สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การสำรวจเอกสาร

จำปีสิรินธรมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Magnolia sirindhorniae* Noot. & Chalermglin เป็นพืชในวงศ์ Magnoliaceae เป็นพืชเฉพาะถิ่นของประเทศไทย (endemic to Thailand) คือมีขึ้นอยู่ในเฉพาะประเทศไทยเท่านั้น และมีขึ้นอยู่เฉพาะพื้นที่ชุ่มน้ำหรือในป่าพรุน้ำจืดที่มีน้ำไหลผ่านตลอดเวลา สำรวจพบครั้งแรกในป่าพรุน้ำจืดของบ้านซับจำปา ตำบลซับจำปา อำเภอท่าหลวง จังหวัดลพบุรี เมื่อวันที่ 16 พฤศจิกายน 2541 ในพื้นที่รวมกันประมาณ 80 ไร่ ในระดับความสูงประมาณ 50 เมตร พื้นที่โดยรอบห่างออกไปประมาณ 10 กิโลเมตร เป็นเขาหินปูน เมื่อมีฝนตกน้ำจากเขาหินปูนนี้จะซึมลงใต้ดินและไหลรวมเป็นน้ำใต้ดิน มาพุขึ้นในป่าบ้านซับจำปา น้ำในบริเวณนี้จะมีความเป็นด่างสูงกว่าในพื้นที่อื่น (ปิยะ เฉลิมกลิ่น, 2545)

เมื่อวันที่ 21 มิถุนายน 2542 ได้มีการเข้าไปสำรวจซ้ำโดยคณะของ ดร.ปิยะ เฉลิมกลิ่น ในพื้นที่ดังกล่าว เก็บดอกมาจากต้นบันทึกภาพและบันทึกรายละเอียดต่างๆ ของดอก พบว่าก่อนที่ดอกเริ่มแย้มจะมีสีเขียวอ่อนที่โคนกลีบดอกด้านนอก เมื่อเริ่มแย้มจะมีลีขาวใส มีกลีบดอก 12-15 กลีบ ปลายกลีบมนกลม จากการสำรวจในครั้งหลังนี้จึงสรุปได้ว่าต้นไม้ชนิดนี้เป็นจำปี แม้ว่าแต่เดิมผู้คนในท้องถิ่นเคยเรียกกันอยู่ว่าจำปาตามสีของกลีบดอกที่ร่วงอยู่ที่โคนต้นซึ่งมีสีเหลืองจำปา และเรียกหมู่บ้านนี้ว่าบ้านซับจำปา ซึ่งหมายถึงพื้นที่ชื้นแฉะที่มีต้นจำปาขึ้นอยู่ แต่ยังไม่มีใครปีนต้นขึ้นไปเก็บดอกสดๆ ลงมาศึกษาว่ามีลีอะไร เมื่อพบว่าดอกแรกแย้มมีสีขาวจึงควรเรียกว่า จำปี แต่ในขณะนั้นยังไม่ทราบว่าเป็นชนิดใด ต่อมาอีกประมาณ 3 เดือนเศษได้กลับไปศึกษาผลอ่อนและแก่จากบนต้น บันทึกภาพ ตรวจสอบลักษณะของผล มีผลย่อยจำนวน 15-25 ผล และมีเมล็ด 1-6 เมล็ดต่อผลย่อย จากการสำรวจในครั้งนี้ได้นำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับพรรณไม้ในวงศ์จำปาที่มีอยู่ในประเทศไทยและประเทศข้างเคียง สามารถระบุได้ว่า เป็นพรรณไม้ชนิดใหม่ของโลก (new species) เมื่อมีการส่งตัวอย่างไปตรวจสอบรายละเอียดซ้ำที่หอพรรณไม้ไลเดน ประเทศเนเธอร์แลนด์ ทางศาสตราจารย์ ฮัน พี นูติบูม ผู้เชี่ยวชาญพรรณไม้วงศ์จำปาก็ยืนยันซ้ำว่าเป็นพรรณไม้ชนิดใหม่ของโลก จึงร่วมกันเขียนรายงานการค้นพบ โดยได้รับพระราชทานพระบรมราชานุญาต ให้ใช้ชื่อพระนามาภิไธยเป็นชื่อพืชชนิดใหม่นี้ว่า *Magnolia sirindhorniae* Noot.& Chalermglin โดยมีชื่อภาษาไทยว่า จำปีสิรินธร แล้วนำลงไปตีพิมพ์ในวารสารการจำแนกพรรณไม้ BLUMEA เมื่อเดือนสิงหาคม 2543 (พรทิพย์ อังคปรีชาเศรษฐ์ และ ปิยะ เฉลิมกลิ่น, 2546)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของจำปีสิรินธร

ลักษณะทั่วไป จำปีสิรินธรเป็นต้นไม้ขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูง 20-25 เมตร ลำต้นตรง ทรงพุ่มกลมโปร่ง มีเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นที่ระดับอก 30-100 เซนติเมตร เปลือกโคนต้นสีน้ำตาลหนา 0.5-1 เซนติเมตร มีกลิ่นฉุนเฉพาะตัว เปลือกแตกเป็นร่องตามยาว กิ่งที่อยู่ในระดับสูงมีเปลือกสีขาว กิ่งอ่อนมีสีเขียวอมน้ำตาล มีช่องอากาศเป็นจุดหรือขีดนูนกระจาย เนื้อไม้และกิ่งเหนียว

ใบ รูปรี กว้าง 7-10 เซนติเมตร ยาว 14-20 เซนติเมตร ปลายใบมนทู่ถึงแหลม โคนใบมนกลมหรือรูปลิ่ม ขอบใบเรียบ เนื้อใบหนาแข็งกรอบ แผ่นใบด้านบนมีขนเล็กน้อย สีเขียวอมเหลือง มีเส้นกลางใบนูนเล็กน้อยและมีเส้นแขนง แผ่นใบด้านล่างสีอ่อนกว่าและมีขนมีเส้นกลางใบและเส้นแขนงใบนูนเด่น เส้นแขนงใบ มี 10-12 คู่ ก้านใบยาว 2.5-4.5 เซนติเมตร รอยแผลเป็นของหูใบแนบโคนก้านใบยาวสองในสามของความยาวของก้านใบ

ดอก ออกเดี่ยวที่ซอกใบใกล้ปลายยอด ดอกบานตั้งขึ้น สีขาวนวล เริ่มแย้มและส่งกลิ่นหอมตั้งแต่พลบค่ำ ดอกบานอยู่ได้ 2 วัน เมื่อใกล้โรยเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเล็กน้อย ดอกตูมรูปกระสวย มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-1.5 เซนติเมตร ยาว 2.5-3.5 เซนติเมตร กาบหุ้มดอกมี 1 แผ่น สีเขียวอ่อนและมีขนอ่อนๆ คลุมอยู่ กาบฉีกออกและหลุดไปเมื่อกลีบดอกเริ่มแย้ม ก้านดอกยาว 1.8 เซนติเมตร กลีบดอกมี 12-15 กลีบ เรียงเป็นชั้น ชั้นละ 3 กลีบ กลีบชั้นนอกรูปหอกแกมขอบขนาน กว้าง 1.2-1.5 เซนติเมตร ยาว 4.5-5 เซนติเมตร ปลายกลีบมนกลม เมื่อเริ่มแย้มโคนกสีบดอกด้านนอกมีสีเขียวอ่อน กลีบดอกชั้นในมีขนาดแคบและสั้นกว่าเล็กน้อย

ผล เป็นกลุ่ม ช่อยาว 4-6 เซนติเมตร ก้านช่อผลยาว 4 เซนติเมตร มีผลย่อย 15-25 ผล แต่ละผลเรียงติดอยู่บนแกนกลางผล ไม่มีก้านผลย่อย ผลรูปกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-1.5 เซนติเมตร ผิวของผลมีช่องอากาศเป็นจุดสีขาว ผลอ่อนสีเขียว เมื่อผลแก่แล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนผลย่อยแตกตามแนวยาว แต่ละผลมี 1-16 เมล็ด เมล็ดสีแดงเข้ม รูปกลมรี ยาว 4-6 เซนติเมตร

ช่วงการออกดอกและติดผล ออกดอกเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม ผลแก่เดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน

การขยายพันธุ์และปลูกเลี้ยง โดยการเพาะเมล็ด ควรเลือกเก็บผลแก่ที่เปลี่ยนจากสีเขียวอ่อนเป็นสีน้ำตาลอ่อน ที่โคนช่อมีผลย่อย 1-2 ผล ที่แตกเป็นช่องเล็กๆ และยังไม่ร่วงจากต้นให้นำผลแก่นี้มาผึ่งไว้ในร่ม 2-3 วัน รอยแตกจะกว้างขึ้นและเมล็ดจะหลุดออกมา นำเมล็ดมาเพาะรวมกันในกระบะทราย แล้วราดด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อราและใช้ถุงพลาสติกคลุมป้องกันความชื้น ในเวลา 45-60 วัน จะเริ่มงอก เมื่อใบเลี้ยงคู่แรกคลี่กางดีแล้ว จึงแยกนำลงปลูกในถุงเพาะชำ แล้วตั้ง

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไว้ในเรือนเพาะชำ จนอายุ หนึ่งปีจะมีความสูง 30-40 เซนติเมตร และมีจำนวนใบ 8-10 ใบ จึงนำออกตั้งกลางแจ้งเพื่อให้ปรับตัวก่อนนำปลูกลงแปลง ส่วนการขยายพันธุ์ด้วยวิธีอื่นยังไม่มีการทดลอง เนื่องจากเป็นพรรณไม้ที่เพิ่งมีการค้นพบใหม่ แนวทางที่เป็นไปได้คือ การทาบกิ่งด้วยต้นตอจำปา หรือใช้วิธีการปักชำในกระบะพ่นหมอก ซึ่งจะได้ต้นที่จะออกดอกเร็วขึ้น สามารถปลูกเป็นไม้ดอกในกระถางในระยะแรกได้ (ปิยะ เฉลิมกลิ่น, 2545)

ลักษณะเด่นที่แตกต่างจากจำปีชนิดอื่น คือขึ้นแซ่น้ำอยู่ในป่าพรุน้ำจืดของภาคกลาง มีต้นใหญ่ เปลือกแตกเป็นร่องลึกตามยาว ใบแก่รูปรีค่อนข้างกลม ดอกเริ่มแย้มมีสีเขียวอ่อนที่โคนกลีบดอกด้านนอก ปลายกลีบมนกลม กลีบค่อนข้างบาง ช่อผลค่อนข้างกลมและเล็ก

การใช้ประโยชน์และอนาคตของจำปีสิรินธร สำหรับจำปีสิรินธรที่ขึ้นอยู่ในแหล่งกำเนิดเดิม ซึ่งเป็นพื้นที่อนุรักษ์ ไม่อนุญาตให้มีการตัดฟันหรือให้มีการนำเนื้อไม้มาใช้ประโยชน์ ถึงแม้ว่าจะมีลำต้นขนาดค่อนข้างใหญ่ และมีเนื้อไม้แข็ง แต่จะอนุรักษ์เป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ เพื่อการส่งเสริมการศึกษา การส่งเสริมการท่องเที่ยว ซึ่งคนไทยทั้งประเทศสามารถใช้ประโยชน์เข้ามาเที่ยวชมได้ ในส่วนของจำปีสิรินธรที่มีการขยายพันธุ์ไปจากแหล่งกำเนิดเดิม แล้วนำไปปลูกในแหล่งกำเนิดใหม่ใช้เป็นไม้ประดับที่ปลูกเป็นไม้บังร่ม บังลม และไม้โชว์ทรงพุ่ม ในอนาคตอาจมีการนำจำปีสิรินธรไปผสมกันกับจำปีหรือจำปาชนิดอื่นๆ ซึ่งจะได้ลูกผสมชนิดใหม่ๆ ขึ้นมา ให้สามารถคัดเลือกนำไปปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับได้มากขึ้น ในเวลาเดียวกันอาจมีการพัฒนาให้มีการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนได้มากขึ้น เช่น ดอกที่หอมและสวยงามสามารถนำมาใช้ร้อยมาลัย ใช้เป็นยาสมุนไพร ใช้ดอกมาสกัดเป็นน้ำมันหอมระเหย หรืออาจใช้เนื้อไม้มาเป็นวัสดุใช้สอย วัสดุตกแต่ง ผลิตเป็นของที่ระลึก ฯลฯ (พรทิพย์ อังคปรีชาเศรษฐ์ และ ปิยะ เฉลิมกลิ่น, 2546)

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์จำปีสิรินธร การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในรูปเมล็ดยังไม่พบรายงานการศึกษา เพราะเมล็ดส่วนใหญ่ถูกหนอนผีเสื้อกลางคืนเจาะเข้าไปกินส่วนที่เป็นอาหารสะสมของเมล็ด ทำให้เมล็ดเสียหายและสูญเสียความงอก นอกจากนี้การงอกของเมล็ดจะเป็นต้นปกติได้ต้องอาศัยความชื้นภายในเมล็ดสูง ดังนั้นจึงยากต่อการเก็บรักษาในสภาพเมล็ดแห้ง ส่วนการเก็บรักษาในหลอดทดลองยังไม่เคยมีรายงานการศึกษามาก่อน

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในหลอดทดลอง

การเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อเพื่อรักษาเนื้อเยื่อนั้นไว้ให้ตรงตามพันธุ์ (Wilkins and Dodds, 1983) แบ่งการเก็บรักษาพืชโดยใช้เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ 3 วิธีคือ

1. Normal growth storage เป็นการเก็บรักษาโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อให้มีการเจริญเติบโตในระดับปกติ อาศัยการย้ายเนื้อเยื่อในอาหารใหม่ในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมอย่างสม่ำเสมอ

2. Minimal growth storage เป็นการเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชไว้ในภาวะที่ทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ ซึ่งอาจทำได้หลายวิธีได้แก่ การเปลี่ยนแปลงภาวะทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ หรือสภาวะของอากาศภายในหลอด หรือขวดเนื้อเยื่อ การเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการลดธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์จากระดับปกติหรือ ลดเพิ่มปัจจัยบางอย่างที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตปกติ รวมทั้งการใช้สารชะลอการเจริญเติบโต เช่น abscisic acid (ABA) cycocel หรือสารประกอบที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ เช่น sugar-alcohols, mannitol และ sorbitol การเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชในสภาพนี้สามารถช่วยลดงาน subculture และความเสี่ยงของการเกิด somaclonal variation ในช่วงเวลาประมาณไม่เกิน 2 ปี แต่การคงในสภาพเช่นนี้นานกว่านั้น อาจทำให้เกิดลักษณะแตกต่างหรือผิดปกติไปจากพืชเดิมได้ (Moriguchi, 1995)

การชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อทำได้หลายวิธี คือ (Sakai, 2000)

2.1 การปรับองค์ประกอบของอาหารเพื่อลดการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อในหลอดทดลองและการใช้สารชะลอการเจริญเติบโต (minimal media and use of growth retardants) อาหารที่ใช้ในการชะลอการเจริญเติบโตอาจลดความเข้มข้นลงเหลือเพียงครึ่งหนึ่ง หรือหนึ่งในสี่ส่วน หรือไม่ใส่น้ำตาลลงในอาหาร ส่วนการใช้สารชะลอการเจริญเติบโตส่วนใหญ่จะใช้ ABA cycocel หรือ paclobutrazol (Finkelstein and Lynch, 2000)

2.1.1 ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก การลดสารที่เป็นองค์ประกอบของอาหารให้อยู่ในระดับที่ต่างจากความต้องการตามปกติของพืช มีผลต่อการเจริญเติบโตขณะทำการเก็บรักษา ซึ่งต่างจากการที่ไม่ลดธาตุอาหารใดเลย ดังเช่นในการทดลองใช้สูตรอาหาร MS ที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารหลักของต้น *Colocasia esculenta* พบว่าอัตราการเจริญไม่เปลี่ยนแปลง ระหว่างเก็บรักษาเมื่อเทียบกับการใช้อาหาร MS ปกติ และสามารถเก็บรักษาได้นานถึง 8 เดือน โดยไม่มีการเปลี่ยนถ่ายอาหารและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงบนอาหารใหม่ (Bessembinder *et al.*, 1993.) หากลดองค์ประกอบของธาตุอาหารหลักเหลือ 1/2MS สามารถลดจำนวนยอดเฉลี่ยที่เกิดใหม่ของต้น *Ipsea malabarica* เหลือเพียง 5.0 ยอดต่อ

ชิ้นส่วน เป็นเวลานาน 20 เดือน (Martin and Pradeep, 2003) ส่วนต้นที่เป็นไม้เนื้อแข็งอย่าง *Eucalyptus grandis* เก็บรักษานาน 10 เดือน (Watt *et al.*, 2000)

2.1.2 การใช้สารยับยั้งการเกิดออสโมซิส มีการศึกษาผลของ mannitol เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่มีไว้เป็นพลังงานสำรองที่พืชสะสมไว้ทดแทนการขาด sucrose พืชสามารถสร้าง mannitol ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยจะเปลี่ยนจาก mannose ที่มีพลังงานต่ำกลายเป็น mannitol ที่มีพลังงานสูง นอกจากนี้ mannitol มีผลต่อการเกิด osmotic stress ภายในเซลล์ (Vinocur and Altman, 2005) หากเติม mannitol ที่ระดับความเข้มข้นสูงย่อมส่งผลต่อค่า osmotic potential ของอาหารให้ลดต่ำลง ในการเก็บรักษาตาข้างเจตมูลเพลิงแดง พบว่าสามารถชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนที่เจริญจากตาที่ข้อได้โดยเฉพาะความสูงของต้นจะลดลงถึง 83.1 เปอร์เซ็นต์ การเพิ่มจำนวนยอดของต้นอ่อนมีแนวโน้มลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี mannitol ความเข้มข้น 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ต้นอ่อนในอาหารที่เติม mannitol 20 กรัมต่อลิตร สามารเก็บรักษาได้ถึง 8 เดือนโดยไม่มีการตาย และต้นอ่อนยังคงมีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง (รมณีย์ เจริญทรัพย์และศาลักษณ์ พรรณศิริ, 2547) การเติม mannitol 30 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้สามารถเก็บรักษาเนื้อเยื่อ *Xanthosoma* spp.ได้นานขึ้นจาก 2 ปีเป็น 3 ปี ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส โดยปราศจากการเปลี่ยนถ่ายอาหาร (Zandvoort *et al.*, 1994) แต่การใช้ mannitol ที่มีความเข้มข้นสูงจนมีผลยับยั้งออสโมซิสรุนแรงเกินไปก็มีผลเสียได้ จากการศึกษาการใช้ mannitol ใน *Colocasia esculenta* แม้ที่ความเข้มข้น 15-40 กรัมต่อลิตร จะช่วยในการชะลอการเจริญทำให้เก็บได้นานถึง 42 เดือน โดยไม่เปลี่ยนอาหาร แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ mannitol เป็น 45-60 กรัมต่อลิตร กลับส่งผลให้การเจริญเติบโตของยอดภายหลังจากการเก็บรักษาบน regeneration medium มีอัตราการรอดที่ต่ำลงมาก และมีผลให้ต้นเกิดอาการผิดปกติอีกด้วย (Bessembinder *et al.*, 1993)

ชนิดของน้ำตาลและการใช้ร่วมกันของน้ำตาลชนิดต่างๆ มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชระหว่างการเก็บรักษาในหลอดทดลองด้วย การใช้ sucrose เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้นสูง 30-50 กรัมต่อลิตร มีผลเพิ่มจำนวนยอด จำนวนราก และ จำนวนลำต้นสะสมอาหารของยอดกระเทียม (*Allium sativum* L.) ได้แต่สามารถเก็บรักษาได้เพียง 4 เดือน ส่วนการใช้ร่วมกันของน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยการเก็บรักษายอด apple ในอาหารที่เติม sucrose ที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ mannitol ที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ชะลอการเจริญนาน 12 เดือน (Hao and Deng, 2003) ในการเก็บรักษายอดมันฝรั่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาล sucrose เป็น 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ mannitol ที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร มีผลชะลอการเจริญเติบโตต่อความสูงลำต้น จำนวนใบและจำนวนรากได้ นาน 16 เดือน (Sarkar *et al.*, 1999)

2.1.3 การใช้สารชะลอการเจริญเติบโต สารชะลอการเจริญเติบโตจัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulator) ที่เป็นสารสังเคราะห์ พืชไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาเองได้ คุณสมบัติของสารกลุ่มนี้คือ ชะลอการแบ่งเซลล์และการยืดตัวของเซลล์จึงมีผลทำให้ต้นพืชที่ได้รับสารมีความสูงน้อยกว่าต้นปกติ นอกจากนี้พืชที่ได้รับสารชะลอการเจริญเติบโตมักจะมีใบหนาและเขียวเข้ม สารชะลอการเจริญเติบโตมีอยู่หลายชนิดด้วยกันแต่ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ paclobutrazol (พีรเดช ทองอำไพ, 2529)

paclobutrazol มีชื่อทางเคมีว่า (2RS, 3RS)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl) pentan-3-ol หรือ $C_{15}H_{20}ClN_3O$ ชื่อการค้า Cultar® ละลายในน้ำหรือเมธานอล 15% เฮกเซน 17% ไซลีน 16% และจะคงตัวในอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 6 เดือน (Greene and Murray, 1983)

paclobutrazol เป็นสารยับยั้งการสังเคราะห์ gibberellins (Stang and Weis, 1984; Wample and Culver, 1983) ซึ่งจะยับยั้งการสังเคราะห์ gibberellins ที่บริเวณเนื้อเยื่อเจริญใต้ปลายยอด (subapical meristem) โดยไม่เกี่ยวกับปลายยอดโดยตรง ดังนั้นจึงไม่มีผลต่อใบที่มีจุดกำเนิดที่ปลายยอดจำนวนใบจึงไม่เปลี่ยนแปลง (Sterett, 1985) สาร paclobutrazol จะไปขัดขวางกระบวนการ oxidation ของ kaurene ไม่ให้เปลี่ยนเป็น kaurenoic acid ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่จะเปลี่ยนไปเป็น gibberellins ชนิดต่างๆในพืช ทำให้ระดับ gibberellins ในพืชมีน้อยลง การแบ่งเซลล์และการขยายขนาดเซลล์ก็ลดลงด้วย (Dalziel and Lawrence, 1984) paclobutrazol มีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ gibberellins ภายในพืชเท่านั้น (Curry and Williams, 1986) และจะเคลื่อนย้ายได้ดีโดยผ่านทางท่อลำเลียงน้ำ (xylem) แต่ไม่เคลื่อนที่ทางท่ออาหาร (phloem) สามารถใช้ได้สะดวกทั้งวิธีการพ่นทางใบและรดลงดิน หรืออาจให้สารโดยการฉีดพ่นที่ลำต้นโดยตรง (stem injection) (Sterett, 1985) แต่สามารถดูดซับเข้าทางรากได้ดีกว่าและเร็วกว่าการให้สารทางใบ (William and Edgerton, 1983)

การศึกษาผลของ paclobutrazol พบว่าสามารถชะลอการเจริญเติบโตด้านความสูงของต้นในหลอดทดลองได้ดังรายงานการใช้ paclobutrazol ความเข้มข้น 8.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กับต้นดองดึงในสภาพปลอดเชื้อ ปรากฏว่าความสูงของต้นลดลงและเพิ่มจำนวนหน่อได้ดีที่สุดโดยไม่มีผลต่อจำนวนรากและจำนวนใบ (สมภพ ครุธทะยาน, 2540) สาร paclobutrazol เข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังมีผลให้ต้น sweet cherry ในสภาพปลอดเชื้อ มีความสูงน้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับสาร โดยยังมีการพัฒนาของตาข้างและมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น แม้ใบมีขนาดเล็ก และมี callus ขนาดใหญ่เกิดขึ้นมาก (Snir, 1988)

สำหรับในกล้วยไม้สกุลหวายนั้นพบว่าการใช้ paclobutrazol เข้มข้น 5,10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในหลอดทดลองเป็นเวลา 5 เดือน ต้นกล้วยไม้มีการตอบสนองต่อสารอย่างชัดเจน คือมีการเจริญยืดยาวของยอดน้อยลง ยอดมีลักษณะแตกกอเตี้ยๆ (rosette) และใบเล็กลง ขณะที่การใช้สารเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต้นกล้วยไม้มีการเจริญทางลำต้นใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ไม่ใช้สาร แต่มีรากมากขึ้น (วิลาวรรณ ศิริพูนวิวัฒน์, 2533)

2.2 การเททับด้วย mineral oil (mineral oil overlay) ลดการหายใจของชิ้นส่วนพืช และเทอาหารทับอีกครั้งหนึ่งสามารถเก็บรักษาแคลลัสของแครอทได้ นาน 4-6 เดือน โดยไม่เปลี่ยนอาหาร ขั้นตอนนี้ได้ผลดีเฉพาะพืชที่มีลำต้นใต้ดินเพราะมีการปล่อยก๊าซ ethylene น้อยกว่าพืชชนิดอื่นจึงจะมีการรอดชีวิตสูง (Augereau *et al.*, 1986)

2.3 การทำให้แห้ง (desiccation) นิยมใช้เฉพาะส่วนที่เป็นแคลลัส เพราะน้ำในเซลล์มีมากจึงทนต่อการสูญเสียน้ำได้ดีกว่าส่วนอื่นๆของพืช เช่นจากการทำให้แห้งของแคลลัสองุ่น, แครอท และ alfalfa สามารถเก็บรักษาได้นาน 1 ปี (Nitzsche, 1980)

2.4 การเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิต่ำ (low temperature storage) โดยการลดอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อเหลือประมาณ 4-5 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาพืชที่เป็นไม้เนื้ออ่อน มีความทนต่ออุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าไม้เนื้อแข็ง เช่น ต้นอ่อนของพิทูเนีย และ เบญจมาศ เก็บรักษาได้นาน 6 ปี (Bajaj, 1995)

3. Ultra-low temperature storage (cryopreservation) หรือ Freeze-preservation คือ การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในสภาพเยือกแข็ง โดยทำการเก็บรักษาส่วนของพืชที่มีชีวิตในไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิต่ำถึง –196 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถใช้อนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชที่ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และไม่สามารถเก็บเมล็ดได้ หลักการสำคัญของวิธี cryopreservation ที่จะใช้ได้อย่างประสบความสำเร็จ คือ ต้องป้องกันไม่ให้ภายในเซลล์กลายเป็นผลึกน้ำแข็ง (ice crystal) ซึ่งจะเป็นอันตรายแก่เซลล์ วิธีการป้องกันการกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง เพื่อให้สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในรูปของเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืชใน ไนโตรเจนเหลว ก็คือ การลดปริมาณน้ำภายในเซลล์หรือทำให้เซลล์สูญเสียน้ำ (dehydration) ซึ่งสามารถทำได้โดย การให้อุณหภูมิต่ำอย่างช้า (conventional slow freezing) การให้อุณหภูมิต่ำอย่างง่าย (simple freezing) การทำให้เกิดสภาพแก้วอย่างสมบูรณ์ (complete vitrification) การทำให้แห้ง (air drying) วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในสภาพเยือกแข็งมีหลายวิธี ได้แก่ วิธี vitrification, encapsulation-dehydration และ encapsulation-vitrification ซึ่ง vitrification เป็นกระบวนการทางกายภาพที่ช่วยป้องกันไม่ให้เกิด

ผลึกน้ำแข็งขึ้น แต่ทำให้น้ำในสภาพของเหลวในสารละลายกลายเป็นของแข็งคล้ายแก้วที่อุณหภูมิประมาณ -110 องศาเซลเซียส (glass transition temperature : Tg) น้ำในสภาพที่กลายเป็นแก้วจะช่วยป้องกันการยุบตัวของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสาร รวมถึง pH ในระหว่างการสูญเสียน้ำ น้ำในสภาพที่กลายเป็นแก้วจะมีแรงดันไอน้ำต่ำกว่าผลึกน้ำแข็ง จึงไม่ทำให้มีการสูญเสียน้ำเพิ่มขึ้นอีก ปฏิกิริยาทั้งหมดที่ต้องมีการแพร่ของโมเลกุลต่างๆ จะหยุดนิ่ง โดยที่ตลอดเวลาของการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว กระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์จะหยุดลงทำให้เกิดการพักตัวทำ โดยส่วนที่ช่วยให้เนื้อเยื่อพืชทนต่อสภาพการสูญเสียน้ำได้ คือการใช้ vitrification solution ซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ส่วน encapsulation-dehydration เป็นวิธีที่ช่วยป้องกันไม่ให้เกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์ โดยอาศัยการลดปริมาณน้ำภายในเซลล์ ซึ่งอาจทำได้ด้วยการทำ air drying แต่จะหุ้มเนื้อเยื่อพืชด้วย calcium alginate beads ก่อนเพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อพืชได้รับความเสียหาย หรือสูญเสียน้ำมากเกินไป สำหรับ encapsulation-vitrification จะเป็นการรวมหลักการของวิธี vitrification และ encapsulation-dehydration เข้าด้วยกัน โดยส่วนของพืชจะต้องผ่านการแช่ใน vitrification solution และผ่านการทำ encapsulation-dehydration ก่อนที่จะนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลว (Sakai, 1985)

3.1 การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในไนโตรเจนเหลวแบบวิธี vitrification การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้สามารถนำไปใช้กับเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น เมล็ด คัพภะ ปลายยอด เนื้อเยื่อเจริญ และโพรโตรพลาส เป็นต้น วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในไนโตรเจนเหลว (Sakai, 2000) มีขั้นตอนดังนี้

3.1.1. การทำ preculture เนื้อเยื่อพืชที่นำมาเก็บรักษาจะต้องผ่านกระบวนการก่อนการเก็บรักษาโดยการเลี้ยงในที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าปกติ (น้อยกว่า 25 องศาเซลเซียส) ในที่มืดร่วมกับสารป้องกันความเย็น หรือน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง นานประมาณ 2-3 วัน ขึ้นกับระบบการเพาะเลี้ยงและชนิดของพืช เพื่อกระตุ้นการปรับตัวให้ทนต่อสภาพการแช่แข็งขณะเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวต่อไป

3.1.2 การเติมสารป้องกันความเย็น (cryoprotectants solutions) ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงปรับการผ่านเข้าออกของสาร (permeability) ผ่านผนังและเยื่อหุ้มเซลล์ และจุดเยือกแข็ง (freeze point) ของเซลล์ซึ่งจะทำให้มีความทนทานต่อการแช่แข็ง (freezing) และการละลายตัว (thawing) หลังการเก็บรักษาได้โดยไม่มีผลกระทบต่อความมีชีวิตและการพัฒนาของเซลล์และเนื้อเยื่อ (Bajaj, 1995) สาร cryoprotectants จำแนกเป็น 2 ประเภทคือ

3.1.2.1 สารเคมีประเภทออกฤทธิ์ภายในเซลล์ สารเคมีกลุ่มนี้เมื่อซึมผ่านเข้าไปภายในเซลล์จะทำหน้าที่ป้องกันอันตรายขณะแช่แข็งและละลาย ตัวอย่างสารเคมีกลุ่มนี้ได้แก่

glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO) และแอลกอฮอล์หลายชนิด เช่น methanol, ethanol, propanediol เป็นต้น ซึ่งสารเคมีพวกนี้จะออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายได้ดีเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นค่อนข้างสูง (1-4 M) ความสามารถในการแพร่เข้าสู่เซลล์ แอลกอฮอล์มีอัตราการแพร่สูงสุด รองลงมาได้แก่ DMSO และ glycerol ตามลำดับ สารเคมีกลุ่มนี้มีข้อเสียอยู่ประการหนึ่ง คือ เป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ

3.1.2.2 สารเคมีประเภทออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ สารเคมีกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ และใช้ได้ผลดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าประเภทแรก (0.01-0.2 M) และเป็นพิษน้อยกว่าด้วย ตัวอย่างสารเคมีกลุ่มนี้ ได้แก่ polyvinylpyrrolidon และน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น sucrose, glucose, mannitol เป็นต้น

ตารางที่1 สารเคมีที่นำมาใช้เป็น cryoprotectants และปริมาณที่การใช้โดยทั่วไป (ประศาสตร์ เกื้อมณี , 2536)

สารเคมี	ปริมาณการใช้ (%)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	2.5-12
Glycerol	1-10
Glucose	4-8
Ethylene glycol	2.5
Polyethylene glycol (PEG) MW 6000	10
Sucrose	3-5
Proline	1 (M)

3.1.3 การเก็บเนื้อเยื่อไว้ในภาวะแช่แข็งเพื่อให้เกิดสภาพแก้วอย่างสมบูรณ์ (complete vitrification) หลังจากเติมสารป้องกันความเย็นนิยมใช้สาร PVS_2 (30% (w/v) glycerol , 15% (w/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), 15% (w/v) ethylene glycol ที่เติม 0.4 sucrose ใน MS basal medium) ร่วมกับตัวอย่างแล้วจึงนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวโดยตรงที่ -196 องศาเซลเซียส ในขณะนั้นมีการเปลี่ยนแปลงของสารละลายภายในเซลล์จากภาวะที่เป็นของเหลวกลายเป็นของแข็งที่มีสภาพคล้ายกระจกใส เริ่มที่ระดับอุณหภูมิ -110 องศาเซลเซียสจนถึง -196 องศาเซลเซียส เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดผลึกน้ำแข็ง

3.1.4 การละลายเนื้อเยื่อที่แข็งตัว (thawing) เมื่อต้องการนำเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวมาใช้ ต้องละลายผลึกน้ำแข็งที่เกาะตัวออกอย่างรวดเร็ว เพื่อไม่ให้น้ำภายในเซลล์เปลี่ยนจากของแข็งที่มีสภาพคล้ายกระจกใสกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง สภาพดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า -110 องศาเซลเซียส เพื่อไม่ให้เซลล์ได้รับอันตรายจึงต้องละลายอย่างรวดเร็วเพื่อผ่านจุดวิกฤตินี้ โดยใส่ลงในน้ำอุ่นหรืออาหารเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิประมาณ 37-40 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่เกิดผลึกของน้ำแข็งภายในเซลล์ จะทำให้การละลายเนื้อเยื่อที่แข็งตัวนี้ทำได้ช้า และเกิดความเสียหายต่อเซลล์นั้นได้

3.1.5 การทำให้เนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตได้อีก (recovery) เนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอนต่างๆ ของการเก็บรักษาดังกล่าวข้างต้นมาแล้ว อาจมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเซลล์และมักจะอ่อนแออย่างยิ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้องการอาหารเพาะเลี้ยงพิเศษที่แตกต่างจากสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงก่อนการเก็บรักษา โดยทั่วๆ ไปแล้วจะไม่มีการล้างเนื้อเยื่อเพราะอาจทำให้เกิดความเสียหายได้ง่าย การนำกลับมาให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตอีกครั้งจำเป็นต้องปรับภาวะการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม

3.2 การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในไนโตรเจนเหลวแบบ encapsulation-vitrification การเก็บรักษาพันธุกรรมพืชในระยะยาว (long term storage) โดยการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (cryopreservation) เป็นการเก็บรักษาพันธุกรรมโดยนำเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาแช่ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส แต่ทั้งนี้จะต้องมีวิธีการป้องกันอันตรายจากการแข็งตัวของน้ำในเซลล์อย่างเฉียบพลันเนื่องจากการแช่ในไนโตรเจนเหลวจะมีผลต่อเยื่อภายในเซลล์และความมีชีวิตของเซลล์ได้ (Bajaj, 1985)

วิธีการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวแบบ encapsulation-vitrification เป็นการรวมหลักการของวิธี vitrification และ encapsulation-dehydration เข้าด้วยกัน โดยมีขั้นตอนการทำ encapsulation-dehydration ด้วยการหุ้มเนื้อเยื่อพืชด้วย sodium alginate ก่อนเพื่อป้องกันหรือลดความเสียหายที่จะเกิดกับเนื้อเยื่อพืช จากนั้นนำไปดึงน้ำออกโดยผ่านการแช่ในสารละลาย vitrification ก่อนที่จะนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลว (Engelmann, 2000)

วิธีการที่ช่วยให้พืชมีอัตราการรอดชีวิตมากขึ้น อาจทำได้โดย การทำ cold hardening ซึ่งพบว่าช่วยเพิ่มความสามารถของพืชในการทนต่ออุณหภูมิต่ำได้ เช่นในการเก็บรักษา shoot-tip ของ apple (*Malus* X *domestica* Borkh.) (Paul *et al.*, 2000) mint (*Mentha spicata* L.) (Hirai and Sakai, 1999) และ plum (*Prunus domestica* L.) (Carlo *et al.*, 2000) โดยวิธี cryopreservation พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงถึง 90 และ47.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การปรับระยะเวลาในการแช่สาร osmoprotective solution สามารถเพิ่มความทนทานของเนื้อเยื่อมันฝรั่งที่เก็บในสภาพอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งได้ดีโดยใช้ 2.0 M glycerol + 0.4 M sucrose แช่เป็นเวลา 60 นาที (Pennycooke and Towill, 2000) และปลายยอดส้ม (*Citrus aurantium* L.) (Ababneh-AL *et al.*, 2002)

การปรับระยะเวลาในการแช่สาร plant vitrification solution เพื่อทำการ dehydrate หรือลดปริมาณน้ำที่อยู่ในเซลล์โดยใช้สารละลายความเข้มข้นสูง เช่น การใช้ PVS_2 ดึงน้ำออกจาก apical meristems ของ wasabi (*Wasabia japonica*) ที่เวลา 30 ถึง 100 นาที สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตจาก 30 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Matsumoto *et al.*, 1995) เช่นเดียวกับปลายยอดส้ม [*Poncirus trifoliate* (L.) X *Citrus sinensis* (L.) Osbeck] ใช้เวลา 60-180 นาที เพิ่มอัตราการรอดชีวิตจาก 30 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Wang *et al.*, 2002a)

จากการตรวจหาการแปรผันทางพันธุกรรมของเนื้อเยื่อที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวโดยการใช้เทคนิค RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) พบว่ายอดของมันฝรั่ง มันสำปะหลัง และลิลลี่ ที่ผ่านการเก็บรักษาแบบ encapsulation-vitrification แล้วไม่ปรากฏความผันแปรทางพันธุกรรมเกิดขึ้น (Hirai and Sakai, 1999)

ประโยชน์ของการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (Towill, 2002)

1. เป็นวิธีการเก็บพันธุกรรมที่มีความคงตัวสูง
2. ลดความเสี่ยงของแมลง และโรคที่เข้ามาทำลาย
3. หลีกเลี่ยงการถ่ายเนื้อเยื่อบ่อยๆ
4. ประหยัดค่าใช้จ่ายด้านแรงงาน, อาหาร และพื้นที่เก็บรักษา
5. สะดวกในการขนย้าย และ แลกเปลี่ยนพันธุ์พืช
6. หยุดอายุและการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนพืช
7. เก็บรักษาได้ทุกส่วนของพืช