

การเก็บรักษาพันธุ์กรรมเอื้องแซะหลวงในสภาพปลอดเชื้อ

พรพรรณ สุขุมพินิจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน

โครงการบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2549

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
โครงการบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน

ชื่อเรื่อง

การเก็บรักษาพันธุ์กรรมเอื้องแซะหลวงในสภาพปลอดเชื้อ

โดย

พรพรรณ สุขุมพินิจ

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา

วิพน วัฒน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ลักขณา เพ็ชรประดับ)

วันที่ 9 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2549

กรรมการที่ปรึกษา

ทอ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทรงวุฒิ เพ็ชรประดับ)

วันที่ 9 เดือน พ.ค. พ.ศ. 49

กรรมการที่ปรึกษา

Pat

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ รณพล จรัสสัมฤทธิ์)

วันที่ 9 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2549

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร

Pat

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประสิทธิ์ โนรี)

วันที่ 9 เดือน 5 พ.ศ. 49

โครงการบัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

Pat

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทรงวุฒิ เพ็ชรประดับ)

รองประธานกรรมการ โครงการบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 17 เดือน พ.ค. พ.ศ. 49

ชื่อเรื่อง	การเก็บรักษาพันธุ์กรรมเอื้องแซะหลวงในสภาพปลอดเชื้อ
ชื่อผู้เขียน	นางสาวพรพรรณ สุขุมพินิจ
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน
ประธานกรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ลักขณา เพ็ชรประดับ

บทคัดย่อ

การศึกษากการเก็บรักษาพันธุ์กรรมเอื้องแซะหลวงในสภาพปลอดเชื้อ แบ่งการทดลองเป็น 3 การทดลองดังนี้ การทดลองที่ 1 ศึกษาการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงเพื่อยืดระยะเวลาการย้ายเลี้ยง โดยใช้ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลแมนนิทอล และสารชะลอการเจริญเติบโตแพคโคลบิวทราโซลด้วยระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยใช้สูตรอาหารพื้นฐานของ Vacin and Went (1949) เติมน้ำตาลซูโครสระดับความเข้มข้น 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ หรือแมนนิทอลระดับความเข้มข้น 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ หรือสารชะลอการเจริญเติบโตแพคโคลบิวทราโซลระดับความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 ppm การทดลองที่ 2 ศึกษาวิธีการเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์ม 2 ระยะการเจริญเติบโตคือ ระยะ pro meristematic และระยะ leaf primordia โดยใช้เทคนิคเมล็ดเทียมร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 6 เดือน และการทดลองที่ 3 ศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์มในไนโตรเจนเหลว ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาคารเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระศรีนครินทร์ ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2547 ถึง สิงหาคม 2548

ผลการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงภายหลังการทดลองเป็นระยะเวลา 6 เดือน ด้วยซูโครส แมนนิทอล และสารแพคโคลบิวทราโซล ในการทดลองที่ 1 พบว่าซูโครสความระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถชะลอความสูงของลำลูกกล้วยได้ 0.56 เซนติเมตร จาก 2.51 เซนติเมตรเป็น 1.95 เซนติเมตร และมีขนาดของลำลูกกล้วยเพิ่มขึ้น 0.08 เซนติเมตรจาก 0.64 เซนติเมตรเป็น 0.72 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารเพาะเลี้ยงปกติที่ใช้ซูโครสระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการใช้น้ำตาลแมนนิทอลพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์มีความสูงไม่แตกต่างกัน (1.59 1.56 และ 1.35 เซนติเมตรตามลำดับ) แต่เตี้ยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้น 0 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (1.96 1.93 และ 2.14 เซนติเมตรตามลำดับ) และที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (0.61 เซนติเมตร) มีขนาดของลำลูกกล้วยมากกว่าที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (0.49 และ 0.54 เซนติเมตร) ส่วนการใช้สาร

ชะลอการเจริญเติบโตแพคโคลบิวทราโซลพบว่าทุกระดับความเข้มข้นมีความสูงของลำลูกกล้วยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (2.55 2.72 2.54 2.47 2.50 และ 2.39 เซนติเมตรตามลำดับ) และที่ความเข้มข้น 0.4 0.6 0.8 และ 1 ppm มีขนาดของลำลูกกล้วยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (0.67 0.67 0.64 และ 0.70 เซนติเมตรตามลำดับ) แต่มีขนาดใหญ่มากกว่าที่ความเข้มข้น 0 และ 0.2 ppm (0.56 และ 0.54 เซนติเมตรตามลำดับ)

ผลการทดลองที่ 2 พบว่าสามารถเก็บรักษาเมล็ดได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเท่านั้นเป็นระยะเวลา 4 เดือน และมีเปอร์เซ็นต์ความงอกลดลงตามจำนวนเดือนที่เก็บรักษา (66 64 23 และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) นอกจากนั้นยังพบว่าใช้ระยะเวลาในการงอกนานขึ้นตามลำดับคือ 38 48 63 และ 75 วัน ส่วนเมล็ดที่เคลือบด้วยสารอัลจินตสามารถเก็บรักษาได้นาน 4 เดือนเช่นเดียวกัน และต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเท่านั้น โดยไม่สูญเสียความงอก (100 เปอร์เซ็นต์) และงอกได้เร็วกว่าเมล็ดที่ไม่ได้เคลือบ (23 29 32 และ 32 วันตามลำดับ) สำหรับการเก็บรักษาโปรโตคอร์มที่เคลือบด้วยสารอัลจินตเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าสามารถเก็บรักษาเมล็ดเทียมได้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเท่านั้นและเก็บรักษาได้นาน 4 เดือน โดยมีความสามารถในการเจริญและพัฒนาลดลงตามระยะเวลาในการเก็บรักษาที่นานขึ้น (62 35 23 และ 18 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่าระยะการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มทั้ง 2 ระยะมีความสามารถในการเจริญและพัฒนาไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาจากระยะเวลาที่โปรโตคอร์มมีการพัฒนาภายหลังการเก็บรักษาพบว่าระยะ pro meristematic ใช้ระยะเวลาในการฟื้นตัวน้อยกว่าระยะ leaf primordia

ผลการเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์มของเอื้องแซะในไนโตรเจนเหลวในการทดลองที่ 3 พบว่า เมล็ดสามารถเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวได้แต่ต้องเติมสารละลาย PVS2 โดยการเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 50-80 นาที เมล็ดสามารถงอกภายหลังการแช่แข็งได้เร็วที่สุดคือ 120 วัน ซึ่งงอกได้เร็วกว่าการเติมสารเป็นระยะเวลา 10 20 30 และ 40 นาที (147 153 155 และ 130 วันตามลำดับ) แต่เมล็ดสูญเสียความงอกทั้งหมด (0 เปอร์เซ็นต์) หากไม่เติมสารละลาย PVS2 ก่อนการเก็บแช่แข็ง และพบว่าวิธีการที่ศึกษาไม่สามารถเก็บรักษาโปรโตคอร์มในไนโตรเจนเหลวได้

Title	<i>In vitro</i> Conservation of <i>Dendrobium scabrilingue</i> Lindl.
Author	Miss Pornpan Sukhumpinij
Degree of	Master of Science in Horticulture
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr.Luckana Phetpradap

ABSTRACT

The study on *in vitro* conservation of *Dendrobium scabrilingue* Lindl. consisted of three experiments with the first experiment considering the effects of sucrose, mannitol and paclobutrazol in reducing plant growth to prolong subculture with Vacin and Went (1949) media supplementation, different concentrations of sucrose (0, 2, 4, 6, 8 and 10%), mannitol (0, 2, 4, 6, 8 and 10%) and paclobutrazol (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 ppm) were used. The second experiment involved seed and protocorm (pro-meristematic and leaf primordia stages) encapsulation and storage at 4° and 25°C for 6 months. The last experiment was on the cryopreservation of seed and protocorm. All experiments were conducted at the Tissue Culture Laboratory, Department of Horticulture, Maejo University, Chiangmai during November 2004 to August 2005.

Results from the first experiment showed that 10% sucrose could reduce plant height for 0.56 cm (from 2.51 to 1.95 cm) and was able to increase psuedo-bulb diameter for 0.08 cm (from 0.64 to 0.72 cm) when compared with basic medium (2% sucrose). For mannitol, plant height was reduced when applied with 6, 8 and 10% (1.59, 1.56 and 1.35 cm, respectively) which were significantly higher than those applied with 0, 2 and 4% (1.96, 1.93, and 2.14 cm, respectively). When plants were treated with 10% mannitol, psuedo-bulb diameter was larger than those at 0 and 2% (0.49 and 0.54 cm, respectively). Paclobutrazol on the other hand, gave no significant differences on plant height (2.55, 2.72, 2.54, 2.47, 2.50 and 2.39 cm, respectively) but at concentrations 0.4, 0.6, 0.8 and 1 ppm, plants gave larger psuedo-bulb diameter (0.67, 0.67, 0.64 and 0.70 cm, respectively) than those at 0 and 0.2 ppm (0.56 and 0.54 cm)

The second experiment found that seeds could only be kept at 4°C for 4 months. However, reduction in germination percentage (66, 64, 23 and 10%) took place when storage was prolonged (38, 48, 63 and 75 days, respectively). On the other hand, encapsulated seeds could be stored only at 25°C for 4 months with 100% germination achieved every month and with faster

days to germination than stored seeds (23, 29, 32 and 32 days). Both developmental phases of encapsulated protocorms (pro-meristematic and leaf primordia stages) showed no significant differences on growth and development but survival occurred only when kept at 25°C with decreasing percentage of growth (62, 35, 23 and 18% after 1, 2, 3 and 4 months of storage , respectively). Pro-meristematic stage protocorm could regenerate faster than leaf primordia stage protocorm.

The last experiment involving of cryopreservation of seed and protocorm showed that seeds could be stored in liquid nitrogen only when treated with PVS2 solution. Seeds treated with PVS2 solution 50-80 minutes before plugging of liquid nitrogen, took 120 days to germinate which was much faster than those treated at 10, 20, 30 and 40 minutes (147, 153, 155 and 130 days, respectively). Both protocorm and encapsulated protocorm were found to have no survival after storage in liquid nitrogen.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ถักขณา เพ็ชรประดับ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำด้านการเรียน การดำเนินการวิจัย การตรวจแก้วิทยานิพนธ์ รวมทั้งอนุเคราะห์วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมีในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพืชสวน อาคารเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระศรีนครินทร์ ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทรงวุฒิ เพ็ชรประดับ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพพล จรัสสัมฤทธิ์ กรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้วิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ บรรพต ดันดิเสรี กรรมการผู้สอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาและตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคุณครูทุกท่านที่ได้อบรม สั่งสอน และให้วิชาความรู้ ตลอดระยะเวลาการเรียนศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณตา คุณยาย คุณย่า ที่เลี้ยงดู อบรมสั่งสอนให้ข้าพเจ้าเป็นคนดี คอยเป็นกำลังใจและคอยสนับสนุนข้าพเจ้าตลอดมา ขอบคุณทุกคนในครอบครัว น้ำๆทั้งสามคน น้องชายและน้องสาวที่น่ารัก ที่เป็นกำลังใจให้เสมอมา

ท้ายนี้ขอขอบคุณ อาจารย์สุพัตรา สระธรรม คุณประนอม ยังคำมัน คุณวราภรณ์ อุคมดี ที่คอยให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือเสมอมา ขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพืชสวนทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติงานมาโดยตลอด

พรพรรณ สุขุมพินิจ

พฤษภาคม 2549

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญภาพ	(11)
สารบัญภาพผนวก	(12)
สารบัญตารางผนวก	(14)
บทที่ 1 บทนำ	1
ปัญหาของการวิจัย	3
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	5
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเอื้องแซะหลวง	5
การเก็บรักษาพันธุ์กรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ	6
การชะลอการเจริญเติบโต	6
การเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยเทคนิคเมล็ดเทียม	7
การเก็บรักษาแบบแช่แข็งหรือการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	15
วิธีการวิจัย	16
การทดลองที่ 1 การชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวง	16
การทดลองที่ 2 ศึกษาวิธีการและอุณหภูมิในการเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์มของเอื้องแซะหลวง	19
การทดลองที่ 3 ศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์มของเอื้องแซะหลวงในไนโตรเจนเหลว	22

บทที่ 4 ผลการทดลอง	26
ผลการทดลองที่ 1 ผลการศึกษาการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อน เอื้องแซะหลวง	26
ผลการทดลองที่ 2 ผลการศึกษาวิธีการเก็บรักษามะลัดและโปรโตคอร์ม เอื้องแซะหลวง	36
ผลการทดลองที่ 3 ผลของการเก็บรักษามะลัดและโปรโตคอร์มเอื้องแซะหลวง ในไนโตรเจนเหลว	42
วิจารณ์ผลการทดลอง	46
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	52
ปัญหาและข้อเสนอแนะ	53
บรรณานุกรม	54
ภาคผนวก	59
ภาคผนวก ก ภาพการเตรียมสารเคมี ภาพเอื้องแซะ และตารางผลการวิเคราะห์ ทางสถิติในแต่ละการทดลอง	60
ภาคผนวก ข ประวัติผู้วิจัย	100

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 ความสูงของลำลูกกล้วยต้นเอื้องแซะจากการชะลอการเจริญเติบโตด้วยชูโครส เป็นระยะเวลา 6 เดือน	27
2 เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นเอื้องแซะจากการชะลอการเจริญเติบโต ด้วยชูโครสเป็นระยะเวลา 6 เดือน	29
3 ความสูงของลำลูกกล้วยต้นเอื้องแซะจากการชะลอการเจริญเติบโตด้วยแมนนิทอล เป็นระยะเวลา 6 เดือน	31
4 เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นเอื้องแซะจากการชะลอเจริญเติบโตด้วย แมนนิทอลเป็นระยะเวลา 6 เดือน	33
5 ความสูงของลำลูกกล้วยต้นเอื้องแซะจากการชะลอการเจริญเติบโตด้วย แพคโคลบิวทราโซลเป็นระยะเวลา 6 เดือน	34
6 เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นเอื้องแซะจากการชะลอการเจริญเติบโตด้วย แพคโคลบิวทราโซลเป็นระยะเวลา 6 เดือน	36
7 เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดภายหลังการเก็บรักษา	37
8 จำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอก	38
9 เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียมภายหลังการเก็บรักษา	41
10 ระยะเวลาในการงอกที่เพิ่มขึ้นของเมล็ดเทียม	42
11 เปอร์เซ็นต์ความงอกของโปรโตคอร์มที่ไม่ได้เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	45

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องชะหลวงที่นำมาทดลอง	17
2 ลักษณะของเมล็ดเอื้องชะหลวงที่ไม่ได้เคลือบและเคลือบด้วยสารอัลจินต	39
3 ลักษณะของเมล็ดเทียม	42

สารบัญภาพผนวก

ภาพผนวก	หน้า
1 วิธีการเตรียมสารเคมีที่ทำให้เกิดเจลของเมล็ดเทียม	61
2 ขั้นตอนการทำเมล็ดเทียม	62
3 การย้ายเลี้ยงภายหลังการเก็บรักษา	63
4 วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการเก็บแช่แข็ง	64
5 ขั้นตอนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	65
6 ขั้นตอนการนำโปรโตคอร์มาเลี้ยงภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	66
7 ความสูงของลำลูกกล้วยของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของซูโครสแตกต่างกัน 6 ระดับ	67
8 เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของซูโครสแตกต่างกัน 6 ระดับ	67
9 ความสูงของลำลูกกล้วยของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลแตกต่างกัน 6 ระดับ	68
10 เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลแตกต่างกัน 6 ระดับ	68
11 ความสูงของลำลูกกล้วยของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของแฟลโคบิวทราโซลแตกต่างกัน 6 ระดับ	69
12 เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของแฟลโคบิวทราโซลแตกต่างกัน 6 ระดับ	69
13 ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงเมื่อเริ่มต้นการทดลองกับซูโครส	70
14 ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงเมื่อภายหลังการทดลองกับซูโครส 3 เดือน	70
15 ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงเมื่อสิ้นสุดการทดลองกับซูโครส 6 เดือน	70
16 ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงเริ่มต้นการทดลองกับแมนนิทอล	71
17 ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงเมื่อภายหลังการทดลองกับแมนนิทอล 3 เดือน	71
18 ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงเมื่อสิ้นสุดการทดลองกับแมนนิทอล 6 เดือน	71
19 ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงเมื่อเริ่มต้นการทดลองกับแฟลโคบิวทราโซล	72
20 ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงเมื่อภายหลังการทดลองกับแฟลโคบิวทราโซล 3 เดือน	72

- | | | |
|----|--|----|
| 21 | ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องชะหลวงเมื่อสิ้นสุดการทดลองกับแพคโคลบิวทราโซล 6 เดือน | 72 |
| 22 | โปรโตคอร์รั้มที่ไม่สามารถรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว | 73 |
| 23 | โปรโตคอร์รั้มที่เคลือบไม่สามารถรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว | 73 |



สารบัญตารางผนวก

ตารางผนวก	หน้า
1 สูตรอาหารของ Vacin and Went (1949)	74
2 สารเคมีที่ทำให้เกิดเจลของเมล็ดเทียม	74
3 สารเคมีที่ใช้ในการเก็บแช่แข็ง	74
4 เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเอื้องแซะภายหลังการเก็บรักษา	75
5 จำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอกภายหลังการเก็บรักษา	75
6 จำนวนวันที่เมล็ดเทียมงอกภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	76
7 จำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอกภายหลังจากการเติมด้วยสารละลาย PVS2	76
8 เปอร์เซ็นต์ความงอกของโปรโตคอร์มที่ไม่ได้เก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว	77
9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ ก่อนการทดลองด้วยน้ำตาลซูโครส	78
10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ หลังการทดลองด้วยน้ำตาลซูโครส 1 เดือน	78
11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ หลังการทดลองด้วยน้ำตาลซูโครส 2 เดือน	78
12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ หลังการทดลองด้วยน้ำตาลซูโครส 3 เดือน	79
13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ หลังการทดลองด้วยน้ำตาลซูโครส 4 เดือน	79
14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ หลังการทดลองด้วยน้ำตาลซูโครส 5 เดือน	79
15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ หลังการทดลองด้วยน้ำตาลซูโครส 6 เดือน	80
16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ ก่อนการทดลองด้วยน้ำตาลซูโครส	80
17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ หลังการทดลองด้วยน้ำตาลซูโครส 1 เดือน	80

48	การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ หลังการทดลองด้วยแพคโคลบิวทราโซล 4 เดือน	91
49	การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ หลังการทดลองด้วยแพคโคลบิวทราโซล 5 เดือน	91
50	การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ หลังการทดลองด้วยแพคโคลบิวทราโซล 6 เดือน	91
51	การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดภายหลัง การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 เดือน	92
52	การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดภายหลัง การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 2 เดือน	92
53	การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดภายหลัง การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือน	93
54	การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดภายหลัง การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน	93
55	การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนวันที่เมล็ดเอื้องแซะงอก	94
56	การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนวันที่เมล็ดเอื้องแซะงอกภายหลัง การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 เดือน	94
57	การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนวันที่เมล็ดเอื้องแซะงอกภายหลัง การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 2 เดือน	95
58	การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนวันที่เมล็ดเอื้องแซะงอกภายหลัง การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือน	95
59	การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนวันที่เมล็ดเอื้องแซะงอกภายหลัง การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน	96
60	การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียมภายหลัง การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 เดือน	96
61	การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียมภายหลัง การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 2 เดือน	97
62	การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียมภายหลัง การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือน	97

- 63 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียมภายหลัง
การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน 98
- 64 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอกที่ไม่ได้เก็บรักษาแบบแช่แข็ง
โดยวิธี Vitrification 98
- 65 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอกภายหลังการเก็บรักษา
แบบแช่แข็งของเมล็ดเอื้องชะหลวงโดยวิธี Vitrification 99
- 66 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของโปรโตคอร์มที่ไม่ได้
เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยวิธี Vitrification และ Encapsulation/Vitrification 99



บทที่ 1

บทนำ

เอื้องชะหลวง (*Dendrobium scabrilingue* Lindl.) เป็นกล้วยไม้ป่าพื้นเมืองของประเทศไทยที่มีความสวยงามและมีเอกลักษณ์โดดเด่นเฉพาะตัวคือมีกลิ่นหอม สมัยโบราณใช้เป็นเครื่องบรรณาการถวายเจ้านายระดับสูง เอื้องชะหลวงเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย มีขนสีน้ำตาล หรือสีดำตามกาบใบ (ระพี, 2516) ดอกเอื้องชะมีกลิ่นหอม เกิดได้ทั้งต้นที่มีใบและต้นที่ทิ้งใบแล้ว ดอกจะออกตามข้อใกล้บริเวณยอด มีลักษณะเป็นช่อสั้นๆช่อละ 1-2 ดอก เมื่อดอกบานกลีบดอกมีสีขาวอมเขียว กลีบปากของดอกบานใหม่มีเขียวอมเหลือง และจะมีสีเข้มขึ้นในวันต่อมา จนเป็นสีเหลืองเข้มหรือเหลืองอมส้ม การกระจายพันธุ์พบในเขตประเทศพม่า ไทย และลาว สำหรับในประเทศไทยพบมากในแถบภูเขาสูงที่มีอากาศเย็นจัด ทางภาคเหนือที่จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดตาก และจังหวัดแม่ฮ่องสอน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออกที่ความสูงจากระดับน้ำทะเล 1,000 เมตร ขึ้นไป (อบฉันท, 2546)

ปัจจุบันพบว่าเอื้องชะมีปริมาณลดน้อยลงและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์เป็นอย่างมาก เนื่องจากการลักลอบนำเอื้องชะออกมาจากป่าเพื่อการจำหน่าย นอกจากนี้สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากการตัดไม้ทำลายป่าทำให้สูญเสียระบบนิเวศที่เหมาะสม สำหรับการออกของเมล็ดโดยธรรมชาติเมล็ดไม่มีอาหารสะสมและอัตราการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติเกิดขึ้นได้น้อย และมีความเสี่ยงสูงจากไฟป่าหรือร่วงหล่นจากคาบไม้ในฤดูแล้ง ดังนั้นการอนุรักษ์หรือเก็บรักษาพันธุ์เอื้องชะไว้ไม่ให้สูญพันธุ์จึงจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคตทั้งทางด้านการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์ การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์หรือการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชสามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน แต่วิธีการที่มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีอื่นคือการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งสามารถเก็บรักษาส่วนต่างๆ คือ โปรโตพลาสต์เซลล์แขวนลอย ละอองเกสร อับเรณู แคลลัส เนื้อเยื่อ เอ็มบริโอ เมล็ด และส่วนอวัยวะต่าง ๆ ของพืช (รังสฤษฎี, 2545) นอกจากนั้นการเก็บรักษาด้วยวิธีการนี้ใช้พื้นที่น้อย ปราศจากโรคและแมลง (Razdan, 1994) การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อมีหลายวิธีคือ ทั้งการชะลอการเจริญเติบโตให้ช้าลง การใช้เทคนิคเมล็ดเทียม และการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง แต่ละวิธีที่กล่าวมาข้างต้นต่างมีข้อดีและข้อด้อยที่แตกต่างกัน ปัจจุบันการศึกษาทางด้านการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กล้วยไม้ไทยรวมถึงเอื้องชะหลวงนั้นยังมีอยู่ค่อนข้างจำกัด ดังนั้นการศึกษาถึงวิธีการและรูปแบบต่างๆที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เอื้องชะหลวงเป็นสิ่งที่สำคัญและจำเป็นเป็นอย่างยิ่ง

การศึกษาครั้งนี้จึงทำการทดลองเพื่อหาความเป็นไปได้ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมเอื้อง
แซะหลวง ทั้งในระยะสั้น ระยะปานกลาง และระยะยาว โดยหาวิธีการที่เหมาะสมในการชะลอการ
เจริญเติบโต เทคนิคเมล็ดเทียม และการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง เพื่อใช้ประโยชน์ด้านการปรับปรุง
พันธุ์และขยายพันธุ์ในอนาคต และใช้เป็นข้อมูลสำหรับขยายผลในการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์
กล้วยไม้ไทยชนิดอื่นต่อไป



ปัญหาของการวิจัย

เอื้องแฉะมีเอกลักษณ์โดดเด่นคือกลิ่นหอมที่เป็นที่ชื่นชอบของคนทั่วไป ในสมัยอดีตถูกใช้เป็นเครื่องบรรณาการอย่างหนึ่ง ปัจจุบันมีการลักลอบนำออกจากป่าเพื่อจำหน่ายทั้งในประเทศและส่งออกต่างประเทศ ทำให้ปริมาณต้นเอื้องแฉะในป่าลดลงจนเกือบสูญพันธุ์ ซึ่งในสภาพธรรมชาติเอื้องแฉะสามารถขยายพันธุ์ได้ด้วยเมล็ดและการแตกหน่อแบ่งกอ เมื่อฝักแก่และแตกเมล็ดจะปลิวไปกับกระแสลมในธรรมชาติ เมล็ดเอื้องแฉะมีขนาดเล็กและไม่มีอาหารสะสม เมล็ดที่ปลิวตกบริเวณที่มีเชื้อราในกลุ่มไมโคไรซาเมล็ดจะสามารถงอกได้จากการนำสารอาหารจากเชื้อราไปใช้ในการงอก แต่เมื่อสภาพป่าถูกทำลายทั้งจากการตัดไม้ทำลายป่าและการจุดไฟเผาป่าเพื่อต้องการที่ดิน ทำให้สูญเสียระบบนิเวศน์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ โอกาสที่เมล็ดจะปลิวไปตกบริเวณที่เหมาะสมจึงเป็นไปได้ยาก สำหรับต้นหรือหน่อถ้าหากประสบกับภาวะแห้งแล้งในฤดูแล้ง ทำให้ลำตुकกล้วยแห้งมากและร่วงหล่นจากกลีบไม้ ต้นที่รอดอยู่ได้จะมีการแตกหน่อน้อยลง การขยายพันธุ์ตามธรรมชาติจึงไม่อาจชดเชยส่วนที่สูญเสียได้ทัน

นอกจากนี้เอื้องแฉะมีการออกดอกเพียงปีละครั้งและมีอายุฝักประมาณ 1 ปี โดยแต่ละฝักมีจำนวนเมล็ดประมาณ 50,000 เมล็ด เมื่อนำมาเพาะขยายในสภาพปลอดเชื้อเมล็ดสามารถงอกได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่ต้องการผลิตต้นเอื้องแฉะปริมาณมากจึงจำเป็นต้องเพาะเมล็ดจำนวนมากในช่วงเดียวกันจำนวนหลายๆ ฝัก เมล็ดจะงอกและพัฒนาในระยะเวลาใกล้เคียงกัน ทำให้มีงานในการย้ายเลี้ยงต้นอ่อนมากเกินแรงงานที่มีอยู่ ไม่สามารถย้ายเลี้ยงต้นอ่อนที่มีปริมาณมากได้ภายในกำหนดเวลา การย้ายเลี้ยงที่ล่าช้าเกินไปต้นเอื้องแฉะจะทิ้งใบและชะงักการเจริญเติบโต ทำให้สูญเสียต้นเอื้องแฉะเป็นจำนวนมาก หากมีวิธีการที่สามารถเก็บรักษาเมล็ดหรือโปรโตคอร์มเป็นช่วงระยะเวลาหนึ่งแล้วทยอยนำออกมาเพาะขยายต่อไป ก็จะสามารถกระจายงานให้เหมาะสมกับปริมาณงานที่มี ทั้งยังสามารถลดการสูญเสียต้นอ่อนและสามารถผลิตต้นให้มากได้ตามที่ต้องการ นอกจากนี้ถ้ามีวิธีการยืดระยะเวลาการเปลี่ยนถ่ายต้นอ่อนให้ได้นานขึ้นจาก 2 ถึง 3 เดือนเป็น 6 เดือนขึ้นไป ก็จะเป็นอีกทางหนึ่งที่สามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายที่สิ้นเปลืองให้น้อยลง

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาวิธีการเก็บรักษาดันอ่อนเอื้องแซะหลวงด้วยการชะลอการเจริญเติบโต
2. เพื่อศึกษาหาวิธีการเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์มเอื้องแซะหลวงด้วยเทคนิคเมล็ดเทียม
3. เพื่อศึกษาหาวิธีการเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์มเอื้องแซะหลวงในไนโตรเจนเหลว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมเอื้องแซะหลวงด้วยวิธีการต่างๆ ทั้งการเก็บรักษาในระยะเวลาสั้นด้วยการชะลอการเจริญเติบโตของดันอ่อน การใช้เทคนิคเมล็ดเทียมสำหรับเมล็ดและโปรโตคอร์ม และการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานด้วยการเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์มในไนโตรเจนเหลว เพื่อสำหรับใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมของเอื้องแซะ และเพื่อเป็นการประหยัดแรงงาน ค่าใช้จ่ายสำหรับการปฏิบัติงาน
2. สามารถนำวิธีการที่เหมาะสมจากการศึกษาไปใช้ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมของเอื้องแซะ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้ชนิดอื่นได้

ขอบเขตของการวิจัย

1. การศึกษาการชะลอการเจริญเติบโต คัดเลือกดันอ่อนที่สมบูรณ์ มีขนาดใกล้เคียงกัน เพื่อนำมาใช้ในการทดลองที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาคารเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระศรีนครินทร์ ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
2. เชื้อพันธุกรรมเอื้องแซะหลวงที่ใช้ในการเก็บรักษา คือ ดันอ่อน เมล็ด โปรโตคอร์ม 2 ระยะ ได้แก่ pro meristematic stage และ leaf primordia stage
3. การศึกษาการเก็บรักษาด้วยเทคนิคเมล็ดเทียม และการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว คัดเลือกโปรโตคอร์มที่สมบูรณ์และมีขนาดใกล้เคียงกัน ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาคารเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระศรีนครินทร์ ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

เอื้องชะหลวง หรือเอื้องชะเป็นกล้วยไม้ป่าพื้นเมืองของไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dendrobium scabrilingue* Lindl. (อบฉันท, 2546) มีชื่อพ้องว่า *Dendrobium gulactanthum* Schlechter., *Dendrobium hedyosmum* Bateman. รวมไปถึง *Dendrobium alboviride* Parish. (Baker and Charles, 1996) จัดอยู่ในวงศ์ของกล้วยไม้ Orchidaceae อยู่ใน Subfamily Epidendroideae tribe Calypsoeae, Subtribe Dendrobiinae (Schuiteman and Vogel, 2000) และจัดอยู่ใน section *Nigrohirsutae* มีลักษณะเด่นคือ ดอกมีกลิ่นหอมและมีขนสีน้ำตาลหรือสีดำตามกาบใบ (ระพี, 2516) เขตการกระจายพันธุ์พบในประเทศ พม่า, ลาว และไทย บริเวณพื้นที่ที่สูงจากระดับน้ำทะเล 2000-4000 ฟุต (610-1220 เมตร) (Baker and Charles, 1996) แหล่งที่พบในประเทศไทย ภาคเหนือพบที่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน จังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดตาก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบตามป่าดิบแล้ง และป่าสน ส่วนในภาคตะวันออกพบที่จังหวัดตราดบริเวณที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 1,000 เมตรขึ้นไป (อบฉันท, 2546)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเอื้องชะหลวง

ลำต้น ต้นหรือลำลูกกล้วยของเอื้องชะสูงประมาณ 10 - 20 เซนติเมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น 0.6 - 1 เซนติเมตร ผิวของลำต้นเป็นร่องตื้นๆตามความยาวของลำ มีขนสีดำสั้นละเอียดตามลำต้น (อบฉันท, 2546)

ราก ระบบรากเป็นแบบรากกึ่งอากาศ(semi-epiphytic) (Baker and Charles, 1996)

ใบ ใบยาวประมาณ 8 เซนติเมตร กว้างประมาณ 1.5 เซนติเมตร มีสีเขียวอมเหลืองเล็กน้อยหรือสีเขียวอ่อน ปลายใบเว้าเฉียง กาบใบมีขนสีดำรวมไปถึงใต้แผ่นใบ (ระพี, 2516)

ดอก ดอกมีขนาด 2-3 เซนติเมตร กลีบดอกมีสีขาว กลีบนอกและกลีบในยาวพอกันหรือกลีบนอกอาจยาวกว่าเล็กน้อย ปากมี 3 แฉกเห็นได้ชัดเจน หูปากทั้งสองข้างตั้งปลายแหลม พื้นสีขาวมีเส้นสีเขียวขนานกันถี่ๆ แผ่นปากใบมีสีเหลืองหรือเหลืองอมเขียว ดอกจะออกไกล่ๆปลายลำ มีดอก 1-3 ดอก ดอกจะบานดูไปด้านหน้า แต่ปลายกลีบผายบานออก เมื่อดอกบานนานหลายวันจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมแสด ดอกมีกลิ่นหอม (ระพี, 2516)

ฝัก มีลักษณะเป็นรูปรี หัวท้ายมน ตัวฝักเกือบกลม ด้านหนึ่งของฝักจะโค้งเป็นครึ่งวงกลม ส่วนอีกด้านจะโค้งน้อยกว่าจนเกือบตรง ขนาดฝักเฉลี่ย 1.3 เซนติเมตร มักพบจุดสีน้ำตาลเล็กๆประปรายบนฝัก (ลักษณะ และ เบญจา, 2545)

เมล็ด มีรูปร่างค่อนข้างไปทางทรงกระบอก ด้านปลายมน ด้านโคนส่วนที่ติดกับรก (placenta) เล็กกว่าส่วนกลางเพียงเล็กน้อย ปลายตัดตรง เปลือกหุ้มเมล็ดบางใส เป็นร่างแหเห็นได้ชัดในเมล็ดแก่ ส่วนเมล็ดอ่อนจะเห็นเพียงเส้นตามยาวและบิดเอียง คัพภะมีสีเหลือง ในเมล็ดอ่อนจะเห็นเป็นแถบสีเหลืองยาวเรียวและมีขนาดใหญ่ขึ้นตามลำดับจนปรากฏเป็นรูปกลมรีในเมล็ดแก่เต็มที่ สีของคัพภะจะเหลืองเข้มขึ้นตามลำดับ มีขนาดความกว้างเฉลี่ย 23.52 ± 0.72 ไมครอน ในหนึ่งฝักมีเมล็ดเฉลี่ย $51,673 \pm 647$ เมล็ด (ลักขณา และ เบญจมา, 2545)

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ

การเก็บรักษาพันธุ์หรือการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชนั้นเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุ์พืช โดยปกติแล้วการเก็บรักษาพันธุ์พืชส่วนใหญ่จะเป็นการเก็บในรูปของเมล็ดพันธุ์พืช แต่เมล็ดพันธุ์บางชนิดมีอายุสั้นไม่สามารถเก็บรักษาได้นานแม้ว่าจะเก็บในอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ ในขณะเดียวกันนั้นพันธุกรรมพืชอาจเกิดการสูญหายและเสี่ยงต่อการกลายพันธุ์ได้ Razdan (1994) กล่าวว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจมาประยุกต์ใช้กับงานด้านการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืช ซึ่งมีข้อดี คือ ใช้พื้นที่น้อย ปราศจากโรคและแมลง สามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากในเวลาอันสั้น การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อนั้นสามารถรักษาความมีชีวิตไว้ได้นานและสามารถใช้เก็บรักษาจากส่วนต่างๆ ได้ ไม่ว่าจะเป็น โปรโตพลาสต์ เซลล์แขวนลอย ละอองเกสร อับเรณู แคลลัส เนื้อเยื่อ เอ็มบริโอ เมล็ด และส่วนอวัยวะต่าง ๆ ของพืช (รังสฤษฎี, 2545)

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ สามารถแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบคือ

1. การชะลอการเจริญเติบโต (slow growth technique) การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้เป็นการเก็บรักษาในระยะเวลาสั้นหรือปานกลาง Ashmore (1997) รายงานว่าสามารถขยายช่วงเวลาการย้ายเลี้ยง (subculture) ออกไปได้ 1-4 ปีในพืชหลายชนิด วิธีการลดการเจริญเติบโตสามารถทำได้หลายวิธีเช่น โดยวิธีการลดอุณหภูมิ การลดสภาพแสงในการเพาะเลี้ยง การตัดแปลงสภาพบรรยากาศ การปรับแต่งอาหารเพาะเลี้ยงและโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพิ่มตัวยับยั้งการออสโมซิส (osmosis) สำหรับการเพิ่มตัวยับยั้งการออสโมซิสในอาหารเพาะเลี้ยงนั้น สามารถทำได้โดยการเติมน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง เช่น แมนนิทอล (mannitol) (รังสฤษฎี, 2545) เนื่องจากแมนนิทอลที่มีความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้พืชเกิดความเครียดอันเนื่องมาจากการออสโมซิสจึงมีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโต ดังรายงานของ Lopez *et al.* (1998) ทำการทดลองโดยใช้แมนนิทอล 4 เปอร์เซ็นต์และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสในการลดการเจริญเติบโตของมันฝรั่ง พบว่าสามารถขยาย

เวลาในการเปลี่ยนอาหารออกไปได้ 8 เดือนหรืออาจจะมากกว่า 12 เดือน ซึ่งโดยปกตินั้นมันฝรั่งต้องทำการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงทุก 4 ถึง 8 สัปดาห์ เนาวรัตน์ (2547) ศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของเมนนีทอลที่เหมาะสมในการชะลอการเจริญเติบโตของเอื้องแซะ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์สามารถชะลอการเจริญเติบโตทางความสูง ในรายงานของ Yong *et al.* (2000) ได้ทดลองความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Rehmannia glutinosa* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งในตระกูล Scrophulariaceae ทำการทดลองโดยใช้ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0, 15 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นการเจริญเติบโตจะลดลง อีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการปรับแต่งสูตรอาหารก็คือ การใช้สารชะลอการเจริญเติบโต ดังรายงานของ Chung *et al.* (1999) ได้ทดสอบสารชะลอการเจริญเติบโตกับกล้วยไม้ *Bletilla striata* โดยใช้สารชะลอเจริญเติบโต 4 ชนิด คือ Uniconazole, Paclobutrazol, Ancymidol และ *N*-dimethyl succinamic acid เติมนลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าสารทั้ง 4 ชนิด สามารถลดการเจริญเติบโตของ *Bletilla striata* ได้แต่สาร Uniconazole ส่งผลให้รูปร่างของใบมีลักษณะผิดปกติ เช่นเดียวกันในปีถัดมา Jee *et al.* (2000) ได้ทำการทดลองเพื่อทดสอบความสามารถในการชะลอการเจริญเติบโตของสาร Uniconazole, Paclobutrazol และ ancymidol กับ *Bletilla striata* พบว่า Paclobutrazol ความเข้มข้น 0.4-0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้นเหมาะสำหรับการลดการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามวิธีการเก็บรักษาด้วยวิธีนี้เหมาะสำหรับการเก็บส่วนปลายยอดและต้นที่ชักนำ (plantlets) แล้วเท่านั้น

2. การเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยเทคนิคเมล็ดเทียม (artificial seed technique) เมล็ดเทียมเป็นการเรียกเอมบริอยด์หรือชิ้นส่วนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่เอมบริอยด์เช่น ปลายยอด ปลายราก ตาข้าง และแคลลัส ที่เคลือบด้วยสารที่ทำให้เกิดเจลทำให้มีลักษณะคล้ายกับเมล็ดจริง (Senaratna, 1992) การเก็บรักษาด้วยเทคนิคเมล็ดเทียมนี้เป็นอีกวิธีการหนึ่งเพื่อทดแทนการเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อที่ต้องมีการเปลี่ยนอาหารไปตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา อีกทั้งการเก็บรักษาในรูปของเซลล์แขวนลอย หรือแคลลัส จะมีการพัฒนาเป็นต้นพืชได้ในระดับต่ำ และอาจเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ที่ส่งผลให้เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะจุด การขาดหายของยีน การเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม หรืออาจเกิดการสูญหายของโครโมโซมบางส่วนหรือทั้งหมด (Grout, 1995) การสูญเสียความตรงตามพันธุ์ซึ่งเกิดจากการผันแปรทางพันธุกรรมไปตามระยะเวลาในการเก็บรักษาที่เพิ่มมากขึ้น (Engelmann, 1991) เมล็ดเทียมจะทำหน้าที่เสมือนเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) เพื่อป้องกันอันตรายให้แก่เอมบริโอที่อยู่ภายใน (Redenbaugh, 1990) โดยการใช้สารที่ทำให้เกิดเจล เช่น สารอัลจินต วุ้น อคาโรส และเจลาติน นำมาเคลือบชิ้นส่วนของพืช แต่พบว่าสารอัลจินตนั้นสามารถทำให้เกิดเป็นแคปซูลและทำให้เอมบริอยด์ยังคงความมีชีวิตได้ดีกว่าชนิดอื่น

นอกจากนี้เมล็ดเทียมยังสามารถใช้เป็นแหล่งของอาหารสะสม เช่น ธาตุอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และองค์ประกอบอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการงอก การเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นอ่อนได้อีกด้วย (Redenbaugh *et al.*, 1987) อีกทั้งยังสามารถผลิตได้จำนวนมากโดยไม่จำกัดช่วงเวลาการผลิต (Ashmore, 1997) แต่ก็มีข้อควรระวังคือ เนื่องจากเมล็ดเทียมมีลักษณะเป็นรูพรุนทำให้สูญเสียธาตุอาหารที่ละลายน้ำไปก่อนที่จะรากและยอดจะงอกออกมา อีกทั้งยังแห้งได้ง่ายเมื่อได้รับอากาศจึงทำให้เก็บรักษาได้เพียงระยะเวลาสั้น ๆ ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการระเหยน้ำออกจากอัลจินตเพื่อให้มีสภาพกับเหมือนเมล็ดจริง (Redenbaugh *et al.*, 1987) ส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารอัลจินตที่ใช้ในการเคลือบนั้นปัจจุบันใช้สารโซเดียมอัลจินต 3 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรตความเข้มข้น 100 มิลลิโมล โดยใช้เป็นระยะเวลา 30 ถึง 40 นาที (Malemnganba *et al.*, 1996)

Ghosh and Sen (1994) ทดลองเคลือบเอ็มบริออยด์ของ *Asparagus cooperi* Baker. ด้วยสารอัลจินตและทำการเก็บรักษาเมล็ดเทียมไว้ที่อุณหภูมิ 2 และ 4 องศาเซลเซียส พบว่าการเก็บรักษาเมล็ดเทียมที่ 2 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลานาน 15 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียม 28.30 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บรักษาไว้ระยะเวลานาน 60 และ 90 วัน เปอร์เซ็นต์ความงอกลดลงเหลือ 12.30 และ 8.30 เปอร์เซ็นต์ และการเก็บรักษาเมล็ดเทียมที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลานาน 15, 60 และ 90 วัน เมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 30.3, 14.6 และ 11.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในปีถัดมา Piccioni and Standardi (1995) ทดลองเคลือบตาของพืช 6 ชนิด ได้แก่ แอปเปิ้ล, กีวี, Birch, Hawthorn, แบล็คเบอร์รี่ และราสเบอร์รี่ ด้วยสารอัลจินต จากนั้นนำเมล็ดเทียมที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารที่มีธาตุอาหารและไม่มีธาตุอาหารเพื่อเปรียบเทียบกัน พบว่าเมล็ดเทียมของพืชทั้ง 6 ชนิดสามารถเจริญได้เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารที่มีธาตุอาหารเท่านั้น ส่วน Sushmita *et al.* (1998) ทำการทดลองเคลือบโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่ได้จากการผสมระหว่าง *Phalaenopsis* cv. Jane และ *Phalaenopsis* cv. Abrae ด้วยสารโซเดียมอัลจินตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต 100 และ 200 มิลลิโมล จากนั้นนำเมล็ดเทียมที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 2, 3 และ 8 สัปดาห์ ทำการย้ายเมล็ดเทียมลงเลี้ยงบนอาหาร พบว่าการพัฒนาของเมล็ดเทียมที่ใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต 100 มิลลิโมลให้ผลที่ดีที่สุด ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสามารถช่วยให้เมล็ดเทียมงอกได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและเมล็ดเทียมทุกเมล็ดสามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชได้ แต่อย่างไรก็ตามอัตราการงอกจะลดลงเมื่อทำการเก็บรักษาในระยะเวลาที่ยาวนานออกไป ในปีเดียวกัน Devi *et al.* (1998) ทดลองใช้โปรโตคอร์มของ *Agrostophyllum myrianthum*, *Cymbidium longifolium*, *Phaius tankervilleae* และ *Renanthera imschootiana* ที่มีอายุ 60-70 วัน ทำการเคลือบด้วยสาร

โซเดียมอัลจินเตและเลี้ยงบนอาหารสูตร Nitch ที่มี IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโปรโตคอร์มที่ไม่ได้ทำการเคลือบก็ทำเช่นเดียวกัน โปรโตคอร์มที่เคลือบจะถูกเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง, 4 และ -20 องศาเซลเซียส พบว่าโปรโตคอร์มทั้ง 4 ชนิดที่ทำการเคลือบสามารถกลับมาเจริญเติบโตได้ดีกว่าโปรโตคอร์มที่ไม่ได้เคลือบ โปรโตคอร์มที่เคลือบและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องสามารถเจริญเติบโตได้ภายใน 35-40 วัน ส่วนโปรโตคอร์มที่เคลือบและเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 200 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความรอดชีวิตถึง 70 เปอร์เซ็นต์ แต่โปรโตคอร์มที่เก็บรักษาไว้ในที่ -20 องศาเซลเซียสภายหลังการเก็บรักษาไม่สามารถรอดชีวิตทั้งหมด ในปีถัดมา Datta *et al.* (1999) ทดลองเคลือบโปรโตคอร์ม *Geodorum densiflorum* ที่มีอายุ 30 วัน ด้วยสารโซเดียมอัลจินเต และทดสอบความงอกโดยการเลี้ยงบนอาหารสูตร Modified Knudson C โดยเพิ่มน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์, peptone 2 กรัมต่อลิตร, BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมล็ดเทียมที่เก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 120 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความงอกถึง 88 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโปรโตคอร์มที่ไม่ได้เคลือบนั้นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ภายหลังจากเก็บรักษาไว้ในที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะ 30 วัน ในปีถัดมา Munu *et al.* (2002) ได้ทดลองเคลือบโปรโตคอร์มของ *Vanda coerulea* ที่มีอายุ 40 วัน ด้วยโซเดียมอัลจินเตและนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 120 วัน จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ส่วนโปรโตคอร์มที่ไม่ได้เคลือบเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 30 วัน จากนั้นย้ายลงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เช่นเดียวกัน พบว่าโปรโตคอร์มที่เคลือบนั้นสามารถงอกได้ 80 เปอร์เซ็นต์ภายหลังจากการเลี้ยงบนอาหารเป็นระยะเวลา 15-20 วัน สำหรับโปรโตคอร์มที่เคลือบและเก็บรักษาไว้ในที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 120 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความงอก 72 เปอร์เซ็นต์ และที่เก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิห้องมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วน โปรโตคอร์มที่ไม่ได้เคลือบและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องกับที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 30 วัน โปรโตคอร์มทั้งหมดไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

3. การเก็บรักษาแบบแช่แข็งหรือการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation) การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชโดยการเปลี่ยนถ่ายอาหารจำเป็นต้องทำอย่างสม่ำเสมอและต่อเนื่องซึ่งสิ้นเปลืองแรงงานและค่าใช้จ่าย การเก็บเนื้อเยื่อพืชไว้ในอุณหภูมิต่ำมาๆดังเช่นอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสของไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) (Withers, 1985) เป็นการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง ซึ่งหยุดกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ของพืช ไม่มีการแบ่งเซลล์และไม่มีการบวนการทางเมตาบอลิซึมต่างๆเกิดขึ้นคล้ายกับการพักตัวของเมล็ด ในทางทฤษฎีนั้นเนื้อเยื่อ

ของพืชจะคงสภาพนั้นไปตลอดกาล และเมื่อนำออกสู่สภาวะปกติเซลล์ต่างๆจะยังมีชีวิต สามารถแบ่งเซลล์ มีการเจริญเติบโตและมีการพัฒนาเป็นต้นพืชได้ตามปกติ (Ashmore, 1997)

ซึ่ง Erica (1994) รายงานว่ากระบวนการเก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยทั่วไป สามารถแบ่งออกเป็น 5 วิธีการดังนี้ 1) การปรับสภาพเนื้อเยื่อ (pre-growth) เพื่อที่จะทนต่อสภาพความเครียด เช่น การเติม proline, trehalose, abscisic acid หรือแม้แต่การเติม DMSO (dimethylsulfoxide) 1-5 เปอร์เซ็นต์ ช่วยให้เนื้อเยื่อปลายยอดสามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ดีขึ้น 2) การปรับสภาพเนื้อเยื่อให้ทนต่อการแข็งตัว (cryoprotective treatment) ซึ่งอาจเป็นการทำให้เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำ (dehydration) เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำในเซลล์เกิดการแข็งตัวขณะที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว อาจทำได้โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง การใช้สารดูดความชื้น การใช้ลมจากตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (flow cabinet) เพื่อลดปริมาณน้ำในเซลล์ หรืออีกวิธีการหนึ่งคือ การเติมสารเคมีที่มีความเข้มข้นสูง (cryoprotectants) เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำภายในเซลล์เกิดการแข็งตัวเนื่องจากสารเคมีทำให้ของเหลวภายในเซลล์มีสภาพความเข้มข้นสูง เซลล์จึงไม่แตกขณะที่ทำการแช่แข็ง เรียกวิธีการนี้ว่า Vitrification 3) การแช่แข็งและการเก็บรักษา (freezing) กระบวนการนี้อาจนำเนื้อเยื่อแช่ในไนโตรเจนเหลวทันทีหรืออาจใช้วิธีการค่อยๆลดอุณหภูมิก่อนจนถึงระดับหนึ่งแล้วจึงเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวต่อไป 4) การละลายตัวหลังการเก็บรักษา (thawing) ทำโดยการนำเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาที่อยู๋ภายในหลอดทดลองแช่แข็ง (cryovial) ละลายด้วยน้ำสะอาดปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส 5) การชักนำให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตคืนสู่สภาพปกติ (recovery) การทำให้เนื้อเยื่อพืชสามารถกลับสู่สภาวะปกติคือ เนื้อเยื่อพืชยังมีชีวิต สามารถแบ่งเซลล์และมีการเจริญเติบโตเป็นต้นพืชได้ตามปกติ

3.1 การเก็บแบบแช่แข็งโดยวิธี Dehydration การเก็บรักษาด้วยวิธีการนี้เป็นการลดปริมาณน้ำในเซลล์ เพื่อการป้องกันไม่ให้น้ำในเซลล์ของเนื้อเยื่อพืชนั้นเกิดการแข็งตัวในขณะที่ทำการเก็บรักษา สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การผึ่งให้เซลล์แห้ง การใช้สารดูดความชื้น รวมไปถึงการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (อารีย์, 2541) น้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นสูงมีผลต่อแรงดันออสโมติกของเซลล์โดยการทำให้เซลล์สูญเสียน้ำแต่เซลล์ไม่ได้รับความเสียหาย (Engelmann, 1991) ซึ่งในพืชแต่ละชนิดจะใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมแตกต่างกันออกไป ดังนั้นจึงต้องพิจารณาทั้งชนิดของพืช ขนาดชิ้นส่วนของพืชก่อนที่จะนำมาทำการทดลอง ดังเช่นงานทดลองของ Edward *et al.* (1993) ที่นำ immature embryo ของ spring wheat (*Triticum aestivum* L.) เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารยับยั้งการเจริญเติบโต ABA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเก็บไว้ในเครื่อง CRYO-MED ที่สามารถรักษาระดับของอุณหภูมิไว้ที่

อุณหภูมิ -35 องศาเซลเซียส และที่ 60 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะย้ายลงเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำออกมาละลายที่อุณหภูมิห้องก่อนย้ายลงอาหาร สังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเอ็มบริโอ สามารถเจริญและพัฒนาได้ภายใน 3 สัปดาห์หลังจากการเลี้ยง

3.2 การเก็บแบบแช่แข็งโดยวิธี Vitrification เป็นวิธีการเก็บรักษาโดยใช้สารเคมีเพื่อ ป้องกันไม่ให้น้ำในเซลล์ตกผลึกแข็งตัวเป็นน้ำแข็ง ซึ่งสารเคมีที่ใช้มีทั้งที่สามารถซึมผ่านเข้าไป ในเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์ (permeable) หรืออาจเพียงห่อหุ้มอยู่ภายนอก โดยสารเคมีที่ใช้กับเนื้อเยื่อพืชเพื่อ เก็บแช่แข็งนั้นควรใช้ในความเข้มข้นที่ต่ำก่อนเพื่อให้สารสามารถแทรกตัว (penetrate) ผ่านเยื่อหุ้ม เซลล์ จึงใช้สารเคมีหรือสารละลายที่มีความเข้มข้นที่สูงขึ้น จากนั้นพืชจะเกิดการสูญเสียน้ำออกมา อันเนื่องจากผลของแรงดันออสโมซิส ส่งผลให้มีการดูดซึมสารเข้าไปแทนที่น้ำที่สูญเสียออกมา ของเหลวภายในเซลล์จึงมีความเข้มข้นสูง หลังจากนั้นจึงทำให้เนื้อเยื่อพืชแข็งตัวอย่างรวดเร็ว (Towill, 1995) ดังนั้นน้ำที่อยู่ในเซลล์จึงมีลักษณะปน่วนไม่เป็นผลึกน้ำแข็ง เซลล์ของพืชจึงไม่ เสียหายหรือได้รับอันตรายจากการแช่แข็ง (Ashmore, 1997) และหลังจากการละลายแล้ว ควรล้าง ชั้นส่วนพืชในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1.2 โมล เนื่องจากน้ำตาลซูโครสเข้มข้นสูงนี้ช่วย หลีกเลี่ยงการเกิดกระบวนการ rapid rehydration ที่เป็นสาเหตุให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหาย (Fukai, 1994) ส่วนสารเคมีที่ใช้ได้แก่ น้ำตาลซูโครส กลีเซอรอล (glycerol) เอทิลีนไกลคอล (ethylene glycol) และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาณการใช้นั้นจะแตกต่างกันไปตามสูตร ของสารละลายในแต่ละชนิด ซึ่งสารละลายสูตร PVS2 จะประกอบด้วย กลีเซอรอล (glycerol) เอทิลีน ไกลคอล (ethylene glycol) และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) 30 15 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Fukai, 1994)

Toshikazu *et al.* (1995) นำ Adventitious bud จาก bulb-scale ของลิลลี่ที่ทำการเลี้ยงใน ห้องทดลอง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 7-30 วัน ให้ความเข้มแสง $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน จากนั้นตัดเนื้อเยื่อเจริญขนาด 1.0 มิลลิเมตร (100 ชิ้น) เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS + ซูโครส 0.3 โมล ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 วัน ย้ายเนื้อเยื่อลงในหลอดทดลอง ทำการเติมสารละลาย กลีเซอรอล 2 โมล + ซูโครส 0.4 โมล ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 20 นาที และที่ 0 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 110 นาที เพื่อทำการเปรียบเทียบ จากนั้นทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง นำ ออกมาละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ย้ายเนื้อเยื่อลง 1.8 มิลลิลิตร ของซูโครส 1.2 โมล นาน 20 นาที จากนั้นย้ายลงเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี Filter papers พบว่าสามารถ

เจริญเติบโตได้ 5 วันและหลังย้ายลงเลี้ยงบนอาหาร 4 สัปดาห์ สามารถเจริญไปเป็นยอดได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และยังพบอีกว่าในขั้นการเตรียมเนื้อเยื่อโดยใช้อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลา นานมากกว่า 7 วัน จะช่วยเพิ่มการสร้างยอดได้มากขึ้น Ishikawa *et al.* (1997) นำเมล็ดกล้วยไม้ *Bletilla striata* Rehb.f. เลี้ยงในอาหารสูตร New Dogashima (ND) เป็นระยะเวลา 10 วัน หลังจากนั้นทำการเตรียมเนื้อเยื่อโดยการเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ที่มีน้ำตาลซูโครส 0.3 โมล ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในที่มืด เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นเติมสารกลีเซอรอล 2 โมล และ ซูโครส 0.4 โมลเป็นระยะเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และใช้สารละลาย PVS2 ความเข้มข้นสูงเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นย้ายไปเก็บในไนโตรเจนเหลว 30 นาที เมื่อครบระยะเวลานำเอมบริโอมาละลายอย่างรวดเร็ว และนำมาล้างด้วยอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร ND ร่วมกับซูโครส 1.2 โมล เป็นระยะเวลา 20 นาที แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ND พบว่าการพัฒนาของเอมบริโอไปเป็นต้นพืชเป็นไปอย่างปกติ ส่วนอัตราการรอดชีวิตมีประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์

เช่นเดียวกันกับ Kanchit (2000) ได้นำฝักกล้วยไม้ *Doritis pulcherrima* Lindl. อายุ 3 เดือนมาทำการทดลอง พบว่าการเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 50 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดคือ 62 เปอร์เซ็นต์ ในปีเดียวกัน Philip (2000) ทำการศึกษาการพัฒนาระบบการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมแบบ long term โดยใช้ Protocorm like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้ลูกผสม *Dendrobium* cv.Kasem Boonchoo White โดยศึกษาหาความแตกต่างของสารที่ใช้เตรียมเนื้อเยื่อด้วยการทำให้ของเหลวภายในเซลล์อยู่ในสภาพความเข้มข้นสูงด้วย cryoprotectant ที่มี loading solutions ที่แตกต่างกัน (LS1 LS2 LS3 LS4 LS5 และ LS6) หยดให้กับ PLBs ทิ้งไว้ 15 นาที ทุกทรีตเมนต์ ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังจากที่เก็บแช่แข็ง ในช่วง 7.4 – 34.4 เปอร์เซ็นต์ แต่ยกเว้น LS1 และ LS2 และในการทดสอบ Vitrification Solutions (VS1 VS2 VS3 VS4 และ VS5) ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 10 นาที โดยทุก treatment มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 11.1-39.2 เปอร์เซ็นต์ และให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 7.4-26.3 เปอร์เซ็นต์แต่ยกเว้น VS1 และเมื่อใช้ VS3 ที่เวลา 0 5 10 15 20 25 และ 30 นาที เปอร์เซ็นต์ของความมีชีวิต 20.1-53.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการรอดชีวิตหลังจากการเก็บรักษามีเปอร์เซ็นต์ 3.7-45 เปอร์เซ็นต์ พบการรอดชีวิตสูงสุด (48.5%) ที่ระยะเวลา 30 นาที เช่นเดียวกัน Tsukazaki *et al.* (2000) ได้ใช้เซลล์แขวนลอยของกล้วยไม้ *Doritaenopsis* cv. New Toyohashi ทำการเตรียมเซลล์ในอาหารเหลวสูตร New Dogashima ที่มีซูโครส 0.1 โมล และ abscisic acid (ABA) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติมสารที่มีส่วนประกอบของ กลีเซอรอล 2 โมล และ ซูโครส 4 โมล เป็นระยะเวลานาน 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และดึงน้ำออกด้วยสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 1-3 ชั่วโมงใน

น้ำแข็ง หลังจากนั้นนำลงเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความรอดชีวิต 64 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบด้วย 2, 3, 5 – Triphenyltetra zolium chloride

3.3 การเก็บแบบแช่แข็งโดยวิธี Encapsulation / Dehydration การเก็บรักษาโดยวิธีการนี้ทำโดยการนำเมล็ดเทียมที่ได้จากการเคลือบชั้นส่วนของพืชด้วยสารอัลจินตหรือสารที่ทำให้เกิดเจล จากนั้นนำไปทำให้สูญเสียน้ำด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การใช้สารซิลิกาเจล หรือการใช้น้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นสูง ก่อนการเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวต่อไป (Ashmore, 1997)

Fukai *et al.* (1994) ใช้ส่วนของต้นผีเสื้อ (*Dianthus hybridus*) พันธุ์ Sakuranadcsiko มาเคลือบด้วยสารอัลจินตแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.4 – 1.0 โมล เป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปคั่งน้ำให้เหลือประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ทำการละลาย (Thawing) และนำไปเลี้ยงบนอาหาร พบว่าสามารถการเจริญได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Martinez *et al.* (1999) ทำการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์โดยใช้กระบวนการของเมล็ดเทียมและการคั่งน้ำออกสำหรับชิ้นส่วนปลายยอดของ hop ในสภาพปลอดเชื้อภายหลังจากตัดชิ้นส่วนปลายยอด และหุ้มด้วยสารอัลจินตที่มีน้ำตาลซูโครส 0.5 โมล ทำการเตรียมเนื้อเยื่อ 2 วัน โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วย ซูโครส 0.75 โมล ทำการคั่งน้ำด้วยสารซิลิกาเจลในตู้ Flow cabinet เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ตามด้วยการทำให้แห้งตัวอย่างรวดเร็วในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 60 นาที และทำการละลายอย่างช้าๆ พบว่ายอดสามารถเจริญเติบโตได้ 80 เปอร์เซ็นต์

3.4 การเก็บแบบแช่แข็งโดยวิธี Encapsulation / Vitrification การเก็บรักษาด้วยวิธีการนี้มีความคล้ายคลึงกันกับการเก็บแช่แข็งด้วยวิธี vitrification แต่มีความแตกต่างคือทำการการเคลือบชั้นส่วนของพืชด้วยสารอัลจินตก่อน จากนั้นจึงทำตามขั้นตอนของการเก็บแช่แข็งด้วยวิธี vitrification ต่อไป ซึ่งการเคลือบชั้นส่วนของพืชด้วยสารอัลจินตก่อนทำการเก็บแช่แข็งนั้นจะช่วยลดความเป็นพิษที่ชั้นส่วนของพืชจะต้องสัมผัสกับสารเคมีโดยตรงได้ (Ashmore, 1997)

Tannoury (1994) ใช้เนื้อเยื่อปลายยอดของต้นคาร์เนชั่นที่ได้จากต้นที่ทำการเลี้ยงในห้องทดลองมาเคลือบด้วยสารอัลจินต หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารเหลวที่มีน้ำตาลซูโครส 0.75 โมล เป็นระยะเวลานาน 18 ชั่วโมง ก่อนการเติมสารละลายที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส น้ำ และโพลีเอทิลีนไกลคอล ในอัตราส่วน 6 : 4 : 6 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที นำลงแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวหลังจากการเก็บรักษาพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Matsumoto *et al.* (1996) ได้นำเอาเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

ของวาซาบิ (wasabi ; *Wasabia japonica*) มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร 1/2 MS และน้ำตาลซูโครส 0.3 โมล ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 1 วัน จึงนำไปเคลือบด้วยสารอัลจินตที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอล และน้ำตาลซูโครส 2 และ 0.4 โมล ตามลำดับ จากนั้นเติมด้วยสารละลายสูตร PVS2 หรือ PVS3 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 30 นาที หรือที่ 0 องศาเซลเซียส นาน 70 -100 นาที จากนั้นทำการเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว พบว่าหลังการเก็บรักษาเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดของวาซาบิสามารถกลับมาเจริญได้ใหม่ภายหลังจากการเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 3 วัน โดยมีอัตราการเจริญของยอดเฉลี่ยประมาณ 96 เปอร์เซ็นต์



บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

ในการทดลองครั้งนี้ใช้ฝัก โปรโตคอร์ม และต้นอ่อนของเอื้องแซะหลวง รวมทั้งอุปกรณ์สำหรับปฏิบัติงานในตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารตามสูตร VW และสารเคมีที่ใช้เพิ่มเติมในแต่ละการทดลอง ดังต่อไปนี้

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ฝักเอื้องแซะหลวง
2. โปรโตคอร์มเอื้องแซะหลวงระยะ pro meristematic และระยะ leaf primordia ที่ได้จากการเพาะเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์ 14 และ 21 วัน
3. ต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงที่ได้จากการเพาะเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์ อายุ 3 เดือน
4. อุปกรณ์สำหรับปฏิบัติงานในตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ (air flow cabinet) ปากคีบ (forceps) มีดผ่าตัด ตะเกียงแอลกอฮอล์ จานแก้ว (petri dish) เป็นต้น
5. อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง เช่น เครื่องชั่งชนิดทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) เครื่องคนสารแบบมีแม่เหล็ก (magnetic stirrer) บีกเกอร์ แท่งแก้วคนสาร และขวดทรงกลมสำหรับใส่อาหาร
6. สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อ เอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์
7. สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารธาตุอาหารตามสูตร VW (ตารางผนวก 1) โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล น้ำตาลซูโครส (sucrose) น้ำกลั่น น้ำมะพร้าว ผงถ่าน และผงวุ้น
8. สารเคมีที่เพิ่มเติมในอาหารสังเคราะห์สำหรับการชะลอการเจริญเติบโต น้ำตาลซูโครส (sucrose) แมนนิทอล (mannitol) และสารชะลอการเจริญเติบโตแพคโคลบิวทราโซล (paclobutrazol)
9. สารเคมีที่ทำให้เกิดเจลของเมือกเตี้ยม (ตารางผนวก 2 ภาพผนวก 1) โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) และแคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
10. สารเคมีที่ใช้ในการเก็บแช่แข็ง (ตารางผนวก 3 ภาพผนวก 4) ซูโครส (sucrose) ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) กลีเซอรอล (glycerol) เอทิลีนไกลคอล (ethylene glycol) และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulphoxide)

วิธีการวิจัย

การศึกษาการเก็บรักษาพันธุ์กรรมเอื้องชะหลวงในสภาพปลอดเชื้อแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 การทดลองดังต่อไปนี้คือ

การทดลองที่ 1

ศึกษาการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องชะหลวง

การทดลองนี้ศึกษาถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลซูโครส น้ำตาลแมนนิทอล และสารชะลอการเจริญเติบโตเพคโคโลบิวทราโซล สำหรับการชะลอการเจริญเติบโตเพื่อยืดเวลาการย้ายเลี้ยงครั้งต่อไปให้นานมากขึ้น

การทดลองย่อยที่ 1.1 ผลของระดับความเข้มข้นของซูโครสต่อการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องชะหลวง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) มีระดับความเข้มข้นของซูโครสที่ต่างกัน 6 ระดับเป็นสิ่งทดลอง (Treatments) คือ 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งสิ้น 6 สิ่งทดลองๆ 10 ข้างละ 2 ต้น รายละเอียดของสิ่งทดลอง มีดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 ไม่เติมซูโครส

สิ่งทดลองที่ 2 ซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 3 ซูโครส 4 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 4 ซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 5 ซูโครส 8 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 6 ซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์

วิธีการทดลอง

คัดเลือกต้นอ่อนของเอื้องชะที่มีอายุ 3 เดือน โดยเลือกให้มีขนาดใกล้เคียงกัน จากนั้นย้ายต้นอ่อนเอื้องชะลงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร VW (1949) ที่มีความแตกต่างของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 6 ระดับคือ 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการทดลอง 10 ข้างละ 2 ต้น ภายหลังจากย้ายต้นอ่อนทำการเก็บข้อมูลก่อนทำการทดลอง และทำการเก็บข้อมูลทุกๆ 1 เดือนเป็นระยะเวลา 6 เดือน

การบันทึกข้อมูล โดยเก็บข้อมูลดังต่อไปนี้ คือ

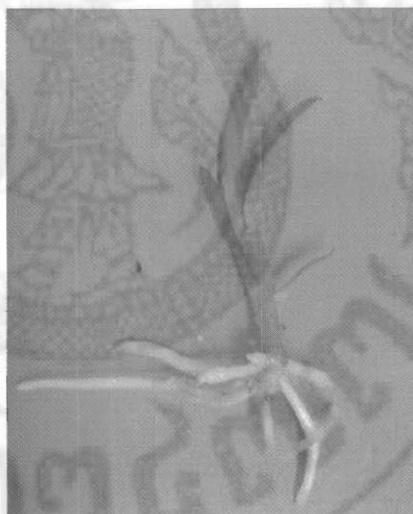
1. ความสูงของลำลูกกล้วย : วัดจากโคนลำ (บนผิวอาหารสังเคราะห์) จนถึงส่วนปลายลำ
2. ความกว้างของลำลูกกล้วย : วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณส่วนที่กว้างที่สุดของลำ

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) โดยใช้ Model CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกต โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลองเดือนกุมภาพันธ์ 2548 และเสร็จสิ้นการทดลองเมื่อเดือนสิงหาคม 2548



ภาพ 1 ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องชะหลวงที่นำมาทดลอง

การทดลองย่อยที่ 1.2 ผลของระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลต่อการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องชะแหละ

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) มีระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่ต่างกัน 6 ระดับเป็นสิ่งที่ทดลอง (Treatments) คือ 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งสิ้น 6 สิ่งทดลองๆ 10 ซ้ำๆละ 2 ต้น รายละเอียดของสิ่งทดลอง มีดังนี้

- สิ่งทดลองที่ 1 ไม่เติมแมนนิทอล
- สิ่งทดลองที่ 2 แมนนิทอล 2 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 3 แมนนิทอล 4 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 4 แมนนิทอล 6 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 5 แมนนิทอล 8 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 6 แมนนิทอล 10 เปอร์เซ็นต์

วิธีการทดลอง

วิธีการเตรียมดิน วิธีการทดลอง การบันทึกข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูล ระยะเวลาทำการทดลอง ทำเช่นเดียวกันกับการทดลองย่อยที่ 1.1 แต่ย้ายต้นอ่อนเอื้องชะแหละในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร VW (1949) ที่มีระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลแตกต่างกัน 6 ระดับคือ 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์

การทดลองย่อยที่ 1.3 ผลของระดับความเข้มข้นของแพคโคลบิวทราโซลต่อการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องชะแหละ

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) มีระดับความเข้มข้นของแพคโคลบิวทราโซลที่ต่างกัน 6 ระดับเป็นสิ่งที่ทดลอง (Treatments) คือ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 ppm รวมทั้งสิ้น 6 สิ่งทดลองๆ 10 ซ้ำๆละ 2 ต้น รายละเอียดของสิ่งทดลอง มีดังนี้

- สิ่งทดลองที่ 1 ไม่เติมแพคโคลบิวทราโซล
- สิ่งทดลองที่ 2 แพคโคลบิวทราโซล 0.2 ppm
- สิ่งทดลองที่ 3 แพคโคลบิวทราโซล 0.4 ppm

สิ่งทดลองที่ 4 แพลโคลบิวทราโซล 0.6 ppm

สิ่งทดลองที่ 5 แพลโคลบิวทราโซล 0.8 ppm

สิ่งทดลองที่ 6 แพลโคลบิวทราโซล 1 ppm

วิธีการทดลอง

วิธีการเตรียมต้น วิธีการทดลอง การบันทึกข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูล ระยะเวลาทำการทดลอง ทำเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1.1 แต่ย้ายต้นอ่อนเอื้องแซะลงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร VW (1949) ที่มีระดับความเข้มข้นของแพลโคลบิวทราโซลแตกต่างกัน 6 ระดับคือ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 ppm

การทดลองที่ 2

ศึกษาวิธีการและอุณหภูมิในการเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์มของเอื้องแซะหลวง

ศึกษาถึงการเก็บรักษาชิ้นส่วนของเมล็ดและโปรโตคอร์มที่มีระยะการเจริญเติบโตที่ต่างกัน 2 ระยะคือ ระยะ pro meristematic และระยะ leaf primordia โดยเก็บรักษาเมล็ดเทียมที่มีความแตกต่างของอุณหภูมิ 2 ระดับคือ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เพื่อทราบถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาชิ้นส่วนต่างๆทั้งเมล็ดและโปรโตคอร์มของเอื้องแซะ

การทดลองย่อยที่ 2.1 ผลของอุณหภูมิและการเคลื่อนต่อการเก็บรักษาเมล็ดเอื้องแซะหลวง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 2 Factorial in Completely Randomized Design โดยแบ่งเป็น 2 ปัจจัยคือ การเคลื่อน 2 แบบ (ไม่เคลื่อนเมล็ด และเคลื่อนเมล็ด) และอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา 2 ระดับ (4 และ 25 องศาเซลเซียส) รวมทั้งสิ้น 4 สิ่งทดลองๆละ 4 ซ้ำๆละ 10 เมล็ดเทียม รายละเอียดของสิ่งทดลอง มีดังนี้

สิ่งทดลองที่ 1 ไม่เคลื่อนเมล็ด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สิ่งทดลองที่ 2 ไม่เคลื่อนเมล็ด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

สิ่งทดลองที่ 3 เคลื่อนเมล็ด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สิ่งทดลองที่ 4 เคลื่อนเมล็ด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วิธีการทดลอง

ทำการแบ่งเมล็ดเอื้องแซะออกเป็น 2 ส่วน โดยนำไปเคลือบด้วยสารอัลจินเตนหนึ่งส่วน จากนั้นนำทั้งเมล็ดเอื้องแซะที่ไม่ได้เคลือบและที่เคลือบบรรจุในหลอดทดลอง หุ้มทับด้วยพาราฟิล์มและทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์ สูตร VW (1949) คัดแปลงเพื่อทดสอบความงอกทุกๆ 1 เดือนเป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยเก็บข้อมูลจำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอก และเปอร์เซ็นต์ความงอก

การบันทึกข้อมูล

1. จำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอก : นับจำนวนวันตั้งแต่วันที่เริ่มเพาะเมล็ดเทียมลงบนอาหารสังเคราะห์จนถึงวันที่เมล็ดงอกเป็นโปรโตคอร์ม
2. เปอร์เซ็นต์ความงอก: เปรียบเทียบปริมาณของเมล็ดที่งอกกับเมล็ดที่เพาะทั้งหมด และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) โดยใช้ Model Factorial in CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกตโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลองเดือนกุมภาพันธ์ 2548 และเสร็จสิ้นการทดลองเมื่อเดือนสิงหาคม 2548

การทดลองย่อยที่ 2.2 ผลของอุณหภูมิและระยะการเจริญเติบโตต่อการเก็บรักษาโปรโตคอร์ม

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 2 Factorial in Completely Randomized Design โดยแบ่งเป็น 2 ปัจจัยคือ เมล็ดเทียมของโปรโตคอร์มที่มีระยะการเจริญเติบโตต่างกัน 2 ระยะ (ระยะ pro meristematic และระยะ leaf primordia) และอุณหภูมิ 2 ระดับ (4 และ 25 องศาเซลเซียส) รวมทั้งสิ้น 4 สิ่งทดลองๆละ 4 ซ้ำๆละ 10 เมล็ดเทียม รายละเอียดของสิ่งทดลอง มีดังนี้

- สิ่งทดลองที่ 1 โปรโตคอร์ัมระยะ pro meristematic ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
 สิ่งทดลองที่ 2 โปรโตคอร์ัมระยะ pro meristematic ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
 สิ่งทดลองที่ 3 โปรโตคอร์ัมระยะ leaf primordia ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
 สิ่งทดลองที่ 4 โปรโตคอร์ัมระยะ leaf primordia ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วิธีการทดลอง

เคลือบโปรโตคอร์ัมทั้ง 2 ระยะด้วยสารอัลจินต โดยนำโปรโตคอร์ัมมาแขวนลอยในสารละลายโซเดียมอัลจินต และดูดโปรโตคอร์ัมหยดลงในแคลเซียมกลูไนด์ไดไฮดเรตทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 30 นาที ทำการเขย่าเป็นระยะหลังจากนั้นล้างเมล็ดเทียมด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับเมล็ดเทียมให้แห้งและบรรจุในหลอดทดลองหุ้มทับด้วยพาราฟิล์ม (ภาพผนวก 2) ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการทดสอบการเจริญเติบโตทุกๆ 1 เดือน เป็นระยะเวลา 6 เดือนโดยนำเมล็ดเทียมที่เก็บรักษามาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW (1949) คัดแปลง (ภาพผนวก 3) ทำการเก็บข้อมูลหลังจากนำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ดังต่อไปนี้ คือ จำนวนวันที่เมล็ดเทียมงอก และเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียม การวิเคราะห์ผลการทดลอง เหมือนกับการทดลองย่อย 2.1

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ผลการทดลองเหมือนกับการทดลองย่อย 2.1

การบันทึกข้อมูล

1. จำนวนวันที่เมล็ดเทียมงอก : นับจำนวนวันตั้งแต่วันที่เริ่มเพาะเมล็ดเทียมลงบนอาหารสังเคราะห์จนถึงวันที่โปรโตคอร์ัมงอกออกมาจากเมล็ดเทียม
2. เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียม : นับจำนวนเมล็ดเทียมที่งอกและคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลองเดือนธันวาคม 2547 และเสร็จสิ้นการทดลองเมื่อเดือนสิงหาคม 2548

การทดลองที่ 3

ศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์ม ของเอื้องชะหลวงในไนโตรเจนเหลว

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมเอื้องชะหลวงในไนโตรเจนเหลว ศึกษาถึงวิธีการลดปริมาณน้ำในเซลล์ของเมล็ดและโปรโตคอร์มก่อนนำไปเก็บรักษาแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสของไนโตรเจนเหลว เพื่อให้ภายหลังการเก็บแช่แข็งเมล็ดและโปรโตคอร์มสามารถกลับมาเจริญเติบโตได้ตามปกติ

การทดลองย่อยที่ 3.1 ศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดด้วยการเติมสารปกป้องเนื้อเยื่อพืชในการเตรียมเมล็ดเอื้องชะหลวงก่อนการเก็บแช่แข็ง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) โดยมีระยะเวลาในการเติมสารปกป้องเนื้อเยื่อพืช PVS2 9 ระยะเวลา คือ 0 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 นาที เป็นสิ่งทดลองรวมเป็น 9 สิ่งทดลอง 4 ซ้ำ รายละเอียดของสิ่งทดลอง มีดังนี้

- สิ่งทดลองที่ 1 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 0 นาที
- สิ่งทดลองที่ 2 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 10 นาที
- สิ่งทดลองที่ 3 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 20 นาที
- สิ่งทดลองที่ 4 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 30 นาที
- สิ่งทดลองที่ 5 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 40 นาที
- สิ่งทดลองที่ 6 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 50 นาที
- สิ่งทดลองที่ 7 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 60 นาที
- สิ่งทดลองที่ 8 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 70 นาที
- สิ่งทดลองที่ 9 ระยะเวลาเติมสารละลาย PVS2 80 นาที

วิธีการทดลอง

นำเมล็ดเอื้องชะหลวงใส่ลงในหลอดทดลองสำหรับการแช่แข็ง จากนั้นเติมสารละลายสูตร PVS2 เป็นระยะเวลา 9 ระยะเวลาคือ 0 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 นาที เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนดนำลงในไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพผนวก 5) เมื่อครบ 24 ชั่วโมงนำมาละลายในน้ำกลั่นหนึ่งขวดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2

นาที่ คูดสารละลายสูตร PVS2 ออกและทำการเติมสารละลาย RS (1.2M sucrose) ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 20 นาที จึงคูดสารละลาย RS ออกและนำโปรโตคอร์มเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร VW (1949) ดัดแปลง (ภาพผนวก 6) ทำการสังเกตและเก็บข้อมูลจำนวนวันที่เมสส์พัฒนาเป็นโปรโตคอร์ม

การบันทึกข้อมูล

จำนวนวันที่เมสส์พัฒนาเป็น โปรโตคอร์ม : นับจำนวนวันตั้งแต่วันที่เลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) โดยใช้ Model CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกตโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลองเดือนมีนาคม 2548 และเสร็จสิ้นการทดลองเมื่อเดือนสิงหาคม 2548

การทดลองย่อยที่ 3.2 ศึกษาวิธีการและระยะเวลาในการเติมสารปกป้องเนื้อเยื่อพืชในการเตรียมโปรโตคอร์มเอื้องชะหลวงก่อนการเก็บแช่แข็ง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 9 Factorial in Completely Randomized Design โดยแบ่งเป็น 2 ปัจจัยคือ วิธีการ 2 วิธีการ (Vitrification และ Encapsulation/Vitrification) และระยะเวลาในการเติมสารปกป้องเนื้อเยื่อพืช PVS2 9 ระยะ (0 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 นาที) รวมทั้งสิ้น 18 สิ่งทดลองๆละ 4 ซ้ำ รายละเอียดของสิ่งทดลอง มีดังนี้

- สิ่งทดลองที่ 1 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 0 นาที
- สิ่งทดลองที่ 2 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 10 นาที
- สิ่งทดลองที่ 3 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 20 นาที
- สิ่งทดลองที่ 4 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 30 นาที
- สิ่งทดลองที่ 5 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 40 นาที

- สิ่งทดลองที่ 6 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 50 นาที
 สิ่งทดลองที่ 7 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 60 นาที
 สิ่งทดลองที่ 8 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 70 นาที
 สิ่งทดลองที่ 9 วิธี Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 80 นาที
 สิ่งทดลองที่ 10 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 0 นาที
 สิ่งทดลองที่ 11 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 10 นาที
 สิ่งทดลองที่ 12 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 20 นาที
 สิ่งทดลองที่ 13 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 30 นาที
 สิ่งทดลองที่ 14 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 40 นาที
 สิ่งทดลองที่ 15 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 50 นาที
 สิ่งทดลองที่ 16 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 60 นาที
 สิ่งทดลองที่ 17 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 70 นาที
 สิ่งทดลองที่ 18 วิธี Encapsulation/Vitrification ระยะเวลาเติมสาร 80 นาที

วิธีการทดลอง

นำโปรโตคอร์มที่ไม่ได้เคลือบและที่เคลือบด้วยสารอัลจินตใส่ลงในหลอดทดลองสำหรับการแช่แข็ง จากนั้นเติมสารละลายสูตร PVS2 เป็นระยะเวลา 9 ระยะเวลาคือ 0 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 นาที เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนดนำลงในไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลา 24 ชั่วโมงนำหลอดทดลองออกจากไนโตรเจนเหลวนำมาละลายในกลั่นน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายสูตร PVS2 ออกและทำการเติมสารละลาย RS (1.2M sucrose) ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 20 นาที จึงดูดสารละลาย RS ออก และนำโปรโตคอร์มเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร VW (1949) คัดแปลงทำการสังเกตและเก็บข้อมูลจำนวนวันที่โปรโตคอร์มพัฒนา และเปอร์เซ็นต์ความงอก

การบันทึกข้อมูล

1. จำนวนวันที่โปรโตคอร์มพัฒนา : นับจำนวนวันตั้งแต่วันที่เลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์
2. เปอร์เซ็นต์ความงอก : นับจำนวนโปรโตคอร์มมีการพัฒนาและคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (Statistical Analysis System) โดยใช้ Model Factorial in CRD และแสดงผลในรูปของตาราง ANOVA โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละค่าสังเกตโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลองเดือนพฤศจิกายน 2547 และสิ้นสุดการทดลองเมื่อเดือนกุมภาพันธ์ 2548

สถานที่ทำการทดลอง

ทุกการทดลองทำการศึกษา ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาคารเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระศรีนครินทร์ ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัด เชียงใหม่

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 1 ผลการศึกษาการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องมะพลวง

ผลการทดลองย่อยที่ 1.1 ผลของระดับความเข้มข้นของชูโครสต่อการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องมะพลวง

จากการศึกษาการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องมะพลวงโดยการเติมน้ำตาลชูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน 6 ระดับคือ 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารสูตร VW เก็บข้อมูลทางด้านความสูงของลำลูกกล้วย และเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วย ทำการศึกษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน ปรากฏผลดังนี้

ความสูงของลำลูกกล้วย

พบว่าความสูงของลำลูกกล้วยเมื่อเริ่มทำการทดลองและภายหลังการทดลองเป็นระยะเวลา 1 เดือนความสูงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยเมื่อเริ่มต้นทำการทดลองมีความสูงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.35-1.42 เซนติเมตร และหลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 1 เดือนความสูงของลำลูกกล้วยเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 1.49-1.63 เซนติเมตร

หลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 2 และ 3 เดือนพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการทดลองเป็นระยะเวลา 2 เดือนพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของชูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ มีความสูงเฉลี่ยของลำลูกกล้วยน้อยที่สุดคือ 1.58 เซนติเมตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับระดับความเข้มข้น 0 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (1.80 1.71 และ 1.66 เซนติเมตรตามลำดับ) แต่มีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้นของชูโครส 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (1.94 และ 1.86 เซนติเมตร) โดยที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์มีความสูงลำลูกกล้วยเฉลี่ยสูงที่สุด และภายหลังการทดลองเป็นระยะเวลา 3 เดือนความสูงของลำลูกกล้วยยังคงเพิ่มขึ้น โดยระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์มีความสูงของลำลูกกล้วยน้อยที่สุดคือ 1.71 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับระดับความเข้มข้น 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (1.93 และ 1.79 เซนติเมตร) แต่มีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้นของชูโครส 0 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (1.97 2.05 และ 2.06 เซนติเมตรตามลำดับ)

ภายหลังการทดลองเป็นระยะ 4 เดือน ความสูงของลำลูกกล้วยยังคงเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความสูงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.89-2.12 เซนติเมตร

เมื่อทำการทดลองเป็นระยะเวลา 5 เดือนจนถึงสิ้นสุดการทดลองในเดือนที่ 6 พบว่ามีความแตกต่างทางความสูง ซึ่งภายหลังการทดลอง 5 เดือนที่ระดับความเข้มข้นของชูโครส 10 เปอร์เซ็นต์

ยังคงมีความสูงเฉลี่ยของลำลูกกล้วยน้อยที่สุดคือ 1.92 เซนติเมตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับระดับความเข้มข้น 0 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (2.15 2.08 และ 2.07 เซนติเมตรตามลำดับ) แต่มีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้นของซูโครส 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (2.45 และ 2.29 เซนติเมตร) โดยที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์มีความสูงลำลูกกล้วยเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 2.45 เซนติเมตร จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ความสูงของลำลูกกล้วยยังคงเพิ่มขึ้นโดยที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์มีความสูงของลำลูกกล้วยน้อยที่สุดคือ 2.09 เซนติเมตร โดยไม่มีความแตกต่างกับความเข้มข้น 0 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (2.22 2.09 และ 2.09 เซนติเมตรตามลำดับ) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้น 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (2.51 และ 2.36 เซนติเมตร) ซึ่งความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์มีความสูงเฉลี่ยสูงที่สุด (ตาราง 1 ภาพผนวก 7 ตารางผนวก 9 ถึง 15)

ตาราง 1 ความสูงของลำลูกกล้วยต้นเอื้องแซะจากการชะลอการเจริญเติบโตด้วยซูโครส เป็นระยะเวลา 6 เดือน

ความเข้มข้น (%)	ความสูง (เซนติเมตร)						
	เริ่มต้น	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน
0	1.42	1.59	1.80 abc	1.97 bc	2.10	2.15 ab	2.22 ab
2	1.36	1.56	1.94 c	2.05 c	2.10	2.45 b	2.51 c
4	1.35	1.52	1.86 bc	2.06 bc	2.12	2.29 bc	2.36 bc
6	1.39	1.63	1.71 ab	1.93 abc	2.03	2.08 ab	2.09 ab
8	1.39	1.55	1.66 ab	1.79 ab	1.93	2.07 ab	2.09 ab
10	1.39	1.49	1.58 a	1.71 a	1.89	1.92 a	1.95 a
F-test	ns	ns	*	*	ns	**	**

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วย

เมื่อเริ่มทำการทดลองและภายหลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 1 เดือน เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.30-0.32 เซนติเมตรเมื่อเริ่มทำการทดลอง และมีขนาด 0.31-0.33 เซนติเมตรภายหลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 1 เดือน

พบว่าภายหลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 2 และ 3 เดือนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมีความแตกต่างกัน ซึ่งการเติมซูโครสทุกระดับความเข้มข้นทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกว้างกว่าการไม่เติมซูโครส โดยภายหลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 2 เดือนที่ระดับความเข้มข้นของซูโครส 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.47 0.47 0.49 0.52 และ 0.53 เซนติเมตรตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้นของซูโครส 0 เปอร์เซ็นต์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของลำลูกกล้วยน้อยที่สุด (0.39 เซนติเมตร) และเมื่อทำการทดลองเป็นระยะเวลา 3 เดือนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยมีขนาดเพิ่มขึ้นโดยที่ระดับความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.54 0.51 0.53 0.56 และ 0.55 เซนติเมตรตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้นของซูโครส 0 เปอร์เซ็นต์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของลำลูกกล้วยน้อยที่สุดคือ 0.45 เซนติเมตร

ภายหลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 4 เดือน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางยังคงเพิ่มขนาดขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้นของซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุดคือ 0.62 เซนติเมตร แต่ไม่แตกต่างกับที่ระดับความเข้มข้น 2 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (0.58 0.61 และ 0.59 เซนติเมตรตามลำดับ)

เมื่อทดลองเป็นระยะเวลา 5 เดือน และจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง พบว่าซูโครสความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุด โดยมีขนาด 0.71 เซนติเมตรภายหลังจากทดลอง 5 เดือน ซึ่งมีขนาดกว้างกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้นของซูโครส 0 2 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.52 0.63 0.64 0.69 และ 0.65 เซนติเมตรตามลำดับ และสูตรอาหารที่เติมซูโครส 2-8 เปอร์เซ็นต์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่าการไม่เติมซูโครสซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของลำลูกกล้วยน้อยที่สุด และปรากฏผลการทดลองเช่นเดียวกันเมื่อสิ้นสุดการทดลองในเดือนที่ 6 โดยที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ยังคงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุดคือ 0.72 เซนติเมตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้น 0 2 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (0.53 0.64 0.65 0.69 และ 0.67 เซนติเมตรตามลำดับ) (ตาราง 2 ภาพผนวก 8 ตารางผนวก 16 ถึง 22)

ตาราง 2 เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นเอื้องแซะจากการชะลอการเจริญเติบโตด้วย
ซูโครสเป็นระยะเวลา 6 เดือน

ความเข้มข้น (%)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)						
	เริ่มต้น	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน
0	0.31	0.32	0.39 b	0.45 b	0.51 c	0.52 c	0.53 c
2	0.31	0.33	0.47 a	0.54 a	0.58 ab	0.63 b	0.64 b
4	0.30	0.33	0.47 a	0.51 a	0.56 bc	0.64 b	0.65 b
6	0.31	0.31	0.49 a	0.53 a	0.61 ab	0.69 b	0.69 b
8	0.32	0.33	0.52 a	0.55 a	0.59 ab	0.65 b	0.67 b
10	0.30	0.32	0.53 a	0.55 a	0.62 a	0.71 a	0.72 a
F-test	ns	ns	**	**	**	**	**

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองย่อยที่ 1.2 ผลของระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลต่อการชะลอการ เจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวง

จากการศึกษาการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงในอาหารสูตร VW ที่มี
ระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่ต่างกัน 6 ระดับคือ 0 2 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการ
เก็บข้อมูลทางด้านความสูงของลำลูกกล้วย และเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วย ทำการศึกษาเป็น
ระยะเวลา 6 เดือน ปรากฏผลดังนี้

ความสูงของลำลูกกล้วย

จากการบันทึกข้อมูลและการวิเคราะห์ทางสถิติโดยแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) พบว่าความสูงของลำลูกกล้วยเมื่อเริ่มทำการทดลองความสูงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความสูงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.09-1.25 เซนติเมตร

ภายหลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 1 เดือนจนถึงสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีความแตกต่างทางความสูง โดยระดับความเข้มข้นของแมนนิทอล 10 เปอร์เซ็นต์มีความสูงเฉลี่ยของลำลูกกล้วยน้อยที่สุด โดยมีขนาด 1.14 เซนติเมตรภายหลังการทดลอง 1 เดือน ซึ่งไม่ต่างกับระดับความเข้มข้น 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (1.16 และ 1.20 เซนติเมตร) แต่มีนัยสำคัญทางสถิติกับที่ระดับความเข้มข้นของแมนนิทอล 0 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (1.44 1.29 และ 1.45 เซนติเมตรตามลำดับ) และปรากฏผลการทดลองเช่นเดียวกันเมื่อทดลองเป็นระยะเวลา 2 และ 3 เดือน โดยที่ระดับความเข้มข้นของแมนนิทอล 10 เปอร์เซ็นต์ ยังคงมีความสูงเฉลี่ยของลำลูกกล้วยน้อยที่สุดคือ 1.20 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับที่ระดับความเข้มข้น 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (1.23 และ 1.32 เซนติเมตร) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้นของแมนนิทอล 0 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (1.61 1.48 และ 1.68 เซนติเมตรตามลำดับ) โดยระดับความเข้มข้นของแมนนิทอล 4 เปอร์เซ็นต์มีความสูงลำลูกกล้วยเฉลี่ยสูงที่สุด สำหรับภายหลังการทดลองเป็นระยะเวลา 3 เดือนที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์มีความสูงเฉลี่ยของลำลูกกล้วยน้อยที่สุดคือ 1.28 เซนติเมตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับที่ระดับความเข้มข้น 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (1.38 และ 1.45 เซนติเมตร) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้นของแมนนิทอล 0 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (1.82 1.64 และ 1.89 เซนติเมตรตามลำดับ)

ภายหลังการทดลองเป็นระยะเวลา 4 และ 5 เดือนพบว่ามีความแตกต่างทางความสูง โดยที่ระดับความเข้มข้นของแมนนิทอล 10 เปอร์เซ็นต์มีความสูงเฉลี่ยของลำลูกกล้วยน้อยที่สุดคือ 1.31 เซนติเมตรภายหลังการทดลองเป็นระยะเวลา 4 เดือน ซึ่งไม่แตกต่างกับที่ระดับความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (1.47 เซนติเมตร) แต่มีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้นของแมนนิทอล 0 2 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (1.85 1.77 1.99 และ 1.53 เซนติเมตรตามลำดับ) โดยระดับความเข้มข้น 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์มีความสูงไม่ต่างกัน และที่ระดับความเข้มข้น 0 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์มีความสูงไม่แตกต่างกัน ภายหลังการทดลองเป็นระยะเวลา 5 เดือนที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ยังคงมีความสูงเฉลี่ยของลำลูกกล้วยน้อยที่สุดคือ 1.33 เซนติเมตร ซึ่งไม่ต่างกับระดับความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (1.47 เซนติเมตร) แต่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้นของแมนนิทอล 0 2 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (1.92 1.89 2.06 และ 1.56 เซนติเมตรตามลำดับ) โดยระดับ

ความเข้มข้น 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์มีความสูงไม่ต่างกัน และที่ระดับความเข้มข้น 0 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์มีความสูงไม่ต่างกัน

และเมื่อสิ้นสุดการทดลองในเดือนที่ 6 พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ยังคงมีความสูงเฉลี่ยของลำลูกกล้วยน้อยที่สุดคือ 1.35 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกับที่ระดับความเข้มข้น 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (1.59 และ 1.56 เซนติเมตร) แต่สูงกว่าระดับความเข้มข้นของแมนนิทอล 0 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (1.96 1.93 และ 2.14 เซนติเมตรตามลำดับ) (ตาราง 3 ภาพผนวก 9 ตารางผนวก 23 ถึง 29)

ตาราง 3 ความสูงของลำลูกกล้วยต้นเอื้องประจากการชะลอการเจริญเติบโตด้วยแมนนิทอล เป็นระยะเวลา 6 เดือน

ความเข้มข้น (%)	ความสูง (เซนติเมตร)						
	เริ่มต้น	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน
0	1.13	1.44 c	1.61 cd	1.82 cd	1.85 cd	1.92 c	1.96 b
2	1.11	1.29 b	1.48 bc	1.64 bc	1.77 c	1.89 c	1.93 b
4	1.25	1.45 c	1.68 d	1.89 d	1.99 d	2.06 c	2.14 b
6	1.05	1.16 a	1.23 a	1.38 a	1.47 ab	1.47 ab	1.59 a
8	1.14	1.20 ab	1.32 ab	1.45 ab	1.53 b	1.56 b	1.56 a
10	1.09	1.14 a	1.20 a	1.28 a	1.31 a	1.33 a	1.35 a
F-test	ns	**	**	**	**	**	**

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วย

เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยเมื่อเริ่มทำการทดลองจนถึงการทดลองเป็นระยะเวลา 2 เดือนพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.30-0.32 เซนติเมตรเมื่อเริ่มต้นทดลอง และภายหลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 1 และ 2 เดือน เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยยังคงมีขนาดเพิ่มขึ้นเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.34-0.39 เซนติเมตร และขนาด 0.40-0.47 เซนติเมตร

ภายหลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 3 เดือนเริ่มพบว่า มีความแตกต่างของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยที่ระดับความเข้มข้นของแมนนิทอล 4 เปอร์เซ็นต์ มีเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยเฉลี่ยมากที่สุดคือ 0.55 เซนติเมตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้น 0 2 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (0.46 0.49 0.49 0.47 และ 0.47 เซนติเมตรตามลำดับ)

ภายหลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 4 เดือนเส้นผ่านศูนย์กลางยังคงเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยของลำลูกกล้วยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.49-0.56 เซนติเมตร

ภายหลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 5 และ 6 เดือนพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของแมนนิทอล 10 เปอร์เซ็นต์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยเฉลี่ยมากที่สุดคือ 0.59 เซนติเมตรในเดือนที่ 5 ซึ่งไม่ต่างกับระดับความเข้มข้น 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (0.57 0.57 และ 0.55 เซนติเมตรตามลำดับ) แตกต่างมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้น 0 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (0.49 และ 0.54 เซนติเมตร) และหลังจากทดลองเป็นระยะเวลา 6 เดือน ปรากฏผลเช่นเดียวกันคือ ที่ระดับความเข้มข้นของแมนนิทอล 10 เปอร์เซ็นต์ยังคงมีเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยเฉลี่ยมากที่สุดคือ 0.61 เซนติเมตร โดยไม่แตกต่างกับระดับความเข้มข้น 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ (0.58 0.57 และ 0.57 เซนติเมตรตามลำดับ) มีขนาดกว้างมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้น 0 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (0.49 และ 0.54 เซนติเมตร) (ตาราง 4 ภาพผนวก 10 ตารางผนวก 30 ถึง 36)

ตาราง 4 เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นเอื้องชะงะจากการชะลอเจริญเติบโตด้วย
แมนนิทอลเป็นระยะเวลา 6 เดือน

ความเข้มข้น (%)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)						
	เริ่มต้น	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน
0	0.32	0.39	0.42	0.45 b	0.49	0.49 c	0.49 c
2	0.30	0.35	0.42	0.49 b	0.51	0.54 bc	0.54 bc
4	0.32	0.39	0.47	0.55 a	0.56	0.57 ab	0.58 ab
6	0.31	0.36	0.44	0.49 b	0.52	0.57 ab	0.57 ab
8	0.30	0.38	0.41	0.47 b	0.51	0.55 ab	0.57 ab
10	0.30	0.34	0.40	0.47 b	0.55	0.59 a	0.61 a
F-test	ns	ns	ns	**	ns	**	**

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลองย่อยที่ 1.3 ผลของระดับความเข้มข้นของแพคโคลบิวทราโซลต่อการชะลอ การเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องชะงะหลวง

จากการศึกษาการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องชะงะหลวงในอาหารสูตร VW ที่มี
ระดับความเข้มข้นของแพคโคลบิวทราโซลที่แตกต่างกัน 6 ระดับคือ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1
ppm โดยทำการเก็บข้อมูลทางด้านความสูงของลำลูกกล้วย และเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วย
ทำการศึกษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน ปรากฏผลดังนี้

ความสูงของลำลูกกล้วย

ความสูงของลำลูกกล้วยเมื่อเริ่มทำการทดลองจนถึงสิ้นสุดการทดลองความสูงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความสูงของลำลูกกล้วยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.42-1.54 เซนติเมตรเมื่อเริ่มต้นทำการทดลอง โดยความสูงยังคงเพิ่มขึ้นตามลำดับซึ่งหลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 1 เดือน ความสูงลำลูกกล้วยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.64-1.84 เซนติเมตร และช่วง 1.93-2.19 เซนติเมตร 2.14-2.45 เซนติเมตร 2.29-2.59 เซนติเมตร 2.39-2.63 เซนติเมตร และ 2.39-2.72 เซนติเมตร ภายหลังการทดลอง 2 ถึง 6 เดือนตามลำดับ (ตาราง 5 ภาพผนวก 11 ตารางผนวก 37 ถึง 43)

ตาราง 5 ความสูงของลำลูกกล้วยต้นเอื้องแซะจากการชะลอการเจริญเติบโตด้วย
แพคโคลบิวทราโซลเป็นระยะเวลา 6 เดือน

ความเข้มข้น (ppm)	ความสูง (เซนติเมตร)						
	เริ่มต้น	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน
0	1.53	1.78	2.11	2.27	2.38	2.46	2.55
0.2	1.54	1.84	2.19	2.45	2.59	2.63	2.72
0.4	1.49	1.67	2.05	2.31	2.43	2.49	2.54
0.6	1.42	1.81	1.93	2.14	2.29	2.44	2.47
0.8	1.49	1.74	1.97	2.26	2.39	2.46	2.50
1	1.47	1.64	2.06	2.32	2.35	2.39	2.39
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วย

เมื่อเริ่มทำการทดลองจนถึงการทดลองเป็นระยะเวลา 2 เดือนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.28-0.32 เซนติเมตรเมื่อเริ่มทำการทดลอง และภายหลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 1 และ 2 เดือน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยยังคงมีขนาดเพิ่มขึ้นเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.32-0.38 เซนติเมตร และขนาด 0.35-0.39 เซนติเมตรตามลำดับ

ภายหลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 3 เดือนพบว่าความสูงเริ่มมีความแตกต่างกันโดยที่ระดับความเข้มข้นของแพคโคลบิวทราโซล 1 ppm ส่งผลให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุดคือ 0.55 เซนติเมตร ไม่ต่างกับระดับความเข้มข้น 0 และ 0.4 ppm (0.48 และ 0.50 เซนติเมตร) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้น 0.2 0.6 และ 0.8 ppm (0.43 0.45 และ 0.46 เซนติเมตรตามลำดับ)

ภายหลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 4 เดือนพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของแพคโคลบิวทราโซล 1 ppm ยังคงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยเฉลี่ยมากที่สุดคือ 0.59 เซนติเมตร ซึ่งไม่ต่างกับระดับความเข้มข้น 0.4 และ 0.8 ppm (0.57 และ 0.56 เซนติเมตร) แต่พบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้น 0 0.2 และ 0.6 ppm (0.51 0.47 และ 0.55 เซนติเมตรตามลำดับ)

ภายหลังจากการทดลองเป็นระยะเวลา 5 เดือนที่ระดับความเข้มข้นของแพคโคลบิวทราโซล 1 ppm มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยเฉลี่ยมากที่สุดคือ 0.61 เซนติเมตร ซึ่งไม่ต่างกับระดับความเข้มข้น 0.4 0.6 และ 0.8 ppm (0.58 0.55 และ 0.56 เซนติเมตรตามลำดับ) แต่พบว่ามี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้น 0 และ 0.2 ppm (0.56 และ 0.54 เซนติเมตร)

เมื่อสิ้นสุดการทดลองเส้นผ่านศูนย์กลางยังคงมีขนาดเพิ่มขึ้น โดยระดับความเข้มข้นของแพคโคลบิวทราโซล 1 ppm มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุดคือ 0.70 เซนติเมตร ซึ่งไม่ต่างกับระดับความเข้มข้น 0.4 0.6 และ 0.8 ppm ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.67 0.67 และ 0.64 เซนติเมตรตามลำดับ แต่พบว่ามี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.2 ppm (0.56 และ 0.54 เซนติเมตรตามลำดับ) (ตาราง 6 ภาพผนวก 12 ตารางผนวก 44 ถึง 50)

ตาราง 6 เส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นเอื้องแซะจากการชะลอการเจริญเติบโตด้วยแพคโคลบิวทราโซลเป็นระยะเวลา 6 เดือน

ความเข้มข้น (ppm)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)						
	เริ่มต้น	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน
0	0.29	0.33	0.36	0.48 ab	0.51 bc	0.51 bc	0.56 b
0.2	0.27	0.33	0.36	0.43 b	0.47 c	0.48 c	0.54 b
0.4	0.28	0.32	0.39	0.50 ab	0.57 a	0.58 a	0.67 a
0.6	0.32	0.38	0.39	0.45 b	0.55 bc	0.55 ab	0.67 a
0.8	0.28	0.34	0.35	0.46 b	0.56 ab	0.56 ab	0.64 a
1	0.29	0.32	0.36	0.55 a	0.59 a	0.61 a	0.70 a
F-test	ns	ns	ns	*	**	**	**

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ผลการทดลองที่ 2 ผลการศึกษาวิธีการเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์มเอื้องแซะหลวง

การทดลองย่อยที่ 2.1 ผลของวิธีการเก็บรักษาเมล็ดเอื้องแซะหลวงที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาวิธีการเก็บรักษาเมล็ดเอื้องแซะและระดับของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกและจำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอก ปรากฏผลดังนี้

เปอร์เซ็นต์ความงอก

จากผลการทดลองพบว่าก่อนทำการเก็บรักษาทั้งด้วยการไม่เคลือบและเคลือบเมล็ดของเอื้องแซะเมล็ดสามารถพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือนพบว่าการเคลือบเมล็ดด้วยสารอัลจินเตร่วมกับการเก็บรักษาที่ 25 องศาเซลเซียสเมล็ดสามารถงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ในทุกลำดับซึ่งงอกมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการไม่เคลือบเมล็ดร่วกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (66 64 23 และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) การไม่เคลือบเมล็ดร่วกับการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสและการเคลือบเมล็ดร่วกับการเก็บรักษาที่ 25 องศาเซลเซียสพบว่าเมล็ดเอื้องแซะทั้งหมดไม่งอก และสำหรับการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 5 และ 6 เดือน ส่งผลให้เมล็ดเอื้องแซะที่ไม่เคลือบและเคลือบร่วกับการเก็บรักษาของทั้ง 2 อุณหภูมิสูญเสียความงอกทั้งหมด (ตาราง 7 ภาพ 2 ตารางผนวก 4 51 ถึง 54)

ตาราง 7 เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดภายหลังการเก็บรักษา

สิ่งทดลอง		เปอร์เซ็นต์ความงอก						
		ระยะเวลาการเก็บรักษา (เดือน)						
		ก่อนเก็บ	1	2	3	4	5	6
การเคลือบสารอัลจิเนต x ระดับอุณหภูมิ								
ไม่เคลือบสารอัลจิเนต	4 องศาเซลเซียส	100	66 b	64 b	23 b	10 b	ไม่งอก	
	25 องศาเซลเซียส	100	0 c	0 c	0 c	0 c	ไม่งอก	
เคลือบสารอัลจิเนต	4 องศาเซลเซียส	100	0 c	0 c	0 c	0 c	ไม่งอก	
	25 องศาเซลเซียส	100	100 a	100 a	100 a	100 a	ไม่งอก	
F-test								
การเคลือบสารอัลจิเนต		ns	**	**	**	**	-	
ระดับของอุณหภูมิ		ns	**	**	**	**	-	
การเคลือบสารอัลจิเนต x ระดับอุณหภูมิ		ns	**	**	**	**	-	

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

จำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอก

พบว่าก่อนทำการเก็บรักษาทั้งด้วยการไม่เคลือบและเคลือบเมล็ดของเอื้องแซะเมล็ดใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 15 และ 18 วันในการงอกซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่พบว่าภายหลังจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือน พบว่าการเคลือบเมล็ดและการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสใช้จำนวนวันเฉลี่ยในการงอกของเมล็ดที่เข้มน้อยที่สุดคือ 23 29 32 และ 32 วันตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการไม่เคลือบเมล็ดเอื้องแซะร่วมกับเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (38 48 63 และ 75 วันตามลำดับ) (ตาราง 8 ตารางผนวก 5 55 ถึง 59)

ตาราง 8 จำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอกภายหลังการเก็บรักษา

สิ่งทดลอง	จำนวนวันที่ใช้ในการงอก ระยะเวลาการเก็บรักษา (เดือน)					
	ก่อนเก็บ	1	2	3	4	5 6
การเคลือบสารอัลจินต x ระดับอุณหภูมิ						
ไม่เคลือบสารอัลจินต 4 องศาเซลเซียส	15	38 b	48 b	63 b	75 b	ไม่งอก
25 องศาเซลเซียส	18	0 c	0 c	0 c	0 c	ไม่งอก
เคลือบสารอัลจินต 4 องศาเซลเซียส	15	0 c	0 c	0 c	0 c	ไม่งอก
25 องศาเซลเซียส	18	23 a	29 a	32 a	32 a	ไม่งอก
F-test						
การเคลือบสารอัลจินต	ns	**	**	**	**	-
ระดับของอุณหภูมิ	ns	**	**	**	**	-
การเคลือบสารอัลจินต x ระดับอุณหภูมิ	ns	**	**	**	**	-

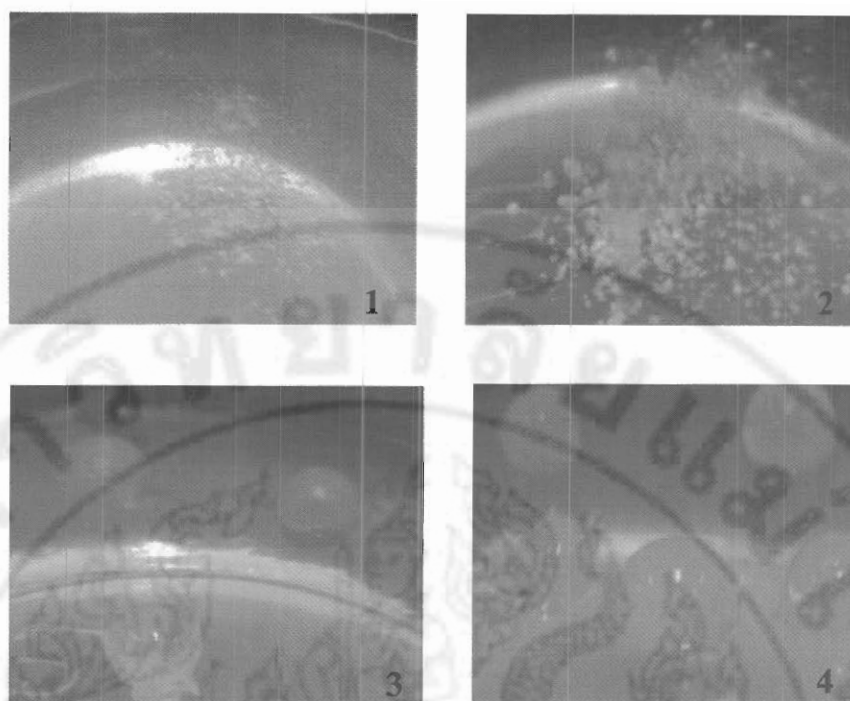
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์



ภาพ 2 ลักษณะของเมล็ดเอื้องแซะหลวงที่ไม่ได้เคลื่อนและเคลื่อนด้วยสารอัลจินต

- 1 คือ ลักษณะเมล็ดเอื้องแซะที่ไม่งอก
- 2 คือ ลักษณะการงอกของเมล็ดเอื้องแซะที่ไม่ได้เคลื่อน
- 3 คือ ลักษณะเมล็ดเอื้องแซะที่เคลื่อนและไม่สามารถงอกได้
- 4 คือ ลักษณะการงอกของเมล็ดเอื้องแซะที่เคลื่อน

ผลการทดลองย่อยที่ 2.2 ผลของระยะการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ัมและการเก็บรักษา เมล็ดเทียมที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ัมและระดับของอุณหภูมิในการเก็บรักษาเมล็ดเทียมต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกและจำนวนวันที่เริ่มงอกของเมล็ดเทียม ปรากฏผลดังนี้

ผลของระยะของโปรโตคอร์ัม

จากการศึกษาการระยะของโปรโตคอร์ัมทั้ง 2 ระยะ คือ ระยะ pro meristematic และระยะ leaf primordia พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียมในแต่ละเดือนโดยก่อนการเก็บรักษาโปรโตคอร์ัมทั้ง 2 ระยะการเจริญเติบโตมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ภายหลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือน พบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียมลดลงโดยโปรโตคอร์ัมระยะ pro meristematic มีเปอร์เซ็นต์ความงอก 28 21 13

และ 9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และ โปรโตคอร์มระยะ leaf primordia มีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียมเป็น 34 14 10 และ 9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตาราง 9 ตารางผนวก 60 ถึง 63)

เมื่อทำการเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการงอกของโปรโตคอร์มทั้ง 2 ระยะคือระยะ pro meristematic และระยะ leaf primordia ในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสพบว่าเมล็ดเทียมใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 21 และ 8 วันสำหรับการงอก ภายหลังจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือน โปรโตคอร์มระยะ pro meristematic ใช้ระยะเวลาในการงอกเฉลี่ย 27 30 34 และ 44 วันตามลำดับ) และ โปรโตคอร์มระยะ leaf primordia ใช้เวลาเฉลี่ยในการงอก คือ 24 25 28 และ 34 วันตามลำดับ (ตารางผนวก 6) เมื่อพิจารณาจากจำนวนวันที่เมล็ดเทียมใช้ในการงอกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับระยะเวลาสำหรับการงอกก่อนการเก็บรักษา พบว่าภายหลังจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือน โปรโตคอร์มระยะ pro meristematic ใช้จำนวนวันในการงอกเพิ่มขึ้น (6 9 13 และ 23 วันตามลำดับ) ซึ่งใช้จำนวนวันที่เพิ่มขึ้นน้อยกว่าโปรโตคอร์มระยะ leaf primordia (16 17 20 และ 26 วันตามลำดับ) (ตาราง 10)

ผลของระดับอุณหภูมิ

จากการศึกษาความแตกต่างของระดับของอุณหภูมิ 2 ระดับคือ ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียสในการเก็บรักษามล็ดเทียมของโปรโตคอร์มเอื้องแซะหลวง พบว่าระดับของอุณหภูมิมิมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งก่อนการเก็บรักษาพบว่าเมล็ดเทียมสามารถงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ภายหลังจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือนพบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียมที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ความงอกคือ 62 35 23 และ 18 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติกับการเก็บรักษามล็ดเทียมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมล็ดเทียมไม่สามารถงอกได้ พบว่าโปรโตคอร์มที่อยู่ภายในมีลักษณะสีขาวทั้งหมด (ตาราง 9 ภาพ 3 ตารางผนวก 60 ถึง 63)

อิทธิพลร่วมของระยะของโปรโตคอร์มและระดับอุณหภูมิ

จากการศึกษาพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างระยะของโปรโตคอร์มและระดับอุณหภูมิไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียมที่ทำการเก็บรักษา

ตาราง 9 เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียมภายหลังการเก็บรักษา

สิ่งทดลอง	เปอร์เซ็นต์ความงอก					
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (เดือน)					
	ก่อนเก็บ	1	2	3	4	5 6
ระยะของโปรโตคอร์ัม						
pro meristematic	100	28	21	13	9	ไม่งอก
leaf primordia	100	34	14	10	9	ไม่งอก
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	
ระดับของอุณหภูมิ						
4 องศาเซลเซียส	100	0 b	0 b	0 b	0 b	ไม่งอก
25 องศาเซลเซียส	100	62 a	35 a	23 a	18 a	ไม่งอก
F-test	ns	**	**	**	**	
ระยะของโปรโตคอร์ัม x ระดับอุณหภูมิ						
pro meristematic	4 องศาเซลเซียส	100	0	0	0	ไม่งอก
	25 องศาเซลเซียส	100	55	43	25	ไม่งอก
leaf primordia	4 องศาเซลเซียส	100	0	0	0	ไม่งอก
	25 องศาเซลเซียส	100	68	28	20	ไม่งอก
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

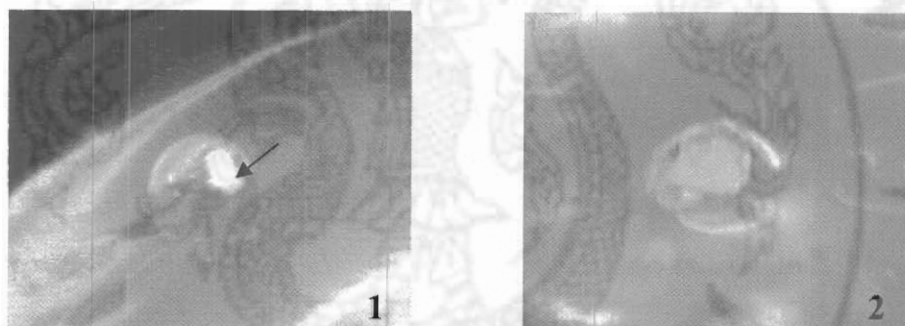
ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 10 ระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นในการงอกของเมล็ดเทียม

สิ่งทดลอง	จำนวนวันที่เพิ่มขึ้นสำหรับระยะเวลาการงอก (วัน)					±SE
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (เดือน)					
	ก่อนเก็บ	1	2	3	4	
ระยะของโปรโตคอร์ัม						
pro meristematic	21	6	9	13	23	5.23
leaf primordia	8	16	17	20	26	4.63
±SE	6.5	5	4	3.5	1.5	



ภาพ 3 ลักษณะของเมล็ดเทียม

- 1 คือ ลักษณะของโปร โตคอร์ัมที่ตายภายหลังการเก็บรักษา
- 2 คือ ลักษณะของโปร โตคอร์ัมที่งอกออกจากเมล็ดเทียม

ผลการทดลองที่ 3 ผลของการเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์ัมเอื้องแซะหลวงในไนโตรเจนเหลว

ผลการทดลองย่อยที่ 3.1 การเก็บรักษาเมล็ดด้วยการเติมสารปกป้องเนื้อเยื่อพืชในการเตรียมเมล็ดเอื้องแซะหลวงก่อนการเก็บแช่แข็ง

จากการศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดเอื้องแซะหลวงในสภาพอุณหภูมิต่ำโดยการเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลาที่ต่างกันคือ 0 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 นาที ภายหลังจากทำการเก็บรักษาเมล็ดเอื้องแซะในไนโตรเจนเหลวและไม่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เมื่อนำเมล็ดเอื้องแซะมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลง พบว่าการเติมสารละลาย PVS2 ช่วยให้เมล็ดงอกได้เร็วกว่าการไม่เติมสาร ซึ่งเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 20 40 50 60 และ 80 นาที

งอกได้เร็วกว่าการไม่เติมสาร ซึ่งเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 20 40 50 60 และ 80 นาที แต่ไม่ได้เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เมล็ดสามารถงอกเป็นโปรโตคอร์มได้เร็วที่สุดคือ 13 วันในทุกลำดับ ซึ่งสามารถงอกได้เร็วกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเติมสารละลาย PVS2 ที่ระยะเวลา 70 10 30 และ 0 นาที (15 18 19 และ 22 วันตามลำดับ) สำหรับการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวพบว่าเมล็ดเอื้องแซะสามารถงอกเป็นโปรโตคอร์มได้โดยการเติมสารละลาย PVS2 ยกเว้นการเติมสารละลาย PVS2 60 และ 70 นาทีเมล็ดไม่สามารถงอกได้เนื่องจากมีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยการเติมสารเป็นระยะเวลา 50 และ 80 นาทีก่อนทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เมล็ดสามารถงอกได้เร็วที่สุดคือ 120 วัน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 40 10 20 และ 30 นาที (130 147 153 และ 154 วันตามลำดับ) ภายหลังการเก็บรักษาด้วยไนโตรเจนเหลวเมล็ดใช้ระยะเวลาในการงอกนานกว่าปกติ 98-133 วัน เฉลี่ย 137.5 วัน (ตาราง 11 ตารางผนวก 7 64 ถึง 65)

ตาราง 11 จำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอกภายหลังการเก็บรักษาเมล็ดเอื้องแซะหลวงในไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลาการเติมสาร PVS2 (นาที)	หลังเก็บแช่แข็ง
0	ไม่งอก
10	147 c
20	153 c
30	155 c
40	130 b
50	120 a
60	ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์
70	ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์
80	120 a
F-test	**

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ผลการทดลองย่อยที่ 3.2 ผลของวิธีการและระยะเวลาในการเติมสารปกป้องเนื้อเยื่อพืชในการเตรียมโปรโตคอร์มเอื้องชะหลวงก่อนการเก็บแช่แข็ง

จากการทดลองการเตรียมโปรโตคอร์มก่อนการแช่แข็งด้วยวิธีการไม่เคลือบโปรโตคอร์ม (Vitrification) และการเคลือบโปรโตคอร์มด้วยสารอัลจินต (Encapsulation/Vitrification) ร่วมกับการศึกษาระยะเวลาในการเติมสารละลาย PVS2 พบว่าโปรโตคอร์มทั้งที่ไม่เคลือบและเคลือบด้วยสารอัลจินตเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW (1949) คัดแปลง โปรโตคอร์มทั้งหมดสามารถงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการเติมสารละลาย PVS2 โดยไม่ได้ทำการเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารพบว่าโปรโตคอร์มที่เคลือบเป็นเมล็ดเทียมสามารถให้เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงสุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ ด้วยการเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 0 และ 10 นาที ซึ่งงอกเร็วกว่าอย่างมีนัยสำคัญกับการเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 20 30 40 50 60 70 และ 80 นาที (65 70 55 45 45 40 และ 30 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) ซึ่งการเติมสารนานกว่า 10 เปอร์เซ็นต์โปรโตคอร์มมีเปอร์เซ็นต์ความงอกลดลง และโปรโตคอร์มที่ไม่ได้เคลือบก่อนการเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 0 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 นาที (57 52 55 42 30 27 27 25 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) ภายหลังจากการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวแล้วนำโปรโตคอร์มกลับมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW (1949) คัดแปลง พบว่าโปรโตคอร์มทั้งหมดทั้งที่ไม่ได้เคลือบและทำการเคลือบด้วยสารอัลจินต โปรโตคอร์มมีลักษณะชืดขาวภายหลังจากการเลี้ยงบนอาหารเป็นระยะเวลา 3 วันและไม่สามารถกลับมาเจริญเติบโตได้อีก (ตาราง 12 ตารางผนวก 8 และ 66)

ตาราง 12 เปอร์เซ็นต์ความงอกของโปรโตคอร์มที่ไม่ได้เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ถึงทดลอง		เปอร์เซ็นต์ความงอก
วิธีการ	x ระยะเวลาการเติมสาร PVS2 (นาที)	
Vitrification	0	57 bcd
	10	52 def
	20	55 cde
	30	42 efg
	40	30 ghi
	50	27 hi
	60	27 hi
	70	25 i
	80	20 i
Encapsulation / Vitrification	0	100 a
	10	100 a
	20	65 c
	30	70 b
	40	55 cde
	50	45 def
	60	45 def
	70	40 fgh
	80	30 ghi
F-test		
วิธีการ		**
ระยะเวลาการเติมสาร PVS2		**
วิธีการ x ระยะเวลาการเติมสาร PVS2		**

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

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

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวง

จากการทดลองการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงด้วยน้ำตาลซูโครสที่มีระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 6 ระดับ พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองในเดือนที่ 6 ที่ระดับความเข้มข้นของซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์สามารถชะลอความสูงของลำลูกกล้วยได้มากที่สุด และที่ระดับความเข้มข้นของซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มส่งเสริมการเจริญเติบโตทางด้านความสูงของเอื้องแซะ (ตาราง 1) ซึ่งปกติเป็นความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ใช้เติมในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นแหล่งพลังงานให้พืช (ตารางผนวก 1) สำหรับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ส่งผลให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของลำลูกกล้วยมากที่สุด ซึ่งการเติมซูโครสทำให้ลำลูกกล้วยมีขนาดกว้างกว่าการไม่เติมซูโครส (ตาราง 2) มีรายงานของ Bannier and Steponkus (1972) ใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MS ร่วมกับการเติมซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อยืดระยะเวลาการย้ายเลี้ยงของ *Chrysanthemum morifolium* เช่นเดียวกับ Atanasov (1986) ที่ใช้ซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์กับ *Beta vulgaris* สามารถยืดระยะเวลาการย้ายเลี้ยงออกไปได้ถึง 2 ปี และ Schnapp and Preece (1986) ใช้ซูโครสเพียง 5 เปอร์เซ็นต์สำหรับการชะลอการเจริญเติบโตของ *Dianthus caryophyllus* ซึ่งระดับความเข้มข้นของซูโครสที่ใช้เพื่อการชะลอการเจริญเติบโต หรือการยืดระยะเวลาการย้ายเลี้ยงนั้นจะมีระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันออกไปตามความเหมาะสมกับชนิดของพืช

สำหรับการใช้น้ำตาลแมนนิทอลเพื่อชะลอการเจริญเติบโตเห็นผลได้ชัดเจนว่าที่ระดับความเข้มข้นของแมนนิทอล 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีผลชะลอทางด้านความสูงของลำลูกกล้วยเมื่อสิ้นสุดการทดลองในเดือนที่ 6 เมื่อไม่เติมแมนนิทอลให้ผลไม่ต่างกับการเติมแมนนิทอลความเข้มข้น 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 3) สำหรับเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของแมนนิทอล 10 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยมากที่สุด (ตาราง 4) สอดคล้องกับรายงานของ เนาวรัตน์ (2547) ที่ศึกษาระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะสมในการชะลอการเจริญเติบโตของเอื้องแซะหอม พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์สามารถชะลอการเจริญเติบโตทางความสูงได้ เช่นเดียวกับ Espinoza *et al.* (1984) ใช้แมนนิทอล 4 เปอร์เซ็นต์ เพื่อชะลอการเจริญเติบโตของพืชตระกูลมะเขือซึ่งสามารถยืดระยะเวลาการย้ายเลี้ยงออกไปได้ 3 ปี และ Lopez *et al.* (1998) ทำการทดลองโดยใช้แมนนิทอล 4 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสเพื่อการชะลอการเจริญเติบโตของมันฝรั่ง พบว่าสามารถยืดเวลาในการเปลี่ยนอาหารออกไปได้ 8 เดือน หรืออาจจะมากกว่า 12 เดือน ซึ่งโดยปกติ

น้ำมันฝรั่งต้องทำการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงทุก 4 ถึง 8 สัปดาห์ จากผลการทดลองย่อยที่ 1.1 และ 1.2 ใช้การปรับแต่งอาหารเพาะเลี้ยงโดยการเพิ่มตัวยับยั้งการออสโมซิส (osmosis) คือ น้ำตาลซูโครส และแมนนิทอลความเข้มข้นสูงเพื่อส่งผลให้พืชเกิดความเครียดอันเนื่องมาจากแรงออสโมซิส ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (รังสฤษฎี, 2545) ซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่เกิดจากการรวมตัวของน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส ส่วนแมนนิทอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ซึ่งมีโมเลกุลที่เล็กกว่า และจากผลการทดลองการใช้สารทั้ง 2 ชนิดพบว่าสามารถชะลอการเจริญเติบโตได้ไม่ต่างกันแต่น้ำตาลซูโครสราคาถูกกว่าแมนนิทอล อีกทั้งโดยทั่วไปมีการใช้น้ำตาลซูโครสเพื่อเป็นแหล่งพลังงานในอาหารเพาะเลี้ยง การใช้ซูโครสเพื่อชะลอการเจริญเติบโตจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการที่สามารถใช้และยังสามารถลดค่าใช้จ่ายลงได้ด้วย

ส่วนการศึกษาระลอกการเจริญเติบโตของต้นเอื้องแซะด้วยสารชะลอการเจริญเติบโตแพคโคลบิวทราโซล พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของแพคโคลบิวทราโซลที่ทำการทดลองไม่มีผลต่อให้ชะลอการเจริญเติบโต ซึ่งต่างจากรายงานของ Jee *et al.* (2000) ที่ทำการทดลองเพื่อทดสอบความสามารถในการชะลอการเจริญเติบโตของสาร Uniconazole Paclobutrazol และ ancymidol กับกล้วยไม้ดินชนิดหนึ่ง (*Bletilla striata*) พบว่าสารแพคโคลบิวทราโซล (Paclobutrazol) ที่ระดับความเข้มข้น 0.4-0.8 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถใช้ชะลอการเจริญเติบโตได้ แต่จากผลการทดลองย่อยที่ 1.3 พบว่าที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันไม่สามารถชะลอการเจริญเติบโตได้ ซึ่งอาจเนื่องจากเป็นกล้วยไม้ที่ต่างชนิดกัน อีกทั้งสารแพคโคลบิวทราโซลสามารถดูดซึมผ่านทางรากได้ดี (พีรเดช, 2537) แต่เอื้องแซะเป็นกล้วยไม้ที่มีระบบรากเป็นแบบรากกึ่งอากาศ (semi-epiphytic) ดังนั้นความสามารถในการดูดซึมสารอาจไม่เท่ากับกล้วยไม้ดินดังรายงานที่กล่าวมาข้างต้น สำหรับสารแพคโคลบิวทราโซลเป็นสารชะลอการเจริญเติบโตที่พืชไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ เป็นสารอินทรีย์ที่มนุษย์สร้างขึ้น มีคุณสมบัติในการชะลอการเจริญเติบโตของพืชโดยชะลอการแบ่งเซลล์และยืดตัวของเซลล์บริเวณปลายยอดกิ่งหรือลำต้น สามารถช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้แก่พืชลดความยาวปล้องและเร่งการออกดอก รากพืชสามารถดูดซึมน้ำผ่านท่อน้ำไปยังส่วนต่างๆของพืชได้ (สมบุญ, 2544)

บททดลองที่ 2 วิธีการและอุณหภูมิในการเก็บรักษามล็ดและโปรโตคอร์มของเอื้องแซะหลวง

จากการศึกษาวิธีการและอุณหภูมิในการเก็บรักษามล็ดเอื้องแซะหลวง ทั้งการเก็บรักษามล็ดปกติและการเก็บรักษาด้วยการเคลือบสารอัลจินเตก่อนทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่าก่อนทำการเก็บรักษามล็ดของเอื้องแซะทั้งมล็ดปกติและมล็ดที่ถูกเคลือบสามารถงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์และใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 15 และ 18 วันในการงอก ภายหลังจากทำการ

เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือน การเคลือบเมล็ดเอื้องแซะด้วยสารอัลจินตและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมล็ดเอื้องแซะยังสามารถงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใช้ระยะเวลาในการงอก 22 29 32 และ 32 วันตามลำดับ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงและงอกได้เร็วกว่าเมล็ดปกติและเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส (มีเปอร์เซ็นต์ความงอก 66 64 23 และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และใช้ระยะเวลา 38 48 63 และ 75 วันตามลำดับในการงอก) และพบว่าเมล็ดปกติที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเมล็ดที่ถูกเคลือบร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รวมไปถึงการเก็บรักษาที่ยาวนานออกไป 5 และ 6 เดือนนั้นส่งผลให้เมล็ดเอื้องแซะสูญเสียความงอกทั้งหมด ซึ่งการเก็บรักษาเมล็ดที่เคลือบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทำให้เมล็ดเอื้องแซะสูญเสียความงอกทั้งหมด อาจเนื่องมาจากไม่ได้ทำการศึกษาลดความชื้นของเมล็ดก่อนทำการทดลอง เพราะในขั้นตอนการเคลือบเมล็ดเอื้องแซะด้วยสารอัลจินตสามารถเพิ่มความชื้นให้กับเมล็ดเอื้องแซะ และเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำอาจทำให้เกิด chilling injury เมล็ดจึงสูญเสียความงอก ซึ่งหลักการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์พืชเพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรม โดยทั่วไปจะควบคุมอุณหภูมิอยู่ที่ประมาณ 4 องศาเซลเซียส และมีการควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ให้อยู่ประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์พืชเกือบทุกชนิด (วันชัย, 2542) และควรลดความชื้นให้เหลือประมาณ 13 เปอร์เซ็นต์ เพราะถ้าเมล็ดมีความชื้นในเมล็ดสูงเมื่อทำการเก็บรักษาเมล็ดจะเสื่อมคุณภาพและสูญเสียความงอกได้ (Kemick, 1961)

จากการศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดเทียมที่มีโปรโตคอร์มของเอื้องแซะทั้ง 2 ระยะเวลาคือ ระยะเวลา pro meristematic และ ระยะเวลา leaf primordia อยู่ภายในพบว่าโปรโตคอร์มที่ไม่ได้ทำการเก็บรักษาทั้ง 2 ระยะเวลาสามารถงอกได้สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โปรโตคอร์มทั้ง 2 ระยะเวลายังสามารถงอกได้โดยเฉลี่ย 62 35 23 และ 18 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือน แต่เปอร์เซ็นต์ความงอกลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้น สำหรับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและการเก็บรักษาที่เป็นเวลา 5 และ 6 เดือนทำให้โปรโตคอร์มทั้งหมดตาย โดยมีลักษณะชืดขาวและบางโปรโตคอร์มมีลักษณะสีน้ำตาล ซึ่งพบว่าผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Kishi and Takagi (1997) ที่ทำการเก็บรักษาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Darwinara* “Pretty Girl” และ *Brassocattleya* “Innocense” ไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส โปรโตคอร์มตายทั้งหมด แต่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมีความงอกถึง 70 เปอร์เซ็นต์หลังการเก็บรักษา 12 สัปดาห์ และเช่นเดียวกับ Maruyama *et al.* (1997) ที่ศึกษาการเคลือบชิ้นส่วนปลายยอดของ *Cedrela odorata*, *Guazuma crinita* และ *Jacaranda mimosaefolia* ผลการทดลองพบว่าชิ้นส่วนของปลายยอดที่ทำการเก็บรักษานั้นสามารถเจริญไปเป็นต้นได้ 70-90 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการเก็บรักษาที่

อุณหภูมิ 12-25 องศาเซลเซียส ได้เป็นระยะเวลา 6-12 เดือน ซึ่งจากผลการทดลองการเก็บรักษา เมล็ดเทียมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทำให้โปรโตคอร์มเอื้องชะงักความงอกทั้งหมดนั้นมีความแตกต่างจากรายงานของ Saiprasad and Polisetty (2003) ที่ทำการศึกษา *Dendrobium* "Sonia" ด้วยการเคลือบกับสารอัลจินตและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสพบว่าสามารถเก็บรักษาได้นานถึง 90 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 56 เปอร์เซ็นต์ และในการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 60 วันยังคงเปอร์เซ็นต์ความงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันกับรายงานของ Datta (1999) ที่เก็บรักษามล็ดเทียมของ *Geodorum densiflorum* ได้นานถึง 120 วันโดยไม่สูญเสียความงอกแต่อย่างใด และ Sushmita *et al.* (1998) ทดลองเคลือบโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่ได้จากการผสมระหว่าง *Phalaenopsis* cv. Jane และ *Phalaenopsis* cv. Abrae จากนั้นนำเมล็ดเทียมที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 2 3 และ 8 สัปดาห์ พบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสามารถช่วยให้เมล็ดเทียมงอกได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและเมล็ดเทียมทุกเมล็ดสามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชได้ แต่อัตราการงอกจะลดลงเมื่อทำการเก็บรักษาในระยะเวลาที่ยาวนานออกไป ซึ่งความแตกต่างของผลการทดลองนี้อาจเป็นไปได้ว่าเนื่องจากกล้วยไม้ที่ทำการทดลองเป็นกล้วยไม้ที่ต่างชนิดกัน ความทนทานต่ออุณหภูมิต่ำจึงมีความแตกต่างกันเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำจึงเกิดความเสียหายทางสรีรวิทยาโดยทำให้โปรโตคอร์มเกิดการฉ่ำน้ำหรือ physiologically chilling injury (Engelmann, 1991) ซึ่งระยะของโปรโตคอร์มในการทดลองพบว่าไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความงอก เมื่อพิจารณาจากตาราง 10 ก่อนการเก็บรักษาโปรโตคอร์มระยะ pro meristematic จะใช้ระยะเวลาในการงอกมากกว่าเนื่องจากโปรโตคอร์มมีขนาดเล็กกว่าโปรโตคอร์มระยะ leaf primordia แต่ภายหลังการเก็บรักษาพบว่าแม้โปรโตคอร์มทั้ง 2 ระยะจะใช้ระยะเวลาในการงอกมากขึ้นเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานานขึ้น แต่โปรโตคอร์มระยะ pro meristematic สามารถฟื้นตัวได้เร็วกว่าโดยใช้ระยะเวลาในการงอกเพิ่มขึ้นน้อยกว่าระยะ leaf primordia

การทดลองที่ 3 การเก็บรักษามล็ดและโปรโตคอร์มของเอื้องชะงักหลวงในไนโตรเจนเหลว

จากการศึกษาการเก็บรักษามล็ดเอื้องชะงักหลวงในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธี Vitrification โดยศึกษาระยะเวลาการเดิมสารละลาย PVS2 ที่แตกต่างกันพบว่าหลังจากทำการเก็บรักษามล็ดในไนโตรเจนเหลว และนำกลับมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW คัดแปลง เมล็ดเอื้องชะงักที่ได้รับการเดิมสารละลาย PVS2 ก่อนการแช่แข็ง พบว่าสามารถงอกเป็นโปรโตคอร์มได้ก่อนการเดิมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 60 และ 70 นาที ที่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เมล็ดจึงไม่สามารถอ่านผลได้ การเดิมสารเป็นระยะเวลา 50 และ 80 นาทีก่อนทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว สามารถงอกได้เร็วที่สุดคือ 120 วัน และการเดิมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา

40 10 20 และ 30 นาที ใช้ระยะเวลาในการออกเฉลี่ย 130 147 153 และ 154 วันตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเดิมสารเป็นระยะเวลา 50 นาทีขึ้นไปเมล็ดสามารถงอกได้และยังงอกได้เร็วกว่าการเดิมสารในระยะเวลาที่น้อยกว่า 50 นาที จากผลการทดลองมีความสอดคล้องกับรายงานของ Kanchit (2000) ที่ทดลองการเก็บแช่แข็งเมล็ดของกล้วยไม้ม้าวัง *Doritis pulcherrima* Lindl. ทำการศึกษาระยะเวลาในการเดิมสารละลาย PVS2 ที่เหมาะสมก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยการเดิมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 50 นาทีให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดคือ 62 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการศึกษาวิธีการเตรียมโปรโตคอร์มของเอื้องแซะก่อนการเก็บแช่แข็งด้วยการใช้โปรโตคอร์มและโปรโตคอร์มที่เคลือบเมล็ดเทียมร่วมกับการศึกษาระยะเวลาการเดิมสารละลาย PVS2 ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่าภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวโปรโตคอร์มตายทั้งหมด โดยมีลักษณะสีขาวหลังจากการเลี้ยงบนอาหารเป็นระยะเวลา 3 วัน และการเดิมสารละลาย PVS2 ตามระยะเวลาต่างๆแต่ไม่ได้แช่แข็ง เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารพบว่าโปรโตคอร์มที่เคลือบเป็นเมล็ดเทียมสามารถใช้สาร PVS2 ได้นาน 10 นาทีเท่านั้น ถ้าเดิมสารเป็นระยะเวลานานกว่า 10 นาทีจะทำให้เปอร์เซ็นต์ความงอกลดลง เนื่องจากสารละลาย PVS2 เป็นสารเคมีหรือสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงที่ใช้เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำในเซลล์พืชตกผลึกแข็งตัวเป็นน้ำแข็งและเกิดการสูญเสียน้ำออกมาอันเนื่องจากผลของแรงดันออสโมซิส โดยจะดูดซึมสารเคมีเข้าไปแทนที่น้ำที่สูญเสียออกมาของเหลวภายในเซลล์จึงมีความเข้มข้นสูง (Towill, 1995) เมื่อทำการเก็บแช่แข็งน้ำที่อยู่ในเซลล์จึงไม่เป็นผลึกน้ำแข็งและมีลักษณะปนร่วน เซลล์จึงไม่ได้รับอันตรายจากการแช่แข็ง (Ashmore, 1997) เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองพบว่าโปรโตคอร์มตายทั้งหมดภายหลังการเก็บรักษา และแม้แต่การเดิมสาร PVS2 เพียงอย่างเดียวก็ยังทำให้เปอร์เซ็นต์ความงอกลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากสารเคมีที่ใช้มีความเข้มข้นสูง โดยเฉพาะไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่เป็นสารเคมีตัวหนึ่งที่ใช้ในส่วนผสมของสารละลาย PVS2 พบว่าเมื่อใช้ในความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษต่อเซลล์พืช โดยมีผลไปรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมของ RNA และโปรตีน ซึ่งโปรโตคอร์มยังคงเป็นเนื้อเยื่ออ่อนและอวบน้ำจึงเป็นอันตรายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นควรลดความเข้มข้นของสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ลง หรืออาจจำเป็นต้องลดสัดส่วนความเข้มข้นของสารเคมีทุกตัวที่เป็นส่วนผสมเพื่อใช้เป็นสารปกป้องเนื้อเยื่อพืช (Kantha, 1985) อย่างไรก็ตามการได้รับสารเคมีโดยตรงสำหรับเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่มีความทนทานต่ำจะก่อให้เกิดความเครียดจากการออสโมซิส และเซลล์เกิดความเสียหายจากความเป็นพิษของสารเคมี ซึ่งในการเตรียมสภาพเซลล์ก่อนด้วยการดึงน้ำออกอย่างเพียงพอด้วยซูโครสหรือซอร์บิทอล (sorbitol) ความเข้มข้นสูงจะสามารถช่วยเพิ่มความทนทานได้ให้เซลล์พืชได้ (Reed, 1990) ดังเช่น Matsumoto *et al.* (1994) ได้

กล่าวว่าการใช้วิธี Vitrification ในการเก็บแช่แข็งจะสำเร็จได้มาจากการควบคุมการดึงน้ำออกและการแทรกซึมของสารปกป้องเนื้อเยื่อ



บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการชะลอการเจริญเติบโตของเอื้องชะหลวงโดยใช้น้ำตาลซูโครส แมนนิทอล และแพคโคลบิวทราโซล พบว่าระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมในการลดการเจริญเติบโต คือที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากสามารถชะลอการเจริญเติบโตทางด้านความสูงได้ และสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตทางด้านกว้างหรือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยได้มากที่สุด โดยที่เส้นผ่านศูนย์กลางลำลูกกล้วยที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงการสะสมอาหารภายในต้นของเอื้องชะที่มีมากขึ้นด้วย สำหรับแมนนิทอลพบว่าที่ความเข้มข้น 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถชะลอความสูงได้ แต่ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยมากที่สุด การใช้สารชะลอการเจริญเติบโตแพคโคลบิวทราโซลจากการทดลองยังไม่มีระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการควบคุมความสูงของลำลูกกล้วยได้ แต่ที่ระดับความเข้มข้น 0.4-1 ppm ส่งผลให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยมีขนาดเพิ่มมากขึ้น

จากการศึกษาวิธีการและการเก็บรักษาเมล็ดเอื้องชะหลวงที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือนพบว่าเมล็ดทั้งเคลือบและไม่เคลือบสามารถเก็บรักษาได้เพียง 4 เดือนเท่านั้น ในเดือนที่ 5 และ 6 เมล็ดสูญเสียความงอก ส่วนเมล็ดที่เคลือบด้วยสารอัลจินตและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูง (100 เปอร์เซ็นต์) และงอกได้เร็วกว่า (23 29 32 และ 32 วันตามลำดับ) เมล็ดที่ไม่ได้เคลือบและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 66 64 23 และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และใช้เวลาในการงอก 38 48 63 และ 75 วันตามลำดับ

การศึกษาระยะการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ัมและระดับของอุณหภูมิในการเก็บรักษาเมล็ดเทียมเป็นเวลา 6 เดือนพบว่า ภายหลังจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือน เปอร์เซ็นต์ความงอกของโปรโตคอร์ัมที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ความงอกคือ 62 35 23 และ 18 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และยังพบว่าระยะการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ัมทั้ง 2 ระยะมีความสามารถในการเจริญและพัฒนาไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาจากระยะเวลาที่โปรโตคอร์ัมมีการพัฒนาภายหลังจากการเก็บรักษาพบว่าระยะ pro meristematic ใช้ระยะเวลาในการฟื้นตัวน้อยกว่า (6 9 13 และ 23 วันตามลำดับ) ระยะ leaf primordia (16 17 20 และ 26 วันตามลำดับ) และภายหลังจากการเก็บรักษาซึ่งการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่ส่งผลให้โปรโตคอร์ัมทั้ง 2 ระยะมีลักษณะชืดขาวทั้งหมดไม่สามารถ

เจริญเติบโต คือที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากสามารถชะลอการเจริญเติบโตทางด้านความสูงได้และสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตทางด้านกว้างหรือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยได้มากที่สุด โดยที่เส้นผ่านศูนย์กลางลำลูกกล้วยที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงมีการสะสมอาหารภายในต้นของเอื้องแซะที่มีมากขึ้นด้วย สำหรับเมื่อนิทอลพบว่าที่ความเข้มข้น 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์สามารถชะลอความสูงได้ แต่ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยมากที่สุด การใช้สารชะลอการเจริญเติบโตแพคโคลบิวทราโซลจากการทดลองยังไม่มีระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการควบคุมความสูงของลำลูกกล้วยได้ แต่ที่ระดับความเข้มข้น 0.4-1 ppm ส่งผลให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยมีขนาดเพิ่มมากขึ้น

จากการศึกษาวิธีการและการเก็บรักษาเมล็ดเอื้องแซะหลวงที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือนพบว่าเมล็ดทั้งเกลือและไมเกลือสามารถเก็บรักษาได้เพียง 4 เดือนเท่านั้น ในเดือนที่ 5 และ 6 เมล็ดสูญเสียความงอก ส่วนเมล็ดที่เกลือด้วยสารอัลจินตและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูง (100 เปอร์เซ็นต์) และงอกได้เร็วกว่า (23 29 32 และ 32 วันตามลำดับ) เมล็ดที่ไม่ได้เกลือและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 66 64 23 และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และใช้เวลาในการงอก 38 48 63 และ 75 วันตามลำดับ

การศึกษาระยะการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ัมและระดับของอุณหภูมิในการเก็บรักษาเมล็ดเทียมเป็นเวลา 6 เดือนพบว่า ภายหลังจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 2 3 และ 4 เดือนเปอร์เซ็นต์ความงอกของโปรโตคอร์ัมที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ความงอกคือ 62 35 23 และ 18 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และยังพบว่าระยะการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์ัมทั้ง 2 ระยะมีความสามารถในการเจริญและพัฒนาไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาจากระยะเวลาที่โปรโตคอร์ัมมีการพัฒนาภายหลังจากการเก็บรักษาพบว่าระยะ pro meristematic ใช้ระยะเวลาในการฟื้นตัวน้อยกว่า (6 9 13 และ 23 วันตามลำดับ) ระยะ leaf primordia (16 17 20 และ 26 วันตามลำดับ) และภายหลังจากการเก็บรักษาซึ่งการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่ส่งผลให้โปรโตคอร์ัมทั้ง 2 ระยะมีลักษณะสีขาวทั้งหมดไม่สามารถเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้การเก็บรักษาเมล็ดเทียมนานเพิ่มขึ้นเมล็ดเทียมจะมีเปอร์เซ็นต์ความงอกลดลงและใช้ระยะเวลาสำหรับการงอกเพิ่มขึ้นด้วย

การเก็บรักษาเมล็ดเอื้องแซะหลวงในไนโตรเจนเหลว พบว่าภายหลังจากการเก็บแช่แข็งเมล็ดเอื้องแซะสามารถงอกเป็นโปรโตคอร์ัมเฉพาะเมล็ดที่เดิมสารละลาย PVS2 เมล็ดสามารถงอกได้เร็วที่สุด (120 วัน) ด้วยการเติมสารเป็นระยะเวลา 50 และ 80 นาทีก่อนทำการเก็บแช่แข็ง

เจริญเติบโตได้ นอกจากนี้การเก็บรักษาเมล็ดเทียมนานเพิ่มขึ้นเมล็ดเทียมจะมีเปอร์เซ็นต์ความงอกลดลงและใช้ระยะเวลาสำหรับการงอกเพิ่มขึ้นด้วย

การเก็บรักษาเมล็ดเอื้องชะหลวงในไนโตรเจนเหลว พบว่าภายหลังการเก็บแช่แข็งเมล็ดเอื้องชะสามารถงอกเป็นโปรโตคอร์มเฉพาะเมล็ดที่เดิมสารละลาย PVS2 เมล็ดสามารถงอกได้เร็วที่สุด (120 วัน) ด้วยการเดิมสารเป็นระยะเวลา 50 และ 80 นาทีก่อนทำการเก็บแช่แข็ง

จากการศึกษาการเตรียมโปรโตคอร์มเอื้องชะก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและศึกษาระยะเวลาในการเดิมสารปกป้องเนื้อเยื่อ PVS2 พบว่าภายหลังการเก็บรักษาโปรโตคอร์มและเมล็ดเทียมของโปรโตคอร์มในไนโตรเจนเหลว โปรโตคอร์มทั้งหมดไม่สามารถกลับมาเจริญเติบโตได้ตามปกติ โดยโปรโตคอร์มมีลักษณะซีดขาวภายหลังการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าการเดิมสารละลาย PVS2 แต่ไม่ได้เก็บในไนโตรเจนเหลวมีผลกระทบต่ออาการเจริญของโปรโตคอร์มที่เคลือบเป็นเมล็ดเทียมสามารถให้เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงสุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการเดิมสารละลาย PVS2 10 นาที แต่เปอร์เซ็นต์ความงอกจะลดลงตามระยะเวลาในการเดิมสารที่นานขึ้น

ปัญหาและข้อเสนอแนะ

ขั้นตอนการทำงานเมล็ดเทียมค่อนข้างยุ่งยากและใช้เวลานาน เนื่องจากโปรโตคอร์มเอื้องชะหลวงที่ใช้มีขนาดเล็กและในการหยดสารไฮเดียมอัลจินेटที่มีโปรโตคอร์มอยู่ภายในลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรตนั้นต้องอาศัยความชำนาญและการคาดคะเนที่แม่นยำในการหยดเพราะว่าเมล็ดเทียมที่ต้องการใช้ในการทดลองเป็นเมล็ดเทียมที่มีโปรโตคอร์มที่อยู่ภายในต้องอยู่ส่วนกลางของเมล็ดเทียม ซึ่งจะมีส่วนที่ไม่สามารถใช้ได้ทำให้สิ้นเปลือง แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองนี้เห็นได้ชัดเจนว่าเทคนิคเมล็ดเทียมสามารถใช้เก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์มได้นานถึง 4 เดือน ซึ่งในปัจจุบันมีเครื่องมือที่จะสามารถผลิตเมล็ดเทียมได้จำนวนมากและรวดเร็ว และนอกจากจะสามารถผลิตได้ปริมาณมากและรวดเร็วกว่าการใช้แรงงานจากคนเมล็ดเทียมที่ได้จะมีขนาดเท่ากันและไม่ต้องสิ้นเปลืองชิ้นส่วนพืชกับปริมาตรสารที่ใช้ แต่ควรทำการศึกษาเปรียบเทียบถึงจุดคุ้มทุนระหว่างการใช้เครื่องมือกับแรงงานคนเนื่องจากเครื่องมือมีราคาแพง

บรรณานุกรม

- เนาวรัตน์ เทพสาร. 2547. **การลดการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องแซะหอมโดยใช้สารแมนนิทอล**. เชียงใหม่. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- พิรเดช ทองอำไพ. 2537. **ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย**. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 195 น.
- รังษณดี กาวีตะ. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 219 น.
- ระพี สาคริก. 2516. **การเพาะปลูกกล้วยไม้ในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย**. ม.ป.ท.: ม.ป.พ. 84 น.
- ลักขณา เพ็ชรประดับ และ เบ็ญจา บำรุงเมือง. 2545. การขยายพันธุ์กล้วยไม้ไทยเอื้องแซะหอมโดยการเพาะเมล็ด. น. 55-69. ใน **รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 4 ภาคโปสเตอร์**. 2-3 ธันวาคม 2545 ณ ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2542. **เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์พืชไร่**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 276 น.
- สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2544. **สรีรวิทยาของพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 237 น.
- อบฉันท ไททอง. 2546. **กล้วยไม้เมืองไทย**. กรุงเทพฯ: อมรินทร์การพิมพ์.
- อารีย์ วรรณวุฒิก. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ อติสรณ์. 133 น.
- Ashmore, S. E. 1997. **Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute. 67p.
- Atanassov, A. I. 1986. Sugar beet (*Beta vulgaris* L.). pp. 207-213. In Bajaj, Y.P.S. (ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 2 (Crop I)**. Berlin: Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Baker, M. and B. O. Charles. 1996. **Orchid species culture Dendrobium**. Singapore: Timber Press Inc. 634 p.
- Bannier, L. J. and P. L. Steponkus. 1972. Freeze preservation of callus cultures of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. **Hort Science**. 7: 194-201.

- Chung, J. D., Y. K. Park, H. Y. Kim, S. O. Jee and J. C. Koh. 1999. Effects of plant growth retardants on the growth of *Bletilla striata in vitro*. **Journal of Korean Society for Horticulture Science**. 40(4): 485-488.
- Datta, K. B., B. Kanjilal and D. Sarker. 1999. Artificial seed technology: development of protocol in *Geodorum densiflorum* (Lam) Schltr. an endangered orchid. **Current Science**. 76(8): 1142-1145.
- Devi, J., B. K. Ray, S. Chetia and P. C. Deka. 1998. Regeneration of low temperature stored encapsulated protocorms of orchid. **Journal of the Orchid Society of India**. 12: 39-41.
- Edward, J. K., K. K. Kutty, A. Q. Javed and C. Paul. 1993. Cryopreservation of immature spring wheat zygotic embryos using an abscisic acid pretreatment. **Plant Cell Reports**. 12: 89-94.
- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm a review. **Euphytica**. 57: 227-243.
- Erica, E. B. 1994. Cryopreservation. pp. 147-167. In Dixon, R. A. and R. A. Gonzales. (eds.). **Plant Cell Culture A Practical Approach**. England: Information Press Ltd.
- Espinoza, N., R. Eatrada, P. Tover, J. bryan and J. H. Dodds. 1984. Tissue culture micropropagation, conservation and export of potato germplasm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 7: 3-10.
- Fukai, S. 1994. Cryopreservation of Germplasm of Chrysanthemums. pp. 448-456. In Bajaj, Y.P.S. (ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.32 Cryopreservation of Plant Germplasm I**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Fukai, S., M. Togashi and M. Goi. 1994. Cryopreservation of *In vitro*-Grown *Dianthus* by Encapsulation-Dehydration. **Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.**, 46(2): 101-107.
- Ghosh, B. and S. Sen. 1994. Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Asparagus cooperi* baker. **Plant Cell Reports**. 13: 381-385.
- Grout, B. 1995. **Introduction to the in vitro preservation of Plant cells, Tissue and Organs**. Berlin : Springer Verlag Berlin Heidelberg. pp. 1-20.
- Ishikawa, K., K. Harata, M. Mii, A. Sakai, K. Yoshimatsu and K. Shimomura. 1997. Cryopreservation of zygotic embryos of Japanese Terrestrial Orchid (*Bletilla striata*). **Plant Cell Reports**. 16(11): 754-757.

- Jee, S. O., J. D. Chung, Y. K. Park and H. Y. Kim. 2000. Effects of growth retardants on the morphogenesis and GA-like substance activity of *Bletilla striata in vitro*. **Journal of Korean Society for Horticulture Science**. 41(4): 409-414.
- Kanchit, T. 2000. Cryopreservation of seeds of Thai Orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.). **CryoLetters**. 21: 237-244.
- Kartha, K. K. 1985. **Cryopreservation of Plant Cells and Organs**. Florida: CRC Press Inc. 276 p.
- Kernick, M. D. 1961. Agronomy. pp. 62-94. In Food and Agriculture Organization of The United Nations. **Agriculture and Horticultural Seeds**. Rome: FAO.
- Kishi, F. and K. Takagi. 1997. Efficient method for the preservation and regeneration of orchid protocorm-like bodies. **Scientia Hort.**, 68(1/4): 149-156.
- Lopez, H. D., M. J. Casas and I. M. Scott. 1998. Storage of potato microplants *in vitro* the presence of acetylsalicylic acid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 54: 145-152.
- Malemnganba, H., B. K. Ray, S. B. Hacharyya and P. C. Deka. 1996. Regeneration of encapsulated protocorms of *Phaius tankervilleae* stored at low temperature. **Indian J. of Exp. Biol.**, 34(8): 802-805.
- Martinez, D., R. S. Tames and M. A. Revilla. 1999. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation / dehydration. **Plant Cell Report**. 19: 59
- Maruyama, E., I. Kinoshi, K. Ishii, K. Ohba and A. Saito. 1997. Germplasm conservation of the tropical forest trees *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart. and *Jacaranda mimosaeifolia* D.Don. by shoot tip encapsulation in calcium alginate and storage at 12-25°C. **Plant Cell Report**. 16: 393-396.
- Matsumoto, T., A. Sakai and K. Yamada. 1994. Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of wasabi (*Wasabi japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. **Plant Cell Reports**. 13: 442-446.
- Munu, D., J. Sharma and S. Abhijit. 2002. *In vitro* culture of artificial seeds of *Vanda coerulea* an endangered orchid. **Research on Crops** 1(2): 205-207.

- Philip, A. S. 2000. **Cryopreservation of protocorm-like bodies of orchid hybrid *Dendrobium Kasem Boonchoo white* by vitrification**. Malaysia: Putra University. 129 p.
- Piccioni, E. and A. Standardi. 1995. Encapsulation of micropropagated buds of six woody species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 42: 221-226.
- Razdan, M. K. 1994. **An Introduction to plant tissue culture**. England : Chaman Enterprises. 398 p.
- Redenbaugh, K. 1990. Application of artificial Seed to tropical crops. **Hort Science**. 25: 251-255.
- Redenbaugh, K., D. Slade, P. Viss and J. A. Fujii. 1987. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. **Hort Science**. 22: 803-809.
- Reed, B. M. 1990. Survival of *in vitro*-grown apical meristems of *Pyrus* following cryopreservation. **Hort Science**. 25: 105-113
- Saiprasad, G. V. S. and R. Polisetty. 2003. Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies. **In vitro Plant**. 39: 42-48.
- Schnapp, R. S., J. E. Preece. 1986. *In vitro* growth reduction of tomato and carnation microplants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 6: 3-8.
- Schuitemen, A. and E.F.de Vogel. 2000. **Orchid Genera of Thailand, Laos, Cambodia and Vietnam**. Netherland: National Herbarium Nederland. pp. 2-10.
- Senaratna, T. 1992. Artificial seeds. **Biotechnology Advances**. 10: 379-392.
- Sushmita, B., H. A. Khan and P. V. Reddy. 1998. *In vitro* seed germination, production of synthetic seed and regeneration of plantlets of *Phalaenopsis* hybrid. **Annals of Agricultural Science**. 43: 539-543.
- Tannoury, M. 1994. Cryopreservation of Germplasm of Chrysanthemums. pp. 448-456. In Bajaj, Y.P.S. (ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.32 Cryopreservation of Plant Germplasm I**. Berlin: Springer Verlag.
- Toshikazu, M., S. Akira, and Y. Kazuto. 1995. Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristem of lily by vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 41: 237-241.
- Towill, L. E. 1995. Cryopreservation by vitrification. pp. 99-111. In Grout, B. (ed.). **Genetic Preservation of Plant Cell *in vitro***. Springer Lab Manual. Berlin: Springer Verlag.

- Tsukazaki, H., M. Mii, K. Tokuhara and K. Ishikawa. 2000. Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. **Plant Cell Reports**. 19: 1160-1164.
- Withers, L. A. 1985. Cryopreservation and Storage of Germplasm. pp. 169-191. In Dixon, R. A. (ed.). **Plant Cell Culture A Practical Approach**. England: Information Printing.
- Yong, S., R. C. Pan, X. J. Wang, Q. S. Sheng, and L. R. Guo. 2000. *In vitro* conservation of *Dendrobium officinale* at low temperature. **Chinese Journal Applied and Environmental Biology**. 6: 326-330.

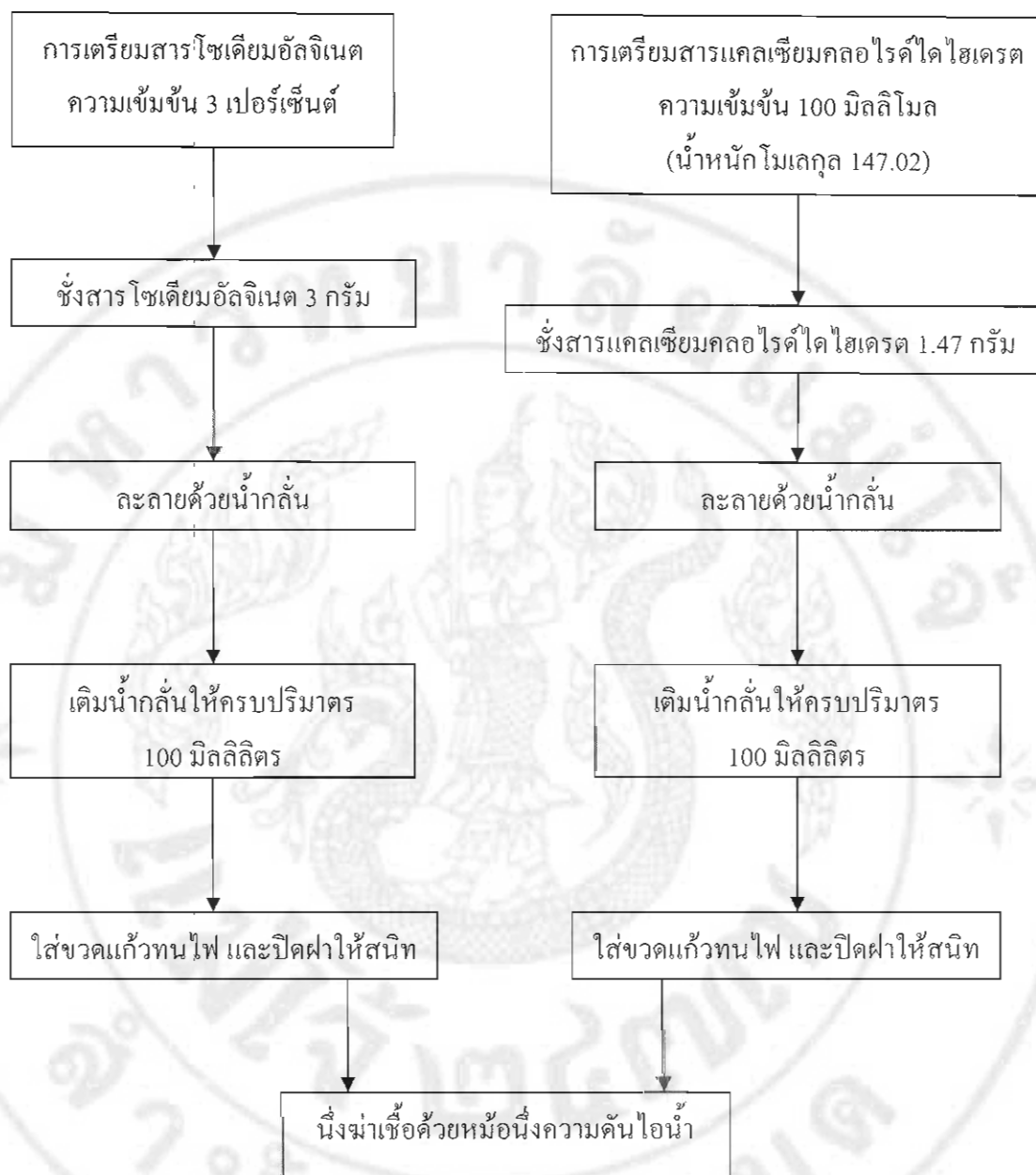


ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

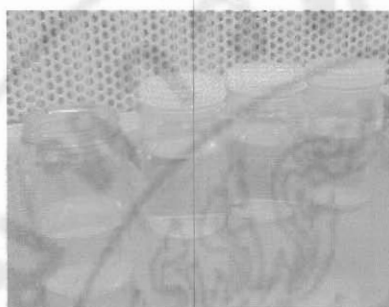
ภาพการเตรียมสารเคมี ภาพเอื้องแซะ และตารางผลการวิเคราะห์ทางสถิติในแต่ละการทดลอง



ภาพผนวก 1 วิธีการเตรียมสารเคมีที่ทำให้เกิดเจลของเมล็ดเทียม



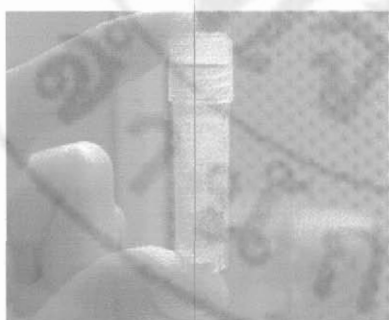
1. คัดเลือกโปรโตคอร์มที่มีขนาดใกล้เคียงกัน
ใส่ลงสารโซเดียมอัลจินต และหยดสาร
โซเดียมอัลจินตที่มีโปรโตคอร์มอยู่ภายในลง
ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต
ทิ้งไว้ ประมาณ 30 นาที



2. นำเมล็ดเทียมที่ได้ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่าน
การนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง



3. ลักษณะเมล็ดเทียมภายหลังจากการเคลือบ



4. บรรจุเมล็ดเทียมลงในหลอดทดลอง
เพื่อทำการเก็บรักษา

ภาพผนวก 2 ขั้นตอนการทำเมล็ดเทียม



1. เมล็ดเทียมที่เก็บรักษาภายในหลอดทดลอง

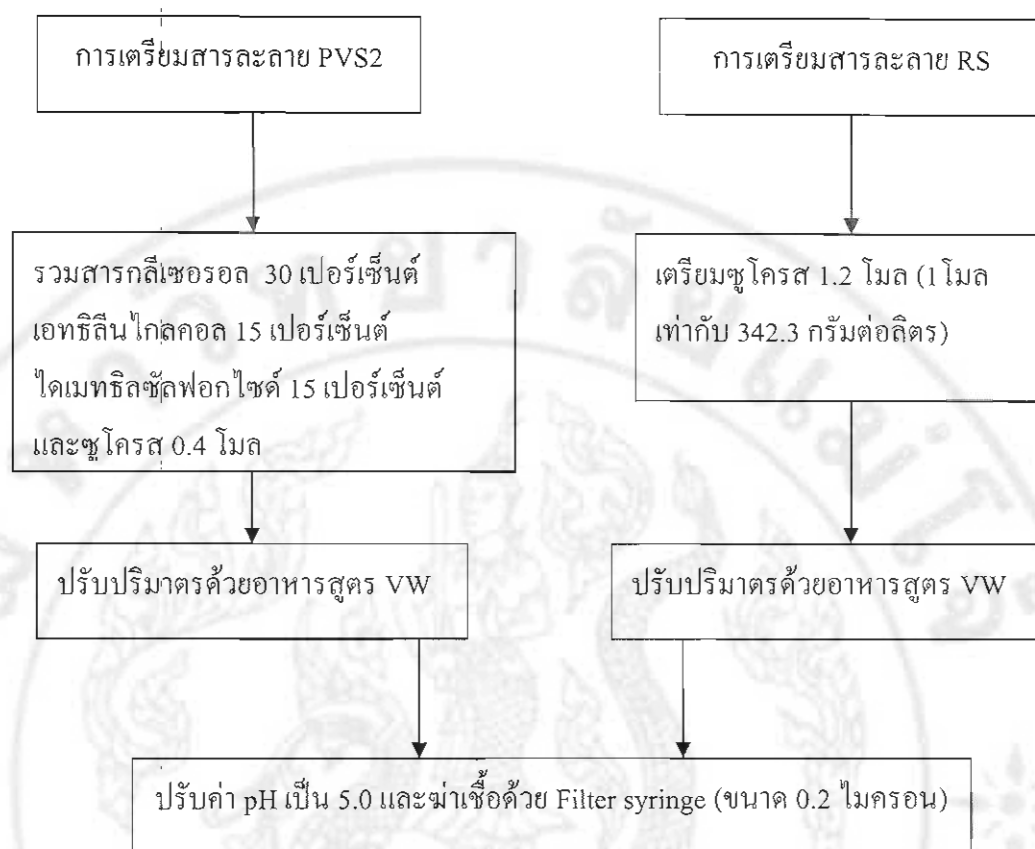


2. ภายหลังการเก็บรักษา นำเมล็ดเทียมเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ดัดแปลง

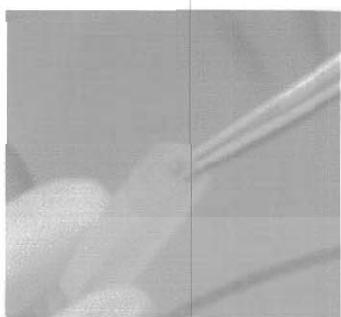


3. นำไปเลี้ยงที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ภาพผนวก 3 การย้ายเลี้ยงภายหลังการเก็บรักษา



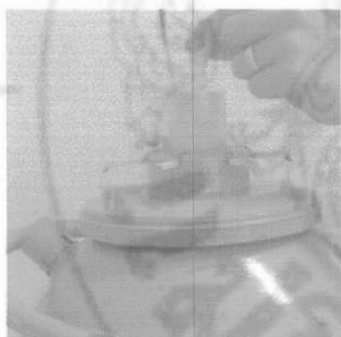
ภาพผนวก 4 วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการเก็บแช่แข็ง



1. นำโปรโตคอร์มของเอื้องแซะใส่ลงในหลอดทดลองสำหรับการแช่แข็ง



2. เติมสารละลายปกป้องเนื้อเยื่อ PVS2 ตามระยะเวลาที่กำหนด



3. นำไปหลอดทดลองใส่ลงในถังไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บรักษา



4. ปิดฝาดังในไนโตรเจนเหลวให้สนิท ทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ภาพผนวก 5 ขั้นตอนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว



1. นำหลอดทดลองที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว มาละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 นาที



2. ดูดสารละลาย PVS2 ออก

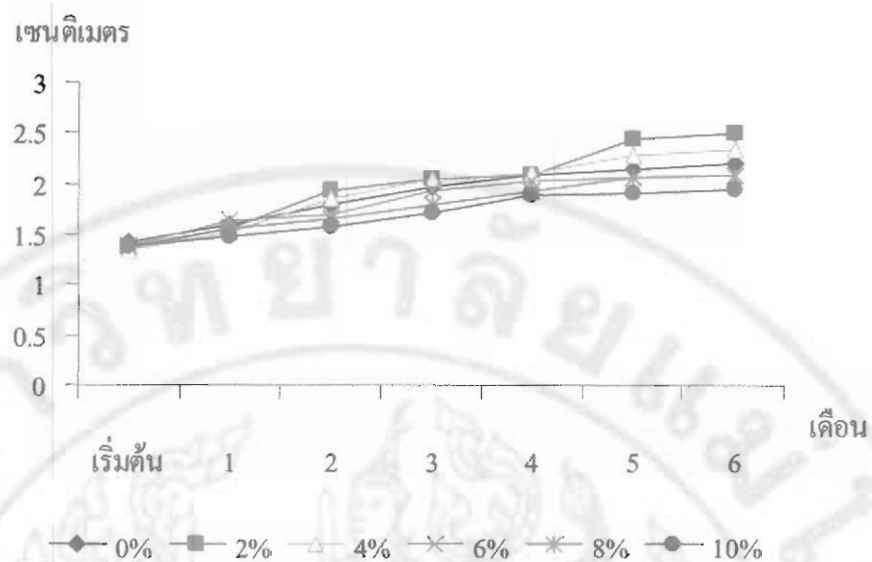


3. เดิมสารละลาย RS เป็นระยะเวลา 20 นาที

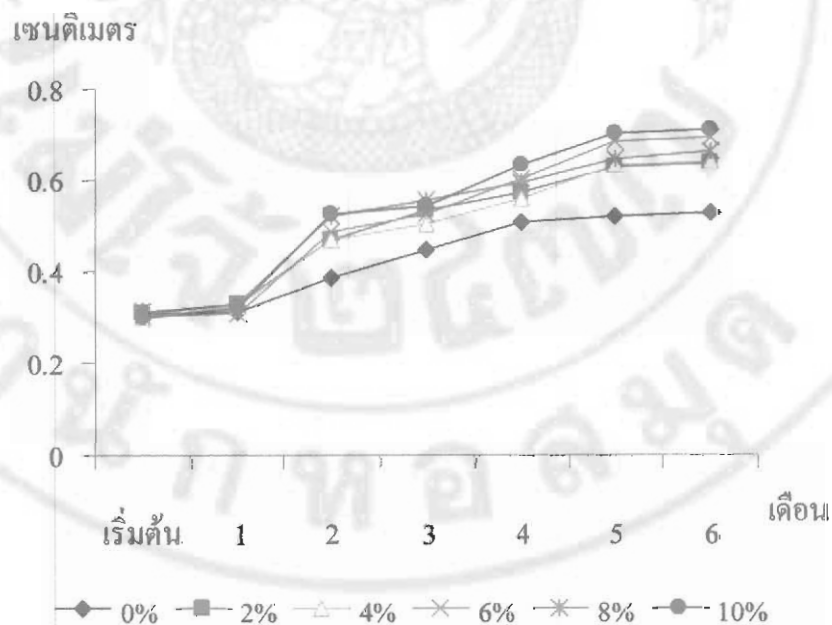


4. นำโปรโตคอร์มลงเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ดัดแปลง และนำไปเลี้ยงที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

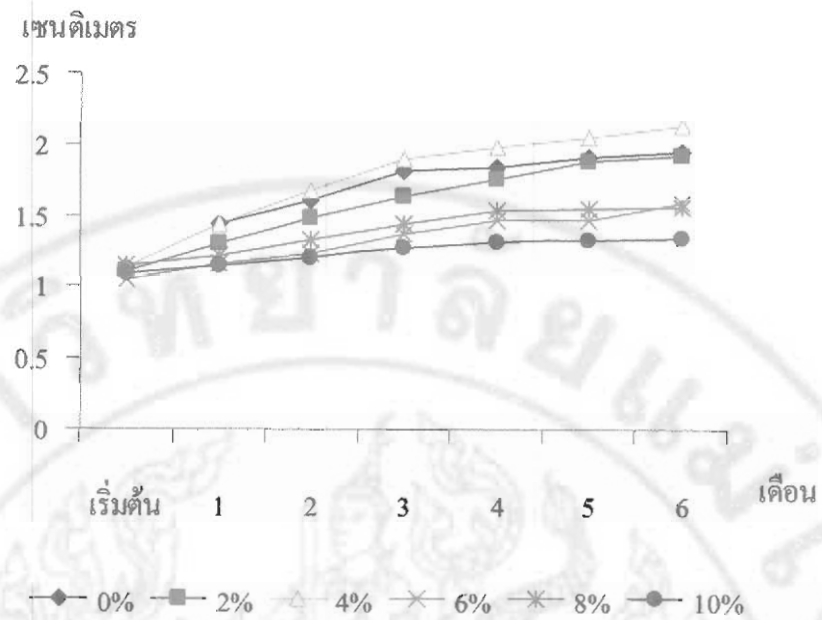
ภาพผนวก 6 ขั้นตอนการนำโปรโตคอร์มมาเลี้ยงภายหลังเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว



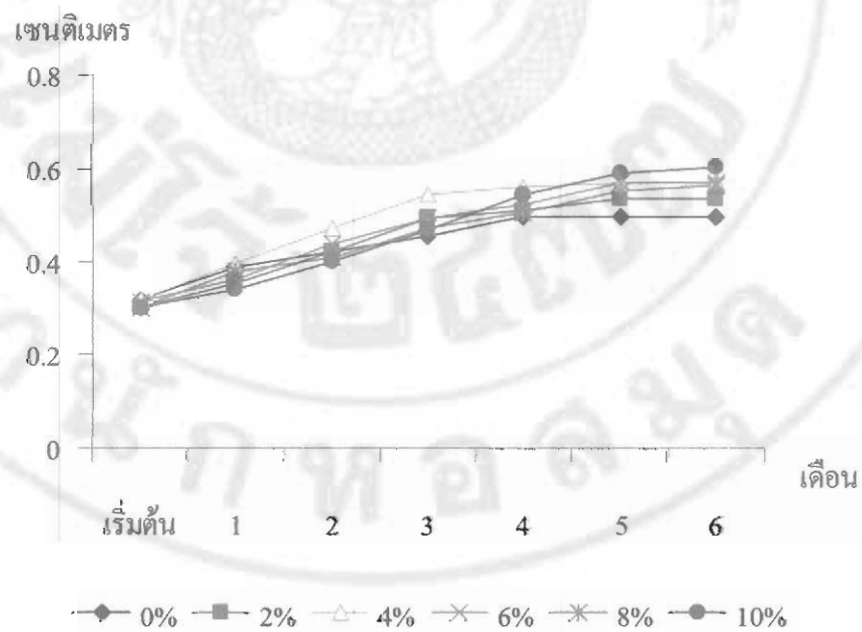
ภาพผนวก 7 ความสูงของลำลูกกล้วยของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของซูโครสแตกต่างกัน 6 ระดับ



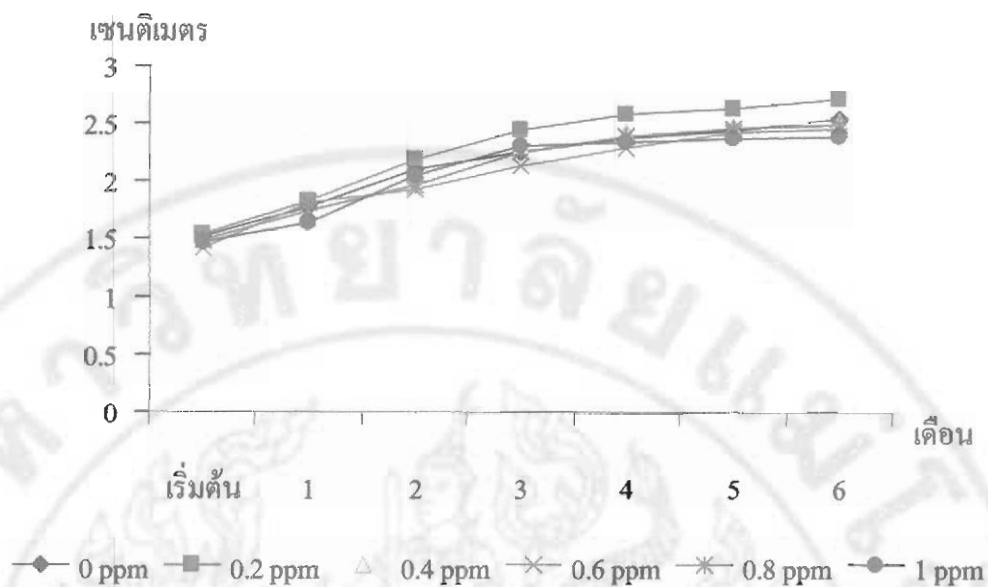
ภาพผนวก 8 เส้นผ่านศูนย์กลางกลางของลำลูกกล้วยของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของซูโครสแตกต่างกัน 6 ระดับ



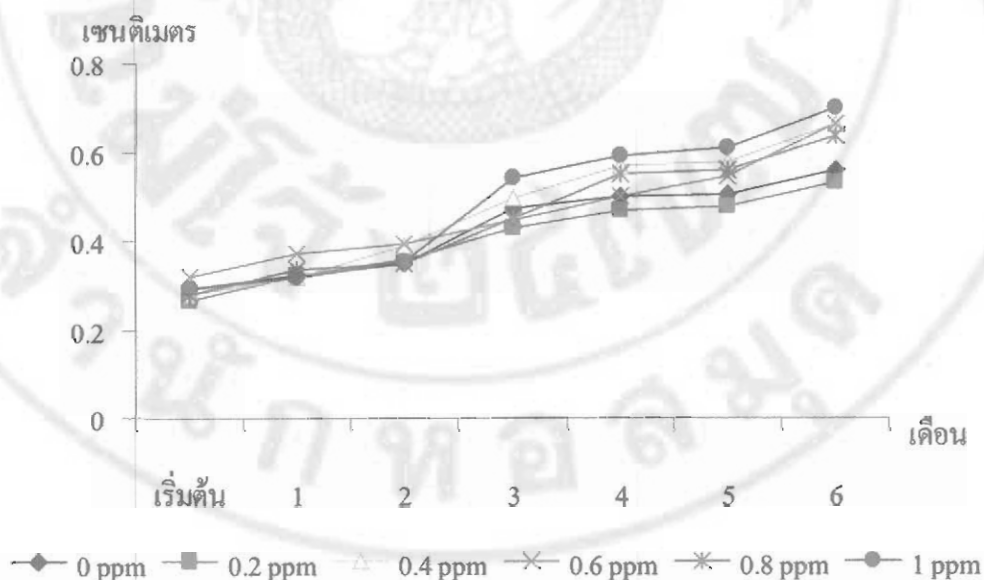
ภาพผนวก 9 ความสูงของลำลูกกล้วยของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของเมเนนิทอลแตกต่างกัน 6 ระดับ



ภาพผนวก 10 เส้นผ่านศูนย์กลางกลางของลำลูกกล้วยของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของเมเนนิทอลแตกต่างกัน 6 ระดับ



ภาพผนวก 11 ความสูงของลำลูกกล้วยของต้นอ่อนเอื้องชะหลวงที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของเพคโคบิวทราโซลแตกต่างกัน 6 ระดับ



ภาพผนวก 12 เส้นผ่านศูนย์กลางกลางของลำลูกกล้วยของต้นอ่อนเอื้องชะหลวงที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของเพคโคบิวทราโซลแตกต่างกัน 6 ระดับ



ภาพผนวก 13 ลักษณะของต้นอ่อนเลี้ยงแชะหลวงเมื่อเริ่มต้นการทดลองกับชูโครส



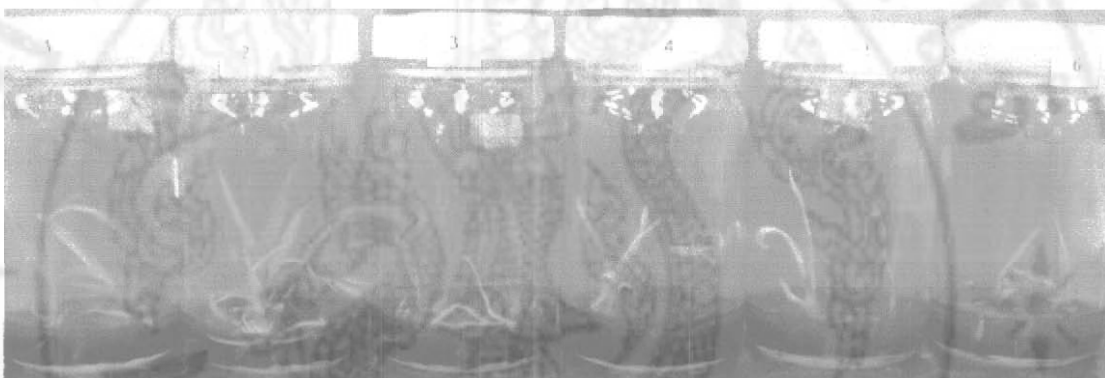
ภาพผนวก 14 ลักษณะของต้นอ่อนเลี้ยงแชะหลวงเมื่อภายหลังการทดลองกับชูโครส 3 เดือน



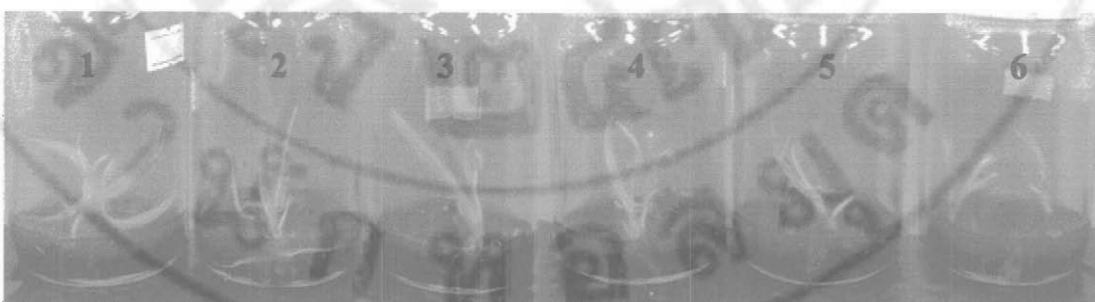
ภาพผนวก 15 ลักษณะของต้นอ่อนเลี้ยงแชะหลวงเมื่อภายหลังการทดลองกับชูโครส 6 เดือน



ภาพผนวก 16 ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงเริ่มต้นการทดลองกับแมนนิทอล



ภาพผนวก 17 ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงเมื่อภายหลังการทดลองกับแมนนิทอล 3 เดือน



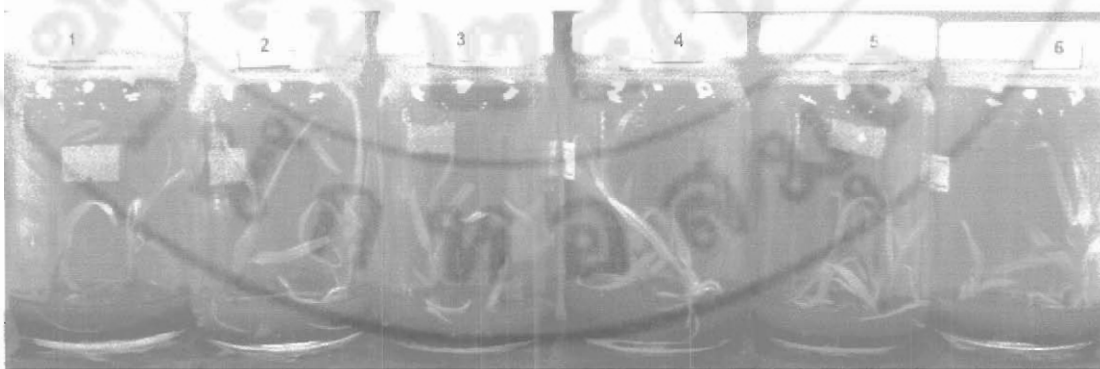
ภาพผนวก 18 ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องแซะหลวงเมื่อภายหลังการทดลองกับแมนนิทอล 6 เดือน



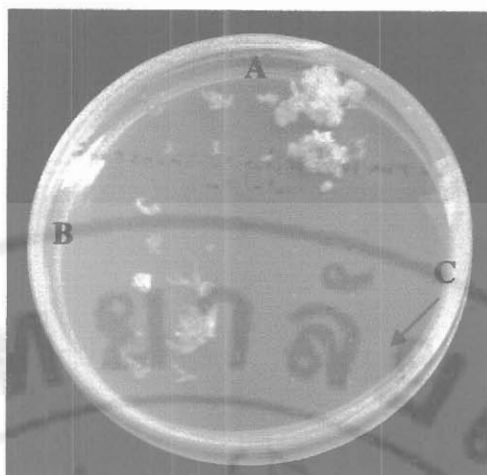
ภาพผนวก 19 ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องชะหลวงเมื่อเริ่มต้นการทดลองกับแพคโคลบิวทราโซล



ภาพผนวก 20 ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องชะหลวงเมื่อภายหลังการทดลองกับแพคโคลบิวทราโซล 3 เดือน



ภาพผนวก 21 ลักษณะของต้นอ่อนเอื้องชะหลวงเมื่อภายหลังการทดลองกับแพคโคลบิวทราโซล 6 เดือน

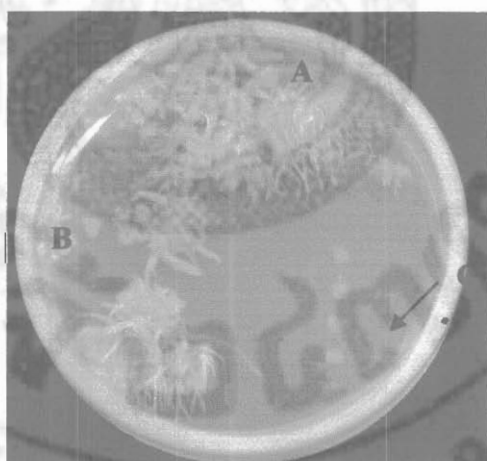


ภาพผนวก 22 โปรโตคอร์ัมภายหลังการเลี้ยงบนอาหารสูตรVW คัดแปลงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

A คือ คอนโทรล

B คือ โปรโตคอร์ัมที่ผ่านการเติมสารละลาย PVS2 แต่ไม่ได้ทำการเก็บรักษา

C คือ โปรโตคอร์ัมที่ไม่สามารถรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว



ภาพผนวก 23 เมล็ดเทียมภายหลังการเลี้ยงบนอาหารสูตรVW คัดแปลงเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

A คือ คอนโทรล

B คือ เมล็ดเทียมที่ผ่านการเติมสารละลาย PVS2 แต่ไม่ได้ทำการเก็บรักษา

C คือ เมล็ดเทียมที่ไม่สามารถรอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ตารางผนวก 1 สูตรอาหารของ Vacin and Went (1949)

สารเคมี	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	200
KNO_3	525
KH_2PO_4	250
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5.7
$\text{Fe}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	28
sucrose	20,000
pH 5.7	-

ตารางผนวก 2 สารเคมีที่ทำให้เกิดเจลของเมล็ดเทียม

สารเคมี	ปริมาณสารที่ใช้
โซเดียมอัลจินต	3 เปอร์เซ็นต์
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	100 มิลลิโมล

ตารางผนวก 3 สารเคมีที่ใช้ในการเก็บแช่แข็ง

สารเคมี	ปริมาณสารที่ใช้
1. สารละลาย PVS2	
- กลีเซอรอล	30 เปอร์เซ็นต์
- เอทรีลีนไกลคอล	15 เปอร์เซ็นต์
- ไดเมทิลซัลฟอกไซด์	15 เปอร์เซ็นต์
- อาหาร VW เหลว	ใช้ปรับปริมาตร
2. สารละลาย RS	
- น้ำตาลซูโครส	1.2 โมล (1 โมล = 342.3 กรัมต่อลิตร)
- อาหาร VW เหลว	ใช้ปรับปริมาตร

ตารางผนวก 4 เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเอื้องมะเขายหลังการเก็บรักษา

สิ่งทดลอง	ระยะเวลาการเก็บรักษา (เดือน)					
	ก่อนเก็บ	1	2	3	4	5 6
การเคลือบสารอัลจินต						
ไม่เคลือบสารอัลจินต	100	33 b	32 b	11 b	5 b	ไม่งอก
เคลือบสารอัลจินต	100	50 a	50 a	50 a	50 a	ไม่งอก
F-test	ns	**	**	**	**	-
ระดับของอุณหภูมิ						
4 องศาเซลเซียส	100	33 b	32 b	11 b	5 b	ไม่งอก
25 องศาเซลเซียส	100	50 a	50 a	50 a	50 a	ไม่งอก
F-test	ns	**	**	**	**	-

ตารางผนวก 5 จำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอกภายหลังการเก็บรักษา

สิ่งทดลอง	ระยะเวลาการเก็บรักษา (เดือน)					
	ก่อนเก็บ	1	2	3	4	5 6
การเคลือบสารอัลจินต						
ไม่เคลือบสารอัลจินต	16	19 b	24 b	32 b	38 b	ไม่งอก
เคลือบสารอัลจินต	16	11 a	15 a	16 a	16 a	ไม่งอก
F-test	ns	**	**	**	**	-
ระดับของอุณหภูมิ						
4 องศาเซลเซียส	15	19 b	24 b	32 b	38 b	ไม่งอก
25 องศาเซลเซียส	18	11 a	15 a	16 a	16 a	ไม่งอก
F-test	ns	**	**	**	**	-

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 6 จำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอกภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

สิ่งทดลอง	จำนวนวันที่ใช้ในการงอก (วัน)					±SE
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (เดือน)					
	ก่อนเก็บ	1	2	3	4	
ระยะของโปรโตคอร์ัม						
pro meristematic	21	27	30	34	44	4.29
leaf primordia	8	24	25	28	34	4.83
±SE	6.5	1.5	2.5	3	5	

ตารางผนวก 7 จำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอกภายหลังการเติมด้วยสารละลาย PVS2

ระยะเวลาการเติมสาร PVS2 (นาทีก)	ก่อนเก็บแช่แข็ง
0	22 d
10	19 c
20	13 a
30	20 c
40	13 a
50	13 a
60	13 a
70	15 b
80	13 a
F-test	**

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 8 เปอร์เซ็นต์ความงอกของโปรโตคอร์ัมที่ไม่ได้เก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว

สิ่งทดลอง	เปอร์เซ็นต์ความงอก
วิธีการ	
Vitrification	38 b
Encapsulation / Vitrification	61 a
F-test	**
ระยะเวลาการเติมสาร PVS2 (นาทีก)	
0	79 a
10	76 a
20	60 b
30	56 b
40	43 c
50	36 cd
60	36 cd
70	33 de
80	25 e
F-test	**

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวก 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
ก่อนการทดลองด้วยน้ำตาชชูโครส

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.029	0.006	0.3621 ^{ns}
Error	54	0.282	0.005	
Total	59	0.311		
CV. (%) =	5.24			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาชชูโครส 1 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.134	0.027	0.5402 ^{ns}
Error	54	1.761	0.032	
Total	59	1.894		
CV. (%) =	11.62			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาชชูโครส 2 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.894	0.179	0.0201 [*]
Error	54	3.275	0.061	
Total	59			
CV. (%) =	4.17			

หมายเหตุ * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวก 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาเลชูโครส 3 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.973	0.195	0.0184 *
Error	54	3.499	0.065	
Total	59	4.472		
CV. (%) =	13.28			

หมายเหตุ * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาเลชูโครส 4 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.484	0.097	0.1494 ^{ns}
Error	54	3.073	0.057	
Total	59	3.557		
CV. (%) =	11.77			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาเลชูโครส 5 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	1.765	0.353	0.0061 **
Error	54	5.181	0.096	
Total	59	6.946		
CV. (%) =	14.35			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาเลชูโครส 6 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	2.056	0.411	0.0012**
Error	54	4.699	0.087	
Total	59	6.755		
CV. (%) = 13.39				

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวก 16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
ก่อนการทดลองด้วยน้ำตาเลชูโครส

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.002	0.0004	0.6633 ^{ns}
Error	54	0.031	0.0006	
Total	59	0.032		
CV. (%) = 7.75				

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาเลชูโครส 1 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.003	0.0007	0.7559 ^{ns}
Error	54	0.069	0.001	
Total	59	0.072		
CV. (%) = 11.07				

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาชชูโครส 2 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.128	0.026	0.0003 **
Error	54	0.245	0.005	
Total	59	0.374		
CV. (%) =	14.15			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาชชูโครส 3 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.072	0.014	0.0035 **
Error	54	0.193	0.004	
Total	59	0.265		
CV. (%) =	11.52			

หมายเหตุ : ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาชชูโครส 4 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.077	0.015	0.0084 **
Error	54	0.239	0.004	
Total	59	0.317		
CV. (%) =	11.54			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาชชูโครส 5 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.208	0.042	0.0001 **
Error	54	0.225	0.004	
Total	59	0.433		
CV. (%) =	10.12			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาชชูโครส 6 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.209	0.042	0.0001 **
Error	54	0.250	0.005	
Total	59	0.459		
CV. (%) =	10.49			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
ก่อนการทดลองด้วยน้ำตาชแมนนิทอล

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.014	0.003	0.5115 ^{ns}
Error	54	0.179	0.003	
Total	59	0.194		
CV. (%) =	5.16			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาลแมนนิทอล 1 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.904	0.181	0.0001**
Error	54	0.777	0.014	
Total	59	1.680		
CV. (%) =	9.36			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาลแมนนิทอล 2 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	1.992	0.398	0.0001**
Error	54	2.022	0.037	
Total	59	4.041		
CV. (%) =	13.65			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาลแมนนิทอล 3 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	3.136	0.627	0.0001**
Error	54	2.862	0.053	
Total	59	5.998		
CV. (%) =	14.62			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาลแมนนิทอล 4 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	3.330	0.667	0.0001**
Error	54	2.789	0.052	
Total	59	6.119		
CV. (%) =	13.76			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 28 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาลแมนนิทอล 5 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	4.271	0.854	0.0001**
Error	54	2.893	0.024	
Total	59	7.164		
CV. (%) =	13.59			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 29 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาลแมนนิทอล 6 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	4.524	0.905	0.0001**
Error	54	5.026	0.093	
Total	59	9.549		
CV. (%) =	17.42			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 30 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
ก่อนการทดลองด้วยน้ำตาลแมนนิทอล

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.004	0.0009	0.2098 ^{ns}
Error	54	0.031	0.0006	
Total	59	0.036		
CV. (%) =	7.83			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 31 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาลแมนนิทอล 1 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.022	0.004	0.1925 ^{ns}
Error	54	0.157	0.003	
Total	59	0.179		
CV. (%) =	14.66			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 32 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาลแมนนิทอล 2 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.032	0.006	0.2054 ^{ns}
Error	54	0.231	0.004	
Total	59	0.263		
CV. (%) =	15.37			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 33 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาลแมนนิทอล 3 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.051	0.010	0.0035**
Error	54	0.138	0.003	
Total	59	0.190		
CV. (%) =	10.43			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 34 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาลแมนนิทอล 4 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.314	0.006	0.0703 ^{ns}
Error	54	0.156	0.003	
Total	59	0.187		
CV. (%) =	10.28			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 35 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาลแมนนิทอล 5 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.056	0.011	0.0039**
Error	54	0.154	0.003	
Total	59	0.209		
CV. (%) =	9.66			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 36 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยน้ำตาลแมนนิทอล 6 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.072	0.014	0.0017**
Error	54	0.172	0.003	
Total	59	0.244		
CV. (%) =	10.13			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 37 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
ก่อนการทดลองด้วยแฟลคโคลบิวทราโซล

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.992	0.019	0.1999 ^{ns}
Error	54	0.706	0.013	
Total	59	0.805		
CV. (%) =	7.69			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 38 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยแฟลคโคลบิวทราโซล 1 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.311	0.062	0.7601 ^{ns}
Error	54	6.458	0.119	
Total	59	6.769		
CV. (%) =	19.85			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 39 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยแพคโคลบิวทราโซล 2 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.444	0.089	0.7027 ^{ns}
Error	54	8.034	0.149	
Total	59	8.477		
CV. (%) =	18.82			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 40 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยแพคโคลบิวทราโซล 3 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.505	0.101	0.7050 ^{ns}
Error	54	9.186	0.170	
Total	59	9.690		
CV. (%) =	18.02			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 41 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยแพคโคลบิวทราโซล 4 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.508	0.102	0.6025 ^{ns}
Error	54	7.497	0.139	
Total	59	8.005		
CV. (%) =	15.49			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 42 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยแพคโคลบิวทราโซล 5 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.346	0.069	0.7253 ^{ns}
Error	54	6.592	0.122	
Total	59	6.937		
CV. (%) =	14.11			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 43 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความสูงของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยแพคโคลบิวทราโซล 6 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.609	0.122	0.3767 ^{ns}
Error	54	6.042	0.112	
Total	59	6.652		
CV. (%) =	13.24			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 44 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
ก่อนการทดลองด้วยแพคโคลบิวทราโซล

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.017	0.003	0.1107 ^{ns}
Error	54	0.096	0.002	
Total	59	0.113		
CV. (%) =	14.68			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 45 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยแพคโคลบิวทราโซล 1 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.022	0.004	0.1621 ^{ns}
Error	54	0.146	0.003	
Total	59	0.168		
CV. (%) =	15.59			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 46 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยแพคโคลบิวทราโซล 2 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.021	0.004	0.4458 ^{ns}
Error	54	0.233	0.004	
Total	59	0.253		
CV. (%) =	17.89			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวก 47 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยแพคโคลบิวทราโซล 3 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.086	0.017	0.0446 [*]
Error	54	0.377	0.007	
Total	59	0.462		
CV. (%) =	17.55			

หมายเหตุ * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 48 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยแพคโคลบิวทราโซล 4 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.112	0.022	0.0004**
Error	54	0.221	0.004	
Total	59	0.333		
CV. (%) =	11.99			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 49 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองด้วยแพคโคลบิวทราโซล 5 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.111	0.222	0.0004**
Error	54	0.219	0.004	
Total	59	0.329		
CV. (%) =	11.61			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 50 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยต้นอ่อนเอื้องแซะ
หลังการทดลองแพคโคลบิวทราโซล 6 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	5	0.213	0.043	0.0001**
Error	54	0.299	0.006	
Total	59	0.512		
CV. (%) =	11.85			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 51 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดภายหลัง
การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	3	29917.19	9972.39	0.0001**
A	1	1139.06	1139.06	0.0001**
B	1	1139.06	1139.06	0.0001**
A*B	1	27639.06	27639.06	0.0001**
Error	12	26.75	2.23	
Total	15	29943.94		
CV. (%) =	3.59			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 52 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดภายหลัง
การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 2 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	3	29534.19	9844.73	0.0001**
A	1	1278.06	1278.06	0.0001**
B	1	1278.06	1278.06	0.0001**
A*B	1	26978.06	26978.06	0.0001**
Error	12	14.75	1.23	
Total	15	29548.94		
CV. (%) =	2.69			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 53 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดภายหลัง
การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	3	27018.75	9006.25	0.0001**
A	1	6006.25	6006.25	0.0001**
B	1	6006.25	6006.25	0.0001**
A*B	1	15006.25	15006.25	0.0001**
Error	12	25.00	2.08	
Total	15	27043.75		
CV. (%) = 4.71				

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 54 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดภายหลัง
การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	3	28300.00	9433.33	0.0001**
A	1	8100.00	8100.00	0.0001**
B	1	8100.00	8100.00	0.0001**
A*B	1	12100.00	12100.00	0.0001**
Error	12	50.00	4.17	
Total	15	28350.00		
CV. (%) = 7.42				

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 55 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนวันที่เมลิ็ดเอื้องแซะงอก

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	3	33.19	11.06	0.0867 ^{ns}
A	1	0.06	0.06	0.9023 ^{ns}
B	1	33.06	33.06	0.0138 [*]
A*B	1	0.06	0.06	0.9023 ^{ns}
Error	12	47.75	3.98	
Total	15	80.94		
CV. (%) = 12.42				

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 56 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนวันที่เมลิ็ดเอื้องแซะงอกภายหลัง
การเก็บรักษา 1 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	3	4186.69	1395.56	0.0001 ^{**}
A	1	248.06	248.06	0.0001 ^{**}
B	1	248.06	248.06	0.0001 ^{**}
A*B	1	3690.56	3690.56	0.0001 ^{**}
Error	12	35.75	2.98	
Total	15	4222.44		
CV. (%) = 11.36				

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 57 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนวันที่เมลิ็ดเอื้องแซะงอกภายหลัง
การเก็บรักษา 2 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	3	6613.50	2204.50	0.0001**
A	1	342.25	342.25	0.0001**
B	1	342.25	342.25	0.0001**
A*B	1	5929.00	5929.00	0.0001**
Error	12	29.50	2.46	
Total	15	6643.00		
CV. (%) =	8.14			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 58 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนวันที่เมลิ็ดเอื้องแซะงอกภายหลัง
การเก็บรักษา 3 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	3	11009.50	3669.83	0.0001**
A	1	992.25	992.25	0.0001**
B	1	992.25	992.25	0.0001**
A*B	1	9025.00	9025.00	0.0001**
Error	12	53.50	4.46	
Total	15	11063.00		
CV. (%) =	8.89			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 59 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนวันที่เมล็ดเอื้องแซะงอกภายหลัง
การเก็บรักษา 4 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	3	15254.25	5084.75	0.0001**
A	1	1849.00	1849.00	0.0001**
B	1	1849.00	1849.00	0.0001**
A*B	1	11556.25	11556.25	0.0001**
Error	12	33.50	2.79	
Total	15	15287.75		
CV. (%) =	6.22			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 60 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียมภายหลัง
การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	3	15318.75	5106.25	0.0001**
A	1	156.25	156.25	0.3715 ^{ns}
B	1	15006.25	15006.25	0.0001**
A*B	1	156.25	156.25	0.3715 ^{ns}
Error	12	2175.00	181.25	
Total	15	17493.75		
CV. (%) =	43.96			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์

ตารางผนวก 61 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียมภายหลัง
การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 2 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	3	5350.00	1783.33	0.0001**
A	1	225.00	225.00	0.0511 ^{ns}
B	1	4900.00	4900.00	0.0001**
A*B	1	225.00	225.00	0.0511 ^{ns}
Error	12	550.00	45.83	
Total	15	5900.00		
CV. (%) =	38.69			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวก 62 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียมภายหลัง
การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	3	2075.00	691.67	0.0007**
A	1	25.00	25.00	0.5250 ^{ns}
B	1	2025.00	2025.00	0.0001**
A*B	1	25.00	25.00	0.5250 ^{ns}
Error	12	700.00	58.33	
Total	15	2775.00		
CV. (%) =	67.89			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวก 63 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเหียนภายหลัง
การเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	3	1225.00	408.33	0.0161 ^{ns}
A	1	0.00	0.00	1.0000 ^{ns}
B	1	1225.00	1225.00	0.0020 ^{**}
A*B	1	0.00	0.00	1.0000 ^{ns}
Error	12	950.00	79.17	
Total	15	2175.00		
CV. (%) =	101.69			

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวก 64 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอกภายหลังการเก็บรักษา
แบบแช่แข็งของเมล็ดเอื้องชะหลวง

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	8	5206.50	1041.30	0.0001 ^{**}
Error	27	433.50	24.08	
Total	35	5640.00		
CV. (%) =	3.57			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวก 65 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนวันที่เมล็ดเริ่มงอกที่ไม่ได้เก็บรักษาแช่แข็ง

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	8	410.72	51.34	0.0001**
Error	27	12.50	0.46	
Total	35	423.22		
CV. (%) =	4.18			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวก 66 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ความงอกของโปรโตคอร์มที่ไม่ได้เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยวิธี Vitrification และ Encapsulation/Vitrification

Source of Variance	DF	SS	MS	Pr > F
Treatment	17	37090.28	2181.78	0.0001**
A	1	10034.72	10034.72	0.0001**
B	8	24127.78	3015.97	0.0001**
A*B	8	2927.78	365.97	0.0013**
Error	54	5175.00	95.83	
Total	71	42265.28		
CV. (%) =	19.85			

หมายเหตุ ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์



ภาคผนวก ข
ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล

นางสาวพรพรรณ สุขุมพินิจ

เกิดเมื่อ

20 พฤศจิกายน 2523

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2540 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนตราษตระการคุณ จังหวัดตราด

พ.ศ. 2544 ปริญญาตรี สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

คณะเกษตรศาสตร์บางพระ จังหวัดชลบุรี

ประวัติการฝึกอบรม

พ.ศ. 2546-2547

ได้รับทุน Short-term Student Exchange Promotion

Program (Inbound) จาก Association of International

Education, Japan (AIEJ) เพื่อเรียนรู้เกี่ยวกับเทคโนโลยีทาง

การเกษตรและวัฒนธรรมของประเทศญี่ปุ่น ที่ Ehime

University

