรสามารถทนได้ เช่นเดียวกับปลายยอดของ celery (*Apium graveolens*) ที่เก็บรักษาบนอาหารที่เติม mannitol 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ

sucrose 20 และ 30 กรัมต่อลิตร (Vitova *et al.*, 2002) สามารถพัฒนาเป็นต้นได้สมบูรณ์ เมื่อนำมาทดสอบการรอดชีวิตบนอาหารปกติ แม้ว่ายอดจาก Treatment ที่เติม mannitol 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ sucrose 20 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มเจริญสูงขึ้นและมีจำนวนใบเพิ่มขึ้นได้ดีกว่ายอดที่มาจากการทดลองที่เติม mannitol 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ sucrose 30 กรัมต่อลิตร แต่ไม่ดีกว่าการเติม sucrose 20 และ 30 กรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว ที่พบว่ายอดสามารถเพิ่มความสูง จำนวนใบ และมีการเจริญของตาข้างได้ แม้จะผ่านเวลาในการเก็บรักษานานต่างกันมากก็ตามจากผลการทดลองในตารางที่ 7 จะเห็นว่ายอดที่ผ่านการเก็บรักษาโดยใช้ sucrose 20 กรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวสามารถกลับมาเจริญเติบโตได้ใกล้เคียงกับยอดที่เก็บรักษาในอาหารที่มี sucrose 30 กรัมต่อลิตร โดยเริ่มฟื้นตัวด้วยคะแนนความแข็งแรง ถึงระดับ 2 คะแนน ตั้งแต่ในเดือนแรกและแข็งแรงดีขึ้นเป็นปกติในเดือนที่ 2 โดยมีค่าเฉลี่ยความแข็งแรง ความสูงและจำนวนใบสูงกว่าเล็กน้อย แต่ยอดผ่านการเก็บรักษาในอาหารที่เติม sucrose 30 กรัมต่อลิตร มีการเจริญของตาข้างมากกว่าเล็กน้อยและมีราก 2.09±0.1 ราก/ยอด ในเดือนที่ 2 ของการเลี้ยง (ตารางที่ 7) การเพิ่มความเข้มข้นของ sucrose มีผลช่วยเพิ่มการสังเคราะห์แสงเองของพืช *Rosa* spp. ในขณะที่เลี้ยงบน regeneration medium (Capellades *et al.*,1991) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณจำนวนตาข้างมักอยู่ในช่วง 20-40 กรัมต่อลิตร (George and Sherrington,1984) ส่วนการชักนำการเกิดรากอาจเพิ่มจำนวนได้ตามระดับความเข้มข้นของ sucrose ที่เพิ่มขึ้นช่วง 30-40 กรัมต่อลิตร (Lane, 1978)

1.3 ผลของความเข้มข้นของสารชะลอการเจริญเติบโตในอาหารที่ใช้เก็บรักษาการเก็บรักษายอดจำปีสิรินธรในอาหารที่เติมสารชะลอการเจริญ paclobutrazol ที่ระดับ 0, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสูตรอาหาร 3/4MS และ sucrose 20 กรัมต่อลิตร

การเติม paclobutrazol ที่ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหาร 3/4MS ที่มี sucrose 20 กรัมต่อลิตร สามารถเก็บรักษายอดจำปีสิรินธรได้เพียง 4 เดือน คะแนนความแข็งแรงลดลงเหลือ 1.25±0.13 คะแนน ในช่วงเดือนที่ 2 ส่วนฐานของลำต้นข้อแรกมีการสร้าง phenolic compound ออกมาในอาหาร อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอย่างเห็นได้ชัด ส่วนยอดจำปีสิรินธรค่อยๆ อ่อนแอลงใบเป็นสีเหลือง ขณะที่การไม่เติม paclobutrazol สามารถเก็บรักษาได้นานถึง 7 เดือน มีคะแนนความแข็งแรงภายหลังการเก็บรักษา 1.38±0.14 คะแนน เนื้อเยื่อไม่มีการสร้าง phenolic compound แต่พื้นผิวอาหารแข็งและแตกออกเป็นลักษณะอาหารถูกใช้หมดไปตามเวลาการเก็บรักษา ส่วนยอดจำปีสิรินธรมีการเจริญเติบโตได้อย่างชัดเจนใบมีสีเขียว ต้นสูงจนถึงเดือนที่ 6 ของการเก็บรักษา หลังจากนั้น

จึงค่อยอ่อนแอลงเพราะอาหารจำกัด ส่วนการเติม paclobutrazol 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชะลอการเจริญและเก็บรักษาได้นาน 8 เดือน คะแนนความแข็งแรงสูงไม่แตกต่างจากตอนเริ่มต้นการทดลองตลอด 5 เดือนแรก และเริ่มลดลงบ้างในเดือนที่ 6 และเมื่อเก็บรักษาจนถึงเดือนที่ 8 คะแนนความแข็งแรงลดลงอีกระดับหนึ่งเป็น 1.54±0.20 คะแนน จากรายงานของ Wood (1984) กล่าวว่าการใช้สาร paclobutrazol ความเข้มข้น 10-15 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยให้มีการสะสมอาหารภายในต้นมากขึ้น เมื่ออาหารที่เลี้ยงหมดพืชจะใช้อาหารที่สะสมไว้แทนจนกว่าอาหารที่สะสมจะหมด ซึ่งน่าจะมีส่วนช่วยให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้

paclobutrazol เป็นสารในกลุ่มชะลอการเจริญที่มีผลชะลอการยืดตัวของยอดและปล้อง โดยไปขัดขวางขบวนการ oxidation ของ keurene ไม่ให้เปลี่ยนไปเป็น gibberellins ต่อไปในพืช (Dalziel and Lawrence, 1984) และมีผลต่อการสังเคราะห์ gibberellins โดยการเติม paclobutrazol 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชะลอการเจริญให้ความสูงคงที่ตลอดทั้ง 4 เดือน ของการเก็บรักษายอดจำปีสิรินธร ลักษณะยอดมีข้อถี่ ปล้องสั้นมากเช่นเดียวกับการเติม paclobutrazol 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ความสูงเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและจะคงที่ ปล้องสั้นลง ส่วนจำนวนใบเฉลี่ยจะพบว่าการเติม paclobutrazol 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดยังสามารถเพิ่มจำนวนใบได้ (ตารางที่ 9 และ 10) เช่นเดียวกับรายงานของ Chen และคณะ (2005) ที่ใช้ paclobutrazol ความเข้มข้นต่ำ 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการเลี้ยง daylily (*Hemerocallis* spp.) เป็นเวลา 3 เดือน พืชยังมีจำนวนใบเพิ่มขึ้นได้ ในขณะที่การใช้ paclobutrazol 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้จำนวนใบลดลง Ziv และ Ariel (1991) ได้รายงานการทดลองเพิ่มปริมาณยอดของ philodendron โดยเติม paclobutrazol ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเหลวพบว่ามีผลยับยั้งการเกิดใบใหม่ เนื่องจาก paclobutrazol ยังยับยั้งการแบ่งเซลล์ใบ แต่ทำให้ใบหนาขึ้นและมีการสะสม chlorophyll เพิ่มขึ้นซึ่ง chlorophyll ที่เพิ่มขึ้นจะไปมีผลต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงในพืชทำให้พืชมีการสะสมอาหารมากขึ้น (Wang *et al.*,1985) เช่นเดียวกับการใช้ paclobutrazol เพิ่มการสังเคราะห์ด้วยแสงของข้าวโพดในระยะต้นอ่อน (Khalil and Rahman, 1995) แต่ต้องใช้ในปริมาณที่ไม่มากมิฉะนั้นจะเกิดพิษต่อพืชได้ สำหรับการชะลอการเจริญของยอดจำปีสิรินธรที่ใช้ paclobutrazol ความเข้มข้นสูงถึง 20 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ใบมีสีเหลืองทั้งใบในเดือนที่ 2 ส่วนการเจริญของตาข้างพบว่าการเติม paclobutrazol ทุกระดับความเข้มข้นไม่มีผลต่อจำนวนตาข้างที่เจริญเพราะ paclobutrazol เป็นสารชะลอการเจริญเติบโตสามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ได้ โดยหากเทียบกับการไม่เติม paclobutrazol จะพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนตาข้างที่มีการเจริญได้ชัดเจน (ตารางที่ 8)

การรอดชีวิตของยอดจำปีสิรินธรภายหลังการเก็บรักษาในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารชะลอการเจริญ

หลังจากที่ยอดจำปีสิรินธรได้ผ่านการเก็บรักษาบนอาหาร ชะลอการเจริญ 3/4MS ที่เติม sucrose 20 กรัมต่อลิตร และ paclobutrazol ระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน เป็นระยะเวลาต่างกัน จนมีอัตราการรอดชีวิตเริ่มต่ำกว่าครึ่งหนึ่งโดยที่การทดลองที่ไม่เติม paclobutrazol เก็บรักษาได้นาน 7 เดือน การทดลองที่เติม paclobutrazol 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บรักษาได้ 8 เดือน และ paclobutrazol 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บรักษา 4 เดือน หลังจากนั้นนำปลายยอดที่ผ่านการเก็บรักษาบนอาหารทั้ง 3 สูตร ข้างต้นที่เหลือรอดมาเลี้ยงบน regeneration medium เป็นเวลานาน 2 เดือน ยอดจำปีสิรินธรสามารถกลับมาเจริญได้ทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์ โดยยอดที่เก็บรักษาใน paclobutrazol ที่ 0 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญเติบโตด้านความแข็งแรงไม่ต่างกันแสดงว่ายอดจำปีสิรินธรสามารถปรับตัวต่ออาหารโดยไม่ได้รับผลกระทบจากการขาดธาตุอาหารเลย แม้การเติม paclobutrazol 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็มีผลกระทบเล็กน้อยแต่ยังอยู่ในเกณฑ์ที่ปรับตัวได้ โดยยอดจำปีสิรินธรยังคงมีสีเขียวอ่อนด้วยคะแนนความแข็งแรง 2.00±0.14 คะแนน เมื่อเลี้ยงครบ 2 เดือน (ตารางที่ 10) แต่ด้านความสูงยังพบผลกระทบอยู่บ้างจาก paclobutrazol ที่อาจตกค้างอยู่ทำให้มีผลชะลอการเจริญ ความสูงจะเพิ่มน้อยกว่าและไม่เพิ่มเลยในการทดลองที่เคยได้รับ paclobutrazol 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นไปได้ว่า paclobutrazol เริ่มหมดไปทำให้ kaurene ซึ่งถูกสะสมไว้เปลี่ยนไปเป็น kaurenoic acid มากขึ้นทำให้มีการสังเคราะห์ gibberellins ในพืชได้มากขึ้น (Douglas and Hontz, 1988) ส่วนการใช้ paclobutrazol 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เคยได้รับหมดฤทธิ์ช้ากว่าจึงยังแสดงผลในการยับยั้งการเจริญทางลำต้นช้าทำให้ความสูงคงที่ เพราะสารนี้จะถูกส่งมาทางท่อลำเลียงและสะสมไว้มากที่บริเวณลำต้น (Albany *et al.*, 2005) จึงแสดงออกที่บริเวณต้นมากกว่าใบ จึงยังสามารถเกิดใบใหม่ได้บ้าง แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่การทดลองที่เคยได้รับ paclobutrazol 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเพิ่มจำนวนใบอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับจำนวนตาข้างที่มีการเจริญยังไม่เพิ่มขึ้นจากเดิม ทั้งสูตรอาหารที่เติมและไม่เติม paclobutrazol เป็นเพราะยังต้องอาศัยเวลาในการปรับตัวจากภาวะการชะลอการเจริญของอาหารที่ใช้ อย่างไรก็ดียอดที่ผ่านการเก็บรักษาในอาหารที่เติม paclobutrazol 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นการทดลองเดียวที่พบว่ามีรากระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 8 เดือน ซึ่งอาจเป็นเพราะ paclobutrazol สามารถยับยั้งการสร้างและการทำงานของ gibberellins (Desjardin *et al.*, 1987) gibberellins มีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ได้ (Hartmann *et al.*, 1997) เมื่อ gibberellins ถูกยับยั้งจึงอาจช่วยให้พืชมีการแบ่งเซลล์สร้างรากได้เมื่อย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร regeneration medium รากเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

ตั้งแต่ในเดือนที่ 2 อาจเป็นเพราะ paclobutrazol หมดไปส่งผลต่อการตอบสนองต่อ IBA ซึ่งเป็นออกซินใน regeneration medium ลักษณะรากจะสั้นใหญ่ไม่ยืดยาว

ดังนั้นจากการทดลองครั้งนี้สูตรอาหารที่น่าจะเหมาะสมที่สุดสำหรับการเก็บรักษายอดจำปีสิรินธรในหลอดทดลองในระยะปานกลางในภาวะการชะลอการเจริญ คือ 3/4MS ที่เติม sucrose 20 กรัมต่อลิตร และ paclobutrazol 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะเก็บรักษายอดได้นาน 7-8 เดือน โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหารและมีอัตราการรอดชีวิต 73.3±8.21 เปอร์เซ็นต์ ในเดือนที่ 7 และ 46.6±9.26 เปอร์เซ็นต์ ในเดือนที่ 8 เมื่อนำมาเลี้ยงบน regeneration medium สามารถเจริญเติบโตกลับฟื้นเป็นต้นปกติได้ทั้งหมดและมีรากเกิดขึ้นด้วย ซึ่งช่วยให้ได้ต้นจำปีสิรินธรที่พร้อมจะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้เป็นอย่างดี

2. **การเก็บรักษายอดจำปีสิรินธรในหลอดทดลองระยะยาวในไนโตรเจนเหลว** (cryopreservation) **โดยวิธี** encapsulation-vitrification

การศึกษาหาระดับอุณหภูมิ และระยะเวลา ที่เหมาะสมในขั้นตอนต่างๆ ของการเตรียมความพร้อมปลายยอดจำปีสิรินธรก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวโดยวิธี encapsulation-vitrification

การทำ preculture เป็นการเตรียมความพร้อมแก่ปลายยอดจำปีสิรินธรเพื่อให้เพิ่มความทนทานต่อการดึงน้ำออก (dehydration) และทนทานต่อความเย็นในสภาพเยื่อกแข็งในไนโตรเจนเหลว ซึ่งส่วนสำคัญ ในการทำ preculture มี 2 ปัจจัย ที่เกี่ยวข้องกัน ได้แก่ อุณหภูมิ และความเข้มข้นของน้ำตาล กล่าวคือ การลดอุณหภูมิเป็นการลดกระบวนการเมทาบอลิซึมช่วยให้มีการสะสมน้ำตาลภายในเนื้อเยื่อมากขึ้น ส่วนการดึงน้ำภายในเซลล์ออกจะต้องอาศัยน้ำตาลความเข้มข้นสูง 0.3-1.0 M เพื่อลดการเกิดผลึกน้ำแข็งที่จะทำอันตรายในเซลล์ ดังรายงานในพืชต่อไปนี้ สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของปลายยอด malus (Paul *et.al.*, 2000), vitis (Wang *et.al.*, 2004) และ *Poncirus trifoliata* X *Citrus sinensis* (Wang *et.al.*, 2002a,b) ในทางตรงกันข้ามการเตรียมความพร้อมปลายยอดจำปีสิรินธร โดยการทำ cold hardening ที่ 15 องศาเซลเซียส และการใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูงมีผลให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11) เพราะเนื้อเยื่อเกิดความเสียหายเนื่องจากอุณหภูมิต่ำในระดับนั้นรุนแรงกับพืชเขตร้อนทำให้ตายอดที่อยู่ตายได้ (Steponkus, 1984) นอกจากนั้นการใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงในขั้นตอนการแช่ osmoprotective solution และ PVS_2 มีผลต่อการสูญเสียน้ำทำให้เป็นอันตรายต่อปลายยอดของพืชได้ เช่นกัน ดังมีรายงานใน vitis (Plessis *et.al.*, 1991) eucalyptus (Poissonnier *et.al.*, 1992) และ *Poncirus trifoliata* (Gonzalez-Arnao *et.al.*, 1998) สำหรับการทำ preculture ที่ 25 องศาเซลเซียส ในอาหาร MS ที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง

0.3 M แล้วนำไปทำ encapsulation เพื่อเป็นเม็ด beads พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพียง 60.0±9.0 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12) อีก 40 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่รอดชีวิตอาจมีสาเหตุเนื่องจากการตัดชิ้นส่วนปลายยอดที่มีขนาดเล็กมากซึ่งต้องย้ายมาทำ preculture ที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง และผ่านขั้นตอนการทำ beads ที่อาจกระทบกระเทือนตายอด ซึ่งต้องใช้ความชำนาญในระดับหนึ่ง การแช่เม็ด beads ใน osmoprotective solution เป็นเวลา 60 นาที ไม่ได้มีผลลบต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (63.3±8.9 เปอร์เซ็นต์) เพราะในสารละลาย osmoprotective solution ประกอบด้วย 2.0 M glycerol และ 0.4 M sucrose ช่วยป้องกันการยุบตัวของเซลล์ และปกป้องการเปลี่ยนแปลงของระบบเมมเบรน ซึ่งจะควบคุมจากการสูญเสียน้ำและการเกิด plasmolysis (Stepokus *et.al.*, 1992) แต่หากแช่เป็นเวลานานกว่า 60 นาที จะเกิดผลเสียตามมาคือ เซลล์จะถูกดึงน้ำออกไปมากเนื่องจากน้ำตาล 0.4 M sucrose ใน osmoprotective solution ทำให้เกิด plasmolysis (Sakai *et.al.*, 2002) ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตต่ำลงเหลือ 36.6±8.9 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11) ส่วนการนำเม็ด beads ที่ผ่านการแช่ osmoprotective solution เป็นเวลา 60 นาทีแล้วย้ายมาแช่ใน PVS_2 ที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 60 นาที เพื่อช่วยลดช่วยลดความเสียหายของระบบเมมเบรน ที่เกิดจากการสูญเสียน้ำก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว (Sakai *et al.*,1991) มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลง 60.0±9.0 เปอร์เซ็นต์ เพราะมีน้ำตาล 0.4 M sucrose ดึงน้ำออกอีก แต่หากแช่นานจนเกินไปจะเกิดพิษต่อเนื้อเยื่อได้ (Wang *et al.*, 2005) สอดคล้องกับการแช่ปลายยอดจำปีสิรินธรใน osmoprotective solution และ PVS_2 ที่นานเกิน 60 นาทีทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำไม่เกิน 36.6±9.0 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11) ดังนั้นวิธีการเตรียมความพร้อมปลายยอดจำปีสิรินธรโดยวิธี encapsulation-vitrification ก่อนการแช่ในไนโตรเจนเหลวที่น่าจะให้ผลดี คือการทดลองที่ 4 และ 5 ซึ่งได้นำมาทดลองแช่ในไนโตรเจนเหลวเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือการทดลองที่ 1 ซึ่งปรากฏผลว่ามีการทดลองเดียวที่พบการรอดชีวิตโดยการทำ preculture ร่วมกับการแช่ beads ใน osmoprotective solution เป็นเวลา 60 นาที และแช่ PVS_2 ที่ 0 องศาเซลเซียส อีก 60 นาที พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 33.3±8.7 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12) เป็นเพราะการทำ preculture ที่ช่วยดึงน้ำออกด้วยอาหารที่มีความเข้มข้นสูงร่วมกับการแช่ใน osmoprotective solution ช่วยป้องกันการยุบตัวของเซลล์ และปกป้องการเปลี่ยนแปลงของระบบเมมเบรน การแช่ PVS_2 ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายจากการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์โดยสาร PVS_2 จะทำให้ของเหลวภายในเซลล์เปลี่ยนเป็นของแข็งคล้ายแก้วจะมีความดันน้ำต่ำกว่าผลึกน้ำแข็งทำให้ป้องกันการเสียน้ำอีก และเนื่องจากของแข็งคล้ายแก้วนี้มีความหนืดสูงส่งผลให้หยุดปฏิกิริยาเคมีในการเคลื่อนย้ายโมเลกุลต่างๆ ทำให้มีการพักตัวเป็นเวลานาน (Sakai ,1985; Engelmann, 2000; Pennycooke, 2000)

ปลายยอดที่ผ่านการ preculture เพียงขั้นตอนเดียวแล้วลงแช่ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ทันทีตายทั้งหมด คงเป็นเพราะน้ำตาลในอาหาร preculture ยังดึงน้ำออกจากเซลล์ได้น้อย และปลายยอดถูกกระทบกระเทือนจากการตัดเป็นชิ้นขนาด 2.0-3.0 มิลลิเมตร ส่วนการทดลองที่ทำ preculture และแช่ใน osmoprotective solution เป็นเวลานาน 60 นาที แต่ไม่ใช้สาร PVS_2 ไม่พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเลย เป็นเพราะมีน้ำภายในเซลล์มากพอที่จะเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ทำให้เกิดความเสียหายแก่โครงสร้างของเซลล์ เช่นระบบเมมเบรนต่างๆ (Sakai ,2002)