การผลิตเมล็ดเทียมจากชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวาน

Artificial Seed Production from Nodal Explant of *Stevia rebaudiana* Bertoni

กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์

Kittisak Chotikadachanarong*

ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพพืช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

Center of Excellence in Plant Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University

Received : 8 December 2017

Accepted : 17 January 2018

Published online : 25 January 2018

บทคัดย่อ

การผลิตเมล็ดเทียมจากชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานโดยการศึกษาผลของน้ำตาลซูโครส และอุณหภูมิในการเก็บเมล็ดเทียมต่อการงอกและการเจริญเติบโตของยอดหญ้าหวาน โดยชิ้นส่วนข้อจะถูกแช่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% ในการผลิตเมล็ดเทียม แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเมล็ดเทียมที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารวุ้น สูตร MS ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1% เหมาะสมสำหรับการงอก และการเจริญเติบโตของยอด จากนั้นจงทดสอบการเก็บเมล็ดเทียมในอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเมล็ดเทียมที่เก็บในอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสมีอัตราการงอกสูงที่สุด 80%

คำสำคัญ : เมล็ดสังเคราะห์ อัลจิเนต การเก็บรักษา

Abstract

This study describes the investigation on the artificial seed production from nodal explants of *Stevia rebaudiana* Bertoni with focus on effects of sucrose concentrations and storage temperatures on germination and growth and development of shoot. Nodal explants were encapsulation by immersion in liquid MS medium supplemented with different concentration of sucrose and 2% sodium alginate. The artificial seeds were kept in refrigerator at 10°C for 7 days before cultured on agar MS medium at 25°C and 16 hours of light per day for 4 weeks. It was found that 1% sucrose was the optimum concentration for germination and growth and development of shoot. Then, artificial seeds (with 1% sucrose) were stored at different temperatures for 7 days before cultured on agar MS medium for 4 weeks. Artificial seeds stored at 0°C showed the highest of germination rate 80%

Keywords : synthesis seed, alginate, preservation

***Corresponding author. E-mail** : Kittisak_cho@cmru.ac.th

บทนำ

หญ้าหวานมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Stevia rebaudiana* Bertoni จัดอยู่ในวงศ์ Asteraceae เป็นพืชล้มลุกระยะยาว มีลักษณะคล้ายต้นกะเพราหรือต้นแมงลัก มีสาร Stevioside ซึ่งเป็นสารให้ความหวานคล้ายคลึงกับน้ำตาล และมีความหวานประมาณ 300 เท่าของน้ำตาลซูโครส นอกจากนี้ยังเป็นสารที่มีแคลอรี่ต่ำมากเมื่อเทียบกับน้ำตาลทราย เนื่องจากไม่ถูกย่อยให้เกิดพลังงานในร่างกาย มีความคงตัวสูงทั้งในตัวทำละลายกรดอ่อน เบสอ่อน และทนความร้อนได้ถึง 200 องศาเซลเซียส จึงไม่สลายตัว หรือเปลี่ยนสภาพจากความร้อนในการปรุงอาหาร จากคุณสมบัติดังกล่าว ในต่างประเทศจึงได้มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลาย เช่น หมากฝรั่ง เครื่องดื่ม ไอศกรีม แยม และเยลลี่ เป็นต้น ในประเทศไทยเองก็เริ่มนำมาเป็นส่วนผสมในอาหาร และเครื่องดื่ม โดยใช้แทนน้ำตาลทรายบางส่วนหรือทั้งหมดเพื่อลดปริมาณแคลอรี่ในอาหาร และเครื่องดื่มสำหรับผู้ที่ต้องการลดความอ้วน หรือผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน ซึ่งไม่สามารถบริโภคน้ำตาลในปริมาณมากๆ ได้ และทั้งนี้ปัจจุบันสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) อนุญาตให้นำสารสกัดหญ้าหวานมาขึ้นทะเบียนเป็นสารหวานแทนน้ำตาลได้

เกษตรกรไทยนำหญ้าหวานเข้ามาปลูกกันมาก ในเขตภาคเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน และพะเยา เนื่องจากหญ้าหวานชอบอากาศค่อนข้างเย็น อุณหภูมิประมาณ 20 - 26 องศาเซลเซียส และขึ้นได้ดีเมื่อปลูกในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 600 - 700 เมตร โดยเกษตรกรมักจะทำการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด แต่พืชชนิดนี้มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดต่ำมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ (Miyazaki and Wantenabe, 1974) และการปักชำเองก็ถูกจำกัดโดยจำนวนของต้นพันธุ์ อีกทั้งยังต้องใช้เวลานาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการขยายพันธุ์หญ้าหวานให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น และได้ต้นพันธุ์ที่แข็งแรงปราศจากโรค โดย Chotikadachanarong and Dheeranupattana (2013) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานบนอาหาร MS ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากที่สุด 9.31±4.17 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ เมื่อนำชิ้นส่วนข้อที่ได้จากชุดการทดลองดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากจำนวนมากที่สุด คือ 11.18±1.34 รากต่อยอด แม้ว่าวิธีดังกล่าวจะสามารถผลิตต้นพันธุ์หญ้าหวานได้จำนวนมากแต่ก็จำเป็นต้องใช้แรงงานในการย้ายเนื้อเยื่อ (subculture) ภายหลังการเพาะเลี้ยงทุกๆ 4 สัปดาห์ เพราะธาตุอาหารในอาหารวุ้นจะถูกพืชนำไปใช้จนหมด ซึ่งในการย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละครั้งจะมีค่าใช้จ่ายด้านแรงงานจึงส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น นอกจากนี้ยังมีค่าใช้จ่ายในส่วนของขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งจำเป็นต้องใช้เป็นจำนวนมาก รวมถึงต้องใช้พื้นที่ในห้องเพาะเลี้ยงจำนวนมาก และยากต่อการขนส่งอีกด้วย

ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงควรนำเทคนิคการผลิตเมล็ดเทียมโดยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์เพื่อเลียนแบบเมล็ดที่ได้จากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติโดยเมล็ดเทียมจะมีองค์ประกอบสำคัญเลียนแบบเมล็ดที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ โซมาติกเอ็มบริโอ หรือ เอ็มบริโอที่ได้จากเพาะเลี้ยงเซลล์ร่างกาย อาหารสะสมเทียม และส่วนห่อหุ้มเอ็มบริโอ หรือเปลือกหุ้มเมล็ดเทียม เนื่องจากเมล็ดเทียมสามารถผลิตได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น สามารถผลิตได้ตลอดทั้งปี ลดแรงงาน ลดพื้นที่ของห้องเพาะเลี้ยง และขนส่งได้ง่าย นอกจากนี้เทคนิคการผลิตเมล็ดเทียมยังเป็นอีกทางเลือกสำหรับการเก็บรักษาพันธุกรรมพืช อีกทั้งประหยัดพื้นที่ในการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชที่มีความสำคัญได้อย่างมีประสิทธิภาพ ยกตัวอย่างเช่น

Wongsansri *et al*. (2015) ซึ่งได้ศึกษาผลของโซเดียมอัลจิเนตต่อการผลิตเมล็ดเทียมจากชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานโดยนำชิ้นส่วนข้อที่ปลอดเชื้อมาแช่ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในอาหารเหลวสูตร MS ที่ไม่เติมแคลเซียมคลอไรด์ ร่วมกับน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 5.7 ใช้ปิเปตดูดชิ้นส่วนข้อมาหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 mM พึ่งให้แห้งแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำมาทดสอบการงอกโดยการนำเมล็ดเทียมไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าเมล็ดเทียมที่ผลิตจากโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2 % ต้นอ่อนเกิดการงอกได้ 100% ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาถึงปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการผลิตและการงอกของเมล็ดเทียมจากชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวาน และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บเมล็ดเทียม เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์ และการเก็บรักษาพันธุกรรมของหญ้าหวานต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมพืชตัวอย่าง

ขยายพันธุ์หญ้าหวานโดยนำชิ้นส่วนข้อที่ปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหารวุ้น สูตร Murashige and Skoog (MS, 1962) ที่เติม kinetin ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เป็น 5.7 นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนจากของเมล็ดเทียมหญ้าหวาน

ตัดชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานที่ปลอดเชื้อความยาวประมาณ 3 ±1 มิลลิเมตร แช่ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0, 1, 2, 3 และ 4% ใช้ Micropipette ดูดเอาชิ้นส่วนของข้อหญ้าหวานหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 mM. โดยให้แต่ละหยด มีชิ้นส่วนของข้อหญ้าหวาน 1 ชิ้น แช่ทิ้งไว้ 45 นาที นำเมล็ดเทียมมาวางในจานเพาะเชื้อที่รองด้วยกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปล่อยให้เมล็ดเทียมแห้งเป็นเวลา 30 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ เก็บเมล็ดเทียมใส่ขวด Vial Tubes ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปิดฝาให้แน่นแล้วพันฝาขวดด้วยพาราฟิล์มเก็บใส่ถุงซิบนำใส่ไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงทดสอบอัตราการงอกโดยนำเมล็ดเทียมที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS 1 เมล็ด ต่อ 1 ขวด จำนวน 15 ขวด ทำ 3 ซ้ำ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกลักษณะของเมล็ดเทียม อัตราการงอกของเมล็ดเทียม การเจริญเติบโตของต้นอ่อนหญ้าหวาน

การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนจากเมล็ดเทียมหญ้าหวาน

ตัดชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานที่ปลอดเชื้อความยาวประมาณ 3 ±1 มิลลิเมตร แช่ในสารละลาย โซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการทดลองแรก โดยใช้ Micropipette ดูดเอาชิ้นส่วนของข้อหญ้าหวาน หยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 mM. โดยให้แต่ละหยดมี 1 ชิ้นส่วนของข้อหญ้าหวาน จากนั้นแช่ทิ้งไว้ 45 นาที นำเมล็ดเทียมมาวางในจานเพาะเชื้อที่รองด้วยกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเปิดฝาออกเกลี่ยเมล็ดเทียมไม่ให้ซ้อนทับกัน ปล่อยให้เมล็ดเทียมแห้งเป็นเวลา 30 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ ใช้ปากคีบคีบเมล็ดเทียมใส่ขวด Vial Tubes ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปิดฝาให้แน่นแล้วพันฝาขวดด้วยพาราฟิล์มเก็บใส่ถุงซิบ นำไปไว้ในอุณหภูมิ 0, 4, 10 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ทดสอบอัตราการงอกโดยนำเมล็ดเทียมที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารวุ้น สูตร MS 1 เมล็ด

ต่อ 1 ขวด จำนวน 15 ขวด ทำ 3 ซ้ำ แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกอัตราการงอกของเมล็ดเทียม การเจริญเติบโตของต้นอ่อนหญ้าหวาน และทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดเทียมหญ้าหวานด้วยวิธีวัดค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity test)

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองทั้งหมดใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomize design) โดยผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one way ANOVA) จากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ ต่อการผลิต และการงอกของเมล็ดเทียมจากชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวาน ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมบนอาหารวุ้นสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 เมล็ดเทียมที่ผลิตจากน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1, 2 และ 4% มีอัตราการงอกสูงกว่า น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0 และ 3% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05 ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมน้ำตาล 1% มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากกว่าน้ำตาล 2 และ 3% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากชุดการทดลองที่เติมน้ำตาล 0 และ 4% สำหรับความสูงของยอดที่งอกจากเมล็ดเทียมซึ่งเติมน้ำตาล 1 และ 3% มีค่าเฉลี่ยมากกว่าความสูงเฉลี่ยจากยอดที่งอกจากเมล็ดเทียมที่เติมน้ำตาล 0 และ 2% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05 แต่ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่เติมน้ำตาล 4% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามพบว่ายอดที่งอกจากเมล็ดเทียมที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1% ให้จำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด 8.76 ใบ ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05 ดังนั้นน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1% จึงมีความเหมาะสมในการผลิตเมล็ดเทียมเนื่องจากให้อัตราการงอก และการเจริญเติบโตของยอดสูงแต่ใช้น้ำตาลซูโครสน้อย จึงทำให้ต้นทุนการผลิตน้อยกว่าชุดการทดลองอื่นๆ อีกทั้งลักษณะของยอดที่งอกจากเมล็ดเทียมมีความแข็งแรง ยอดและใบไม่พบความผิดปรกติ ดังภาพที่ 1 ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Hudi *et al*. (2007) ซึ่งได้ศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมจากชิ้นส่วนข้อของมะเขือม่วง (*Solanum melongena* L.) พบว่าน้ำตาลซูโครส 1% มีผลให้เมล็ดเทียมมีอัตราการงอกมากที่สุด และยังพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสจะมีผลทำให้อัตราการงอกและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนลดลง เช่นเดียวกับรายงานของ Thobunluepop (2009) ซึ่งได้ศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสต่อการงอกของเมล็ดเทียมจากเอ็มบริออยด์ของข้าวโพดหวาน พบว่าน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3% ให้อัตราการงอกสูงกว่าความเข้มข้น 0 และ 6% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05 สอดคล้องกับการศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสต่อการงอกของเมล็ดเทียมจากเอ็มบริออยด์ของฝรั่งโดยเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3, 6 และ 9% พบว่าน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3% มีอัตราการงอกของเมล็ดเทียมสูงที่สุดเช่นเดียวกัน (Manoj *et al*., 2008) โดยสาเหตุที่น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่ำๆ ทำให้เมล็ดเทียมมีการงอกได้มากกว่าเนื่องจากน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูงจะมีผลทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์แสงของเนื้อเยื่อลดต่ำลงจึงส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลง (Hudi *et al*., 2007)

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของ อัตราการงอก จำนวนยอด จำนวนใบ และความสูงของยอด±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของยอดที่งอกจากเมล็ดเทียมซึ่งเติมซูโครสความเข้มข้นต่างๆ ภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	อัตราการงอก (%)	จำนวนยอด (ยอด/เมล็ด)	จำนวนใบ (ใบ/ยอด)	ความสูงยอด (มม.)
ซูโครส 0%	62.22 ± 10.18[b]	2.07 ± 0.81[ab]	7.55 ± 1.54[b]	9.52 ± 3.24[b]
ซูโครส 1%	91.11 ± 3.84[a]	2.36 ± 0.85[a]	8.76 ± 3.09[a]	12.14 ± 6.30[a]
ซูโครส 2%	93.33 ± 11.55[a]	1.82 ± 0.44[b]	7.41 ± 2.27[b]	9.48 ± 5.41[b]
ซูโครส 3%	68.89 ± 10.18[b]	1.80 ± 0.55[b]	7.48 ± 2.30[b]	11.64 ± 6.95[a]
ซูโครส 4%	88.89 ± 10.18[a]	2.02 ± 0.80[ab]	7.08 ± 2.58[b]	11.23 ± 5.42[ab]

*หมายเหตุ: อักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ภาพที่ 1 ยอดที่งอกจากเมล็ดเทียมที่เติมซูโครส 1% และเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บเมล็ดเทียมต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนจากเมล็ดเทียมของหญ้าหวานซึ่งผลิตโดยโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1% จากนั้นนำเมล็ดเทียมไปเก็บในอุณหภูมิ 0, 4, 10 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ทดสอบอัตราการงอกโดยนำเมล็ดเทียมที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เมล็ดเทียมมีอัตราการงอกสูงที่สุด คือ 80% ซึ่งสูงกว่าการเก็บในอุณหภูมิอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 สำหรับการเจริญเติบโตของยอดที่งอกออกมาจากเมล็ดเทียมนั้นพบว่าจำนวนยอดเฉลี่ย และความสูงของยอดเฉลี่ยจากเมล็ดเทียมที่เก็บในทุกอุณหภูมิไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05 ในขณะที่จำนวนใบเฉลี่ยของเมล็ดเทียมที่ถูกเก็บในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีจำนวนใบมากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 2) และเมื่อเปรียบเทียบค่าการนำไฟฟ้าของชิ้นส่วนข้อหญ้า

หวานปกติ กับเมล็ดเทียมที่ผ่านการเก็บในอุณหภูมิต่างๆ พบว่ามีค่าการนำไฟฟ้าที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ดังตารางที่ 3 แสดงว่าชิ้นเนื้อเยื่อในเมล็ดเทียมที่ผ่านการเก็บในอุณหภูมิต่างๆ นั้นยังมีชีวิตอยู่ เนื่องจากมีการปล่อยประจุไฟฟ้าออกมาเท่ากับชิ้นส่วนปกติ เนื่องจากความเย็นจะชะลอกระบวนการเมตาบอริซึมของเนื้อเยื่อในเมล็ดเทียมทำให้เนื้อเยื่อเข้าสู่ระยะพักตัวได้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นั้นเหมาะสำหรับการเก็บรักษาเมล็ดเทียมของหญ้าหวานเนื่องจากให้อัตราการงอกสูงกว่า อีกทั้งการเจริญเติบโตของยอดและความมีชีวิตของชิ้นเนื้อเยื่อไม่แตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ และลักษณะของยอดที่งอกจากเมล็ดเทียมมีความแข็งแรง และไม่พบลักษณะผิดปกติดังภาพที่ 2 สาเหตุเนื่องจากการใช้น้ำตาลซูโครสเพียง 1% ในการผลิตเมล็ดเทียม จะทำให้เนื้อเยื่อมีความชื้นเหลืออยู่มากกว่าและเมื่อนำไปเก็บในอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเย็นจะดึงน้ำออกไปเมล็ดเทียมและเนื้อเยื่ออีกจึงทำให้เนื้อเยื่อยังมีความชื้นอยู่เพียงพอที่จะมีชีวิตรอดอยู่ได้ แตกต่างจากงานวิจัยอื่นๆ เช่น การเก็บเมล็ดเทียมจากชิ้นส่วนยอดและข้อของไมยราบ (*Mimosa pudica* L.) โดยเติมน้ำตาลซูโครส 3% แล้วนำไปเก็บอุณหภูมิ 0 และ 4 องศาเซลเซียส พบว่าการเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน มีอัตราการงอกมีเมล็ดเทียมถึง 100% ในขณะที่ 0 องศาเซลเซียส มีอัตราการงอกเป็น 0% (Banu *et al*., 2014) และ Maqsood *et al*. (2015) ซึ่งรายงานว่าเมล็ดเทียมที่ผลิตจากเอ็มบริออยด์ของบอนสีร่วมกับน้ำตาลซูโครส 3% เมื่อนำไปเก็บในอุณหภูมิ 0 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมีอัตราการงอกสูงกว่าที่เก็บในอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เช่นกัน สาเหตุน่าจะเกิดจากซูโครส 3% ทำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดการสูญเสียน้ำมาก เมื่อนำไปเก็บที่ 0 องศาเซลเซียส เนื้อเยื่อจึงสูญเสียน้ำมากจนไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้

การศึกษาผลของน้ำตาลซูโครส และอุณหภูมิในการเก็บเมล็ดเทียมของชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานพบว่าน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1% และการเก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมต่อการผลิต และเก็บรักษาเมล็ดเทียมของหญ้าหวานได้ จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกในการขยายพันธุ์หญ้าหวานเนื่องจากสามารถได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น สามารถผลิตได้ตลอดทั้งปี ลดแรงงานในการย้ายเลี้ยง ลดพื้นที่ของห้องเพาะเลี้ยง และขนส่งได้ง่าย นอกจากนี้เทคนิคการผลิตเมล็ดเทียมยังเป็นอีกทางเลือกสำหรับการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชอีกด้วย

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของ อัตราการงอก จำนวนยอด จำนวนใบ และความสูงของยอด±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของยอดที่งอกจากเมล็ดเทียมซึ่งเก็บในอุณหภูมิต่างๆ ภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์

อุณหภูมิที่ใช้เก็บเมล็ดเทียม	อัตราการงอก (%)	จำนวนยอด (ยอด/เมล็ด)	จำนวนใบ (ใบ/ยอด)	ความสูงยอด (มม.)
0 °C	80.00 ± 0.00^{a}	2.03 ± 0.81^{a}	6.46 ± 2.91^{ab}	7.25 ± 3.64^{a}
4 °C	38.87 ± 9.89^{b}	2.06 ± 1.48^{a}	7.06 ± 1.65^{ab}	6.38 ± 2.46^{a}
10 °C	41.11 ± 18.36^{b}	1.85 ± 0.81^{a}	6.05 ± 2.13^{b}	6.59 ± 2.87^{a}
25 °C	35.80 ± 5.20^{b}	1.60 ± 0.70^{a}	7.50 ±b2.25^{a}	7.25 ± 3.13^{a}

*หมายเหตุ: อักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตารางที่ 3 ค่าการนำไฟฟ้าเฉลี่ยของเมล็ดเทียมหญ้าหวานภายหลังการเก็บรักษาในอุณหภูมิต่างๆ เปรียบเทียบกับชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานปกติ (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลอง	**ค่าการนำไฟฟ้า** (µs/cm/g.seed) ± SD*
ชุดควบคุม	544.44 ± 19.25[a]
อุณหภูมิที่ใช้เก็บเมล็ดเทียม 0°C	497.71 ± 98.16[a]
อุณหภูมิที่ใช้เก็บเมล็ดเทียม 4°C	460.62 ± 5.34[a]
อุณหภูมิที่ใช้เก็บเมล็ดเทียม 10°C	498.02 ± 32.51[a]
อุณหภูมิที่ใช้เก็บเมล็ดเทียม 25°C	493.41 ± 19.57[a]

*หมายเหตุ: อักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05

ภาพที่ 2 ยอดที่งอกจากเมล็ดเทียมซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 0°C และเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาผลของน้ำตาลซูโครส และอุณหภูมิในการเก็บเมล็ดเทียมของชิ้นส่วนข้อของหญ้าหวานพบว่าน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1% และการเก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมต่อการผลิต และเก็บรักษาเมล็ดเทียมของหญ้าหวานได้ และควรจะมีการศึกษาการเก็บในอุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส เพื่อให้สามารถเก็บเมล็ดเทียมได้เป็นระยะยาวนานขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนการวิจัย จากมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ งบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 โดยการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ที่สนับสนุนในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Banu, L. A., Harun-Or-Rashid, M. and Bari Miah, M. A. (2014). Development of artificial seed and preservation in *Mimosa pudica* L., an important medicinal plant in Bangladesh. *J. bio-sci, 22*, 89-99.

Chotikadachanarong K. and Dheeranupattana S. (2013). Micropropagation and acclimatization of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *16*(7), 887-890.

Hudi, A. K. M. N., Rahman, M. and Bari, M. A. (2007). Effect of carbon source in alginate bead on synthetic seed germination in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Journal of Plant Sciences, 2*(5), 538-544.

Manoj, K. R., Jaiswal, V.S. and Jaiswal, U. (2008). Effect of ABA and sucrose on germination of encapsulated somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.) *Scientia Horticulturae, 117*, 302–305.

Maqsood, M., Mujib, A. and Khusrau, M. (2015). Preparation and low temperature short-term storage for synthetic seeds of Caladium bicolor. *Not Sci Biol, 7*(1), 90-95.

Miyagawa, H., Fujioka, N., Kohda, H., Yamasaki, K., Taniguchi, K. and Tanaka, R. (1986). Studies on the Tissue Culture of *Stevia rebaudiana* and Its Components; (II)1. Induction of Shoot Primordia. *Planta Med, 52*(4), 321-323.

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

Thobunluepop, P. (2009). The somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo of sweet corn inbred line. *Journal of Plant Breeding and Crop Science, 1*(10), 330-335.

Wongsansri, J., Chotikadachanarong, K., Phichai, K. and Nontaswatsr, C. (2015) Effects of Sodium alginate on Artificial Seed Production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. In *Phayao Research Conference 2015*. (pp. 809-817). University Of Phayao: Phayao. (in Thai)