รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอ้อย
2. **โครงการวิจัย** : โครงการวิจัยการปรับปรุงพันธุ์อ้อยสำหรับเขตดินทราย ทรายร่วน และร่วนทราย สภาพน้ำฝน
3. **กิจกรรม** :

   กิจกรรมที่ 1 การปรับปรุงพันธุ์อ้อยสำหรับเขตดินทราย ทรายร่วน และร่วนทราย สภาพน้ำฝน
4. **กิจกรรมย่อย (ถ้ามี)** : -
5. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** :

   การทดลองที่ 1.2 การศึกษาประสิทธิภาพของการเก็บรักษาละอองเกสรอ้อยด้วยความเย็นยิ่งยวด

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) :

   Effectiveness of the cryopreserved sugarcane pollen
6. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : นางสาวศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล สังกัด ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

   ผู้ร่วมงาน : นางสาวรวีวรรณ เชื้อกิตติศักดิ์ สังกัด ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

   นายวีรกรณ์ แสงไสย์ สังกัด ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

   นางสาวอมราวรรณ ทิพยวัฒน์ สังกัด ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

7. **บทคัดย่อ**

การทดสอบดูดความชื้นจากดอกอ้อยน้ำหนักประมาณ 0.1 กรัมต่อถุงในตู้ดูดความชื้นอัตโนมัติ ที่ตั้งสภาวะความชื้นที่ 20 %RH พบว่า ความชื้นลดลงต่ำสุดเป็น 60% เมื่อทำการดูดความชื้นนาน 50 นาที ส่วนการดูดความชื้นลงเหลือ 80% ใช้เวลาในการดูดที่ 20 นาที ส่วนการทดสอบดูดความชื้นในช่อดอกสดที่มีการดูดความชื้นในสองสภาพ คือ เติมซิลิก้าเจล และไม่เติมซิลิก้าเจลในตัวอย่างช่อดอก และดูดความชื้นในตู้ดูดความชื้นอัตโนมัติ ที่ตั้งความชื้นที่ 10 % ในสภาพอุณหภูมิห้อง พบว่าการเติมซิลิก้าเจลร่วมด้วยทำให้มีความชื้นลดลงมากกว่าการไม่เติมซิลิก้าเจล โดยที่ 20 นาที มีความชื้นเหลือในระดับ 74 % และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงพบว่ามีความชื้นเหลือ 35 % ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและความงอกของท่อละอองเกสรในช่อดอกสดในอุณหภูมิห้อง พบว่าละอองเกสรที่อยู่ในสภาพช่อดอกสดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องยังคงความมีชีวิตได้นาน 30-40 นาที แต่ที่ 50 นาทีไม่สามารถตรวจพบได้ ส่วนเปอร์เซ็นต์ความงอกพบว่างอกได้ถึง 10 นาที แต่ที่ 20 นาทีไม่พบความงอกของท่อละอองเกสร การผสมกลีเซอรอลในอาหารสังเคราะห์สำหรับเลี้ยงละอองเกสรที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 10% เพื่อการรักษาสภาพเซลล์สำหรับการเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ พบว่ามีผลยับยั้งการงอกของท่อละอองเกสร แต่ทั้งนี้ยังไม่มีการทดลองศึกษาสัดส่วนของกลีเซอรอลที่เหมาะสม จากการทดสอบพันธุ์และประสิทธิภาพการงอกของท่อละอองเกสร

กรมวิชาการเกษตร

โดยการตรวจจากต่างๆ 7 สายพันธุ์ ได้แก่ Biotec1, KK07-253, KK08-187, KK03-214, UTJ10-19, KKU99-01< KK07-370 พบว่า ประสิทธิภาพการงอกของท่อละอองเกสรในแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกัน พันธุ์ UTJ 10-19 มีเปอร์เซ็นต์การงอกของท่อละอองเกสรที่ได้จากอับละอองเกสรต่ำกว่าพันธุ์อื่น (70%) ส่วนพันธุ์ KK08-187 มีการงอกที่ดีกว่าพันธุ์อื่น (100%) ซึ่งอาจแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพ ความมีชีวิต และความแข็งแรงของละอองเกสรในแต่ละพันธุ์ การตรวจการงอกของท่อละอองเกสรของละอองเกสรอ้อยและอับละอองเกสรอ้อยที่เก็บที่อุณหภูมิ –4, -20, -80 และ -196°C นาน 1 สัปดาห์ ในสภาพไม่ดูดความชื้น พบว่าที่อุณหภูมิ 4 °C อับละอองเกสรอ้อยมีความงอกประมาณ 30% ส่วนละอองเกสร ไม่พบความงอก แสดงให้เห็นว่าการเก็บในสภาพช่อดอก ที่อุณหภูมิ 4 °C ยังคงความงอกได้ดีกว่าการเก็บในสภาพละอองเกสร การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอ็นไซม์ที่สัมพันธ์กับความแข็งแรงของละอองเกสรที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ในตัวอย่างดอกอ้อยลดความชื้นลง 20 % เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 4 เดือน และ -196°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถตรวจพบกิจกรรมเอ็นไซม์และสารในกลุ่มปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ได้แก่ APX, SOD และ H2O2 และสารชีวเคมีชนิดอื่น ได้แก่ MDA, Proline, Protein การเก็บรักษาดอกอ้อยที่อุณหภูมิ -196°C หลังการดูดความชื้น พบค่ากิจกรรมเอ็นไซม์เกือบเท่ากับการเก็บรักษาดอกอ้อยสดที่ -80°C ก่อนการดูดความชื้น ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 °C หลังการดูดความชื้น มีค่ากิจกรรมเอ็นไซม์ APX, GPX และ CAT ต่ำลง และมีค่าของสาร MDA บ่งชี้เซลล์ถูกทำลายมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -196 °C หลังการดูดความชื้น ทำให้เซลล์ยังคงสภาพมากกว่าที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสหลังการดูดความชื้น จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิเย็นมีผลต่อโครงสร้างของละอองเกสรที่ดูดความชื้นลงเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์ก่อนการเก็บรักษา จากผลของการเก็บละอองเกสรที่ อุณหภูมิห้อง ในตู้เย็น 8-10 °C , ลบ 20 °C, ลบ 80°C, และ ลบ 196°C การรั่วไหลของสารอิเลคโตรไลท์ในดอกอ้อยสดมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการเก็บรักษาต่ำลง และพบว่ามีการรั่วไหลของอิเลคโตรไลท์มากขึ้นในตัวอย่างดอกอ้อยสดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C (57.3 และ 86.7 µS/cm) ผลการลดความชื้นโดยใช้เม็ดซิลิก้าเจลและเก็บรักษาในที่อุณหภูมิห้อง, 4 °C, -20°C, -80 °C และ -196 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าละอองเกสรอ้อยมีการรั่วไหลที่ 50.83, 56.67, 80.38, 81.02, 73.81 µS/cm ตามลำดับ ส่วนช่อดอกอ้อยมีการรั่วไหลที่ 18.35, 47.85, 58.91, 51.83, 51.02 µS/cm ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเก็บในสภาพช่อดอก มีการแตกของเซลล์น้อยกว่า และการเก็บที่ติดลบมีการแตกของเซลล์มากกว่า การทดสอบความมีชีวิตและการงอกของท่อในละอองเกสรที่เก็บรักษาด้วยการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dehydration หรือ lyophilization) พบว่ากลุ่มที่ไม่นำก้านดอกอ้อยออกจากช่อดอก ยังคงความมีชีวิตประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มที่นำก้านดอกอ้อยออกจากช่อดอก ไม่มีความมีชีวิต แต่ทั้งสองกลุ่มไม่มีความงอกของท่อละอองเกสร แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่ยังคงก้านช่อดอกไว้ มีความมีชีวิตได้นานกว่านำก้านช่อดอกออก การศึกษาระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อความมีชีวิตและการงอกของท่อละอองเกสรในอ้อย 3 สายพันธุ์ ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8-10°C, -4°C, -20°C และ -80°C ในซิลิก้าเจล ในปี 2560/61 พบว่ามีความมีชีวิตเริ่มต้นระหว่าง 70-90% และมีความงอกอยู่ระหว่าง 30-50% หลังเก็บรักษา เป็นเวลา 5 เดือน พบว่าทุกวิธีการยังคงความมีชีวิตของละอองเกสรระหว่าง 15-85% โดยการเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C ในสภาพอับละอองเกสรมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำกว่าอุณหภูมิอื่น (15-20%) ส่วนการศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรอ้อย

และเก็บอับละอองเกสรอ้อย ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิดังกล่าวในซิลิก้าเจล ตั้งแต่ รวมระยะเวลาเก็บรักษา 9 เดือน พบว่า การเก็บแบบละอองเกสรมีความมีชีวิตตั้งแต่ 30-85 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ -20 องศาเซลเซียส มี เปอร์เซ็นต์ ความมีชีวิตสูงสุด ส่วนการเก็บแบบอับละอองเกสรมีความมีชีวิตตั้งแต่ 10-60 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ -80°C มีเปอร์เซ็นต์ ความมีชีวิตต่ำสุด เมื่อเทียบกับอีก 3 อุณหภูมิ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษา แบบละอองเกสรในสภาพแห้งด้วยซิลิก้าเจลที่อุณหภูมิ -20°C สามารถรักษาความมีชีวิตของละอองเกสรได้ มากกว่า 1ปี ผลการทดลองผสมอ้อยด้วยเกสรที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำโดยเก็บเกสรอ้อยพันธุ์พ่อ KK08-195 ที่ เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 14 วัน และ 30 วัน และพันธุ์อื่นที่เก็บรักษาเป็นเวลา 1 ปี และ 2 ปี ผสม กับต้นแม่ 3 หมายเลข ได้แก่ 04-4-064, KK13-563 และ KK13-600 พบว่าไม่ประสบผลสำเร็จ
คำสำคัญ : อ้อย แล้ง ขาดน้ำ ความเครียดออกซิเดชั่น การเจริญเติบโต

8. คำนำ

การปรับปรุงพันธุ์อ้อยเพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ดีตามต้องการนั้น จำเป็นต้องมีแหล่งพันธุกรรม ที่มีความหลากหลายเพื่อเพิ่มโอกาสในการคัดเลือกลักษณะที่ดีของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ อย่างไรก็ตามแม้มี แหล่งพันธุกรรมดังกล่าวแล้ว แต่ปัญหาที่ตามมา คือ การออกดอก ซึ่งขึ้นอยู่กับพันธุ์ อายุ ช่วงเวลา และ สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม หากคู่ผสมที่ต้องการมีการออกดอกไม่พร้อมกัน ก็ไม่สามารถทำการผสมเกสรได้ การบังคับให้อ้อยออกดอกโดยใช้การกำหนดช่วงเวลาการให้แสง เกิดขึ้นได้เฉพาะในอ้อยบางชนิด ทำให้ยังมี ข้อจำกัด เช่นเดียวกันกับการปลูกในแหล่งที่มีอากาศเย็นเพื่อให้อ้อยออกดอก หรือการกำหนดระยะเวลาการ ออกดอก ที่ไม่ครอบคลุมถึงช่วงเวลาการออกดอกของอ้อยกลุ่มพันธุ์ที่ต้องการใช้ใน อีกทั้งยังต้องหาพื้นที่ที่ เหมาะสมในการปลูกเพื่อให้อ้อยออกดอกได้ ซึ่งต้องเป็นที่สูง อากาศเย็น และความชื้นเหมะสม การผสมการ ทดลองเก็บเกสรด้วยการแช่เย็น พบว่ามีผลต่อความมีชีวิตของละอองเกสร ซึ่งมีระยะเวลาการเก็บได้สั้นมาก เพียง 1-4 วัน ดังนั้นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บละอองเกสรในช่วงที่อ้อยออกดอก ให้ยังคงความมี ชีวิตและความงอกอยู่ได้ จึงเป็นแนวทางที่เหมาะสม และง่ายต่อการปฏิบัติ

การเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชด้วยความเย็นยิ่งยวดมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย สามารถเก็บเนื้อเยื่อได้ เป็นเวลานานหลายปี และยังคงความมีชีวิตอยู่ได้ สามารถนำมาเพาะให้เจริญเติบโตต่อไปได้อีก มีรายงานการ เก็บรักษาละอองเกสรของพืชหลายชนิดเพื่อใช้ประโยชน์ในงานปรับปรุงพันธุ์ เช่น ปาล์มน้ำมันซึ่งพบว่าละออง เกสรที่เก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน 8 ปี ยังคงความมีชีวิตอยู่ถึง 54± 1.72% มีความงอกที่ 49± 1.2% โดยความ งอกตามปกติอยู่ที่ 52± 2.08% และไม่พบความผิดปกติของ pollen tube หลังงอก (Tandon, et al., 2007) เช่นเดียวกันกับการเก็บรักษาละอองเกสรข้าวฟ่างด้วยไนโตรเจนเหลวเพื่องานปรับปรุงพันธุ์และการเก็บรักษา เชื้อพันธุกรรม ซึ่งพบว่าสามารถเก็บรักษาได้นานถึง 17 ปี โดยความมีชีวิตและการงอกของท่อของละอองเกสร ที่เก็บรักษาและละอองเกสรใหม่ไม่แตกต่างกัน รวมทั้งพบว่าสามารถผสมได้แม้พบว่าการติดเมล็ดน้อยกว่าการ ใช้ละอองเกสรใหม่ (Panella, et al., 2009) การศึกษาในข้าวโพดพบว่าเมล็ดที่ได้จากการผสมด้วยเกสรที่เก็บ ไว้ภายใต้สภาพเยือกแข็งระดับลบ 196 °C มานั้น ไม่พบว่ามีความผิดปรกติใดๆ ในรูปแบบของไอโซไซม์เปอร์ ออกซิเดส คุณสมบัติของโปรตีน zeinที่ใช้ผลิตกลูเตน จำนวนและรูปร่างของโครโมโซม ทั้งระหว่าง meiosis

และ หลังการแบ่งตัว (Post MeioticSegregation: PMS)รวมทั้งลักษณะทางการเกษตรของต้นที่ได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (Sixin, et al., 1996)

ในกลุ่มพืชสวนมีรายงานการพัฒนาวิธีเก็บรักษาละอองเกสรของมะม่วงและลิ้นจี่พันธุ์ต่างๆด้วยไนโตรเจนเหลวให้ใช้การได้ดีขึ้น โดยมีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ไซโคเฮกเซนในการกระจายละอองเกสรก่อนตากแห้งและแช่แข็ง จากการเช็คความมีชีวิตของละอองเกสรพบว่าเทียบเท่ากับละอองเกสรใหม่ และสามารถเก็บได้นานกว่า 4 ปี รวมทั้งนำมาใช้ผสมเกสรได้ (Chaudhury, et al., 2010)เช่นเดียวกันกับการเก็บรักษาเกสรของบ๊วย *(PrunusmumeSieb. etZucc)* จำนวน 51 พันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุกรรมที่พบว่าความงอกไม่แตกต่างจากเกสรสด แม้ทำการเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลานานถึง 4 ปี รวมทั้งยังมีความสามารถในการผสมเกสรได้ (Zhang, et al., 2009)

ความแข็งแรงของละอองเกสร (pollen vigor) นับเป็นสิ่งสำคัญอันดับต้นๆ ต่อขบวนการผสมเกสรและความสำเร็จในการพัฒนาเป็นเมล็ด(Zhang et al., 2011)นักวิจัยส่วนใหญ่ในปัจจุบันจะใช้การตรวจความมีชีวิต (pollen viability) และการงอกของ pollen tube ในการบ่งบอกถึงความแข็งแรงของละอองเกสร (Chaudhary et al.(2010; Suketi et al. 2011)มีรายงานว่าละอองเกสรที่ยังคงประสิทธิภาพอยู่ในสภาพอุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นสิ่งบ่งชี้หนึ่งที่แสดงถึงลักษณะทนต่อสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงได้ (Singh et al., 2010)Wenguang และคณะ (2012) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและความแข็งแรงของละอองเกสรของยาสูบ 2 พันธุ์ในช่วงอายุต่างๆ ของดอก และพบว่า spermidineและmalondialdehydeสามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งบอกถึงความแข็งแรงของละอองเกสรได้ รวมทั้งช่วงอายุของดอกมีผลต่อความแข็งแรงของละอองเกสรด้วยเช่นกัน

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยประกอบด้วย การศึกษาวิธีการเก็บรักษาละอองเกสรของอ้อยด้วยการใช้ความเย็นยิ่งยวด ศึกษาประสิทธิภาพของละอองเกสรอ้อยที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยความเย็นยิ่งยวด โดยการตรวจสอบความมีชีวิตและความสามารถในการผสมเกสร และ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอ็นไซม์ที่สัมพันธ์กับความแข็งแรงของละอองเกสรในอ้อยพันธุ์ต่างๆ และละอองเกสรอ้อยที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยความเย็นยิ่งยวด เพื่อให้ได้วิธีการในการเก็บรักษาละอองเกสรอ้อยในระยะยาวที่ยังคงประสิทธิภาพในการผสมเกสร รวมถึงได้วิธีการในการระบุความแข็งแรงของละอองเกสรอ้อยในพันธุ์ต่างๆ ที่สามารถนำไปใช้ได้ในงานปรับปรุงพันธุ์

8. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ : เครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสง อ่างควบคุมอุณหภูมิ อุปกรณ์ดูดจ่ายสารละลาย เครื่องปั่นเหวี่ยง หลอดเอพเพนดอร์ฟ ตู้ดูดความชื้น ตู้แช่แข็ง ถังไนโตรเจนเหลว

ตัวอย่างพืช : เกสรอ้อยจากอ้อยพันธุ์ต่างๆ ที่ปลูกที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

วิธีการ :

แบ่งตามขั้นตอนได้ดังนี้

12.1 ศึกษาและพัฒนาวิธีการเก็บรักษาเกสรอ้อยด้วยความเย็นยิ่งยวด

กรมวิชาการเกษตร

12.1.1 เก็บละอองเกสรในช่วงเช้าจากต้นที่ดอกบาน รักษาความเย็นและชื้นในระหว่างนำส่งห้องปฏิบัติการหรือตัดลำที่มีดอกพร้อมจะบานและแช่ลำใน Mangelsdorf's nutrient solution เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บละอองเกสรในช่วงเช้า (30 ช่อดอกจะได้ละอองเกสรประมาณ 1-2 กรัม)

12.1.2 ดูดความชื้นจากละอองเกสรลงประมาณ 20% ของน้ำหนักเริ่มต้น ด้วยเม็ดซิลิกาหรือในตู้ดูดความชื้น รักษาอุณหภูมิที่ 4-8°C ประมาณ 1 ชั่วโมง

12.1.3 นำละอองเกสรแห้งที่ได้บรรจุลงในหลอด Cryotube เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และแช่แข็ง 8°C, -18°C และ -196°C

12.1.4 ทดสอบระยะเวลาความมีชีวิตทางกายภาพของละอองเกสรหลังการเก็บรักษา ตั้งแต่ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 วัน โดยการย้อมด้วย Lugol solution (1 g iodine; 2g potassium iodide; 100 ml distilled water ; Machado, JR.1987) ตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ กำลังขยาย 40 เท่า แยกความแตกต่างระหว่างการย้อมติดสีน้ำตาลและไม่ติดสี บันทึกเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต โดยใช้จำนวน 100 เมล็ดต่อซ้ำ

12.1.5 ศึกษาประสิทธิภาพของละอองเกสรในหลอดทดลองหลังการเก็บรักษา ตั้งแต่ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 วัน โดยตรวจความงอกของท่อละอองเกสรใน pollen germination medium (100 ppm Boric acid, 60 ppm calcium nitrate, 100 ppm magnesium sulfate, 30% of sugar per 1 liter of water ; Amaral,et al. 2013) หลังตั้งทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ กำลังขยาย 40 เท่า โดยความยาวท่อต้องยาวกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของละอองเกสร บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกของท่อ โดยใช้จำนวน 100 เมล็ดต่อซ้ำ

12.1.6 วิเคราะห์ผลด้วยการคำนวณทางสถิติ

12.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอ็นไซม์ที่สัมพันธ์กับความแข็งแรงของละอองเกสร

ดำเนินการโดย นำละอองเกสรสด และเกสรที่เก็บรักษาที่ 4 สภาพอุณหภูมิ มาสกัดและวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีตามวิธีการตรวจต่างๆในหัวข้อต่อไป

12.2.1 วิเคราะห์ปริมาณ polyamines ตามวิธีการของ Takagi et al. (2004)

12.2.2 วิเคราะห์กิจกรรมเอ็นไซม์ในปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้แก่ peroxidase (POX), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) และ ascorbate peroxidase (APX) ตามรายงานของ Wenguanget al. (2012)

12.2.3 วิเคราะห์ปริมาณ Malondialdehyde (MDA) ตามรายงานของ Zhang et al. (2007)

12.2.4 วิเคราะห์ค่า membrane permeability โดยการตรวจ electrolyte leakage ตามรายงานของ Wenguanget al. (2012)

12.2.5 บันทึกผลและวิเคราะห์ผลด้วยการคำนวณทางสถิติ

12.3 ศึกษาประสิทธิภาพในการผสมเกสรของละอองเกสรที่ผ่านการแช่แข็ง (in vivo viability) ดำเนินการตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

กรมวิชาการเกษตร

13.3.1 ทำหมันดอกตัวผู้โดยนำท่อนอ้อยที่มีดอกมาแช่ในน้ำอุ่น 46°C นาน 12 นาทีหรือ 50°C นาน 5 นาที (Machado JR et al., 1989) แล้วแช่ท่อนอ้อยใน Mangelsdorf's solution

13.3.2 ทำการผสมเกสรโดยใช้เกสรที่เก็บรักษาด้วยวิธีการต่างๆ นำมา rehydrate เป็นเวลาประมาณ 15 นาที ที่ 24 °C หลังผสมทำการคลุมดอก

13.3.3 เก็บรักษาต้นที่ผสมแล้วไว้ในอุณหภูมิห้อง และเปลี่ยนสารละลายทุกวัน เป็นเวลาประมาณ 1 เดือน หรือจนพัฒนาเป็นเมล็ด

13.3.4 เพาะเมล็ด และบันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกของต้นอ่อน

13.4. วิเคราะห์และสรุปผล

เวลาและสถานที่

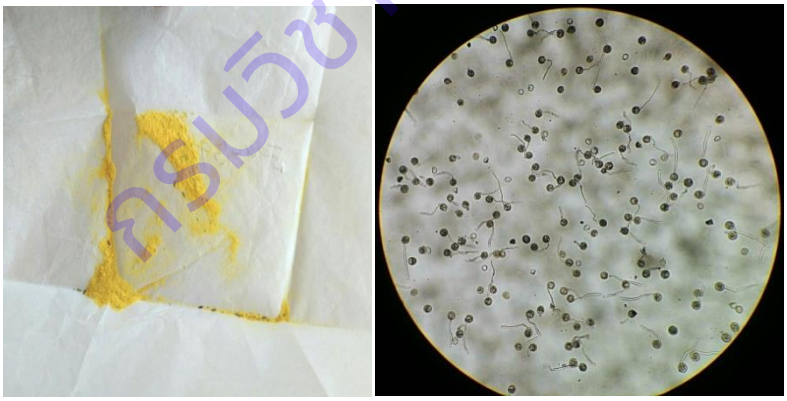
เริ่มต้น : ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง : ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

9. ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาและพัฒนาวิธีทดสอบความมีชีวิตของละอองเกสรหลังการเก็บรักษาเกสรอ้อยด้วยความเย็นยิ่งยวด

การทดลองเก็บรักษาเกสรอ้อยที่มีความชื้น 80% ไว้ที่อุณหภูมิต่ำ แล้วทดสอบระยะเวลาความมีชีวิตทางกายภาพของละอองเกสรหลังการเก็บรักษา โดยการย้อมสีและศึกษาประสิทธิภาพของละอองเกสรในหลอดทดลองหลังการเก็บรักษา โดยตรวจความงอกของท่อละอองเกสรแล้วตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ พบว่าสามารถตรวจพบความงอกของท่อละอองเกสรได้(ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ละอองเกสรอ้อยและการงอกของท่อละอองเกสรตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

ผลการเก็บละอองเกสรอ้อยที่ไม่ได้ลดความชื้นและเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็ง

ในปี 2560 ระหว่างเดือน ธันวาคม 2559 ถึง มกราคม 2560 เป็นปีที่อ้อยออกดอกมาก สามารถเก็บละอองเกสรอ้อยจากการครอบดอกจากแปลงได้จำนวน 6 ตัวอย่าง คือ KK07-250, KK07-037, KK07-370, UT13, สุพรรณบุรี และ อ้อยป่า *Erianthus spp*. เก็บรวบรวมดอกและละอองเกสรอ้อย สายพันธ์ต่างๆ ในแปลงทดลองศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น และมีปริมาณละอองเกสรในแต่ละพันธุ์ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยทำการเก็บละอองเกสรในช่วงเช้า คัดแยกละอองเกสรด้วยตะแกรงตาถี่ (ภาพที่ 2) เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 7

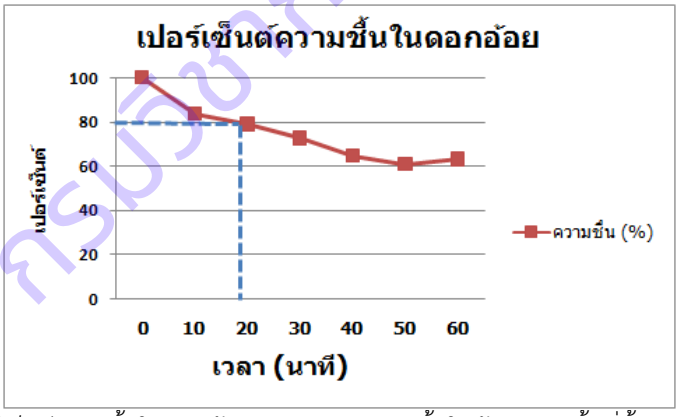
กรมวิชาการเกษตร

เดือน ทำการตรวจการงอกในเดือนสิงหาคม พบว่าละอองเกสรที่เก็บไว้ในอุณหภูมิต่างๆ เสียสภาพ สาเหตุจากความชื้นของละอองเกสรที่ไม่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำ

ภาพที่ 2 การตัดแยกละอองเกสรอ้อยด้วยตะแกรงตาถี่

ผลของระยะเวลาในการดูดความชื้นจากเกสรอ้อยก่อนการทดสอบการแช่แข็ง

การทดสอบดูดความชื้นจากดอกอ้อยน้ำหนักประมาณ 0.1 กรัมต่อห่อ ในตู้ดูดความชื้นอัตโนมัติ (Super Dry Keeper Extra, Sanplatec, Japan) ที่ตั้งสภาวะความชื้นที่ 20 %RH ทดสอบเป็นเวลา 60 นาที พบว่า ความชื้นลดลงต่ำสุดเป็น 60% เมื่อทำการดูดความชื้นนาน 50 นาที ส่วนการดูดความชื้นลงเหลือ 80% ใช้เวลาในการดูดที่ 20 นาที (ภาพที่ 3) จากนั้นได้นำตัวอย่างดอกอ้อยที่ดูดความชื้นแล้วเหลือ 80% แช่แข็งที่ละอองเกสรอ้อยที่เก็บได้จากแปลงทดลองศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ในปี 2560 ส่วนหนึ่งหลังดูดความชื้นเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์ ทำการแบ่งชั่งในถุงกระดาษไขแก้วสีขาว ถุงละ 0.1 กรัม และเก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 อุณหภูมิ คือ 8 ℃, -20 ℃, -80 ℃ และ – 196 ℃ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีหลังจากการเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ



ภาพที่ 3 ระยะเวลาและเปอร์เซ็นต์ความชื้นในดอกอ้อยหลังการดูดความชื้นในตู้ดูดความชื้นที่ตั้งสภาวะความชื้นที่ 20 %RH ทดสอบกับดอกอ้อยน้ำหนักประมาณ 0.1 กรัมต่อห่อ

การตรวจเช็คความงอกของท่อละอองเกสร

ผลการตรวจเช็คความงอกของท่อละอองเกสร โดยนำละอองเกสรมาแช่ในน้ำยาตรวจความงอก (stock MM 1 มิลลิลิตร น้ำตาล 2 กรัม ในปริมาตรน้ำ 10 มิลลิลิตร) นำไปบ่มที่กล่องชื้นเป็นเวลา 10 นาที, 1 ชั่วโมง และ 24 ชั่งโมง ในอ้อยสายพันธุ์ KK07-250, KK07-037, KK07-370, UT13, สุพรรณบุรี และอ้อยป่าที่เป็นตัวอย่างสดจากแปลงทดลอง และนำมาตรวจทันที ไม่พบความงอกของท่อละอองเกสร (ตารางที่ 1) แต่การทดสอบในอ้อยป่า Erianthus ที่ตัดดอกและนำมาแช่ในน้ำยา Hawaiian solution พร้อมครอบช่อดอกไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมงขึ้นไป สามารถตรวจพบว่าการงอกของท่อละอองเกสรได้ (ตารางที่ 1, ภาพที่ 4) สาเหตุ

อาจเกิดจากสภาพอากาศเย็นที่ทำให้เกสรอ้อยไม่มีชีวิต เนื่องจากมีรายงานว่าอ้อยไม่สร้าง viable pollen หากมีอุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส (Horsley and Zhou, 2013) ดังนั้นเกสรอ้อยที่ไม่มีความงอกนี้อาจเกิดจากไม่แข็งแรง หรือไม่มีความมีชีวิตแล้ว

ภาพที่ 4 การงอกของท่อละอองเกสรของอ้อยป่า *Erianthus* ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 และ 100 เท่า

ผลของระยะเวลาในการดูดความชื้นต่อความชื้นในช่อดอกสดที่อุณหภูมิห้อง

จากการทดสอบดูดความชื้นในช่อดอกสดที่มีการดูดความชื้นในสองสภาพ คือ เติมซิลิก้าเจล และไม่เติมซิลิก้าเจลในตัวอย่างช่อดอก และดูดความชื้นในตู้ดูดความชื้นอัตโนมัติ ที่ตั้งความชื้นที่ 10 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพอุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 18) พบว่าการเติมซิลิก้าเจลด้วยทำให้มีความชื้นลดลงมากกว่าการไม่เติมซิลิก้าเจล โดยที่ 20 นาที มีความชื้นเหลือในระดับ 74 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงพบว่ามีความชื้นเหลือ 35 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ความชื้นในช่อดอกสดตามระยะเวลาต่างๆ ในตู้ดูดความชื้นอัตโนมัติที่กำหนดความชื้นที่ 10 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพอุณหภูมิห้อง

เวลา(ชั่วโมง)	เปอร์เซ็นต์ความชื้น	
	ไม่เติมซิลิก้าเจล	เติมซิลิก้าเจล
0.00	100	100
0.20	95.79	73.9
0.40	90.82	71.5
1.00	85.46	66.8
2.00	77.48	54.9
3.00	67.41	54.3
4.00	63.06	49.9
5.00	59.75	48.5
24.00	46.71	35.5

กรมวิชาการเกษตร

ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและความงอกของท่อละอองเกสรในช่อดอกสดในอุณหภูมิห้อง

พบว่าละอองเกสรในช่อดอกสดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องยังคงความมีชีวิตได้นาน 30-40 นาที ที่ 50 นาทีไม่สามารถตรวจพบได้ ส่วนเปอร์เซ็นต์ความงอกพบว่างอกได้ถึง 10 นาที ที่ 20 นาทีไม่พบความงอกของท่อละอองเกสรแล้ว (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความมีชีวิต และความงอกของละอองเกสรอ้อยจากช่อดอกสด ในเวลาต่างๆ ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

เวลา (นาที)	%ความมีชีวิต	%ความงอกของท่อละอองเกสร
0	80%	60%
10	20%	20%
20	20%	0%
30	0%	0%
40	30%	0%
50	0%	0%
60	0%	0%

การศึกษาความมีชีวิตและความงอกของท่อละอองเกสรในอับละอองเกสรในช่อดอกและละอองเกสรที่เก็บรักษาในอุณหภูมิต่างๆ ที่เติมและไม่เติมซิลิก้าหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 9 เดือน

การศึกษาความงอก และความมีชีวิตของอับละอองเกสรอ้อยในช่อดอกและละอองเกสรที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 10,-4,-20 และ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 เดือนทำการศึกษาในวันที่ 28 กันยายน 2561 จากตัวอย่างที่เก็บเมื่อ 11 ธันวาคม 2560 พบว่ายังตรวจพบความมีชีวิตของละอองเกสรได้ทั้งสองแบบในระดับ 10-40 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบความงอกของท่อละอองเกสร (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การศึกษาความมีชีวิตและการงอกของท่อละอองเกสรในอับละอองเกสรในช่อดอกอ้อยและละอองเกสรอ้อย ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 0, -4, -20 และ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 9 เดือน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ซิลิก้า (มี S,ไม่มี NS)	% ความมีชีวิต		% ความงอกท่อละอองเกสร	
		ช่อดอก	ละอองเกสร	ช่อดอก	ละอองเกสร
0	S	10%	0%	0%	0%
	NS	40%	0%	0%	0%
-4	S	10%	25%	0%	0%
	NS	20%	40%	0%	0%
-20	S	10%	25%	0%	0%
	NS	0%	30%	0%	0%
-80	S	10%	10%	0%	0%
	NS	10%	10%	0%	0%

กรมวิชาการเกษตร

ผลของกลีเซอรอลต่อการงอกของท่อละอองเกสร :

การทดลองเก็บอับละอองเกสรอ้อย และละอองเกสรพันธุ์ต่างๆ จากดอกที่คลุมไว้ในระยะดอกบาน ช่วงเวลา ตั้งแต่ 5.00 – 7.00 น. มาทดสอบการงอกด้วยเทคนิคหยดแขวน (hanging drop technique) โดยใช้อาหารสังเคราะห์สำหรับเลี้ยงละอองเกสรสูตร Brewbaker and Kwack (1963) ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 10% วิธีการ คือ หยดอาหารบนกระจกสไลด์ 1 หยด โดยใช้อับละอองเกสร 3 อับละอองเกสร ใช้เข็มเขี่ยเบาๆให้ละอองเกสรกระจายทั่วอาหาร และในส่วนของละอองเกสรที่ได้จากเขย่านั้นเขี่ยละอองเกสรให้กระจายทั่วอาหาร จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่กล่องให้ความชื้น เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นหยดสารประกอบกลีเซอรอล (Glycerol) จากนั้นนำแผ่นปิดสไลด์ปิดลงบนสไลด์ สุ่มนับจำนวนละอองเกสรที่งอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดย ละอองเกสรที่จะนับว่างอกได้ต้องมีลักษณะของหลอดละอองเกสรสมบูรณ์ สุ่มนับละอองเกสรที่งอก 5 บริเวณต่อ 1 สไลด์ จำนวน 3 สไลด์ต่อพันธุ์ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณความงอก

มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองพบว่าเกสรอ้อยไม่เกิดการงอกของท่อละอองเกสร ในสารละลายที่มีการหยดสารกลีเซอรอลร่วมด้วย (ภาพที่ 5) แสดงให้เห็นว่า กลีเซอรอลมีผลต่อการงอกของท่อละอองเกสร อย่างไรก็ตามยังไม่มีการทดลองศึกษาสัดส่วนของกลีเซอรอลที่เหมาะสม

ภาพที่ 5 การงอกของท่อละอองเกสรอ้อยในสารละลายซักนำการงอกของท่อละอองเกสรที่มีส่วนผสมของกลีเซอรอล

พันธุ์และประสิทธิภาพการงอกของท่อละอองเกสร

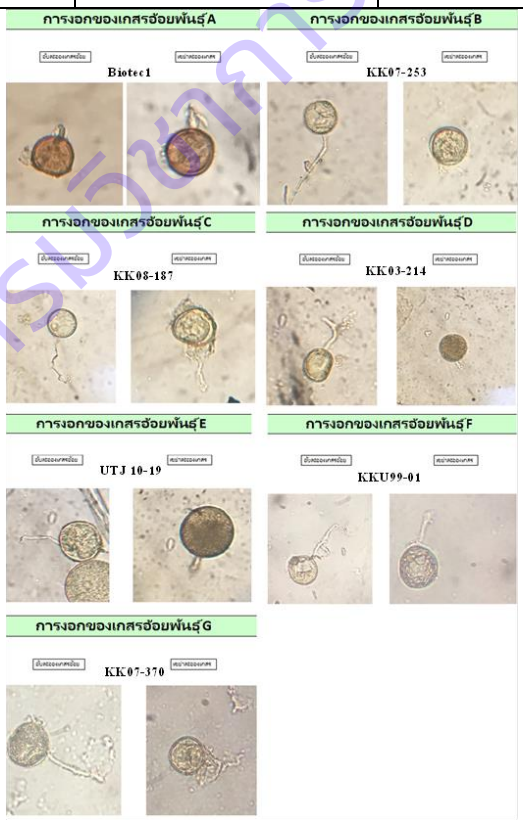
ผลจากการตรวจจากอับละอองเกสรอ้อยและละอองเกสรพันธุ์ต่างๆ 7 สายพันธุ์ จากดอกที่คลุมไว้ในระยะดอกบานช่วงเวลา ตั้งแต่ 5.00 – 7.00 น. มาทดสอบการงอกด้วยเทคนิคหยดแขวน (hanging drop technique) โดยใช้อาหารสังเคราะห์สำหรับเลี้ยงละอองเกสรสูตร Brewbaker and Kwack (1963) ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 10% วิธีการ คือ หยดอาหารบนกระจกสไลด์ 1 หยด โดยใช้อับละอองเกสร 3 อับละอองเกสร ใช้เข็มเขี่ยเบาๆให้ละอองเกสรกระจายทั่วอาหาร จากนั้นนำแผ่นปิดสไลด์ปิดลงบนสไลด์ และในส่วนของละอองเกสรที่ได้จากเขย่านั้นเขี่ยละอองเกสรให้กระจายทั่วอาหาร จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่กล่องให้ความชื้น เป็นเวลา 10 นาที สุ่มนับจำนวนละอองเกสรที่งอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดยละอองเกสรที่จะนับว่างอกได้ต้องมีลักษณะของหลอดละอองเกสรสมบูรณ์ สุ่มนับละอองเกสรที่งอก 5 บริเวณต่อ 1 สไลด์ จำนวน 3 สไลด์ต่อพันธุ์ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณความงอก มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ พบว่า

กรมวิชาการเกษตร

ประสิทธิภาพการงอกของท่อละอองเกสรในแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกัน พันธุ์ UTJ 10-19 มีเปอร์เซ็นต์การงอกของท่อละอองเกสรที่ได้จากอับละอองเกสรต่ำกว่าพันธุ์อื่น ในขณะที่การตรวจเช็คความงอกของท่อในละอองเกสรพบว่ามีการงอกที่ต่ำลงเกือบทั้งหมด ยกเว้นพันธุ์ Biotec1 ซึ่งอาจแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพความมีชีวิต และความแข็งแรงของละอองเกสรในแต่ละพันธุ์ ดังนั้นการเก็บละอองเกสรด้วยการเก็บในลักษณะช่อดอกอาจทำให้ละอองเกสรมีความมีชีวิตที่ยาวนานมากขึ้น (ตารางที่ 4) ทั้งนี้พบว่าท่อละอองเกสรที่ได้จากอับละอองเกสรจากช่อดอก มีความยาวมากกว่าที่ได้จากละอองเกสรที่เคาะจากช่อดอก (ภาพที่ 6)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ความงอกของท่อละอองเกสรของเกสรอ้อย 7 พันธุ์ที่ศึกษา บริเวณแปลงอ้อย ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นเปรียบเทียบจากวิธีการเก็บระหว่างอับละอองเกสรที่ได้จากช่อดอก และละอองเกสรที่เขย่าจากช่อดอก

พันธุ์	ความงอกของท่อละอองเกสร	
	อับละอองเกสรอ้อย	ละอองเกสร
Biotec1	75%	80%
KK07-253	90%	70%
KK08-187	100%	85%
KK03-214	85%	50%
Utj10-19	70%	60%
KKU99-01	90%	80%
KK07-370	95%	90%



ภาพที่ 6 การงอกของท่อละอองเกสรของอ้อย 7 สายพันธุ์ ในตัวอย่างที่เก็บจากอับละอองเกสรในช่อดอก (ซ้าย) และละอองเกสรที่ได้จากการเคาะจากช่อดอก (ขวา)

กรมวิชาการเกษตร

ความงอกของละอองเกสรอ้อยและอับละอองเกสรอ้อย ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิต่างๆ หลังจากการเก็บ 1 สัปดาห์ ในสภาพไม่ดูดความชื้น

ผลการทดลองพบว่าเมื่อเวลาผ่านไปหนึ่งสัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 °C อับละอองเกสรอ้อยมีความงอกประมาณ 30% ส่วนละอองเกสร ไม่มีความงอกหลังเก็บรักษาในอุณหภูมิละเวลาดังกล่าว (ภาพที่ 7, ตารางที่ 5) แสดงให้เห็นว่าการเก็บในสภาพช่อดอก ที่อุณหภูมิ 4 °C ยังคงความงอกได้ดีกว่าการเก็บในสภาพละอองเกสร

ภาพที่ 7 การงอกละอองเกสรอ้อยที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่องจากกล้องจุลทรรศน์ 40X

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การงอกของเกสรอ้อยที่เก็บไว้ในอุณหภูมิต่างๆ หลังจากการเก็บหนึ่งสัปดาห์

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	%ความงอก	
	อับละอองเกสร	ละอองเกสร
-4 (ช่องแช่แข็ง)	30%	0%
- 20	0%	0%
- 80	0%	0%
- 196	0%	0%

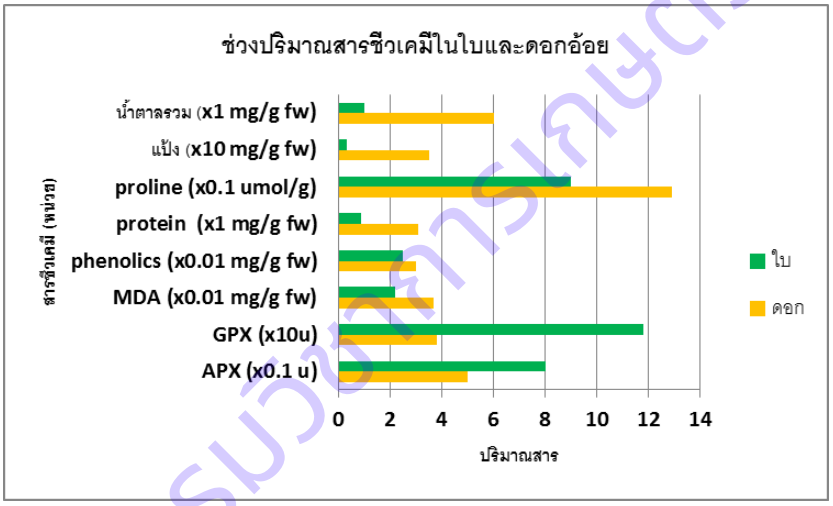
การงอกของท่อ pollen tube เป็นกิจกรรมที่ต้องการพลังงานสูงมาก และต้องการออกซิเจนอย่างรวดเร็ว พบว่า Actin และ [$Ca^{2+}i$] มีส่วนร่วมในกิจกรรมดังกล่าวนี้ รวมทั้งมีรายงานว่า reactive oxygen species (ROS) เป็นสารที่มีความจำเป็นต่อการงอกของท่อละอองเกสร (pollen tube) เช่นกัน ROS เป็นผลมาจากเมตาบอลิสมแบบใช้ออกซิเจน (aerobic metabolism) ซึ่ง superoxide ($O_2^{\cdot-}$) ที่ได้นั้นเป็น signaling ROS หลักที่ส่งสัญญาณไปยังกลไกอื่นอีกมากมาย การเติมสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น SOD, Glutathione หรือ Ascorbate พบว่ามีผลในการยับยั้งการงอกของท่อละอองเกสรได้ มีการตรวจพบ Tip-localized reactive oxygen species (ROS) ในระหว่างการงอกของท่อละอองเกสร (growing pollen tubes) เช่นเดียวกับที่พบในในขนราก (root hairs) แม้ cell walls จะมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน extracellular superoxide จะรวมตัวเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และ hydroxyl radical (OH•) ซึ่งจะถูกสลายต่อโดย cell wall superoxide dismutases (SOD) พบว่า H_2O_2 สามารถเป็นได้ทั้ง intracellular และ intercellular signalling molecule ในพืช เนื่องจากเสถียรมากกว่า ROS ชนิดอื่น และพบว่า *Arabidopsis thaliana* mutant ที่มีการทำลายยีน *AtrbohC/RHD2* ด้วยเทคนิค knockout ซึ่งเป็นยีนที่ผลิตเอ็นไซม์ NAPDH oxidase (NOX) ที่ใช้ในการสร้าง superoxide (O_2•–) นั้น มีขนรากขนาดสั้น และมีปริมาณ ROS ที่ปลายขนรากลดลง (Potocky, et al., 2007)

กรมวิชาการเกษตร

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอ็นไซม์ที่สัมพันธ์กับความแข็งแรงของละอองเกสรที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

ประกอบด้วยการนำละอองเกสรอ้อยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ มาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารและกิจกรรมเอ็นไซม์ต่างๆ ได้แก่ polyamines กิจกรรมเอ็นไซม์ในปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้แก่ peroxidase (POX), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) และ ascorbate peroxidase (APX) ปริมาณ Malondialdehyde (MDA) และ membrane permeability โดยการตรวจ electrolyte leakage ในกลุ่มนี้มีผลการทดลองดังนี้

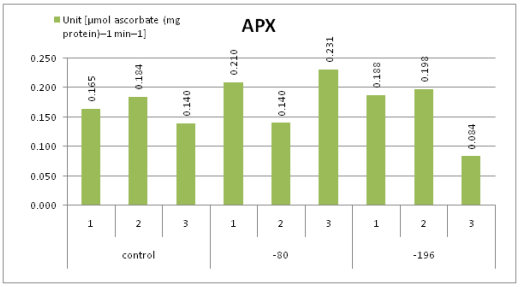
ดอกอ้อยสดแช่แข็ง : ผลการตรวจสารและกิจกรรมเอ็นไซม์บางชนิดในดอกอ้อยที่เก็บในช่วงเดือนกุมภาพันธุ์ และทำการแช่แข็งที่ -80°C นาน 4 เดือน โดยไม่มีการลดความชื้น ทำการตรวจหากิจกรรมเอ็นไซม์ในกลุ่มออกซิเดชั่นได้ ได้แก่ APX, GPX และสารอื่น ได้แก่ MDA, โปรตีนรวม, โพรลีน, แป้ง, น้ำตาล และสารประกอบฟีนอลิกส์ พบว่า มีค่าอยู่ในช่วงที่ตรวจพบได้ในใบอ้อยที่อยู่ในสภาวะปกติ ยกเว้นกิจกรรมเอ็นไซม์ APX, GPX มีค่าต่ำกว่าที่ใบ ส่วนสาร MDA และ โพรลีนมีปริมาณสูงกว่าที่ใบมาก (ภาพที่ 8) ทั้งนี้ไม่ได้มีการตรวจเปรียบเทียบกับตัวอย่างดอกอ้อยสด เนื่องจากไม่มีตัวอย่าง

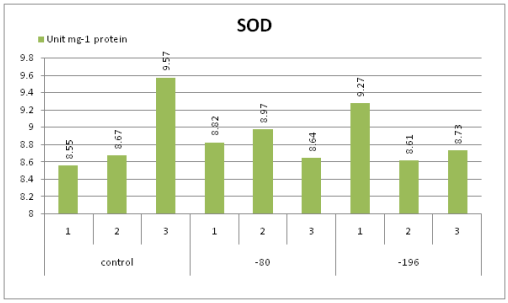


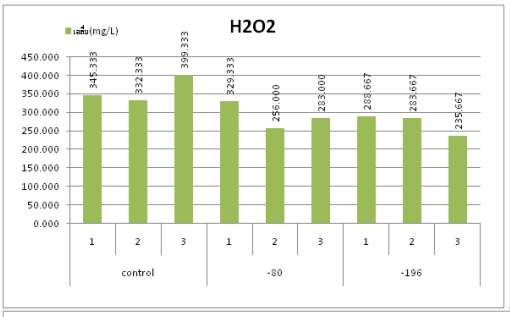
ภาพที่ 8 ช่วงค่ากิจกรรมเอ็นไซม์และสารชีวเคมีบางชนิดที่พบได้ในใบอ้อยในสภาวะปกติ และในดอกอ้อยที่แช่แข็งที่ -80°C นาน 4 เดือน โดยไม่ได้ลดความชื้น

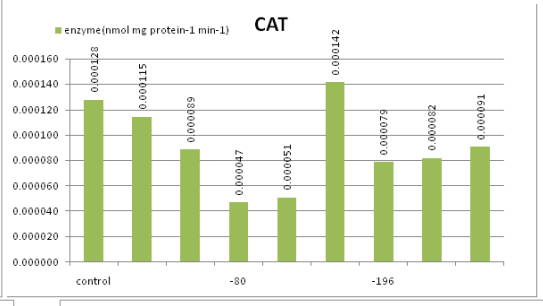
ดอกอ้อยลดความชื้นและแช่แข็ง : ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอ็นไซม์ในตัวอย่างที่ลดความชื้นลง 20 เปอร์เซ็นต์ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ โดยการนำดอกอ้อยที่เก็บในอุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 4 เดือนแล้ว มาเก็บรักษาความชื้นในตู้ดูดความชื้นที่ตั้งค่าความชื้นไว้ที่ 80 % RH เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเกสรอ้อยที่ลดความชื้นลงแล้วนี้ไปเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิห้อง, –80 และ -196°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ Ascorbate peroxidase (APX), Guaiacal Peroxidase (GPX), Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Protein, Malondialdehyde (MDA), Proline และ Hydrogen peroxide (H_2O_2) ดำเนินการอุณหภูมิละ 3 ซ้ำ พบว่าเอ็นไซม์และสารในกลุ่มปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้แก่ APX, SOD และ H_2O_2 และสารชีวเคมีชนิดอื่น ได้แก่ MDA, Proline, Protein, ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 9)

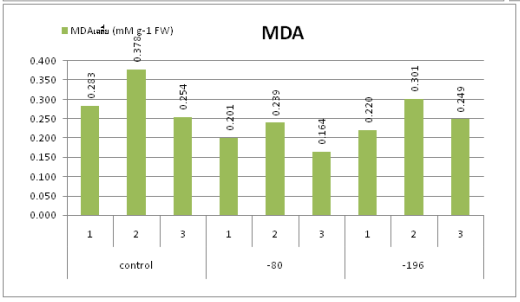
กรมวิชาการเกษตร

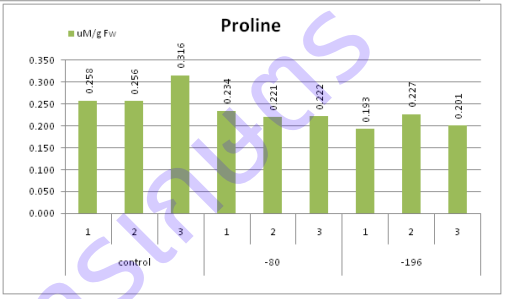






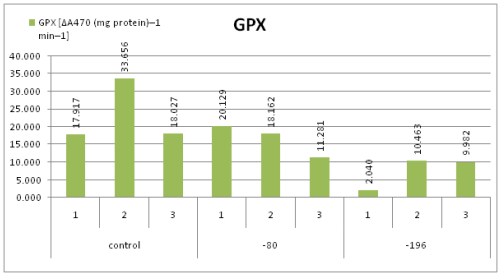


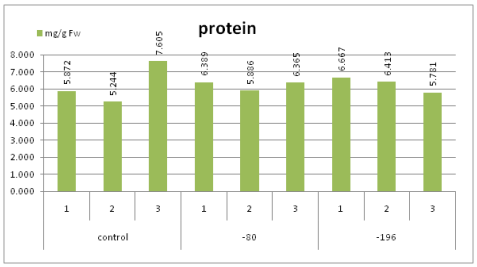




ภาพที่ 9 ช่วงค่ากิจกรรมเอ็นไซม์ และสารชีวเคมีบางชนิดในกลุ่มปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่พบได้ในดอกอ้อยที่แช่แข็ง control : ไม่ได้ลดความชื้น เก็บรักษาที่ -80°C ; -80 และ 196 คือ ลดความชื้นลงเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์ และเก็บรักษาที่ -80°C และ -196°C นาน 24 ชั่วโมง APX : ascorbate peroxidase; SOD: superoxide dismutase, H_2O_2 : hydrogen peroxide, Catalase (CAT), Malondialdehyde (MDA) และ Proline

ในขณะที่เอ็นไซม์ GPX ลดลงมากเมื่อเทียบต่อหนึ่งหน่วยโปรตีนในตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิ 196°C (ภาพที่ 5) แสดงให้เห็นว่าการลดความชื้นและอุณหภูมิลงในระดับ -196°C มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ชนิดนี้ (ภาพที่ 10)





ภาพที่ 10 ช่วงค่ากิจกรรมเอ็นไซม์ Guaicol peroxidase (GPX) และโปรตีนรวมในดอกอ้อยที่แช่แข็ง control : ไม่ได้ลดความชื้น และเก็บรักษาที่ -80°C , -80 และ 196 คือ ลดความชื้นของดอกอ้อยลงเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C และ -196°C นาน 24 ชั่วโมง ตามลำดับ APX : ascorbate peroxidase;, SOD: superoxide dismutase, H_2O_2 : hydrogen peroxide

กรมวิชาการเกษตร

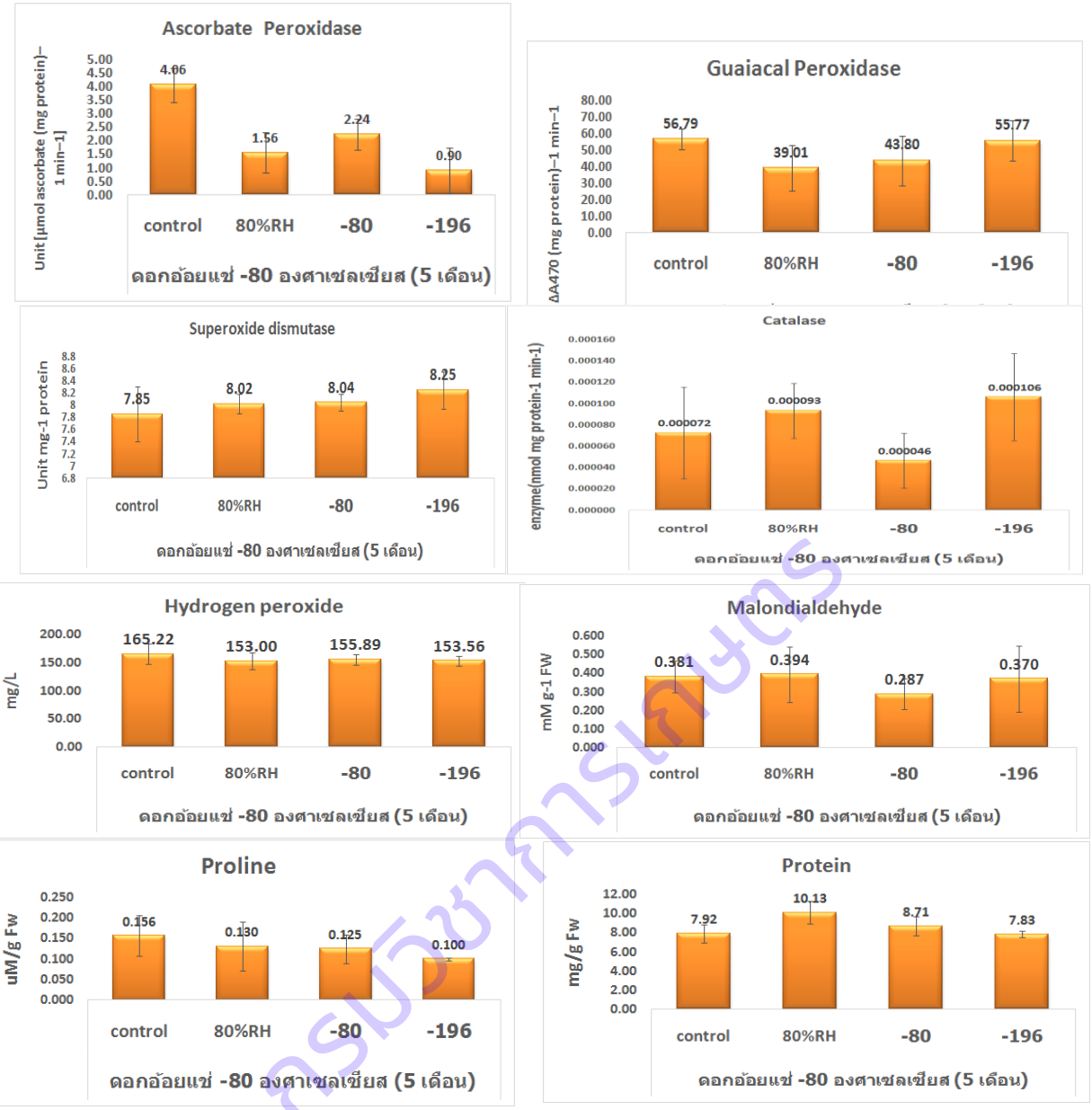
ดังนั้นผลจากการดูดความชื้นและแช่แข็งดอกอ้อยที่อุณหภูมิ -80°C และ -196°C นาน 24 ชั่วโมง พบว่าไม่มีผลต่อเอ็นไซม์ APX, SOD และ total protein แต่มีผลอย่างมากต่อเอ็นไซม์ GPX และ CAT (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยของสารชีวเคมีและกิจกรรมเอ็นไซม์ที่ตรวจพบในดอกอ้อยที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C นาน 4 เดือน ก่อนดูดความชื้น (control) และหลังดูดความชื้นลง 20% แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C และ -196°C

สารและเอ็นไซม์	เปอร์เซ็นต์		
	control	-80°C	-196°C
APX	100	119	96
GPX	100	71	32
SOD	100	99	99
CAT	100	72	76
PROTEIN	100	100	101
PROLINE	100	82	75
MDA	100	66	84
H_2O_2	100	81	75

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอ็นไซม์และสารชีวเคมีบางชนิดในช่อดอกชุดที่ 2 ที่เก็บรักษาในสภาพช่อดอกสดที่ -80°C เป็นเวลา 5 เดือน (สค. 60) เมื่อนำมาศึกษาพบว่ามีค่ากิจกรรมเอ็นไซม์ลดลงเป็นส่วนใหญ่และสารชีวเคมีบางชนิดเปลี่ยนไปหลังการดูดความชื้นและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 และ -196 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 11) สาเหตุอาจเกิดจากโปรตีนเสียสภาพเมื่อถูกนำมาลดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นในการเก็บรักษาจำเป็นทำการดูดความชื้นก่อนการเก็บรักษา หรือทำการลดความชื้นที่อุณหภูมิเดียวกัน โดยใช้สารดูดความชื้น เช่น ซิลิก้าเจล

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 11 ช่วงค่ากิจกรรมเอ็นไซม์ Guaicol peroxidase (GPX) และโปรตีนรวมในดอกอ้อยที่แช่แข็งชุดที่ 2 (ปี 2560) control : ไม่ได้ลดความชื้น และเก็บรักษาที่ -80°C , -80 และ 196 คือ ลดความชื้นของดอกอ้อยลงเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C และ -196°C นาน 24 ชั่วโมง ตามลำดับ APX : ascorbate peroxidase;, SOD: superoxide dismutase, H_2O_2 : hydrogen peroxide

การเก็บรักษาดอกอ้อยที่อุณหภูมิ -196°C หลังการดูดความชื้น พบว่ายังมีค่ากิจกรรมเอ็นไซม์เกือบเท่ากับการเก็บรักษาดอกอ้อยสดที่ -80 องศาเซลเซียสก่อนการดูดความชื้น ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสหลังการดูดความชื้น มีค่ากิจกรรมเอ็นไซม์ APX, GPX และ CAT ต่ำลง และสาร MDA บ่งชี้เซลล์ถูกทำลายมากขึ้น (ตารางที่ 7) แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสหลังการดูดความชื้น ทำให้เซลล์ยังคงสภาพมากกว่าที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสหลังการดูดความชื้น

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยของสารชีวเคมีและกิจกรรมเอ็นไซม์ที่ตรวจพบในดอกอ้อยสด (ชุดที่ 2 ปี 2560) ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C นาน 5 เดือน ก่อนดูดความชื้น (control) และหลังดูดความชื้นลง 20% แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C และ -196°C (TO : วิเคราะห์ทันที ; T24 : หลังเก็บรักษาต่อ 24 ชม.)

สารชีวเคมีและเอ็นไซม์	เปอร์เซ็นต์			
	Control (T0)	80% RH ((T 0)	-80°C (T24)	-196°C (T24)
APX	100	103	71	97
GPX	100	69	77	98
SOD	100	102	102	105
CAT	100	129	64	147
PROTEIN	100	128	110	99
PROLINE	100	83	80	64
MDA	100	103	71	97
H_2O_2	100	93	94	93

การทดลองตรวจปริมาณสารชีวเคมีและกิจกรรมเอ็นไซม์ตามตารางที่ 2ในดอกอ้อยป่าที่เก็บสดจากแปลงทดลอง (วันที่ 27 กพ. 2560) ระหว่างดอกบานและดอกตูม (ภาพที่ 12) ตรวจพบว่าสารดังกล่าวมีปริมาณที่แตกต่างกันในดอกสดทั้ง 2 ชนิด โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นและลดลงดังแสดงในตารางที่ 8

ภาพที่ 12 ดอกอ้อยป่าสด ซ้าย : ดอกบาน ขวา : ดอกตูม

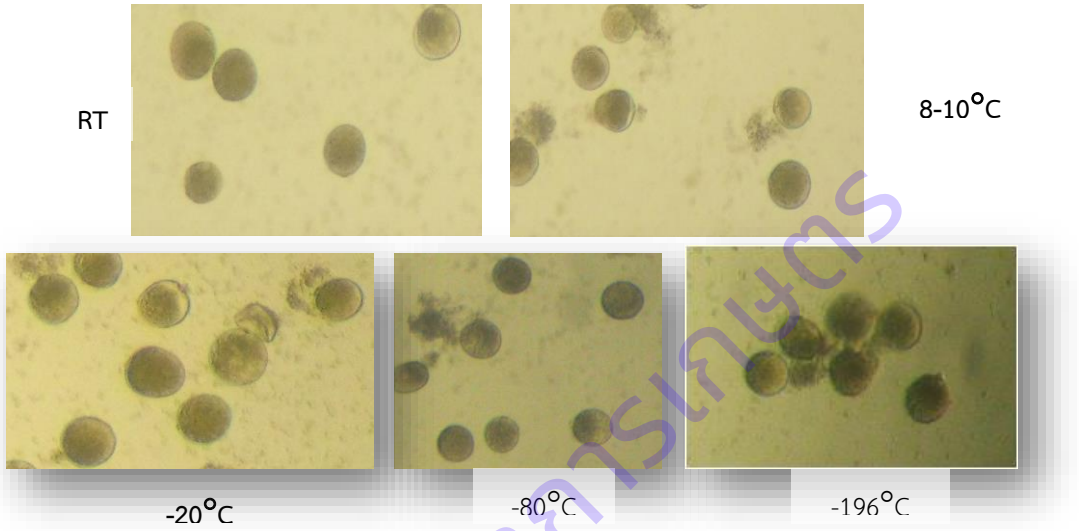
กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 8 ปริมาณสารชีวเคมีและกิจกรรมเอ็นไซม์ที่ตรวจพบในดอกสดอ้อยป่าเปรียบเทียบระหว่างดอกบานและดอกตูม

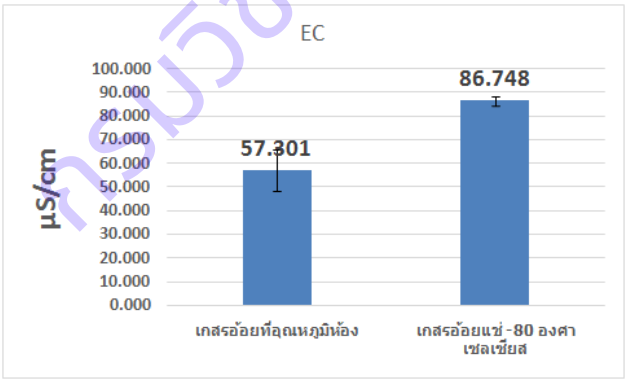
สารชีวเคมี	ดอกตูม (unit))	ดอกบาน (unit))	เปอร์เซ็นต์สารในดอกบานเทียบดอกตูม
APX	0.16	0.10	60
GPX	1.11	1.87	169
SOD	0.0019	0.0040	206
CAT	8.28	8.27	100
PROTEIN	5.65	7.97	141
PROLINE	0.17	0.11	67
MDA	0.59	0.12	20
H_2O_2	142.87	120.93	85

ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาและความชื้นต่อโครงสร้างของละอองเกสร

การเปรียบเทียบผลของการเก็บรักษาละอองเกสรที่ดูดความชื้นลงเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์ ในอุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง ในตู้เย็น 8-10 °C , ลบ 20 °C, ลบ 80°C, และ ลบ 196°C พบว่ามีผลต่อโครงสร้างของละอองเกสร โดยพบว่าละอองเกสรมีการแตกมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการเก็บรักษาต่ำลง (ภาพที่ 13) และพบว่ามีการรั่วไหลของอิเลคโตรไลท์มากขึ้นในตัวอย่างดอกอ้อยสดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ ลบ 80 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่ามีการแตกของเซลล์ (ภาพที่ 14) ดังนั้นต้องศึกษาวิธีการในการลดการแตกของละอองเกสร ด้วยการใช้สารเคมี หรือ การลดความชื้น ก่อนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ



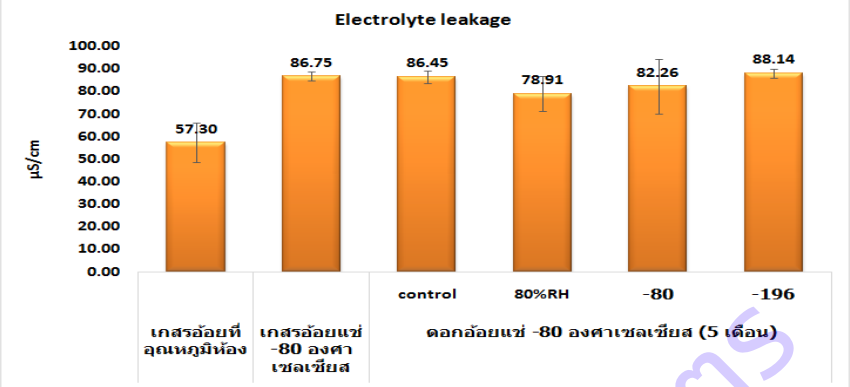
ภาพที่ 13 ผลของการลดอุณหภูมิและลดความชื้นลง 20 เปอร์เซ็นต์ ต่อโครงสร้างของละอองเกสรอ้อยพันธุ์KK07-250



ภาพที่ 14 ค่าเฉลี่ยการรั่วไหลของอิเลคโตรไลท์ในการเก็บรักษาดอกอ้อยที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิเย็นลบ 80 องศาเซลเซียส

กองวิชาการเกษตร

การวิเคราะห์ค่าการรั่วไหลของสารอิเลคโตรไลต์ ที่บ่งบอกถึงภาวะผนังเซลล์ถูกทำลายในละอองเกสรอ้อย และในดอกอ้อยสด พบว่า เกสรอ้อยที่เก็บรักษาที่ -80 °C หลังการดูดความชื้น มีค่าอิเลคโตรไลต์ เฉลี่ยประมาณ 1.5 เท่า ของตัวอย่างสด ในขณะที่ค่าการรั่วไหลของดอกอ้อยสดที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ ที่ -80 และ -196°C มีค่าใกล้เคียงกัน(ภาพที่ 15) แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ มีผลต่อสภาพการคงตัวของเซลล์ ทั้งนี้ยังไม่ได้มีการทดสอบการลดความชื้นลงมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์



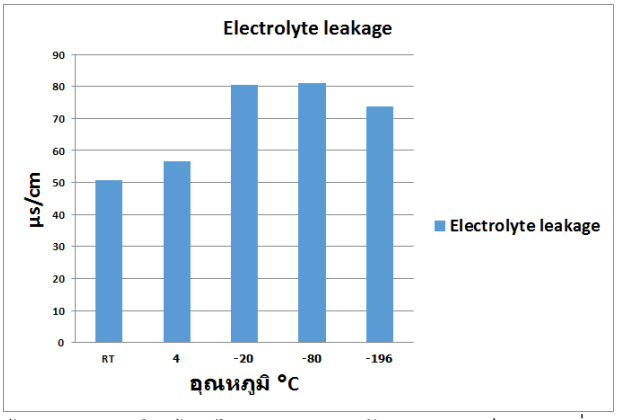
ภาพที่ 15 ค่าเฉลี่ยการรั่วไหลของอิเลคโตรไลท์ในการเก็บรักษาดอกอ้อยที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิเย็นลบ 80 °C และลบ 196 °C ก่อนและหลังการดูดความชื้นลง 20 เปอร์เซ็นต์

อุณหภูมิในการเก็บรักษาและการรั่วของอิเลคโตรไลท์

ผลการวิเคราะห์การเก็บตัวอย่างเกสรอ้อยชุดปี 2561 เก็บตัวอย่างในช่วงเวลา 5.00-7.00 น. ในระหว่างวันที่ 1-11 ธันวาคม 2560 จำนวน 7 พันธุ์ อุณหภูมิช่วงเช้าประมาณ 21 องศาเซลเซียส โดยการตัดช่อดอกสดของอ้อยที่ยังไม่มีการแตกออกของเกสรอ้อย และจากการเคาะละอองเกสร เก็บในสภาพดูดความชื้นโดยใช้เม็ดซิลิก้าเจล และไม่ดูดความชื้น เก็บรักษาในน้ำแข็งในระหว่างเก็บตัวอย่าง ตรวจเช็คความงอกของท่อละอองเกสร ก่อนการแบ่งตัวอย่างเก็บในอุณหภูมิแตกต่างกัน ได้แก่ ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียล, -20 องศาเซลเซียล , -80 องศาเซลเซียล และ -196 องศาเซลเซียล ตรวจเช็คค่า EC และความงอกของตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดลองวิเคราะห์การรั่วไหลของอิเลคโตรไลท์ในตัวอย่างละอองเกสรสดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิเย็นมากตั้งแต่ -20 ถึง -196 องศาเซลเซียส มีการรั่วไหลของอิเลคโตรไลท์มากขึ้น ส่วนที่อุณหภูมิ 4 ถึง 8 องศาเซลเซียส พบการรั่วไหลเพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่ามีการแตกของเซลล์น้อยกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่ต่ำลง (ภาพที่ 16)

		เฉลี่ย	SD
0h	RT	50.83	2.57
24h	4	56.67	3.65
	-20	80.38	6.84
	-80	81.02	7.56
	-196	73.81	5.69

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 16 ค่าการรั่วไหลของอิเลคโตรไลท์ในละอองเกสรอ้อยสดหลังเก็บรักษาที่อุณหภูมิเย็นต่างๆ (องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

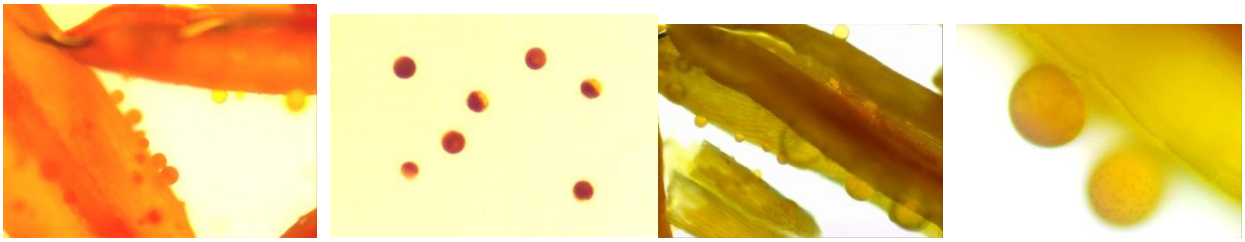
การวิเคราะห์ค่าการรั่วไหลของอิเลคโตรไลท์ในช่อดอกสดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิเย็นมากตั้งแต่ -20 ถึง -196 องศาเซลเซียส มีการรั่วไหลของอิเลคโตรไลท์มากขึ้น ส่วนที่อุณหภูมิ 4 ถึง 8 องศาเซลเซียส พบการรั่วไหลเพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่ามีการแตกของเซลล์น้อยกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่ต่ำลง เช่นเดียวกัน แต่การเก็บช่อดอกสดพบว่ามีการรั่วไหลของอิเลคโตรไลท์น้อยกว่าการเก็บละอองเกสร และพบว่าการเก็บที่อุณหภูมิที่ต่ำลงทั้ง 4 สภาวะ มีผลใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 17)

ภาพที่ 17 ค่าการรั่วไหลของอิเลคโตรไลท์ในช่อดอกสดของอ้อยที่มีอับละอองเกสรหลังเก็บรักษาที่อุณหภูมิเย็นต่างๆ(องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การเพื่อศึกษาความมีชีวิต (viability) ของละอองแกสร

การใช้ KI ในดอกอ้อยสด (ชุด2 ปี 2560) ที่เก็บรักษาที่ -80 องศาเซลเซียส เนื่องจากไม่มีละอองเกสรสำหรับทดสอบ ย้อมติดเหลืองน้ำตาล แสดงให้เห็นว่า ไม่มีชีวิต ย้อมติดสีดำแสดงถึงความมีชีวิต จากการทดลองย้อมสี พบว่าส่วนใหญ่ติดสีเหลือง และสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 18) แต่เนื่องจากเป็นการย้อมทดลองในตัวอย่างที่เก็บรักษาเป็นเวลานาน รวมทั้งเป็นปีที่เกสรอ้อยมีความงอกต่ำมาก จึงไม่สามารถระบุความมีชีวิตได้ ดังนั้นการทดลองขั้นต่อไปจะทำการศึกษาในละอองเกสรสดที่เก็บจากแปลงและย้อมสีทันที เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่าง

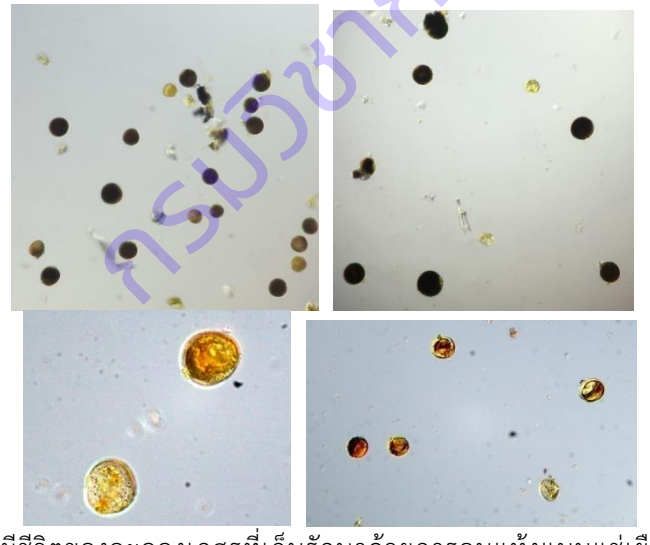
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 18 การศึกษาการมีชีวิตของละอองเกสรในดอกอ้อยสดพันธุ์ KK07-253 ที่เก็บรักษาอุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียสด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 5X 10X และ 40X โดยการหยดสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium Iodide Solution)

การทดสอบความมีชีวิตและการงอกของท่อในละอองเกสรที่เก็บรักษาด้วยการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dehydration หรือ lyophilization)

ผลการทดลองในตัวอย่างชุดที่ 4 (2561/2562) โดยเป็นตัวอย่างเกสรอ้อยจากอ้อยลูกผสม จำนวน 3 สายพันธุ์ เก็บในระหว่าง 21 ธันวาคม 2561 ช่วงเวลาการเก็บ 4.00 – 7.00 น. โดยแบ่งเกสรอ้อยออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 ไม่นำอับเกสรอ้อยออกจากก้าน และส่วนที่ 2 นำเกสรอ้อยออกจากก้าน นำเกสรอ้อยทั้ง 2 แบบใส่ลงในเครื่อง Freeze Dry นานเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ไม่นำก้านดอกอ้อยออกจากช่อดอก ยังคงความมีชีวิตประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ แต่พบว่าไม่มีความงอกของท่อละอองเกสร การทดสอบในกลุ่มที่นำก้านดอกอ้อยออกจากช่อดอก ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ไม่นำก้านดอกอ้อยออกจากช่อดอก ไม่มีความมีชีวิตและไม่มีความงอกของท่อละอองเกสร แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่ยังคงก้านช่อดอกไว้ มีความมีชีวิตได้นานกว่านำก้านช่อดอกออก (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 ความมีชีวิตของละอองเกสรที่เก็บรักษาด้วยการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dehydration หรือ lyophilization) ย้อมด้วย KI ในกลุ่มที่ไม่นำก้านดอกอ้อยออกจากช่อดอก (บน) และกลุ่มที่นำก้านดอกอ้อยออกจากช่อดอก (ล่าง)

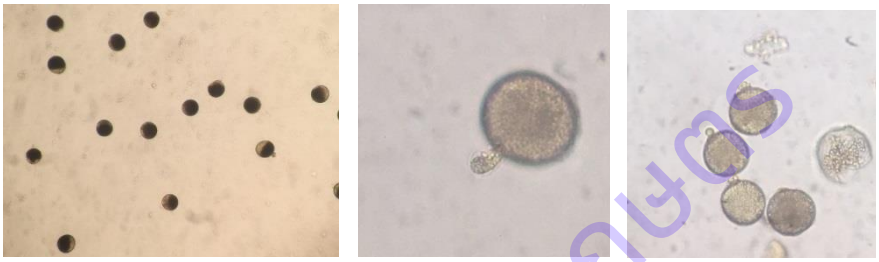
กรมวิชาการเกษตร

ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อความมีชีวิตและการงอกของท่อละอองเกสร

ผลการศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรอ้อย และอับละอองเกสรอ้อยชุดที่ 4 ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 0, -4, -20 และ -80°C ในซิลิก้าเจล ในปี 2560/61 พบว่ามีความมีชีวิตระหว่าง 70-90 เปอร์เซ็นต์ และมีความงอกอยู่ระหว่าง 30-50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9) และภาพที่ 20

ตารางที่ 9 การศึกษาความมีชีวิตและการงอกของท่อละอองเกสรในละอองเกสรสดชุดที่ 4 (2561/2562)

พันธุ์	%Viability in Pollen		%Germination in Pollen	
	ละอองเกสร	อับละอองเกสร	ละอองเกสร	อับละอองเกสร
1.พันธุ์อ้อยลูกผสม	80%	90%	50%	50%
2.พันธุ์อ้อยลูกผสม	85%	90%	50%	40%
3.พันธุ์อ้อยป่า	70%	80%	30%	40%



ภาพที่ 20 ความมีชีวิตของละอองเกสรย้อมด้วย KI (ซ้าย) และการงอกของท่อละอองเกสร (กลางและขวา)

ผลการศึกษาความมีชีวิตของอับละอองเกสรอ้อยชุดที่ 4 ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 0,-4,-20 และ -80°C เป็นเวลา 5 เดือน พบว่าทุกวิธีการยังคงความมีชีวิตของละอองเกสร โดยการเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำกว่าอุณหภูมิอื่น (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ความมีชีวิตของเกสรอ้อยจำนวน 3 พันธุ์ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 0,-4,-20 และ -80°C เป็นเวลา 5 เดือน

พันธุ์	%Viability in Pollen							
	ละอองเกสร				อับละอองเกสร			
	0°C	-4°C	-20°C	-80°C	0°C	-4°C	-20°C	-80°C
1.พันธุ์อ้อยลูกผสม	60%	70%	80%	40%	60%	60%	50%	20%
2.พันธุ์อ้อยลูกผสม	60%	60%	85%	50%	40%	40%	40%	15%
3.พันธุ์อ้อยป่า	50%	60%	70%	40%	40%	50%	50%	20%

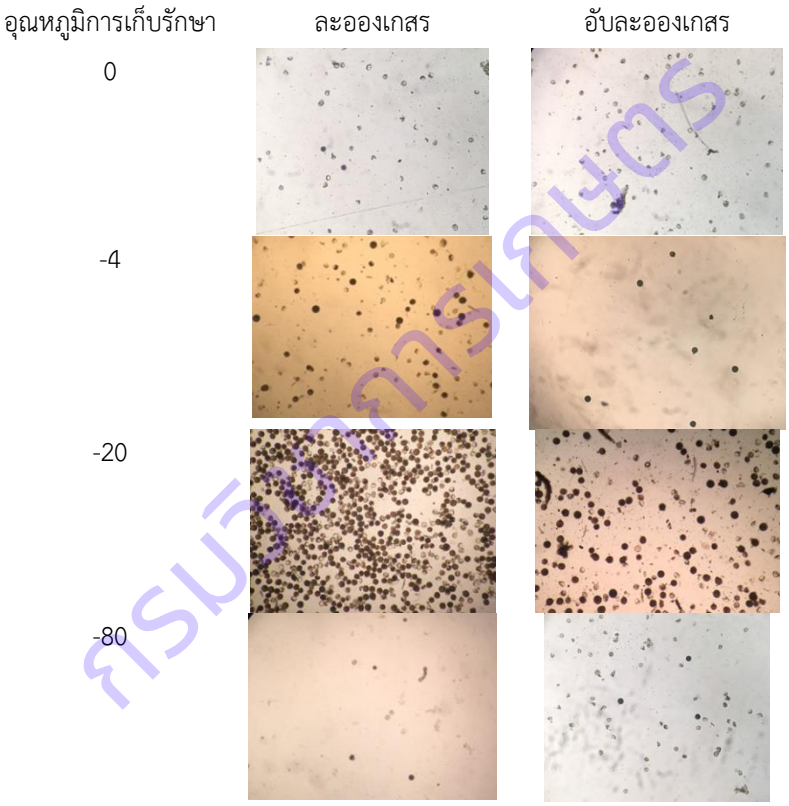
ผลการศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรอ้อย และเก็บอับละอองเกสรอ้อย ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 0, -4, -20 และ -80 องศาเซลเซียส ในซิลิก้าเจล ตั้งแต่ปี 2560/61 รวมระยะเวลาเก็บรักษา 1 ปี 9 เดือน พบว่า การเก็บแบบละอองเกสรมีความมีชีวิตตั้งแต่ 0-20 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ -20 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ ความมีชีวิตสูงสุด ส่วนการเก็บแบบอับละอองเกสรมีความมีชีวิตตั้งแต่ 0-10 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ 4- และ-20 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ ความมีชีวิตสูงสุด (ตารางที่ 11, ภาพที่ 21) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็น

กรมวิชาการเกษตร

ว่าการเก็บรักษาแบบละอองเกสรในสภาพแห้งด้วยซิลิก้าเจลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สามารถรักษาความมีชีวิตของละอองเกสรได้มากกว่า 1ปี แต่ทั้งนี้ ไม่ได้ทำการศึกษาการงอกของท่อละอองเกสร

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเกสรอ้อยจำนวน 1 พันธุ์ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 0,-4,-20 และ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี 9 เดือน

อุณหภูมิการเก็บรักษา	%Viability in Pollen	
	ละอองเกสร	อับละอองเกสร
0	0%	0%
-4	10%	10%
-20	20%	10%
-80	5%	5%



ศูนย์วิทยทรัพยากร

ภาพที่ 21 ความมีชีวิตของเกสรอ้อยจำนวน 1 พันธุ์ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 0,-4,-20 และ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี 9 เดือน

ผลการศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรอ้อย และเก็บอับละอองเกสรอ้อย ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 อุณหภูมิ ได้แก่ 0, -4, -20 และ -80 ℃ ในซิลิก้าเจล ตั้งแต่ปี 2561/2 รวมระยะเวลาเก็บรักษา 9 เดือน ในอ้อยกลุ่มลูกผสม 3 หมายเลข พบว่า การเก็บแบบละอองเกสรมีความมีชีวิตตั้งแต่ 30-85 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ -20 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ ความมีชีวิตสูงสุด ส่วนการเก็บแบบอับละอองเกสรมีความมีชีวิตตั้งแต่ 10-60 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ -80℃ มีเปอร์เซ็นต์ ความมีชีวิตต่ำสุด เมื่อเทียบกับอีก 3 อุณหภูมิ (ตารางที่ 12, 14) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาแบบละอองเกสรในสภาพแห้งด้วยซิลิก้าเจลที่อุณหภูมิ -20℃ สามารถรักษาความมีชีวิตของละอองเกสรได้มากกว่า 1ปี แต่ทั้งนี้ ไม่ได้ทำการศึกษาการงอกของท่อละอองเกสร รอทดสอบประสิทธิภาพในการผสมในฤดูออกดอกในปี 2562

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเกสรอ้อยจำนวน 3 หมายเลข ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 0,-4,-20 และ -80 ℃ เป็นเวลา 9 เดือน

พันธุ์	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและอุณหภูมิในการเก็บรักษา (องศาเซลเซียส)							
	ละอองเกสร				อับละอองเกสร			
	0	-4	-20	-80	0	-4	-20	-80
1.พันธุ์อ้อยผสม	60%	60%	80%	40%	60%	50%	50%	20%
2.พันธุ์อ้อยผสม	60%	50%	85%	50%	40%	40%	40%	10%
3.พันธุ์อ้อยป่า	40%	50%	70%	30%	40%	50%	50%	20%

การทดลองผสมอ้อยด้วยเกสรที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

ผลจากการใช้ละอองเกสรที่เก็บในเวลาเช้า ประมาณ 7 : 00 น. เก็บในสภาพสด และดูดความชื้นแบ่งตัวอย่างเก็บในแต่สภาพ เก็บรักษาวิธีที่อุณหภูมิ -20 ℃ โดยเก็บเกสรอ้อยพันธุ์พ่อ KK08-195 แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ Control โดยการตัดต้นพันธุ์ตัวผู้ ที่มีดอกบาน 50 เปอร์เซ็นต์ เกสรอ้อยที่และดูดความชื้นและเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 ℃ เป็นเวลา 14 วัน และเกสรอ้อย และดูดความชื้น ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 ℃ เป็นเวลา 30 วัน ทดสอบในต้นตัวเมียโดยตัดต้นพันธุ์ตัวเมียที่มีดอกบานประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ทั้งหมด 3 พันธุ์ ได้แก่ 1. พันธุ์แม่ 04-4-064 (Control) 2.พันธุ์แม่ KK13-563 (Control) 3.พันธุ์แม่ KK13-600 (Control) ผสมกับเกสรอ้อยพันธุ์พ่อ ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 ℃ เป็นเวลา 14 วัน และ 30 วัน และที่เก็บรักษาเป็นเวลา 1 ปี และ 2 ปี พบว่าไม่ประสบผลสำเร็จ นำเกสรอ้อยที่เก็บไว้ เป็นเวลา 2 ปี , 1ปี, 1 เดือนและ 2 สัปดาห์ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสมาผสมกับต้นแม่ที่เตรียมไว้ โดยการแต้มละอองเกสร จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน เพื่อรอการผสมติด ผลการทดสอบพบว่าผสมไม่ติด สาเหตุอาจเกิดจากอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมในช่วงเวลาที่ทำการทดสอบ

ตารางแสดงการผสมเกสรอ้อย

วัน/เดือน/ปี	ระยะเวลาการเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส	พันธุ์พ่อ	พันธุ์แม่	หลังจากผสม 1 เดือน
8 มกราคม 2563	2ปี	พันธุ์ที่ 4 อ้อยป่า	KK07-253	ผสมไม่ติด
8 มกราคม 2563	1ปี	พันธุ์ที่ 2 อ้อยป่า	KK07-253	ผสมไม่ติด
7 มกราคม 2563	1เดือน	KK08-195	EBC14-60	ผสมไม่ติด
7 มกราคม 2563	2 สัปดาห์	KK08-195	EBC14-60	ผสมไม่ติด

กรมวิชาการเกษตร

10. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

การทดลองเก็บรักษาละอองเกสรอ้อยในสภาพอุณหภูมิต่ำพบว่ามีศักยภาพในการนำมาใช้ในการเก็บรักษา โดยสามารถตรวจพบความมีชีวิตของละอองเกสรได้ยาวเป็นปีในการเก็บรักษาทุกอุณหภูมิ แต่อุณหภูมิต่ำมีผลต่อโครงสร้างของละอองเกสร โดยตรวจพบการแตกของเซลล์มากขึ้น การศึกษาสารเคมีที่ใช้รักษาสภาพของเซลล์ก่อนเก็บรักษา หรือการดูดความชื้นที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาจะทำให้วิธีการนี้มีประโยชน์มากยิ่งขึ้น แต่ยังคงพบปัญหาจากการตรวจประสิทธิภาพของการผสมด้วยการตรวจเช็คความงอกของท่อละอองเกสรซึ่งพบว่าหลังการเก็บรักษา ในอุณหภูมิต่ำไม่สามารถตรวจพบความงอกของท่อละอองเกสรได้ ดังนั้นการศึกษาสารละลายที่สนับสนุนการงอกของท่อละอองเกสรจะทำละอองเกสรที่เก็บด้วยวิธีการนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผสมได้

11. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : ให้ระบุผลงานที่สิ้นสุด ได้นำไปใช้ประโยชน์อย่างไร พัฒนาต่อหรือถ่ายทอด หรือเผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์กับกลุ่มเป้าหมาย (ระบุเป็นข้อๆ)

11.1 อยู่ระหว่างการจัดเตรียมข้อมูลเพื่อการเผยแพร่

11.2 ต่อยอดวิธีการและผลการทดลองในโครงการปรับปรุงพันธุ์อ้อยปี 2565-2567 ของสถาบันวิจัยพืชไร่ฯ

12. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยที่ช่วยปฏิบัติการทดลอง ทดสอบอ้อยตามแผนงานทดลอง ขอขอบคุณ คุณปิยะรัตน์ จังพล คุณรวีวรรณ เชื้อกิตติศักดิ์ คุณภาคภูมิ ถิ่นคำ ที่เอื้อเฟื้อต้นอ้อยเพื่อการทดสอบ ขอขอบคุณ อ.ทักษิณา ศันสยะวิชัย ผชช.วีระพล พลรักดี ที่ให้คำปรึกษาด้านพันธุ์ และให้ตัวอย่างในการทดสอบ

13. เอกสารอ้างอิง :

Amaral, A. L., J.M. Santos, L.K. Morais, G.V.S. Barbosa, A.M.C. Rocha, C.C. Almeida, P.A. Silva, M.S. Aguiar, T.M.M. Camara and A.D. Santiago. 2011. Storage of sugarcane pollens. In: Balancing sugar and energy production in developing countries : Sustainable technologies and marketing strategies. New Deli. Proceedings. (1), p. 570-573.

Amaral, A.L., J.M. Santos, J.M. Camara, T.M. Duartefilho, L.S. , G.V.S. Barbosa and P.A. Silva. 2013. Pollen Storage for Asynchronics Crosses In Sugarcane.In: International Society of Sugarcane Technologists, 28., 2013, São Paulo. Proceedings...São Paulo, 2013, p. 779-786.

Chaudhury, R., S.K. Malik and S. Rajan. 2010. An improved pollen collection and cryopreservation method for highly recalcitrant tropical fruit species of mango MangiferaindicaL.) and litchi (Litchi chinensisSonn.). CryoLetters31 (3), 268-278.

Machado JR, G.R., J.E. Queiroz and R.L.C. Braga JR. 1989. Estudo da emasculação de variedadesde cana-de-açúcar. BoletimTécnicoCopersucar, SãoPaulo, v. 45, p. 3-5.

ศรีวิชัยการเกษตร

Machado, JR, G. P. Melhoramento da Cana-de-açúcar. In: cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill; Paranhos, 1987. p.165-186.

Panella, L., L. Wheeler, and M. E. McClintock. 2009. Long-term Survival of Cryopreserved Sugarbeet Pollen. Journal of Sugar Beet Research Vol. 46 Nos. 1 & 2. P 1-9.

Singh R, S. Singh, D. Cheema and M. Dhaliwa. 2010. Effect of HighTemperature on Pollen Viability and Reproductive Organs of Tomato (LycopersiconesculentumMill). Crop Improv. 37:209-209

Sixin, S., Z. Zhie and X. Jianping. 1996. Genetic stability in maize pollen after long-term cryopreservation. Europe PMC. 22(4):409-413.

Suketi K, C.I.H. Tuharea, W.D. Widodo, R. Poerwanto. 2011. Pollenviability and pollen tube growth of IPB's papaya. J. Agr. Indo. J.Agron. Indonesia 39:43-48

Takagi K, Y.Tatsumi, K. Kitaichi, M. Iwase,E. Shibata, M. Nakao, T. Matsumoto, K. Takagi and T. Hasegawa. 2004. A sensitive colorimetric assay for polyamines in erythrocytes using oat seedling polyamine oxidase.ClinChimActa.340(1-2):219-27.

Tandon, R., R. Chaudhury and K.R. Shivana. 2007. Cryopreservation of oil palm pollen. Current Science, Vol. 92. No. 2 p. 182-183.

Wenguang M., W. Jianchen, H. Jin, G. Yajing, L.Yongping and Z. Yunye. 2012. Relation between changes in polyamine, protectiveenzyme activity and pollen vigor of tobacco in differentflowering stages. African Journal of Agricultural Research Vol. 7(40), pp. 5491-5497

Yaohui, Z and H. Oiyao. 1994. Low temperature storage of S. spontaneumpollen and their viability. Sugarcane and canesugar, Siri: Hainan Sugarcane Breeding Station, 1994. v. 2, p. 7-9.

Zhang S, J. Hu, Y. Zhang, X.J. Xie and A. Knapp.2007. Seed priming withbrassinolide improves lucerne (Medicago sativa L.) seed germinationand seedling growth in relation to physiological changes undersalinity stress. Aust. J. Agric. Res. 58:811-815

Zhang SN, J. Zhang, C.Z. Sun, J.J. Wang JJ. 2011. Pollen viability and seed formation of autotetraploid broccoli. Fujian J. Agr. Sci. 26:238-242

Zhang, Y.L., R.D. Chen, C.J. Huang and Y. Liu. 2009. Cryo-banking of Prunusmume pollen and its application in cross-breeding.Cryo Letters.30(3):165-70.