การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrification
Cryopreservation Technique of Taro (*Colocacia esculenta*) Germplasm Using Vitrification Method

พัฒน์นรี รักษ์คิด[1/*] พัชร ปิริยะวินิตร[1/] กัญญาภรณ์ พิพิธแสงจันทร์[1/] สุนิศา ขัดแปง[1/]
Padnaree Rukkid[1/*] Phatchara Piriyavinit[1/] Kunyaporn Pipithsangchan[1/] Sunisa Khatpaeng[1/]

Received 7 Oct 2019/Revised 3 Mar 2021/Accepted 11 Mar 2021

ABSTRACT

Taro (*Colocacia esculenta* (L.) Schott) is a tropical root crop that can be cultivated in all regions of Thailand. Currently the taro's genetic resources are being conserved in the field collection at Phichit Agricultural Research and Development Center, Department of Agriculture. Cryopreservation is considered to be a more cost saving option for long term conservation of vegetatively propagated crops and can also reduce the cumbersome maintainance of large amount of taro from season to season. This research aimed to conserve two non-aromatic (Phueak Khai (P1) and Phueak Aoi (P2)) and two aromatic (Phueak Hom THA-104 (P3) and Phueak Hom Phayao (P4)) taro germplasms using cryopreservation approach. The apical meristems of the 4 taros were cultured on 12 Murashige and Skoog (MS) based medium supplemented with the combinations of different concentrations of benzyladenine acid (BA) (0, 3, 5 and 7 mg/l) and naphthalene acetic acid (NAA) (0, 1 and 2 mg/l) for 16 weeks. Results showed that MS medium supplemented with 5 mg/l BA and 2 mg/l NAA was suitable for the two non-aromatic taro cultures which provided the highest shoot number averages at 10.25 and 9.19 shoots per explant for P1 and P2, respectively. For aromatic taro cultures, P3 and P4 showed the highest shoot number averages on MS medium supplemented with 5 mg/l BA and 1 mg/l NAA at 10.04 and 9.57 shoots per explant, respectively. The taro shoots obtained from the 4 cultivars were further investigated for possible conservation under the cryopreservation condition using vitrification method. Results revealed that the optimum condition for taro cryopreservation was by dehydrating the taro shoots in plant vitrification solution 3 (PVS3) at 25 °C for 30 minutes which showed the average recovery rates of 49.5, 64.1, 52.7 and 59.5 % of P1-P4, respectively after 4-weeks cultured.

Keywords: In vitro conservation, micropropagation

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร, จ.ปทุมธานี 12110

[1/] Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Pathum Thani. 12110

***Coresponding author: padnaree.r@gmail.com**

บทคัดย่อ

เผือก เป็นพืชหัวเขตร้อนที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ กรมวิชาการเกษตร ได้รวบรวมและปลูกอนุรักษ์พันธุกรรมเผือกไว้ในสภาพแปลง รวบรวมพันธุ์ ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร เพื่อประหยัดค่าใช้จ่าย และลดขั้นตอนในการปลูกอนุรักษ์พันธุกรรมต้นเผือกในสภาพแปลงปลูก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี vitrification โดยใช้เผือกไม่หอม 2 สายพันธุ์ คือ เผือกไข่ และเผือกอ้อย และเผือกหอม 2 สายพันธุ์ คือ เผือกหอม THA-104 และเผือกหอมพะเยา ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดเผือก 4 สายพันธุ์ บนอาหาร 12 สูตร ได้แก่ อาหารสังเคราะห์ Murashige and Skoog (MS) ที่เติมกรดเบนซิลอะดีนิน (BA) 0, 3, 5 และ 7 มก./ล. ร่วมกับกรดแนพทาลีนแอซีติก (NAA) 0, 1 และ 2 มก./ล. เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า MS ที่เติม BA 5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 2 มก./ล. เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับเพาะเลี้ยงเผือกไม่หอม โดยชักนำให้เกิดยอดสูงสุดเฉลี่ยที่ 10.25 และ 9.19 ยอด/ชิ้นส่วน สำหรับเผือกไข่และเผือกอ้อย ตามลำดับ และ MS ที่เติม BA 5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล. เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสำหรับเพาะเลี้ยงเผือกหอม โดยชักนำให้เกิดยอดสูงสุดเฉลี่ย 10.04 และ 9.57 ยอด/ชิ้นส่วน สำหรับเผือกหอม THA-104 และเผือกหอมพะเยา ตามลำดับ จากนั้น นำปลายยอดเผือกทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ได้ มาศึกษาสภาวะการอนุรักษ์ในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี vitrification พบว่า สภาวะที่เหมาะสม คือ การแช่ปลายยอดเผือกในสาร cryoprotectant ชนิด PVS3 (plant vitrification solution 3) ที่อุณหภูมิ 25° ซ. นาน 30 นาที ให้อัตราการรอดชีวิตของเผือกไข่ เผือกอ้อย เผือกหอม THA-104 และเผือกหอมพะเยา หลังการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ เฉลี่ย 49.5, 64.1, 52.7 และ 59.5% ตามลำดับ

คำสำคัญ: การอนุรักษ์ในสภาพปลอดเชื้อ การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

บทนำ

เผือก (*Colocacia esculenta* (L.) Schott) เป็นหนึ่งในพืชหัวเศรษฐกิจที่มีศักยภาพในการส่งออก ปัจจุบัน เผือกหอมกำลังเป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศ เช่น ประเทศออสเตรเลีย ฮ่องกง ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ และมาเลเซีย ในปี พ.ศ. 2563 ประเทศไทยมีการส่งออกเผือกในรูปแช่แข็งภายใต้พิกัดศุลกากร HS 07 (Edible vegetable) ไปยังประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย เนเธอร์แลนด์ สวีเดน อังกฤษ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น แคนาดา และสวิตเซอร์แลนด์ รวมจำนวน 109.104 ตัน คิดเป็นมูลค่า 9.51 ล้านบาท (กรมศุลกากร, 2564) โดยพิจารณาถึงการใช้ประโยชน์ได้ทั้งหัว ก้านใบ และใบเผือก รวมทั้งตลาดภายในและต่างประเทศ เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวและพืชไร่บางชนิดแล้ว เผือกจัดเป็นพืชที่น่าสนใจที่จะส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูกเพื่อสร้างรายได้อีกพืชหนึ่ง (นิรนาม, 2557)

เผือกมีลำต้นใต้ดินสะสมอาหาร ลักษณะเป็นหัวขนาดใหญ่ หนักได้ถึง 4 กก. เผือกมีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หรือตอนใต้ของเอเชียกลาง จากสถิติการปลูกพืชในปี พ.ศ. 2563 พบว่า ประเทศไทยมีการปลูกเผือกอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ จำนวน 1,824 ครัวเรือน พื้นที่ปลูกทั้งประเทศประมาณ 10,694.44 ไร่ ผลผลิตประมาณ 25,380.322 ตัน เฉลี่ย 3.42 ตัน/ไร่ ราคาผลผลิตเฉลี่ย 25.53 บาท/กก. แหล่งปลูกเผือกที่สำคัญ ได้แก่ จ.สระบุรี กาญจนบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี อยุธยา เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช กำแพงเพชร เชียงใหม่ สิงห์บุรี และนครสวรรค์ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2563)

ได้มีการศึกษาและเก็บรวบรวมเชื้อพันธุ์เผือกในระดับนานาชาติ ณ มหาวิทยาลัยแห่งชาติมาเลเซีย (The National University of Malaysia) ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมพืชหัวแห่งฟิลิปปินส์ (The Philippine Root Crop Research and Training Center) และ The Bubia Research Station ในปาปัวนิวกินี โดยมีเป้าหมายเพื่อรวบรวม อนุรักษ์และใช้ประโยชน์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์เผือกในด้านการเพิ่มผลผลิต ลดรสเฝื่อน ยืดอายุการเก็บเกี่ยว การเกิดหน่อที่เหมาะสม ความต้านทานต่อเชื้อ *Phytophthora* และ *Pythium* ปรับปรุง

คุณภาพในการนำมาประกอบอาหาร และการปรับตัวเข้ากับสภาพดินเลวได้ดี ทั้งนี้ การแลกเปลี่ยนสายพันธุ์ดีสามารถแลกเปลี่ยนต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ (Wang, 1983) สำหรับประเทศไทย โดย กรมวิชาการเกษตร ได้มีการรวบรวมและอนุรักษ์พันธุกรรมเผือกในสภาพแปลงอนุรักษ์ที่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร เป็นการดำเนินงานวิจัยภายใต้โครงการความร่วมมือระหว่างประเทศ เพื่อพัฒนาการผลิตเผือกในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และภาคพื้นแปซิฟิก (Taro Network for Southeast Asia and Oceania) ในช่วงปี พ.ศ. 2541-2544 ปัจจุบันยังคงมีการรวบรวมพันธุกรรมเผือก ศึกษาลักษณะ และอนุรักษ์ในสภาพแปลงปลูก จำนวน 250 ตัวอย่าง ซึ่งการอนุรักษ์ในสภาพดังกล่าว ใช้เนื้อที่และแรงงานจำนวนมาก อีกทั้งเสี่ยงต่อการสูญหายของเชื้อพันธุกรรมเมื่อประสบกับภัยพิบัติทางธรรมชาติ หากไม่มีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมเหล่านี้สำรองไว้ การเก็บรักษาพันธุกรรมพืชในระยะยาว (long term storage) ในสภาพอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (cryopreservation) โดยการนำชิ้นส่วน หรือเนื้อเยื่อพืชมาแช่ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 ซ. เป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชระยะยาวที่มีประสิทธิภาพ และเสียค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาเฉลี่ยต่อตัวอย่างน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเก็บรักษาแบบอื่น (Engelmann, 2000) ซึ่งวิธีการนี้เหมาะสำหรับการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชที่ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และไม่สามารถเก็บรักษาเมล็ดได้ ตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์จะหยุดลง ทำให้เกิดการพักตัว

วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในสภาพเยือกแข็งมีหลายวิธี ได้แก่ การปรับสภาพเพื่อให้ทนต่อสภาพอุณหภูมิต่ำ (preculture) การดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) การใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง เพื่อปรับสภาพน้ำและออสโมติคของเซลล์ (cryoprotectant หรือ vitrification) การใช้เทคนิคการห่อหุ้มชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเพื่อป้องกันอันตรายจากอุณหภูมิต่ำ (encapsulation) หรือการประยุกต์ใช้เทคนิคต่าง ๆ ร่วมกัน ได้แก่ droplet-vitrification, encapsulation-dehydration และ encapsulation-vitrification เป็นต้น (Reed, 2008) งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาเทคนิคการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี vitrification ผลการวิจัยที่ได้สามารถนำไปใช้รองรับ สนับสนุน และวางแผนการอนุรักษ์พันธุกรรมเผือกในสภาพเยือกแข็ง ซึ่งเป็นการอนุรักษ์ระยะยาวควบคู่ กับการอนุรักษ์ในสภาพแปลงปลูกของกรมวิชาการเกษตร เพื่อความยั่งยืนและการใช้ประโยชน์เชื้อพันธุกรรมเผือกในอนาคตต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พืชทดลอง

รวบรวมพันธุ์เผือกหอม และไม่หอม อย่างละ 2 สายพันธุ์ จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร กรมวิชาการเกษตร เพื่อใช้ในการทดลอง ได้แก่ เผือกไข่ (P1) เผือกอ้อย (P2) เผือกหอม THA-104 (P3) และเผือกหอมพะเยา (P4) ศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและลักษณะของหัวที่แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์

2. ศึกษาการเพิ่มปริมาณยอดบนอาหารสูตรต่าง ๆ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (apical meristem)

2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำหัวพันธุ์เผือกทั้ง 4 สายพันธุ์ จากแหล่งรวบรวม (ข้อ 1) มาปลูกในโรงเรือน เมื่อต้นเผือกมีอายุ 3 เดือน นำต้นเผือกมาทำความสะอาดชิ้นส่วน โดยการล้างด้วยน้ำสบู่ และแช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ทำการตัดชิ้นส่วนตา (axillary bud) ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ 30% หยดสาร Tween 20 จำนวน 1-2 หยด ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ลอกชิ้นส่วนรอบนอกของตาออก และตัดส่วนของตาให้มีขนาดประมาณ 2-3 มม. เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS)

2.2 การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต

เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาเผือกในอาหาร MS นาน 6 สัปดาห์ จนเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ นำมาตัดเนื้อเยื่อปลายยอด (apical meristem) ให้มีขนาดเท่า ๆ กัน ประมาณ 5 มม. เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ กรดเบนซิลอะดีนิน (benzyladenine acid; BA) ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0, 3, 5 และ 7 มก./ล. ร่วมกับกลุ่มออกซิน ได้แก่ กรดแนพทาลีนแอซีติก (naphthalene acetic acid; NAA) ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0, 1 และ 2 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design จำนวน 4 ซ้ำ รวมเป็น 48 หน่วยทดลอง สำหรับเผือกแต่ละสายพันธุ์ โดย

ปัจจัยที่ 1 คือ ระดับความเข้มข้นของ BA จำนวน 4 ระดับ ได้แก่ 0, 3, 5 และ 7 มก./ล.

ปัจจัยที่ 2 คือ ระดับความเข้มข้นของ NAA จำนวน 3 ระดับ ได้แก่ 0, 1 และ 2 มก./ล.

บันทึกจำนวนยอดและการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง เป็นเวลานาน 16 สัปดาห์ นำข้อมูลจำนวนยอดที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

3. ศึกษาการเก็บรักษาปลายยอดเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrification

3.1 ทำการปรับสภาพ (preculture)

เผือกที่ทดสอบ จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ เผือกไข่ เผือกอ้อย เผือกหอม THA-104 และเผือกหอมพะเยา ตัดเนื้อเยื่อปลายยอดเผือกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต อายุประมาณ 4 สัปดาห์ ให้มีขนาดประมาณ 1.5-2 มม. สายพันธุ์ละ 200 ชิ้น แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 0.3 M ในสภาพมืด 12 ชม.

3.2 ทำการเก็บรักษาด้วยวิธี vitrification

โดยแช่ปลายยอดเผือกที่ทำการปรับสภาพแล้วในสาร loading solution (กลีเซอรอล ความเข้มข้น 2 M + น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 0.4 M) เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 ซ. จากนั้น นำไปแช่สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotectant) 2 ชนิด (Sakai *et al*., 1990) ได้แก่ PVS2 (Plant Vitrification Solution 2) ประกอบด้วย กลีเซอรอล ความเข้มข้น 30% + ไดเมททิล ซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO) ความเข้มข้น 15% + เอทิลีนไกลคอล ความเข้มข้น 15% + น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 0.4 M และ PVS3 (Plant Vitrification Solution 3) ประกอบด้วย กลีเซอรอล ความเข้มข้น 50% + น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 50% เปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ปลายยอดเผือกแต่ละพันธุ์แยกกันในสารแต่ละชนิด เป็นเวลา 0, 10, 20 และ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 ซ. หลังจากนั้น นำตัวอย่างทดลองแต่ละตัวอย่างใส่ใน cryotube แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลว จำนวน 20 ซ้ำ/กรรมวิธี/สายพันธุ์ โดยมีตัวอย่างปลายยอดเผือกที่จุ่มสาร cryoprotectant แต่ละชนิด แต่ไม่ได้แช่ไนโตรเจนเหลวเป็นชุดควบคุม

3.3 ตรวจสอบความรอดชีวิต

หลังจากการแช่ปลายยอดในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชม. นำ cryotube แช่ในน้ำอุณหภูมิ 40 ซ. (Thawing) 1-2 นาที เพื่อละลายตัวอย่าง แล้วล้างสาร cryoprotectant ด้วย unloading solution (น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 1.2 M) เป็นเวลา 10-15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 ซ. จากนั้น เพาะเลี้ยงปลายยอดเผือกบนอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 0.3 M เป็นเวลา 1 วัน แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 0.1 M เป็นเวลา 10 วัน จากนั้น ย้ายปลายยอดมาเลี้ยงบนอาหาร MS ต่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการรอดชีวิต (survival rate) ของปลายยอดเผือกจากแต่ละกรรมวิธี เปรียบเทียบชนิดของสาร cryoprotectant ได้แก่ PVS2 และ PVS3 และระยะเวลาในการแช่สาร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะตัวอย่างเผือกทดลอง

ลักษณะการเจริญเติบโต และลักษณะของหัวเผือกที่แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของเผือก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ เผือกหอม 2 สายพันธุ์

Table 1 Morphological characters of non aromatic taro (Phueak Khai and Phueak Aoi) and aromatic taro (Phueak Hom THA-104 and Phueak Hom Phayao) at vegetative and harvest stage

Cultivars	Phueak Khai	Phueak Aoi	Phueak Hom THA-104	Phueak Hom Phayao
Plant height	Medium (82.6 cm)	Medium (88.4 cm)	Medium (75.6 cm)	Medium (75.0 cm)
Predominant position (shape) of leaf lamina surface	Drooping position of anterior and posterior lobes	Cup-shaped	Cup-shaped	Flat, with drooping edge
Predominant orientation of lamina	Semi-vertical, tip pointing downwards	Vertical, tip pointing downwards	Vertical, tip pointing downwards	Vertical, tip pointing downwards
Leaf blade margin	Undulate	Undulate	Undulate	Undulate
Growth formation	Erect	Semi-erect	Semi-erect	Semi-erect
Leaf blade colour	Green (GG 138 A)	Green (GG N137 C)	Green (GG 137 B)	Green (GG 137 A)
Vein junction colour	Yellow (YG 2C)	Red (PGN 77A)	Green (WBG N92 A)	Green (YGGN 144C)
Leaf blade colour variegation	Absent	Absent	Absent	Absent
Basic colour of leaf petiole	Light green (YGG 145A)	Dark purple (PGN 77A)	Light green (GG 137C)	Light green (YGG 146B)
Presence of colour variations on petiole	Purple lines or stripes	Purple lines or stripes	Purple lines or stripes	Purple lines or stripes
Botanical variety	Dasheen	Dasheen	Dasheen	Dasheen
Maturity period	Late (8-10 month)	Late (8-10 month)	Late (8-10 month)	Late (8-10 month)
Stolons	absent	absent	plant with stolons only	absent
Number of stolons (side shoots)	None	None	8.2	None
Stolon length (cm)	-	-	24	-
Number of suckers (direct shoot)	11	10	12.6	17.8
Corm shape	Dumb-bell	Elongated	Conical	Conical
Corm weight at maturity (g)	340	590	446	126
Corm length (cm)	16.2	25.96	14.76	7.98
Corm diameter (cm)	7.47	6.57	8.61	5.08
Corm branching	Branched	Branched	Unbranched	Branched
Corm skin surface	Fibrous and scales present	Scales present	Fibrous and scales present	Fibrous
Corm esh colour (of central part)	Yellow (YG 10D)	colour is not uniform (with blotched of darker or lighter pigmentation) (PG 76G and WGN 144D)	White (WGN 155D)	Red purple (PG 75D)
Number of cormel per plant	37.8	27.6	58.4	111

คือ เผือกไข่ (P1) เผือกอ้อย (P2) และเผือกหอม 2 สายพันธุ์ คือ เผือกหอม THA-104 (P3) และเผือกหอมพะเยา (P4) (Table 1, Figure 1)

2. การเพิ่มปริมาณยอดบนอาหารสูตรต่าง ๆ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

การทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของเผือกทั้ง 4 สายพันธุ์ (เผือกไข่ เผือกอ้อย เผือกหอม THA-104 และเผือกหอมพะเยา) บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 16 สัปดาห์ พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 3-4 สัปดาห์ เนื้อเยื่อเริ่มมีการพัฒนาเป็นยอดจำนวนมาก (multiple shoots) มีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นไปในทิศทางเดียวกันทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสาร NAA และไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองกลุ่ม แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในการตอบสนอง

Table 2 Effect of BA and NAA on shoot multiplication from apical meristem explants of non aromatic taro after 16 weeks culture

	Non Aromatic Taro							
MS +	Phueak Khai				Phueak Aoi			
	NAA (mg/l)				NAA (mg/l)			
BA (mg/l)	0	1	2	mean	0	1	2	mean
0	1.45	1.91	1.71	1.69 c	1.45	1.21	1.63	1.43 c
3	6.17	4.89	5.88	5.65 b	4.63	3.68	3.05	3.79 b
5	8.34	9.57	10.25	9.39 a	5.77	8.37	9.19	7.78 a
7	7.97	7.39	6.97	7.44 a	6.52	6.42	7.35	6.76 a
mean	**5.98**	**5.94**	**6.20**	**6.04**	**4.59**	**4.92**	**5.31**	**4.94**
CV (%)	**15.66**				**16.98**			

Means within columns followed by a common letters are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 3 Effect of BA and NAA on shoot multiplication from apical meristem explants of aromatic taro after 16 weeks culture: Phueak Hom Doi Musoe and Phueak Hom Phayao

	Aromatic Taro							
MS +	Phueak Hom Doi Musoe				Phueak Hom Phayao			
	NAA (mg/l)				NAA (mg/l)			
BA (mg/l)	0	1	2	mean	0	1	2	mean
0	2.30	1.88	1.62	1.94 c	1.71	1.83	1.45	1.66 c
3	6.11	5.21	6.40	5.91 b	4.79	5.24	4.24	4.75 b
5	8.69	10.04	9.72	9.48 a	8.12	9.57	8.76	8.82 a
7	6.61	5.84	6.91	6.45 b	6.84	6.20	5.98	6.34 b
mean	**5.93**	**5.74**	**6.16**	**5.94**	**5.37**	**5.71**	**5.11**	**5.39**
CV (%)	**17.79**				**18.80**			

Means within columns followed by a common letters are not significantly different at 5% level by DMRT.

Figure 1 Characters of taro at vegetative stage; budding, leaf and tuber in non aromatic taro : Phueak Khai (A) and Phueak Aoi (B) and aromatic taro : Phueak Hom THA-104 (C) and Phueak Hom Phayao (D)

ต่อ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดย BA ที่ระดับความเข้มข้น 5 มก./ล. ทำให้เพิ่มปริมาณยอดของเผือกไข่และเผือกอ้อยมากที่สุดเฉลี่ย 9.39 และ 7.78 ยอด (Table 2) ขณะที่เผือกหอม THA-104 และเผือกหอมพะเยา มีปริมาณยอดเฉลี่ย 9.48 และ 8.82 ยอด (Table 3, Figure 2) ทั้งนี้ เนื่องจากสาร BA ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มไซโคไคนิน จะกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของยอดในสภาพปลอดเชื้อ (พีรเดช, 2537; Taiz and Zeiger, 1998) และนิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก การทดลองนี้ ให้ผลสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดในเผือก (Chung and Goh, 1994; Hutami and Purnamaningsih, 2013) และพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมาก (Acedo *et al*., 2018; Vaurasi and Kant, 2016)

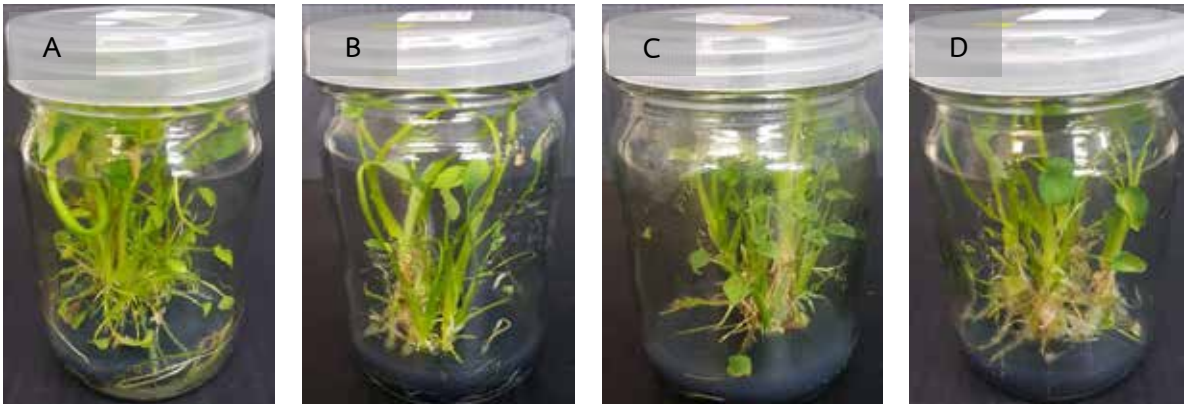

Figure 2 Shoot multiplication of taro on MS medium supplemented with 5 mg/l BA and 2 mg/l NAA in non aromatic taro : Phueak Khai (A) and Phueak Aoi (B) and MS medium supplemented with 5 mg/l BA and 1 mg/l NAA in aromatic taro : Phueak Hom THA-104 (C) and Phueak Hom Phayao (D) after 16 weeks

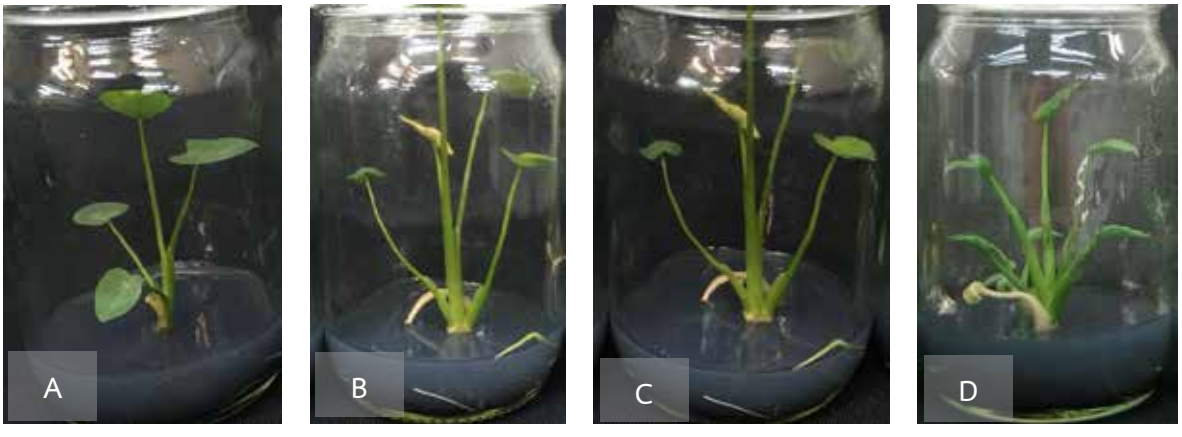

Figure 3 Characteristic of four taro explant varieties after cultured on MS medium for 4 weeks and shoot tip were used for vitrification method: Phueak Khai (A), Phueak Aoi (B), Phueak Hom THA-104 (C) and Phueak Hom Phayao (D)

สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอด เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากของเผือกไม่หอม (เผือกไข่ และเผือกอ้อย) คือ MS ที่เติม BA 5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 2 มก./ล. ชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 10.25 และ 9.19 ยอด ในขณะที่สูตรอาหารที่เหมาะสมของเผือกหอม (เผือกหอม THA-104 และเผือกหอมพะเยา) คือ MS ที่เติม BA 5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล ทำให้ได้ปริมาณยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 10.04 และ 9.57 ยอด ซึ่งสอดคล้องกันกับการทดลองของ Nath *et al.* (2012) ที่เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดเผือกนาน 10 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุดเฉลี่ย 3.66 ยอด/ชิ้นส่วน นอกจากนี้ ยังมีรายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน meristem domes ของเผือกบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 2 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุดเฉลี่ย 5.9 ยอด/ชิ้นส่วน (Ko *et al.*, 2008)

3. การเก็บรักษาปลายยอดเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrification

ลักษณะของต้นเผือกที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต อายุประมาณ 4 สัปดาห์ (Figure 3) ที่พร้อมตัดเนื้อเยื่อปลายยอดเผือกไปแช่สาร

cryoprotectant ผลการทดลองพบว่า เผือกทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ไม่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวมีอัตราการรอดชีวิต 100% และตัวอย่างที่ไม่มีการใช้สาร cryoprotectant PVS2 หรือ PVS3 (0 นาที) ก่อนการแช่ในไนโตรเจนเหลว จะไม่พบอัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดเผือก เนื่องจากสาร cryoprotectant PVS2 และ PVS3 ซึ่งมีองค์ประกอบของน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง สามารถป้องกันการเกิดอันตรายจากการเกิดผลึกเมื่อแช่ในสภาพเยือกแข็ง เพราะสาร cryoprotectant จะช่วยดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อพืช ซึ่งเป็นการปรับสภาพน้ำและแรงดันออสโมติคภายในเซลล์ เพื่อป้องกันการถูกทำลายเมื่ออยู่ในสภาพเยือกแข็ง (Cordova and Thammasiri, 2016)

จากผลการทดลอง พบว่า การเก็บรักษาปลายยอดเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี vitrification ระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่สาร PVS2 อยู่ในช่วง 20 - 30 นาที ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเผือก โดยเผือกไข่ ที่แช่สาร PVS2 นาน 30 นาที จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด (39.6%) แต่เผือกอ้อย เผือกหอมพะเยา และเผือกหอม THA-104 จะใช้เวลาในการแช่ PVS2 เพียง 20 นาที มีอัตราการรอดชีวิต 51.8, 39.6, และ 31.6% ตามลำดับ (Table 4) สอดคล้องกับรายงานของ Hong *et al.* (2009) ที่พบว่า ระยะเวลาในการแช่สาร cryoprotectant แตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์พืช โดยมีรายงานในพืชหลายชนิด เช่น การเก็บรักษาเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของวาซาบิด้วยวิธี encapsulation-vitrification พบว่า การแช่ในสารละลาย PVS2 นาน 30 และ 100 นาที สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตจาก 30 เป็น 95% (Matsumoto *et al.*, 1995) การเก็บรักษาปลายยอดของส้มด้วยวิธี encapsulation-vitrification เมื่อแช่ปลายยอดส้มในสารละลาย PVS2 ที่เวลา 90-180 นาที สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตเป็น 100% (Wang *et al.*, 2002) ขณะที่ Kim *et al.* (2006) พบว่า การเก็บรักษาปลายยอดมันฝรั่งด้วยวิธี droplet-vitrification โดยปรับสภาพน้ำภายในเซลล์ด้วย PVS2 นาน 20 นาที หลังจากแช่ไนโตรเจนเหลวแล้วล้างสาร cryoprotectant ด้วย unloading solution (น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 0.8 M) เป็นเวลา 30 นาที พบอัตราการรอดชีวิตอยู่ระหว่าง 64.0 - 94.4% จากทั้งหมด 12 ตัวอย่างพันธุ์ นอกจากนี้ในการเก็บรักษาปลายยอดของ *Kaempferia galanga* L. ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่ใกล้สูญพันธุ์ ด้วยวิธี vitrification โดยการแช่ใน loading

Table 4 Effect of cryoprotectant (PVS2 and PVS3) with different immersion times on the survival rate of cryopreserved taro shoot tip after thawing and culturing on MS medium for 4 weeks

Treatment	Survival rate (%)			
	Phueak Khai	Phueak Aoi	Phueak Hom THA-104	Phueak Hom Phayao
PVS2 (0 min) + LN2	0	0	0	0
PVS2 (10 min) + LN2	10.0	12.8	10.6	0
PVS2 (20 min) + LN_2	29.8	51.8	31.6	39.6
PVS2 (30 min) + LN2	39.6	51.8	34.6	19.8
PVS3 (0 min) + LN2	0	0	0	0
PVS3 (10 min) + LN2	10.0	25.6	21.1	10.0
PVS3 (20 min) + LN2	29.8	51.8	42.2	19.8
PVS3 (30 min) + LN2	49.5	64.1	52.7	59.5
PVS2 (0 min) - LN2 (control 1)	100	100	100	100
PVS3 (0 min) - LN2 (control 2)	100	100	100	100

+ LN_2 : Immersed in liquid nitrogen for 24 hr - LN_2 : Non-immersed in liquid nitrogen

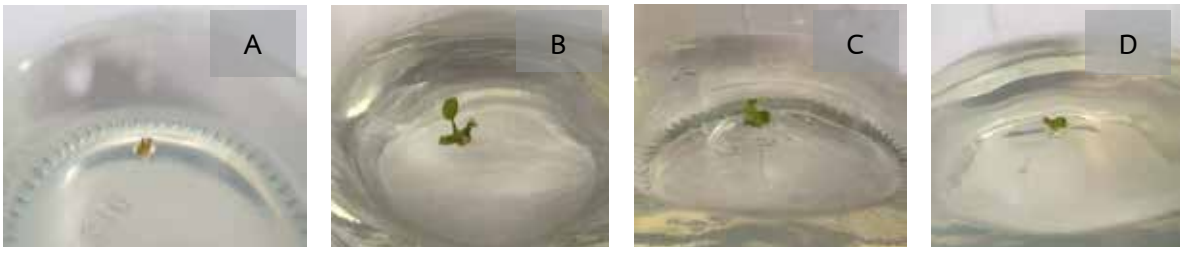

Figure 4 Shoot proliferation of 4 taro culture on MS medium for 10 days after shoot tip cryopreservation using vitrification method with PVS3 as cryoprotectant: Phueak Khai (A), Phueak Aoi (B), Phueak Hom THA-104 (C) and Phueak Hom Phayao (D)

solution และสารละลาย PVS2 อย่างละ 20 นาที จะทำให้มีอัตราการรอดชีวิต 50 - 60% (Preetha *et al*., 2013)

ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับแช่ปลายยอดเผือกในสาร PVS3 ที่อุณหภูมิ 25°ซ. นาน 30 นาที ก่อนนำไปแช่แข็ง และให้อัตราการรอดชีวิตของเผือกอ้อย เผือกหอมพะเยา เผือกหอม THA-104 และ เผือกไข่ มีอัตราการรอดชีวิต 64.1, 59.5, 52.7 และ 49.5% ตามลำดับ (Table 4, Figure 4) โดยองค์ประกอบของ cryoprotectant ของสารทั้ง 2 ชนิด มีความแตกต่างกันคือ ส่วนประกอบของสาร PVS3 จะมีความเข้มข้นของกลีเซอรอลและน้ำตาลซูโครสสูงกว่าสาร PVS2 (Kim *et al*., 2006; Sakai *et al.,* 1990) ซึ่งลักษณะดังกล่าว อาจส่งผลดีต่อการมีชีวิตและการพัฒนาเป็นต้นพืช เนื่องจากกลีเซอรอลส่งผลต่อการป้องกันเนื้อเยื่อพืช นอกจากนี้ สาร PVS2 มีองค์ประกอบของไดเมททิล ซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO) ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้ในการปรับสภาพเพื่อให้เซลล์ทนต่อสภาพอุณหภูมิต่ำ (Kartha *et al*.,1980) อย่างไรก็ตาม สาร DMSO เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ และรบกวนเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ให้เสียสมดุล ทำให้เกิดรูรั่วบนเยื่อหุ้มเซลล์ จึงส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เซลล์ทำลายตัวเอง (cell apoptosis) ได้ (Underwood *et al*., 2019; Yang *et al*., 2016) นอกจากนี้ ความเป็นพิษต่อเซลล์พืชจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสภาพอุณหภูมิที่สูงขึ้น (Best, 2015) ดังนั้น จึงอาจกล่าวได้ว่า สาร DMSO เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์พืชในระหว่างขั้นตอนการทำละลาย (Thawing) (Takagi *et al*., 1997) และอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การใช้ PVS2 มีอัตราความมีชีวิตรอดต่ำกว่าการใช้สาร PVS3 ซึ่งสอดคล้องกันกับการทดลองของ Sant *et al*. (2008) ที่อนุรักษ์ชิ้นส่วนปลายยอดเผือกด้วยวิธี droplet vitrification

สรุปผลการทดลอง

สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอด เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากของเผือกไข่และเผือกอ้อย (เผือกชนิดไม่หอม) คืออาหาร MS ที่เติม BA 5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 2 มก./ล. ทำให้ได้ปริมาณยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 10.25 และ 9.19 ยอด ในขณะที่สูตรอาหารที่เหมาะสมของเผือกหอม THA-104 และเผือกหอมพะเยา (เผือกชนิดหอม) คืออาหาร MS ที่เติม BA 5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล ให้ปริมาณยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 10.04 และ 9.57 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 16 สัปดาห์ และสาร cryoprotectant ที่เหมาะสำหรับการเก็บรักษาปลายยอดเผือกในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี vitrification คือ สาร PVS3 และเวลาที่เหมาะสมในการแช่ คือ 30 นาที ทำให้เผือกอ้อย เผือกหอมพะเยา เผือกหอม THA-104 และเผือกไข่ มีอัตราการรอดชีวิต 64.1, 59.5, 52.7 และ 49.5 % ตามลำดับ ทั้งนี้ เพื่อการใช้ประโยชน์จึงควรทำการศึกษาอัตราการเจริญเป็นพืชต้นใหม่ (regeneration of new shoot) หลังจากการแช่ปลายยอดเผือกในไนโตรเจนเหลวเพิ่มเติม

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นายทวีป หลวงแก้ว นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร กรมวิชาการเกษตร เป็น

อย่างยิ่ง ที่ให้การสนับสนุนเรื่องข้อมูลและตัวอย่างสำหรับการปฏิบัติงานวิจัย ขอขอบคุณสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร สถานที่ทำการวิจัย และคณะผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่สนับสนุนและร่วมงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2564. ระบบให้บริการข้อมูลสารสนเทศการผลิตทางด้านการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. แหล่งข้อมูล: http://production.doae.go.th/service/login. สืบค้น: 20 เมษายน 2564.

กรมศุลกากร. 2564. รายงานสถิติ กรมศุลกากร. แหล่งข้อมูล: http://www.customs.go.th/statistic__report.php. สืบค้น: 20 เมษายน 2564.

นิรนาม. 2557. เผือก. ฐานความรู้ด้านพืช กรมวิชาการเกษตร. แหล่งข้อมูล: http://www.doa.go.th/pl__data/TARO/STAT/st1.html. สืบค้น: 25 เมษายน 2560.

พีรเดช ทองอำไพ. 2537. *ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย*, พิมพ์ครั้งที่ 4, วี.บี. บุ๊คเซนเตอร์, ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ. 196 หน้า.

Acedo, V.Z., O.P. Damasco, A.C. Laurena, P.C. Sta Cruz, L.O. Namuco and A.G. Lalusin. 2018. Shoot tip splitting for rapid micropropagation of Philippine taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott). *Int. J. Adv. Agri. Res*. 6: 38-46.

Best, B.P. 2015. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Tssues and Questions. *Rejuvenation Res.* 18(5): 422-436.

Buitink, J. and O. Leprince. 2004. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. *Cryobiology* 48(3): 215-228.

Chung, R.C. and C.J. Goh. 1994. High frequency direct shoot regeneration from corm axillary buds and rapid clonal propagation of taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta* (L.) Schott (Araceae)). Plant Sci. 104: 93-100.

Cordova, L.B. and K. Thammasiri. 2016. Cryopreservation on a cryo-plate of *Arundina graminifolia* protocorms, dehydrated with silica gel and drying beads. *Cryo Lett.* 37(2): 68-76.

Engelmann, F. 2000. Development of cryopreservation techniques. pp. 8-20. *In:* Englemann, F. and Takagi, H. (eds.), Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm Current Research Progress and Application. IPGRI, Rome.

Hong, S., M. Yin; X. Shao, A. Wang and W. Xu. 2009. Cryopreservation of embryogenic callus of Dioscorea bulbifera by vitrification. *Cryo Lett.* 30(1): 64-75.

Hutami, S. and R. Purnamaningsih. 2013. Shoot multiplication of taro (*Colocasia* esculenta var. Antiquorum) through in vitro culture. Pages 35-40. *In:* Proceeding International Conference 2013 The 4th Green Technology. Faculty of Science and Technology, Islamic of University State Maulana Malik Ibrahim Malang, Indonesia.

Kartha, K.K., N.L. Leung and K. Pahl. 1980. Cryopreservation of plantlets. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 105: 481-484.

Kim, H.H., J.W. Yoon, Y.E. Park, E.G. Cho, J.K. Sohn, T.S. Kim and F. Engelmann. 2006. Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification. *Cryo Lett.* 27: 223-234.

Ko, C.Y., J.P. Kung and R. Mc Donald. 2008. In vitro micropropagation of white dasheen (*Colocasia esculenta*). *Afr. J. Biotechnol.* 7(1): 41-43.

Matsumoto, T., A. Sakai, C. Takahashi and K. Yamada. 1995. Cryopreservation of in vitro grown apical meristems of wasabi (*Wasadia japonica*) by encapsulation-vitrification method. Cryo Lett. 16: 189-196.

Mohanty, P., M.C. Das, S. Kumaria and P. Tandon. 2012. High-efficiency cryopreservation of the medicinal orchid *Dendrobium nobile* Lindl. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 109(2): 297-305.

Nath, V.S., M.S. alias Sankar, V.M. Hegde, M.L. Jeeva, R.S. Misra and S.S. Veena. 2012. A simple and efficient protocol for rapid regeneration and propagation of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott.) in vitro from apical meristems. *Int. J. Plant Dev. Biol.* 6(1): 64-66.

Preetha, T.S., A.S. Hemanthakumar and P.N. Krishnan. 2013. Shoot tip Cryopre servation by Vitrification in *Kaempferia galanga* L. An *endangered*, over exploited medicinal plant in Tropical Asia. *J. Pharm. Biol. Sci.* 8(3): 19-23.

Reed, B.M. 2008. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, Springer, New York. 542 p.

Sakai, A., S. Kobayashi and Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel organe (*Citrus sinensis* Osb. var. brasiliensis Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9(1): 30-33.

Sant, R., B. Panis, M. Taylor and A. Tyagi. 2008. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 92: 107-111.

Taiz, L. and E. Zeiger. 1998. Plant Physiology, in Chapter 21, 2nd Ed, Sinauer Associates, U.S.A. 792 p.

Takagi, H., N.T. Thinh, O.M. Islam and T. Senboku. 1997. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Reports.* 16: 594-599.

Underwood, L., J. Solocinski, E. Rosiek, Q. Osgood and N. Chakraborty. 2019. Active modulation of Hydrogen bonding by sericin enhances cryopreservation outcomes. brioRxiv. Available at: https://doi.org/10.1101/773721. Accessed: 29 August, 2019.

Vaurasi, V. and R. Kant. 2016. Effects of salinity and plant growth media on in vitro growth and development of taro (*Colocasia esculenta* L.) varieties. *Acta Horticulturae et Regiotecturae.* 1: 17-20.

Wang, J.K. 1983. Taro, a review of Colocacia esculenta and its potentials. University of Hawaii Press, Hawaii. 400 p.

Wang, Q., O. Batuman; P. Li, M.B. Joseph and R. Gafny. 2002. A simple and efficient cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of 'Troyer' citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] by encapsulation-vitrification. *Euphytica* 128: 135-142.

Yang, J., N. Cai, H. Zhai, J. Zhang, Y. Zhu and L. Zhang. 2016. Natural zwitterionic betaine enables cells to survive ultrarapia cryopreservation. Available at: www.nature.com/scientificreports. Accessed: 2 March, 2020.