เทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์หญ้าแฝกพันธุ์สงขลา 3 (*Vetiveria zizanioides* Nash) ในไนโตรเจนเหลว

Germplasm Preservation Technique of Vetiver Grass Variety Songkhla 3 (*Vetiveria zizanioides* Nash) in Liquid Nitrogen

ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ

Laddawan Moosikapala

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Doctor of Philosophy in Plant Science
Prince of Songkla University
2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ เทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์หญ้าแฝกพันธุ์สงขลา 3 (*Vetiveria zizanioides* Nash) ในไนโตรเจนเหลว

ผู้เขียน นางสาวลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ขวัญจิตร สันติประชา

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สนธิชัย จันทร์เปรม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ เทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์หญ้าแฝกพันธุ์สงขลา 3 (*Vetiveria zizanioides* Nash) ในไนโตรเจนเหลว

ผู้เขียน นางสาว ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ

สาขาวิชา พืชศาสตร์

ปีการศึกษา 2552

บทคัดย่อ

ทำการเตรียมชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกด้วยวิธีการต่าง ๆ ก่อนการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในระยะยาวและระยะปานกลาง พบว่า การหุ้มห่อชิ้นส่วนปลายยอด (ขนาด 3 มิลลิเมตร) ด้วยวุ้นอัลจิเนต (Sigma) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และแช่ในสารละลาย $CaCl_2$ เป็นเวลา 30 นาที ให้เม็ดบีดที่มีคุณภาพดี กลม สีใส และอัตราการสร้างยอดหลังจากนำไปเพาะเลี้ยงสูง 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 0.57 ยอดต่อชิ้นส่วน การ dehydration ชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 3 มิลลิเมตร ในจานเพาะเลี้ยงในตู้ larminar flow เป็นเวลา 0-5 ชั่วโมง ให้อัตรารอดชีวิต (100 เปอร์เซ็นต์) ไม่แตกต่างกัน การ vitrification ชิ้นส่วนขนาดเล็ก (1-2 มิลลิเมตร) ให้อัตราการสร้างยอด 25 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอดเฉลี่ย 2 ยอดต่อชิ้นส่วน การ pretreatment ชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 3 มิลลิเมตร ในอาหารเหลวสูตร ½ MS เติม glycerol เข้มข้น 0.3 โมลาร์ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นจึงแช่ในสารละลายโลดดิ้ง (loading solution: LS) เป็นเวลา 20 นาที และ PVS2 เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารสูตร MS เติมซูโครส 1.2 โมลาร์ เป็นเวลา 20 นาที ให้ความมีชีวิตสูงสุด 77.78 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน การแช่ชิ้นส่วนปลายยอดในสารละลาย LS ที่ประกอบด้วย glycerol เข้มข้น 2 โมลาร์ ร่วมกับ sucrose เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ร่วมกับเทคนิค vitrification โดยการแช่ปลายยอดในสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ให้อัตรารอดชีวิตสูงสุด 100% หลังเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว แม้ว่าวิธีการเตรียมชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกด้วยวิธีการต่าง ๆ ข้างต้นส่งผลให้ความมีชีวิตของชิ้นส่วนภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวมีสูงก็ตาม แต่ทุกชิ้นส่วนไม่สามารถที่จะพัฒนาสร้างยอดใหม่ได้หลังการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมของหญ้าแฝกด้วยวิธีการนี้จึงไม่เหมาะสม

การเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกในระยะปานกลางโดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร ¼ MS เติมพาโคลบิวทราโซล เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 เดือนโดยไม่มีการย้ายเลี้ยง ให้อัตราการสร้างยอดรวม และจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 75 เปอร์เซ็นต์และ 3.76 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ และความยาวยอด 2-6 มิลลิเมตร ในสภาพการเพาะเลี้ยงปกติ (อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส) จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมต้นที่ผ่านการเก็บรักษาในระยะปานกลางโดยใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 7 ไพรเมอร์ พบว่า มีจำนวน 3 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหญ้าแฝกได้ แถบดีเอ็นเอของต้นที่ผ่านการเก็บรักษาในหลอดทดลองเหมือนกับต้นควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บรักษา แสดงว่าไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม

Thesis Title	Germplasm Preservation Technique of Vetiver Grass Variety Songkhla 3 (*Vetiveria zizanioides* Nash) in Liquid Nitrogen
Author	Miss Laddawan Moosikapala
Major Program	Plant Science
Academic Year	2009

ABSTRACT

Shoot tip explants of vetiver grass were prepared in several methods before preservation in medium and long term in liquid nitrogen. Embeding of shoot tips (at approx. size of 3 mm) in 3% sodium alginate (from Sigma Co. Ltd.) in the presence of $CaCl_2$ gave a good quality of bead formation. Conversion rate of shoot to plantlet after transfer to shoot multiplication medium (SMM) was 70%. Dehydration of shoot tips at size of 3 mm in laminar flow station for 0-5 h gave non significant difference in survival percentage at 100. Pretreatment of shoot tips in liquid ½ MS in the presence of 0.3 M glycerol on orbital shaker at 100 rpm for 3 days subsequent to soak in loading solution (LS) for 20 min and PVS2 for further 20 min then plunged in liquid nitrogen resulted in the highest survival rate of the shoot tips at 77.78% after thawing in thermal bath at 40±1^{o}C for 2 min, followed by washing with basal MS medium with 1.2 M sucrose for 20 min and cultured on SMM for 4 days. Improved protocol by soaking shoot tips in LS with 2 M glycerol and 0.4 M sucrose in combination with vitrification in PVS2 for 1 h gave 100 percent survival rate after storage in liquid nitrogen for 1 h. Eventhough many techniques of shoot tip preparation gave the best survival rate but growth and development of shoot tips after culturing on SMM was not obtained. This indicated that germplasm storage of shoot tips of vetiver grass in liquid nitrogen, so far, is not success by our protocol.

Medium-term of germplasm storage by culturing on ¼ MS medium supplemented with 3 mg/l paclobutrazol for 12 months without subculture provided the highest conversion rate of shoot tip at 75% and number of shoots at 3.76 shoots/shoot

tip. The length of survive shoots was not exceed 6 mm. Analysis of genetic variation of preserved shoots by RAPD technique revealed that 3 primers out of 7 primers gave the clear uniform or monomorphism of DNA profiles. By this protocol of medium-term preservation there is no variation of shoot occur.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(11)
รายการรูป	(13)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	5
วัตถุประสงค์	15
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	16
3. ผล	34
4. วิจารณ์	58
5. สรุป	68
เอกสารอ้างอิง	70
ภาคผนวก	79
ประวัติผู้เขียน	85

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกที่ผ่านการแช่ในสารละลาย PVS2	34
2	ผลของอุณหภูมิและเวลาในการละลายน้ำแข็งต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว	35
3	ผลของระยะเวลาในการแช่ในสารละลาย PVS2 ต่อความมีชีวิตและการสร้างยอดของชิ้นส่วนปลายยอดที่แช่และไม่แช่ในไนโตรเจนเหลว	36
4	ผลของการ pretreatment ร่วมกับเทคนิค vitrification ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว	37
5	ผลของระยะเวลาในการ loading treatment ร่วมกับเทคนิค vitrification ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว	38
6	ผลของอุณหภูมิและชนิดของสารละลาย PVS ต่อการสร้างยอดของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกก่อนและหลังเก็บในไนโตรเจนเหลว	39
7	ผลของขนาดชิ้นส่วนปลายยอดต่อการสร้างยอดก่อนและหลังเก็บในไนโตรเจนเหลว	40
8	ผลขององค์ประกอบสารละลาย cryoprotectants ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝก	42
9	ผลของ glycerol และชนิดของน้ำตาลต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกก่อนและหลังแช่ในไนโตรเจนเหลว หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน	43
10	ผลของระยะเวลาในการ dehydration ต่อน้ำหนักและความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว	44
11	ผลของการ pretreatment ร่วมกับเทคนิค dehydration ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว	44
12	ผลของระยะเวลาในการ loading treatment ร่วมกับเทคนิค dehydration ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว	45
13	ผลของความเข้มข้นวุ้นอัลจิเนตต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว	46

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	ผลของชนิดและความเข้มข้นของวุ้นอัลจิเนตต่อการสร้างยอดของชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร MS เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	47
15	ผลของการ pretreatment ร่วมกับเทคนิค encapsulation ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว	48
16	ผลของระยะเวลาในการ loading treatment ร่วมกับเทคนิค dehydration ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว บนอาหารสูตร MS เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์	48
17	ผลของสภาพการเพาะเลี้ยงต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว	49
18	ผลของระยะเวลาการ dehydrated ในตู้ laminar flow ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดที่ผ่านการหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนต หลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว	50
19	ผลของความเข้มข้นของธาตุอาหารและพาโคลบิวทราโซลต่อการสร้างยอด จำนวน ยอดต่อชิ้นส่วนและความยาวยอดในการเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดในหลอดทดลองเป็นเวลา 2 และ 12 เดือน	53
20	ผลของสภาพการเก็บรักษาร่วมกับอาหาร 1/4 MS เติมพาโคลบิวทราโซลในการเก็บชิ้นส่วนปลายยอดในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 12 เดือน	55

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	การสร้างยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดที่ผ่านการแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลาต่าง ๆ บนอาหารสูตร MS เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก) ไม่แช่ในไนโตรเจนเหลว (ข) แช่ในโตรเจนเหลว	37
2	ยอดที่พัฒนาจากชิ้นส่วนปลายยอดที่ผ่านการแช่ในสารละลาย PVS2 และ PVS3 ที่อุณหภูมิ 5 และ 25 องศาเซลเซียส บนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์	40
3	ลักษณะยอดที่พัฒนาจากชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 1-2 มิลลิเมตร (ก) และ 3-5 มิลลิเมตร (ข) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์	41
4	ลักษณะของเม็ดบีดจากการหุ้มชิ้นส่วนปลายยอดด้วยวุ้นอัลจิเนตยี่ห้อต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์	47
5	ชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากผ่านการเตรียมชิ้นส่วนด้วยเทคนิคต่าง ๆ (ก) ชุดควบคุม (ข) vitrification, dehydration และ encapsulation และเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 เดือน	51
6	ลักษณะของยอดที่พัฒนาจากชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการเติมพาโคลบิวทราโซลความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน	54
7	ยอดที่พัฒนาจากชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารเติม MS ร่วมกับ PBZ เป็นเวลา 12 เดือน	56
8	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPJ4 (ก) OPN15 (ข) และ OPAB09 (ค) ในต้นหญ้าแฝกที่เก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในหลอดทดลองในสภาพชะลอการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (DNA ladder) เลนที่ 1 เป็นต้นควบคุม เลน 2-7 เป็นดีเอ็นเอตัวอย่างที่เก็บรักษา	57

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

หญ้าแฝก (vetiver grass) เป็นพืชตระกูลหญ้าชนิดหนึ่งเช่นเดียวกับ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง อ้อย และตะไคร้ มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย อย่างไรก็ตาม พบว่ามีการกระจายอยู่ทั่วไปในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย ปัจจุบันในทางพฤกษศาสตร์ สามารถจำแนกหญ้าแฝกที่พบในประเทศไทยได้เป็น 2 ชนิดตามสภาพที่มีการเจริญเติบโต หรือ ecotype ได้แก่ หญ้าแฝกหอม หรือแฝกลุ่ม (*Vetiveria zizanioides* Nash) และหญ้าแฝกดอน (*Vetiveria menoralis*) หญ้าแฝกเป็นพืชที่มีประโยชน์และสามารถใช้ประโยชน์ได้หลากหลายโดยเฉพาะหญ้าแฝกหอม รากของหญ้าแฝกมีการแผ่กระจายลึก และลักษณะเป็นร่างแห ทำให้นำมาใช้ในการอนุรักษ์ดินและน้ำ (Vietmeyer and Ruskin, 1993) พื้นที่ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวมทั้งภาคใต้ของประเทศไทย เป็นพื้นที่ลาดเอียง หรือภูเขาอยู่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีความเสี่ยงต่อการชะล้างพังทะลายของหน้าดินอันเนื่องมาจากการกัดเซาะของน้ำฝนที่รุนแรงมาก ทำให้หน้าดินเกิดความเสียหายอย่างมาก (Vietmeyer, 1996) การแก้ปัญหาที่ผ่านมาเป็นการปลูกพืชต่าง ๆ เพื่อป้องกันการชะล้าง หรือพังทะลายของหน้าดิน และการปลูกพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจขวางแนวลาดชัน อย่างไรก็ตาม พืชที่ปลูกมีระบบรากไม่ดี ทำให้การยึดเกาะดินไม่ดีจึงยังคงทำให้หน้าดินเกิดความเสียหาย พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชได้ทรงตระหนักถึงสภาพปัญหาและสาเหตุที่เกิดขึ้นและทรงเห็นถึงศักยภาพของหญ้าแฝก จึงมีพระมหากรุณาธิคุณพระราชทานพระราชดำริให้มีการดำเนินการศึกษาทดลองเกี่ยวกับหญ้าแฝก นอกจากนี้ รากของหญ้าแฝกยังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดน้ำมันหอมระเหย ประดิษฐ์หัตถกรรมต่าง ๆ (Vietmeyer, 1996) เนื่องจากหญ้าแฝกบางชนิดไม่มีดอก ส่วนที่มีดอกก็ไม่สามารถขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดได้ดี เนื่องจากมีความงอกต่ำและสูญเสียความงอกเร็ว จึงขยายพันธุ์ด้วยการแยกหน่อ และมีการแจกต้นเพื่อปลูกในพื้นที่เป้าหมาย โดยสำนักงานพัฒนาที่ดิน อย่างไรก็ตาม ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการ นอกจากนี้ในสภาพธรรมชาติหญ้าแฝกจะมีช่วงการแตกหน่อในฤดูฝนและจะมีการออกดอกตั้งแต่ช่วงกลางฤดูฝนถึงปลายฤดูฝน และจะเข้าสู่ระยะพักตัวในฤดูแล้งและฤดูร้อน การขยายพันธุ์หน่อหญ้าแฝกให้ได้ปริมาณมาก โดยทั่วไปทำได้ 2 วิธี คือ วิธีการแยกหน่อที่เจริญมาจากตาข้างที่โคนกาบใบของหน่อแก่ อีกวิธีคือ การแยกหน่อตะเกียง ซึ่งเจริญมาจากตาข้างที่ก้านช่อดอกแก่ข้ามปี โดยนำหน่อ

ดังกล่าวมาเพาะชำในถุงพลาสติกดำที่ใส่วัสดุเพาะชำที่มีการระบายน้ำและถ่ายเทอากาศดี ดูแลเพาะชำในสภาพที่มีความชุ่มชื้น มีการพรางแสงที่เหมาะสมตามระยะเวลาการเจริญเติบโต หรือปลูกลงดินในแปลงขนาดใหญ่ ซึ่งจะได้หน่อปริมาณมากแต่ต้องใช้น้ำ และยังมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมธรรมชาติเป็นตัวแปรปรวน ดังนั้นจึงได้นำเทคนิคการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มต้นพันธุ์ได้ตลอดฤดูกาล และการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีการควบคุมสภาพแวดล้อม แสง และอุณหภูมิในการเจริญเติบโต ทำให้ได้ต้นกล้าจำนวนมาก มีขนาดสม่ำเสมอ แข็งแรงเหมือนเดิม ต้นกล้ามีขนาดเล็กขนย้ายไปปลูกได้สะดวก เป็นต้นกล้าที่มีอายุน้อย ซึ่งอยู่ในระยะที่มีการเจริญเติบโตทางต้น มีอัตราการแตกหน่อสูง ซึ่งจะมีผลดีต่อการปลูกหญ้าแฝกเป็นแนวอนุรักษ์ที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และสม่ำเสมอ (สำนักงานคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ, 2539) มีรายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของหญ้าแฝกผ่านการสร้าง compact callus หรือกระบวนการ organogenesis จากชิ้นส่วนดอก (Keshavachandran and Khader, 1997) ชิ้นส่วนใบ (Mucciarelli *et al*., 1993; Sreenath *et al*., 1994; Leupin *et al*., 2000) ชิ้นส่วน mesocotyl ของต้นกล้า (George and Subramanian, 1999) และจากเหง้า (crown) (Leupin *et al*., 2000; Prasertsongskun, 2003) ซึ่งต้นในหลอดทดลองเป็นทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มปริมาณต้นให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาสั้น และยังใช้เป็นวัสดุเริ่มต้นที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ในการสร้างเมล็ดเทียม การปรับปรุงพันธุ์ หรือการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ต่อไป

ปัจจุบันนี้มีพันธุ์พืชจำนวนมากได้สูญพันธุ์ไปแล้ว และอีกจำนวนไม่น้อยที่กำลังจะสูญพันธุ์ไป ทั้งนี้เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของธรรมชาติบ้าง มนุษย์หรือสัตว์เข้าทำลายบ้าง ทั้งที่ตั้งใจหรือไม่ตั้งใจ เช่น การทำลายป่าหรือทำไร่เลื่อนลอย หรือทำลายสภาพแวดล้อม ซึ่งเป็นที่น่าเสียดาย โดยเฉพาะพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ หรือใช้ปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต ดังนั้นการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชที่กำลังสูญพันธุ์หรือมีจำนวนน้อยหรือแม้กระทั่งพืชที่มีความสำคัญ จึงมีความจำเป็น โดยทั่วไปมีการเก็บรักษาในสวนพฤกษศาสตร์วนอุทยาน โดยพยายามจัดให้สภาพแวดล้อมเหมือนเดิม และป้องกันไม่ให้ถูกทำลายจากมนุษย์หรือสัตว์ แต่อย่างไรก็ตาม ความเสี่ยงในการสูญเสียพืชเหล่านั้นยังมีอยู่อีกมาก เช่น ถูกลักขโมย ถูกภัยธรรมชาติคุกคามจากการเกิดโรคและแมลงระบาดที่ไม่สามารถป้องกันได้ น้ำท่วม ไฟป่า หรือเกิดฟ้าผ่า เป็นต้น นอกจากนี้การเก็บรักษาโดยวิธีนี้จะสิ้นเปลืองแรงงานและค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมากในระยะเวลายาวนาน

พืชประมาณ 20,000 ชนิด ที่หาได้ยากและกำลังสูญพันธุ์ เช่น พืชพันธุ์พื้นเมืองหลายชนิด โดยเฉพาะข้าวสาลีถูกทอดทิ้งและสูญหายไป เช่นประเทศกรีซนับตั้งแต่สงครามโลก

ครั้งที่ 2 ข้าวสาลี 95 เปอร์เซ็นต์ ของสายพันธุ์ถูกทอดทิ้งและบางส่วนสูญหายไป (Pluck and Vaughan, 1991 อ้างโดย Bajaj 1995) ทำให้สูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม ในทางตรงข้ามการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ข้าวได้รับความสำคัญ อย่างไรก็ตาม มีการสูญหายของสายพันธุ์ป่าในระหว่างการพัฒนาของโครงการต่าง ๆ และการทำลายข้าวโพดของเชื้อ *Helminthosporium maydis* ในปี 1970s ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชพยายามหาแหล่งพันธุกรรมพืชที่นอกเหนือจากแหล่งธรรมชาติ การเก็บรักษาโดยทั่วไปเก็บในรูปต่าง ๆ เช่น เมล็ด tubers ราก bulbs corms rhizomes ตา กิ่งพันธุ์ อย่างไรก็ตาม มีข้อจำกัดในไม้ผลที่มีเมล็ดแบบ recalcitrant และเอ็มบริโอสูญเสียการงอกอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้พืชที่ขยายพันธุ์โดยไม่ใช้เพศไม่สามารถเก็บรักษาระยะยาวได้ ต้องนำมาปลูกเพิ่มปริมาณในเรือนเพาะชำหรือในแปลงปลูก ซึ่งสภาพอากาศไม่แน่นอนหรือโรค แมลง หรืออื่น ๆ ทำให้เชื้อพันธุ์สูญหาย โดยเฉพาะในไม้ยืนต้นไม่สามารถเก็บรักษาในระยะยาวได้ เนื่องจากต้องใช้แรงงานและค่าใช้จ่ายสูง และมีปัญหาในโรคและสภาวะเครียดจากสภาพแวดล้อม (Matsumoto *et al*., 2001) ด้วยเหตุนี้จึงมีการพัฒนาวิธีการเก็บรักษา การดูแลรักษา การแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์ และสร้างธนาคารยีนในพืชที่หายากหรือใกล้สูญพันธุ์ โดยนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ประโยชน์ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ โดยเก็บรักษาในอาหารเพาะเลี้ยงที่ให้มีการเจริญเติบโตต่ำ หรือลดความถี่ในการย้ายเลี้ยง เช่น เพาะเลี้ยงในอาหารที่ลดองค์ประกอบของอาหารลง หรือเติมสารชะลอการเจริญเติบโต เช่น abscisic acid (ABA) การลดความชื้น เป็นต้น ซึ่งวิธีการดังกล่าวทั้งหมดสามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลาสั้นถึงปานกลาง ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาปลายยอดในพืชหลายชนิดรวมทั้งพืชที่มีรากและหัวและไม้ผลและพืชสวนอื่น ๆ หลายชนิด การเก็บรักษาระยะเวลาปานกลางสามารถเก็บได้เป็นระยะเวลาประมาณ 10 ปี อย่างไรก็ตามการ เก็บรักษาด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องย้ายเลี้ยงไปยังอาหารใหม่ และอาจมีการปนเปื้อน นอกจากนี้การย้ายเลี้ยงเพื่อรักษาต้นพันธุ์เป็นระยะเวลานานอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม (Panis *et al*., 2004) ปัจจุบันนี้วิธีที่มีศักยภาพในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในระยะยาวคือ cryopreservation ซึ่งเป็นการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียส อุณหภูมิดังกล่าวหยุดกิจกรรมทุกอย่างของเซลล์ สามารถเก็บรักษาชิ้นส่วนเป็นระยะเวลานานโดยเซลล์ไม่ตาย และพันธุกรรมไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อต้องการที่จะทำให้เซลล์กลับมามีกิจกรรมเหมือนเดิมก็เพิ่มอุณหภูมิให้เซลล์กลับมามีกิจกรรมตามปกติ การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ และสร้างธนาคารยีนในพืชที่หายากหรือใกล้สูญพันธุ์ หรือเก็บรักษาพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ตลอดจนเป็นการกำจัดเชื้อโรคที่ทำลายพืชในธรรมชาติ เช่น cucumber mosaic virus (CMV) และ banana streak virus (BSV) ในกล้วย หลังจากเก็บรักษา

เนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด พบว่า ให้ต้นที่ปลอด CMV 30 เปอร์เซ็นต์ และ BSV 90 เปอร์เซ็นต์ (Helliot *et al*., 2002) ตลอดจนเก็บรักษาพันธุกรรมพืชที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ (Bajaj, 1995) เพื่อนำมาใช้ในการขยายพันธุ์ได้เมื่อต้องการหรือเพื่อการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์ หรือเป็นเชื้อพันธุ์เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป เช่น Cornejo และคณะ (1995) ประสบความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของข้าว พันธุ์ Thaipei 309 ที่ได้จากการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์โดย cryopreservation โดยการเก็บรักษาไม่ทำให้ความสามารถในการปลูกถ่ายยีนหรือการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ลดลง อย่างไรก็ตาม การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้ใช้อุณหภูมิต่ำมาก การแช่ชิ้นส่วนลงในไนโตรเจนเหลวโดยตรงทำให้เซลล์พืชได้รับความเสียหายและตายได้ การเก็บรักษาในระยะแรก (conventional freezing method) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน (two-step procedure) โดยขั้นแรกเป็นการลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ (slow cooling) 0.5-1 องศาเซลเซียสต่อนาที จนอุณหภูมิประมาณ –40 องศาเซลเซียส และเข้าสู่ขั้นตอนที่สอง โดยจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที (rapid cooling) ต้องใช้เครื่องมือควบคุมโปรแกรมการลดอุณหภูมิ ซึ่งยุ่งยากและราคาแพง (Vicient and Martinez, 1998) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ ในการเตรียมชิ้นส่วนก่อนการเก็บรักษาโดยการปรับปริมาณน้ำให้เหมาะสม ให้เซลล์มีการปรับสภาพ และสามารถทนต่อสภาพเย็นได้โดยเซลล์ไม่ตายและพันธุกรรมไม่เปลี่ยนแปลง การเตรียมชิ้นส่วนพืชโดยการลดปริมาณน้ำก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวโดยตรง ได้แก่ วิธี vitrification, dehydration และ encapsulation หรือใช้วิธีร่วมกัน

ในกรณีของหญ้าแฝกนั้นแหล่งพันธุกรรม (germplasm) ก็คือต้นหญ้าแฝกที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในสภาพธรรมชาตินั้น ๆ (หรือตาม ecotype) เช่น ในทุ่งหญ้า ในบึง ตามภูเขาสูง บนดินที่มีสภาพเป็นกรด (Chomchalow, 2003) การเก็บรักษาพันธุกรรมในแปลงปลูก หรือในสภาพธรรมชาติโดยกรมพัฒนาที่ดิน หรือหน่วยงานอื่น ๆ ของรัฐ กรมพัฒนาที่ดิน (2541) รายงานว่า หญ้าแฝกหอมที่พบขึ้นอยู่ทั่วไปในสภาพธรรมชาตินั้น มีการกระจายขึ้นอยู่ในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ มีการปรับตัวเองให้เหมาะสมกับพื้นที่นั้น มีช่อดอกหลายช่อ และเกิดการผสมข้ามต้นทุกปี ทำให้มีความแข็งแรงขึ้นในลักษณะต่าง ๆ ในด้านพันธุกรรม ทนทานต่อโรค และปัจจัยวิกฤตของภูมิอากาศในท้องที่นั้น ๆ แต่ขณะเดียวกันก็ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยเฉพาะพันธุ์ปลูกเพื่อใช้รากสกัดน้ำมันหอมระเหยทำให้สารหอมระเหยมีปริมาณลดลงหรือมีปริมาณไม่คงที่ นอกจากนี้ การเก็บรักษาด้วยวิธีดังกล่าวต้องใช้พื้นที่มาก เสียค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาสูง ทุกปีจะต้องมีการรื้อแปลงปลูกเพื่อปลูกใหม่ ทำให้มีความยุ่งยากเสี่ยงต่อการสูญเสียพันธุกรรม ดังนั้นการเก็บรักษาพันธุกรรมของหญ้าแฝกที่มีระบบรากที่ดีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอด

ทดลองในสภาพต่าง ๆ เป็นการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในระยะเวลาปานกลาง หรือเก็บในระยะยาวโดยการเก็บในไนโตรเจนเหลว เพื่อให้มีแหล่งเชื้อพันธุ์ที่ดี และไม่กลายพันธุ์และสามารถที่จะนำมาใช้เป็นวัสดุพืชเริ่มต้นเพื่อการขยายพันธุ์อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป ไม่ต้องไปเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงตั้งแต่ขั้นต้นใหม่ โดยทำการเตรียมชิ้นส่วนปลายยอดก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีการที่ทำได้ง่าย สะดวก และประสบผลสำเร็จในพืชหลายชนิด ได้แก่ การปรับสภาพของน้ำระหว่างเซลล์และออสโมติคของเซลล์ (vitrification) การดึงน้ำออกจากเซลล์บางส่วน (dehydration) หรืออาจนำเอาเทคนิคการหุ้มห่อชิ้นส่วนที่จะเก็บรักษาในวุ้นอัลจิเนต (encapsulation) เพียงลำพังหรือร่วมกัน

การตรวจเอกสาร

1. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์โดยวิธี cryopreservation

ปัจจุบันนี้วิธีที่มีศักยภาพในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในระยะยาวคือ cryopreservation ซึ่งเป็นการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียส อุณหภูมิดังกล่าวหยุดกิจกรรมทุกอย่างของเซลล์ ไม่มีกระบวนการ biophysical หรือการเคลื่อนที่ของน้ำ (Morris, 1981) ความมีชีวิตของชิ้นส่วนจึงไม่เปลี่ยนแปลงตลอดช่วงการเก็บในไนโตรเจนเหลว ส่วนความเสี่ยงต่อความมีชีวิตหรือความแปรปรวน เกิดขึ้นเฉพาะในช่วงของกระบวนการแช่ในไนโตรเจนเหลว (critical cooling) และช่วงของการละลายน้ำแข็ง ซึ่งถ้าไม่เหมาะสมจะทำให้เกิดความเสียหายแก่ชิ้นส่วน ดังนั้นการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในสภาพนี้สามารถเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานโดยเซลล์ไม่ตาย และพันธุกรรมไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อต้องการที่จะทำให้เซลล์กลับมามีกิจกรรมเหมือนเดิมก็เพิ่มอุณหภูมิให้เซลล์กลับมามีกิจกรรมตามปกติ นอกจากนี้ การเก็บด้วยวิธีนี้ใช้พื้นที่น้อย สามารถป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ มีการดูแลรักษาน้อย และเป็นการลดต้นทุนในการเก็บรักษา และสามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในธนาคารยีนสำหรับพืชที่หายากหรือใกล้สูญพันธุ์ ตลอดจนเก็บรักษาพันธุกรรมพืชที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ (Bajaj, 1995) เพื่อนำมาใช้ในการขยายพันธุ์ได้เมื่อต้องการหรือเพื่อการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์ หรือเป็นเชื้อพันธุ์เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป โดยทั่วไปการเก็บรักษาด้วยวิธี cryopreservation เหมาะสำหรับพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยส่วนร่างกาย (vegetatively propagated plant) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ค่อนข้างจำกัดในพืชชนิด recalcitrant seed เนื่องจากลักษณะบางอย่าง เช่น การไม่ทนต่อการสูญเสียน้ำ มีโครงสร้างซับซ้อน และลักษณะ heterogeneity ในช่วงของ

พัฒนาการ และมีองค์ประกอบของน้ำมากในช่วง maturity (Rao, 2004) สำหรับวัสดุที่สามารถนำมาเก็บรักษาด้วยวิธีการนี้ เช่น เซลล์ โปรโตพลาสต์ ชิ้นส่วนปลายยอด โซมาติคเอ็มบริโอ เมล็ด หรือ ไซโกติคเอ็มบริโอ Vicient และ Martinez (1998) รายงานว่า ชนิดและระยะพัฒนาการของชิ้นส่วนที่นำมาเก็บรักษามีผลต่อความสำเร็จในการเก็บรักษา โดยปริมาณน้ำในเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วน จำนวนและขนาดของแวคิวโอล ส่งผลต่อการทนต่ออุณหภูมิต่ำ เซลล์ที่มีจำนวนและแวคิวโอลขนาดเล็กทนต่ออุณหภูมิต่ำมากกว่าเซลล์มีขนาดและจำนวนแวคิวโอลมาก (Uragami, 1991) อย่างไรก็ตาม การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้ใช้อุณหภูมิต่ำมาก การแช่ชิ้นส่วนลงในไนโตรเจนเหลวโดยตรงทำให้เซลล์พืชได้รับความเสียหายและตายได้ ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคในการเตรียมชิ้นส่วนก่อนการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยการปรับปริมาณน้ำให้เหมาะสม ให้เซลล์มีการปรับสภาพ และสามารถทนต่อสภาพเย็นได้โดยเซลล์ไม่ตายและพันธุกรรมไม่เปลี่ยนแปลง และสามารถแช่ในไนโตรเจนเหลวได้โดยตรงโดยไม่ต้องใช้เครื่องควบคุมการลดอุณหภูมิ ได้แก่ เทคนิค vitrification ซึ่งกระบวนการในเทคนิคนี้มีการดึงน้ำที่จะเกิดการแข็งตัวเมื่ออุณหภูมิลดลงออกเป็นส่วนใหญ่หรือทั้งหมดจากชิ้นส่วนด้วยวิธีทางกายภาพ (physical) หรือ osmotic dehydration โดยจะทำให้ภายในเซลล์เกิดการแข็งตัวในลักษณะไม่เป็นผลึกน้ำแข็ง (amorphous glassy structure) vitrification เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงสุดเนื่องจากมีการปรับใช้ในเก็บรักษาชิ้นส่วนต่าง ๆ ได้ง่ายและกว้างขวาง และให้อัตราการรอดชีวิตหลังการเก็บรักษาได้สูง (Matsumoto *et al*., 2001; Pennecooke and Towill 2000; Thinh *et al*., 2000; Reinhoud *et al*., 1995; Ishikawa *et al*., 1996) เทคนิคนี้เหมาะสำหรับอวัยวะที่ซับซ้อนอย่างเอ็มบริโอ และปลายยอด (Rao, 2004) นอกจากนี้มีการดัดแปลงเพื่อใช้ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ด้วยวิธี cryopreservation โดยใช้กระบวนการของเทคนิค vitrification เป็นพื้นฐาน จำนวน 7 เทคนิค ได้แก่ (1) encapsulation-dehydration (2) vitrification (3) encapsulation-vitrification (4) desiccation (5) pregrowth (6) pregrowth-desiccation และ (7) droplet freezing (Engelmann, 2000) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เทคนิคที่ประสบผลสำเร็จในพืชหลายชนิดในปัจจุบัน คือ vitrification, encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration

เทคนิคที่พัฒนาใหม่นี้มีการดัดแปลงเพื่อนำไปใช้และประสบความสำเร็จในพืชมากกว่า 80 ชนิด (Engelmann, 1997; Reinhoud *et al*., 2000; Takagi, 2000) อย่างไรก็ตามมีรายงานการใช้เทคนิคนี้เพื่อเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในระยะยาวค่อนข้างจำกัดมีเฉพาะในปาล์มน้ำมันและมันฝรั่ง (Engelmann, 1997) เทคนิค vitrification นี้มีการใช้สารป้องกันความเย็น (cryoprotectants) ป้องกันความเสียหายเนื่องจากความเย็นหรือป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งเมื่อ

อุณหภูมิต่ำมาก โดยทั่วไปสารที่นำมาใช้ต้องมีคุณสมบัติดังนี้ 1. น้ำหนักโมเลกุลต่ำ 2. ละลายได้ง่าย 3. ไม่เป็นพิษที่ระดับความเข้มข้นต่ำ 4. ล้างออกจากเซลล์ได้ง่าย 5. ซึมผ่านเข้าภายในเซลล์อย่างรวดเร็ว ซึ่ง DMSO (dimethylsulfoxide) มีคุณสมบัติดังกล่าวทั้งหมด (Bajaj and Reinert, 1977) อย่างไรก็ตาม การใช้ความเข้มข้นสูงทำให้ลดการหายใจ ยับยั้งการสร้าง RNA และโปรตีนในเซลล์และเนื้อเยื่อพืช (Bajaj *et al.,* 1970 อ้างโดย Bajaj and Reinert, 1977) นอกจากนี้สารอื่น ๆ ที่ใช้มีหลายชนิด เช่น glycerol, ethylene glycol, propylene glycol โดยสารแต่ละชนิดมีความเป็นพิษต่อเยื่อหุ้มเซลล์ต่างกัน เนื่องจากผลการกระทบจากการแตกตัว (dissolving effect) โดยการซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ต่างกัน glycerol มีความเป็นพิษน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับ DMSO ethylene glycol และ propylene glycol (Bajaj, 1995) ในศรรษตวรรษที่ 21 นักวิจัยประสบความสำเร็จในการลดความเป็นพิษของ cryoprotectants โดยมีการใช้ร่วมกัน ทำให้ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดลดลง (Frety *et al*., 1992; Wang *et al*., 1994) Vicient และ Martinez (1998) รายงานความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารแต่ละชนิด เช่น DMSO 5-10 เปอร์เซ็นต์ sorbitol หรือ ซูโครส 0.33-0.5 โมลาร์ และ glycerol 2 โมลาร์ มีการผสมสาร cryoprotectant หลายชนิดเข้าด้วยกันเรียกว่า PVS2 (plant vitrification solution) ซึ่งประกอบด้วย glycerol เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (W/V) (3.26 โมลาร์) ethylene glycol เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (2.42 โมลาร์) DMSO เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (1.9 โมลาร์) และซูโครส เข้มข้น 7.2 เปอร์เซ็นต์ (0.4 โมลาร์) (Sakai *et al*., 1990) และประสบความสำเร็จเมื่อใช้สารละลายนี้ในกระบวนการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในพืชหลายชนิด ซึ่งแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการแช่ร่วมกับชิ้นส่วน และชนิดพืช อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จในการเตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธี vitrification อาจต้องมีปัจจัยร่วมบางประการได้แก่ พันธุกรรมและลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะของชิ้นส่วนที่เก็บรักษา การ pretreatment ในอาหารที่เติม ซูโครส หรือ ABA ก่อนที่จะ vitrified ร่วมกับ cryoprotectants

ในพืชที่ขยายพันธุ์โดยส่วนร่างกาย (vegetatively propagated) ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดดีที่สุดเนื่องจากไม่กลายพันธุ์และปลอดไวรัส (Bajaj, 1995) ขนาดของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดที่เหมาะต่อการเก็บรักษาประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดหรือโดมและมีใบประกอบขนาดเล็ก (leaf primordia) 1-2 คู่ Takagi และคณะ (1997) เปรียบเทียบขนาดของปลายยอดเผือก (taro) สองขนาดคือ 0.8 มิลลิเมตร (มีโดม และ 1-2 leaf primordia) และ 2 มิลลิเมตร (มีโดม และ 2-3 leaf primordia) และ ตาข้างขนาด 1-1.5 มิลลิเมตร (มีโดม และ 3-4 leaf primordia) พบว่า ชิ้นส่วนทั้งสามชนิดมีอัตรารอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่ใน PVS2 เป็นเวลา 20 นาที อย่างไรก็ตาม หลังจากแช่นานกว่า 30 นาที ความมีชีวิตของ

ชิ้นส่วนค่อย ๆ ลดลงโดยขนาดชิ้นส่วนปลายยอด 0.8 มิลลิเมตร ลดลงมากที่สุด และเมื่อแช่เป็นเวลา 60 นาที ความมีชีวิตเป็น 60 เปอร์เซ็นต์, 65 เปอร์เซ็นต์ และ 80 เปอร์เซ็นต์ ในชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 0.8 มิลลิเมตร, 2 มิลลิเมตร และ ตาข้าง ตามลำดับ ในขณะที่ Panis และคณะ (2004) รายงานขนาดฐานของเนื้อเยื่อส่วนยอดต่ออัตรารอดชีวิตหลังการเก็บรักษาของกล้วยพันธุ์ Williams (AAA group) พบว่า ขนาด 1 มิลลิเมตร ให้อัตรารอดชีวิตสูงสุด 65.8 เปอร์เซ็นต์ ขนาดที่ใหญ่กว่านี้ให้อัตรารอดชีวิตลดลงตามลำดับ ส่วนขนาดเล็กกว่านี้ไม่เหมาะสมเนื่องจากเสี่ยงต่อความเสียหายเนื่องจากการตัด

Panis และคณะ (2005) ดัดแปลงเทคนิค droplet vitrification โดยหยด PVS2 หยดขนาดเล็กบนปลายยอดกล้วยที่วางอยู่บนกระดาษฟอยด์ เป็นระยะเวลาต่าง ๆ (10-60 นาที) ก่อนจุ่มแช่ลงในไนโตรเจนเหลว ในปลายยอดกล้วยจีโนมต่าง ๆ พบว่า การให้ปลายยอดกล้วยแช่ใน PVS2 เป็นเวลา 30 นาทีขึ้นไป ให้อัตรารอดชีวิตสูงกว่า 10-20 นาที (อย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์) ในทุกจีโนม และกล้วยที่มีจีโนม ABB และ AAB การแช่เป็นระยะเวลานาน 50 และ 60 นาที ให้อัตรารอดชีวิตเพิ่มขึ้น 95 เปอร์เซ็นต์ และ 93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกล้วยที่มีจีโนม AAA หรือ AA ให้อัตรารอดชีวิตไม่ต่างกันในเวลา 30-60 นาที ในขณะที่กล้วยจีโนม AAAh ชิ้นส่วนปลายยอดได้รับความเสียหายเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากกล้วยที่มีจีโนม B อย่างน้อย 1 หรือ 2 ชุดมีการทนแล้งมากกว่าจีโนม A แม้ว่าจะมีความแตกต่างเล็กน้อยระหว่างจีโนม อย่างไรก็ตาม เขาสรุปว่า การแช่ด้วย PVS2 เป็นเวลา 30-60 นาที เหมาะต่อกล้วยพันธุ์ต่าง ๆ (ให้อัตราการรอดชีวิตประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์)

การเตรียมชิ้นส่วนโดยใช้เทคนิค vitrification ในพืชบางชนิดจำเป็นต้องมีการ pretreatment ชิ้นส่วนก่อนที่จะแช่ใน PVS2 เพื่อเป็นการเตรียมชิ้นส่วนให้ทนต่อการสูญเสียน้ำ โดยเซลล์มีการปรับตัวด้วยการเปลี่ยนแปลงขนาดเซลล์ แวคิวโอล และผนังเซลล์ (Withers, 1988) และส่งเสริมอัตรารอดชีวิตหลังจากเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว pretreatment สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดพืชและชิ้นส่วนที่เก็บรักษา เช่น การเติม ABA, ซูโครส ในอาหารเพาะเลี้ยง หรือการลดความชื้นบางส่วน หรือการให้อากาศเย็น (cold pre-treatment) อย่างไรก็ตาม โดยส่วนใหญ่ใช้ ซูโครส Engelmann และคณะ (1995) รายงานว่าการ pretreatment ในอาหารที่เติม ซูโครส เป็นการเพิ่มการสร้างแป้งบริเวณผิวเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่และเป็นออสโมติคัมป้องกันความเสียหายในระหว่างการสูญเสียน้ำและการแข็งตัวในในโตรเจนเหลว Takagi และคณะ (1997) รายงานว่า การ pretreatment ปลายยอดเผือกในอาหารสูตร MS (Murashige and Skooge) เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วแช่ใน

สารละลาย LS (ประกอบด้วย glycerol เข้มข้น 2 โมลาร์ และซูโครส เข้มข้น 0.4 โมลาร์) เป็นเวลา 20 นาทีก่อนแช่ใน PVS2 โดยแช่ไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วจุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่า ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 83.1 เปอร์เซ็นต์ Tsukazaki และคณะ (2000) รายงานว่าการ pretreatment เซลล์แขวนลอยกล้วยไม้ *Doritaenopsis* บนอาหารเติม ซูโครส เข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 7 วัน ให้อัตราการรอดชีวิตหลังจากเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว 51 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการไม่ pretreatment อย่างไรก็ตาม การใช้ ABA เข้มข้น 0.1 หรือ 0.5 โมลาร์ ให้ผลไม่แตกต่างกันและไม่ต่างกับการไม่ใช้ ในขณะที่ Frety และ Lorz (1995) รายงานว่าการใช้ ABA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมการทนอุณหภูมิต่ำในข้าวบาร์เลย์ และข้าวสาลี การเติมซูโครส เข้มข้น 0.75 โมลาร์ ส่งเสริมการทนต่ออุณหภูมิต่ำในโซมาติคเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน (Dumet *et al*., 1993) ส่วน Frety และ Lorz (1995) รายงานการใช้ sorbitol เข้มข้น 0.3 โมลาร์ ในเซลล์แขวนลอยของข้าวบาร์เลย์ ในขณะที่ Attree และคณะ (1995) รายงานว่าการใช้ PEG (polyethyleneglycol) หรือ dextrans น้ำหนักโมเลกุลสูง ๆ ส่งเสริมการทนต่ออุณหภูมิต่ำมากกว่าคาร์โบไฮเดรต การ cold pretreatment ส่งเสริมการทนต่ออุณหภูมิต่ำในแคลลัสข้าวบาร์เลย์แต่ไม่ส่งเสริมในเซลล์แขวนลอย (Frety and Lorz, 1995) ในขณะที่ Ishikawa และคณะ (1996) รายงานว่า การ pretreatment non-embryogenic suspension ของ bromegrass ด้วย cryoprotectant (CSPI) ที่ประกอบด้วย ซูโครส เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ DMSO เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ glycerol เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นเวลา 30 นาทีก่อนแช่ใน PVS2 เป็นเวลา 2-4 นาที ส่งเสริมอัตราการรอดชีวิต 30-40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ ซูโครส หรือ ABA ให้อัตราการรอดชีวิตลดลงมาก

Ahuja และคณะ (2002) ทำการ pretreatment ปลายยอดของแยม (*Dioscorea floribunda*) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 มิลลิเมตร (จากต้นในหลอดทดลองอายุ 6-8 สัปดาห์) ในอาหารเหลวสูตร MS เติมซูโครส 0.3 โมลาร์ ที่ 25 องศาเซลเซียส และแช่ในสารละลาย LS ในอาหารเหลวสูตร MS เป็นเวลา 20 นาที และแช่ใน PVS2 (โดยมีอาหารสูตร MS เป็นองค์ประกอบด้วย) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที และล้างด้วยสารละลาย (unloading solution) ที่ประกอบด้วยอาหารสูตร MS ร่วมกับซูโครส เข้มข้น 1.2 โมลาร์ เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม BAP (benzylaminopurine) เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA (naphthaleneacetic acid) เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 (gibberellic acid) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 15 วัน จึงย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BAP เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม

ต่อลิตร และ GA_3 เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ให้อัตรารอดชีวิต 87 เปอร์เซ็นต์ สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ 30 เปอร์เซ็นต์

Wang และคณะ (2005) รายงานการเก็บรักษาปลายยอดมะละกอ (*Carica papaya*) จำนวน 6 สายพันธุ์ โดยแช่ปลายยอดด้วยสารละลาย LS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วดึงน้ำด้วยการแช่ใน PVS2 ดัดแปลง (โดยมีองค์ประกอบดังนี้ polyehyleneglycol 6000 เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ proline เข้มข้น 0.02 โมลาร์ glycerol เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ethylene glycol เข้มข้น 13.6 เปอร์เซ็นต์ DMSO เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และซูโครส เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ในอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 1 ml ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แช่ในไนโตรเจนเหลวอย่างน้อย 1 สัปดาห์ พบว่า ปลายยอดทั้ง 6 สายพันธุ์ สามารถเจริญเติบโตระหว่าง 48-93 เปอร์เซ็นต์

การละลายน้ำแข็ง (thawing) และการเพาะเลี้ยงเป็นพืชต้นใหม่ (regrowth) ของชิ้นส่วนพืชหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญต่ออัตรารอดชีวิตและความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่เช่นเดียวกับการเตรียมชิ้นส่วนก่อนการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยทั่วไปใช้วิธีการละลายน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว (rapid thawing) ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส (Lynch *et al*., 1994) Wang และคณะ (1994) รายงานว่าการล้างหรือไม่ล้างสารละลาย cryoprotectant จากชิ้นส่วนให้ผลการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่แตกต่างกันในแต่ละพืชและวิธีการ การใช้วิธีการที่เหมาะสมทำให้ระยะเวลาในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ใกล้เคียงกับชิ้นส่วนที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาโดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (Nishizawa *et al*., 1993) เช่น การเก็บรักษาเซลล์ซัสเพนชั่นและแคลลัสฝ้ายในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 4 ปี เมื่อนำมาละลายน้ำแข็งและเพาะเลี้ยงในอาหาร พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่สูงและต้นที่ได้มีลักษณะปกติ (Rajasekaran *et al*., 1996 อ้างโดย Vicient and Martinez, 1998) นอกจากนี้ Wang และคณะ (2005) รายงานอัตรารอดชีวิตของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อปลายยอดมะละกอหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลวโดยวิธี vitrification เป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้วละลายน้ำแข็งโดยแช่ใน water bath โดยทันที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90-120 วินาที แล้วล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารเหลวเติมซูโครส ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 15 นาที ก่อนเพาะเลี้ยงบนอาหาร ว่าให้ผลไม่ต่างกัน และวิธีการดังกล่าวประสบผลสำเร็จในกล้วย (Thinh *et al.,* 1999)

2. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในหลอดทดลอง

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในหลอดทดลองเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเนื่องจากข้อจำกัดในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในแปลง ซึ่งมีข้อดีหลายอย่าง เช่น ปลอดเชื้อราและแบคทีเรีย เป็นการลดต้นทุนในการเก็บรักษา ง่ายและสะดวกในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์ และอาจเป็นแหล่งรวบรวมเชื้อพันธุ์ (core collection) สำหรับการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ระยะยาว (Malaurie *et al*., 1998) สามารถยืดระยะเวลาในการย้ายเลี้ยงซึ่งเป็นการลดต้นทุนและเวลาในการดูแลรักษา วิธีการนี้สามารถดูแลวัสดุพืชในหลอดทดลองได้ระหว่าง 1-15 ปี ซึ่งช่วงของการย้ายเลี้ยงขึ้นอยู่กับพืชแต่ละชนิด การเพาะเลี้ยงในสภาพชะลอการเจริญเติบโตสามารถทำได้หลายวิธี โดยส่วนใหญ่มักลดอุณหภูมิร่วมกับเพาะเลี้ยงในสภาพความเข้มแสงต่ำ หรือในที่มืด ในพืชที่ทนอากาศเย็นอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 0-5 องศาเซลเซียส ส่วนพืชในเขตร้อนอุณหภูมิควรอยู่ในช่วงระหว่าง 15-20 องศาเซลเซียส (Rao, 2004) อีกวิธีหนึ่งที่สามารถทำได้คือการดัดแปลงอาหารที่เพาะเลี้ยง โดยการลดน้ำตาลและหรือองค์ประกอบของธาตุอาหาร และลดปริมาณของออกซิเจนในการเพาะเลี้ยงโดยใช้คลุมชิ้นส่วนด้วยอาหารเหลวหรือ mineral oil (Withers and Engelmann, 1997) อย่างไรก็ตาม การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชด้วยเทคนิคนี้ต้องการอัตรารอดชีวิตสูง สามารถลดจำนวนครั้งในการย้ายเลี้ยงและสามารถดัดแปลงใช้ได้หลากหลายสายพันธุ์ (Malaurie *et al.,* 1998) และสามารถขยายพันธุ์โดยที่ต้นกล้าที่ได้ไม่กลายพันธุ์ โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงในสภาพชะลอการเจริญเติบโตมักมีการนำมาใช้และดัดแปลงและประสบผลสำเร็จในพืชหลายชนิด มีรายงานประมาณ 37,600 ชนิดที่ใช้เทคนิคนี้ในการเก็บรักษาใน genebanks (FAO, 1996) และที่ใช้เทคนิคนี้ในการเก็บรักษาเป็นประจำ ได้แก่ กล้วย มันฝรั่ง มันเทศ มันสำปะหลัง แยม หอมชนิดต่าง ๆ และไม้ยืนต้นในเขตหนาว Borges และคณะ (2004) รายงานความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนข้อของต้นแยม (*Dioscorea alata* L.) ที่เก็บรักษาในหลอดทดลองในอาหารสูตร D-571 เติมแมนนิทอล BA (6-benzyladenine) และผงถ่านความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 9 เดือน ว่าสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่สูงสุด 100 และ 98 เปอร์เซ็นต์ จากการเก็บรักษาในอาหารสูตร D-571 เติม mannitol เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.1 หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน เข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำนองเดียวกัน Nair และ Chandrababu (1994) รายงานความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของ *D. alata* และ *D. rotundata* ที่เก็บรักษาในหลอดทดลองในอาหารสูตร MS เติม mannitol เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 เดือน ว่ามีอัตราการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุม

การเจริญเติบโต Taylor และคณะ (2001) รายงานว่าการลดอุณหภูมิเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาโดยชะลอการเจริญเติบโตในเผือก โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ได้เป็นระยะเวลา 9-12 เดือน โดยไม่ต้องย้ายเลี้ยง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ นอกจากนี้มีรายงานว่าสามารถเก็บรักษาเผือกที่อุณหภูมิ 9 องศาเซลเซียส ในที่มืด ได้นานกว่า 8 ปี โดยย้ายเลี้ยงทุก 3 ปี (Bessembinder *et al*., 1993)

พาโคลบิวทราโซล (paclobutrazol: PBZ) [(2*RS*, 3*RS*)-1-(4-chlorophenyl)-4, 4-dimethyl-2-(l,2,4-triazol-l-yl)pentan-3-ol] เป็นสารชะลอการเจริญเติบโตทำหน้าที่ยับยั้งการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินเพื่อลดการยืดยาวของข้อ ความสูง พื้นที่ใบ และทำให้ใบมีสีเขียวเข้ม (Bai and Chaney, 2001) โดยทั่วไปจิบเบอเรลลินจะชักนำให้เกิดการยืดยาวของลำต้น การเติบโตของเนื้อเยื่อเจริญหรือตา (มาลี, 2532) Hazarika (2003) รายงานการใช้สารชะลอการเจริญเติบโตหลายชนิดที่ใช้ในการขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า ความยาวข้อสั้นลง ขนาดใบลดลง ส่งเสริมการสร้างคลอโรฟิลล์ตลอดจนความหนาของราก Demeulemeester และคณะ (1995) ทดลองนำสารเคมีในกลุ่มนี้ เช่น Mepiquat chloride, Chloromequat chloride, Tetcyclacis, PBZ, BAS 111, Daminozide และ LAB 198 999 ความเข้มข้น 50 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร มาทดสอบผลของการยับยั้งการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินในการเพาะเลี้ยง Chicory พบว่า PBZ และสารประกอบในกลุ่ม cyclohexanetriones สามารถลดการเจริญของลำต้นได้ และการใช้ PBZ ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักแห้งสูงสุด ธัญพิสิษฐ์ (2544) รายงานว่า PBZ เป็นสารชะลอการเจริญเติบโตที่ควบคุมขนาดทรงพุ่ม ขนาดความยาวของก้านใบ และแผ่นใบของสาวน้อยประแป้งให้มีขนาดกะทัดรัดและเหมาะสมกับไม้กระถาง โดยที่คุณภาพต่างๆ เช่น สีของกาบใบไม่เปลี่ยนแปลง เยาวพา (2546) รายงานว่า PBZ เป็นสารอินทรีย์ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยมีคุณสมบัติชะลอการแบ่งเซลล์และยืดตัวของเซลล์บริเวณใต้ปลายยอดของกิ่ง ทำให้ต้นพืชที่ได้รับสารมีความสูงน้อยกว่าปกติ เป็นประโยชน์ต่อการควบคุมความสูงของไม้ดอกไม้ประดับให้มีขนาดกระทัดรัดเหมาะกับการปลูกเป็นไม้กระถาง และจากการทดลองถึงผลของ PBZ ต่อการเจริญเติบโตของดาวกระจาย พบว่า ดาวกระจายได้รับสาร PBZ ความเข้มข้น 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อต้น ทำให้ความสูง ขนาดทรงพุ่ม และเส้นผ่านศูนย์กลางต้นน้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารอย่างมีนัยสำคัญ ต้นที่ได้รับสาร PBZ ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อต้น มีความสูง ขนาดทรงพุ่ม และเส้นผ่านศูนย์กลางต้นน้อยที่สุด PBZ จัดได้ว่าเป็นสารชะลอการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถควบคุมความสูงของลำต้นให้สั้นลง โดยไม่มีผลต่อลักษณะอื่นๆ เนื่องจากไปมี

ผลยับยั้งการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน ทำให้ต้นเล็กลง กะทัดรัด และสามารถใช้ได้กับพืชหลายชนิดทั้งไม้ผล และไม้ดอกไม้ประดับ อีกทั้งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ กลไกการทำงานของ PBZ คือ การไปยับยั้งการสร้าง Kaurene oxidase ดังนั้นจึงไปหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในขั้นตอนการเปลี่ยนจาก ent-kaurene เป็น ent-kaurenoic acid ในกระบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน (Hazarika, 2003) เพราะเหตุนี้จึงมีผลต่อความสูงและการยืดยาวของปล้อง Eliasson และคณะ (1994) ใช้ PBZ ความเข้มข้น 0.00 0.15 0.30 และ 0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับ *Prunnus serotina* บนอาหารสูตร MS ร่วมด้วยการเติมและไม่เติม IBA (3-indolebutyric acid) พบว่า อาหารสูตร MS เติม PBZ ความเข้มข้นสูงขึ้นร่วมกับ IBA ทำให้การเจริญของยอดลดลงในหลอดทดลอง แต่ความเข้มสีของใบเพิ่มขึ้น อีกทั้งทำให้เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำในต้นพืชลดลง Nagaraju และคณะ (2002) ได้เพาะเลี้ยงหัวของซ่อนกลิ่นฝรั่ง (gladiolus) 6 สายพันธุ์ ได้แก่ Bellariana Blue Moon Cream White Friendship Her Majesty และ Top Bress บนอาหารสูตร MS เติม PBZ ความเข้มข้น 0 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 30 60 90 และ 120 กรัมต่อลิตร พบว่าอาหารที่เติม PBZ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดหัวใหญ่ที่สุด แต่ความยาวของใบ และรากสั้นที่สุด Chen และคณะ (2005) เพาะเลี้ยงก้านดอกของ daylily ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 และ 6 เปอร์เซ็นต์ เติมและไม่เติม PBZ ความเข้มข้น 8.5 ไมโครโมลาร์ พบว่า อาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ และเติม PBZ ทำให้มีน้ำหนักแห้งและปริมาณแป้งสูงสุด Smith และคณะ (1990) รายงานว่าการเติม PBZ ลงในอาหารชักนำรากมีผลทำให้จำนวนปากใบลดลง ไขที่ผิวใบเพิ่มขึ้น ลำต้นสั้นลง รากหนาขึ้น ลดการเหี่ยวหลังจากย้ายปลูกลงดิน อีกทั้งเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์ให้แก่ต้นพืช นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ PBZ เพื่อวัตถุประสงค์ช่วยในการชักนำการออกดอกในหลอดทดลองด้วยเช่น Kostenyuk และคณะ (1999) รายงานว่าหากมีจิบเบอเรลลินความเข้มข้นสูงส่งผลทำให้ออกดอกช้า และเปอร์เซ็นต์การเกิดดอกลดลง อย่างไรก็ตาม เมื่อเติม PBZ ร่วมกับ BA มีผลทำให้ส่งเสริมการเกิดดอก ทำให้ออกดอกเร็วขึ้นและมีปริมาณมาก

นอกจากนี้พาโคลบิวทราโซลยังเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ส่งเสริมการสร้าง ABA หน้าที่หนึ่งของ ABA คือทำให้ปากใบปิดเพื่อลดการสูญเสียน้ำจากการหายใจ มีการดัดแปลงนำพาโคลบิวทราโซลมาใช้ในสวนไม้ดอกไม้ประดับโดยส่งเสริมให้ทนต่อสภาพการขาดน้ำในระยะเวลาสั้นได้ และส่งเสริมเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้น้ำในไม้ยืนต้นโดยสัมพันธ์กับการเพิ่ม

ของ ABA โดยส่งผลให้มีการลดการเปิดของปากใบ ลดการเจริญเติบโตของยอด โดยขนาดใบและพื้นที่ผิวของลำต้น และมีรากฝอยเพิ่มขึ้นเพื่อการดูดน้ำ และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของใบเพื่อลดการสูญเสียน้ำ (William and Chaney, 2005) พาโคลบิวทราโซลเพิ่มการสะสมของแป้งในชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืช (Wood, 1984; Wieland and Wample, 1985; Wang *et al*., 1986) พาโคลบิวทราโซลมักนำมาใช้ในไม้ยืนต้นหลายชนิด โดยมีผลในการลดการยืดยาวของยอด การขยายของใบและเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น (Keever *et al*., 1990; Burch *et al*., 1996) นอกจากนี้มีการนำพาโคลบิวทราโซลมาใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของไม้ดอกไม้ประดับและไม้กระถางหลายชนิด เช่น เบญจมาศ บีโกเนีย ฟรีเซีย เพิ่มการแตกกอในข้าว หรือชะลอการเจริญเติบโตของหญ้า

3. การทดสอบความแปรปรวนโดยใช้เทคนิค RAPD

วิธีการดั้งเดิมในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมคือ การใช้ลักษณะทางสัณฐาน ได้แก่ ลักษณะรูปร่างใบ สีดอก สีผล และลักษณะผล เป็นต้น เป็นเครื่องหมายของการแสดงออกของยีน แต่อย่างไรก็ตามลักษณะทางสัณฐานมีข้อจำกัดหลายประการ เพราะว่าพืชบางพันธุ์มีลักษณะต่าง ๆ ใกล้เคียงกันมากจนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้โดยสายตา จากข้อจำกัดนี้ทำให้มีการนำเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรม เครื่องหมายดังกล่าวคือ ไอโซไซม์ เครื่องหมาย Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) เครื่องหมาย Ramdom Amplified Polymorphic DNAs (RAPD) Amplified Fragment length Polymorphism (AFLP) Simple Sequence Repeat (SSR) และ Cleaved Amplified Polymorphism Sequence (CAPS) เป็นต้น

ปัจจุบันนี้การตรวจสอบความแปรปรวนต้นที่ได้จากการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์นิยมใช้วิธีทางด้านชีวโมเลกุล เนื่องจากความน่าเชื่อถือมากกว่า ซึ่งมีหลายเทคนิค โดยเทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่างกาย (somaclonal variation) (Raina, 1996) เครื่องหมาย RAPD เป็นหนึ่งในหลายเครื่องหมายโมเลกุลที่อาศัยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเออย่างสุ่มโดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวเพียงชนิดเดียว ไพรเมอร์ที่ใช้มีขนาดสั้น ๆ เพียง 10 เบสเท่านั้น ซึ่งสามารถซื้อได้ทั่วไปจากบริษัทผู้ผลิต เนื่องจากการเพิ่มปริมาณเป็นแบบสุ่ม ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบ ข้อดีของ RAPD คือ ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก วิธีการทำได้ง่ายและรวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอตัวอย่างพืช นอกจากนี้ไพรเมอร์สามารถเลือกซื้อได้ตามต้องการ ใช้ปริมาณตัวอย่าง

ดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย และค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างไม่แพง เพราะเหตุนี้จึงได้นำเครื่องหมาย RAPD มาใช้เพื่อแยกความแตกต่างทางพันธุกรรม และมีรายงานการใช้เทคนิค RAPD กับพืชหลายชนิด Yu และ Nquyen (1994) รายงานการใช้ RAPD ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมข้าวนาดอนและนาลุ่ม พบว่า จากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 42 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 260 แถบและเป็น polymorphism ทั้งหมด 80 เปอร์เซ็นต์ โดยสามารถนำไปเป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อสร้างเป็นแผนภูมิทางพันธุกรรม นอกจากนี้การใช้เครื่องหมาย RAPD สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ Soulange และคณะ (2007) ใช้เครื่องหมาย RAPD แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *Cinnamomun camphora* กับ *Cinnamomum verum* ที่ได้จากเพาะเลี้ยงปลายยอดและใบได้ หลังการอนุบาลลงดินเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยใช้ไพรเมอร์ 11 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ชัดเจน ทำให้เกิดแถบที่มีขนาด 0.4 ถึง 3.4 กิโลเบส มีแถบประมาณ 8 แถบ ซึ่งทำให้สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ อย่างไรตาม เทคนิคนี้บางครั้งมีข้อจำกัดเนื่องจากไม่สามารถให้ผลผลิตภายใต้สภาวะที่แน่นอน ดังนั้นอาจจะใช้หลายเทคนิคร่วมกัน (Gonzalez-Benito *et al*., 1999)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์หญ้าแฝกในระยะยาวในไนโตรเจนเหลวโดยใช้ชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกพันธุ์สงขลา 3
2. เพื่อศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์หญ้าแฝกในระยะปานกลางในสภาพชะลอการเจริญเติบโตโดยใช้ชิ้นส่วนปลายยอด
3. เพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นหญ้าแฝกที่รอดชีวิตจากการเก็บรักษาด้วยวิธีการข้างต้น โดยใช้เทคนิค RAPD

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

1.1.1 การศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในในไนโตรเจนเหลวและในสภาพชะลอการเจริญเติบโต

ใช้ชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกจากกลุ่มยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเพิ่มปริมาณ ซึ่งเป็นสูตรอาหาร MS เติม NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงกลุ่มยอดทุก 2 เดือน

1.1.2 การตรวจสอบความแปรปรวนโดยใช้เทคนิค RAPD

ใช้ใบจากยอดของหญ้าแฝกที่พัฒนาจากชิ้นส่วนหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลวและที่เก็บในหลอดทดลองในสภาพชะลอการเจริญเติบโตเป็นเวลา 1 ปี

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร MS (รายละเอียดในตารางภาคผนวก)

1.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เช่น BA NAA PBZ

1.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนด้วยเทคนิคต่าง ในการเก็บในไนโตรเจนเหลว

- DMSO
- Glycerol
- ซูโครส
- Ethylene glycol

- Alginate
- $CaCl_2$ $2H_2O$
- FDA (fluorescein diacetate)

1.2.4 สารเคมีที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ และตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ ดังต่อไปนี้

- CTAB (cetylmethylammonium bromide)
- Tris-HCl Tris base
- β-Mercapthoethanol
- PVP-40 (Polyvinylpyrolidone)
- Na_2EDTA
- NaCl
- Acetic acid, Boric acid
- Chloroform
- Isopropanol
- Ethanol 70 เปอร์เซ็นต์
- Agarose
- Ethidium bromide
- น้ำกลั่น

1.2.5 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ดังต่อไปนี้

- PCR buffer
- dNTP
- Primer
- Taq DNA polymerase

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่น กระบอกตวง volumetric flask จานเพาะเลี้ยง ไปเปต ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 8 ออนซ์ หลอดทดลอง

2.2 ไมโครไปเปต หลอดเอฟเพนดอร์ฟ หลอดเซ็นตริฟิวก์ cryotubes

2.3 อุปกรณ์โลหะ เช่น ปากคีบ ด้ามมีด และใบมีดผ่าตัด

2.4 อุปกรณ์ฆ่าเชื้อ เช่น หม้อนึ่งความดันอัดไอ เตาอบความร้อนแห้ง

2.5 ตู้ย้ายเลี้ยง

2.6 ชุดอิเล็กโตรโพรีซีสแบบแนวนอน

2.7 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง เครื่องเขย่าแบบวงกลม

2.8 เครื่อง UV transluminator

2.9 กล้องบันทึกภาพแบบดิจิตอล

2.10 เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง

2.11 ถังเก็บไนโตรเจนเหลว

2.12 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR)

2.13 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

2.14 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (4 และ -20 องศาเซลเซียส)

วิธีการ

1. ศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในไนโตรเจนเหลว

1.1 การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวร่วมกับเทคนิค vitrification

1.1.1 ผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกที่ผ่านการแช่ในสารละลาย PVS2

นำชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกในสภาพปลอดเชื้อขนาดความยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร ใส่ใน cryotube หลอดละ 20 ยอด เติมสารละลาย PVS2 ซึ่งประกอบด้วย glycerol เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ethylene glycol เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ DMSO เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ และซูโครส เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ในอาหารสูตร MS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แช่เป็นเวลา 30 นาที จึงดูดสารละลายทิ้ง แล้วเติมสารละลายซูโครส ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารของสูตร MS เติมซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.1 0.3 0.5 และ 0.7 มิลลิโมลาร์ หลอดละ 2 มิลลิลิตร โดยแช่ไว้เป็นเวลา 1 นาที ทำ 2 ครั้ง และซับชิ้นส่วนด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสารละลาย FDA โดยใช้กล้องจุลทรรศน์

1.1.2 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการละลายน้ำแข็งต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

นำชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกในสภาพปลอดเชื้อขนาดความยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร ใส่ใน cryotube หลอดละ 20 ยอด เติมสารละลาย PVS2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แช่เป็นระยะเวลา 30 นาที เก็บในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 30 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 2 นาที จึงเทสารสารละลาย PVS2 ทิ้ง ล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ แช่ไว้เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 2 ครั้ง ซับด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสารละลาย FDA โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ จำนวน 20 ยอด ส่วนที่เหลือเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด และ ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.1.3 ผลของระยะเวลาในการแช่ในสารละลาย PVS2 ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

นำชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกขนาดความยาวประมาณ 3 มิลลิเมตร ใส่ใน cryotube หลอดละ 20 ยอด แล้วเติมสารละลาย PVS2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แช่เป็นระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0 15 30 45 60 75 90 105 120 นาที จากนั้นแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทสารสารละลาย PVS2 ทิ้ง ล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 2 ครั้ง ซับด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสารละลาย FDA โดยใช้กล้องจุลทรรศน์จำนวน 10 ยอด ส่วนที่เหลือเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอดและตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.1.4 ผลของการ pretreatment ร่วมกับเทคนิค vitrification ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้เปรียบเทียบการ pretreatment ชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกในอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงครึ่งหนึ่ง (1/2 MS) เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ

การไม่ pretreatment แล้วนำชิ้นส่วนทั้งสองส่วนมาแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสารสารละลาย FDA จำนวน 20 ยอด ส่วนที่เหลือเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.1.5 ผลของระยะเวลาการ pretreatment ร่วมกับเทคนิค vitrification ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้ใช้กลุ่มตายอดขนาด 3-5 มิลลิเมตร มา pretreatment ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติมซูโครส 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 0 1 3 และ 5 วัน แล้วนำมาแช่ในสารละลาย LS บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แช่ในสารละลาย PVS2 ต่ออีก เป็นเวลาต่าง ๆ คือ 0 0.5 1 2 และ 3 ชั่วโมง แล้วจึงแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลาย PVS2 ทิ้ง ล้างชิ้นส่วนด้วยสารละลายที่มีองค์ประกอบของอาหารสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 10 นาที 1 ครั้ง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอดและตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.1.6 ผลของระยะเวลาในการ loading treatment ร่วมกับเทคนิค vitrification ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

นำชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 3 มิลลิเมตร มาแช่ในสารละลาย LS ที่ประกอบด้วย glycerol เข้มข้น 2 โมลาร์ ร่วมกับซูโครส เข้มข้น 0.4 โมลาร์ วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0 0.5 1 และ 2 ชั่วโมง แล้วนำชิ้นส่วนมาแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 30 นาที ชิ้นส่วนที่ผ่านการเตรียมทั้งหมด นำมาบรรจุในหลอด cryotube แช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารเหลวสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 1 นาที ซับด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำชิ้นส่วนไปตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสารสารละลาย FDA จำนวน 20 ยอด ส่วนที่เหลือเพาะเลี้ยงใน

อาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.1.7 ผลของสภาพการเพาะเลี้ยงต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้นำกลุ่มตายอดขนาด 3-5 มิลลิเมตร มา pretreatment ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 1 วัน แล้วนำมาแช่ในสารละลาย LS บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แช่ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลาย PVS2 ทิ้ง ล้างชิ้นส่วนด้วย สารละลายที่มีองค์ประกอบของอาหารสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 10 นาที 1 ครั้ง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพต่าง ๆ 3 วิธีคือ

- เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีกระดาษกรอง 2 แผ่น เป็นเวลา 2 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรเพิ่มปริมาณ ในสภาพการเพาะเลี้ยงปกติ
- เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเพิ่มปริมาณยอดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรเพิ่มปริมาณ ในสภาพการเพาะเลี้ยงปกติ
- เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีกระดาษกรอง 2 แผ่น เป็นเวลา 2 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเพิ่มปริมาณยอดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรเพิ่มปริมาณ ในสภาพการเพาะเลี้ยงปกติ

ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงในสภาพต่าง ๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.1.8 ผลของอุณหภูมิและชนิดของสารละลาย cryoprotectant ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้ใช้กลุ่มตายอดโดยตัดให้มีขนาด 3-5 มิลลิเมตร มา pretreatment ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน นำมาแช่ในสารละลาย LS บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงแช่ในสารละลาย cryoprotectant 2 ชนิด คือ PVS2 และ PVS3

(ประกอบด้วย ซูโครส เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ glycerol เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิ 5 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาละลายน้ำแข็ง โดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลาย PVS2 ทิ้ง ล้างชิ้นส่วนด้วยสารละลายที่มีองค์ประกอบของอาหารสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 1.2 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 10 นาที 1 ครั้ง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.1.9 ผลของขนาดของชิ้นส่วนต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้ใช้กลุ่มตายอดขนาด 1-2 หรือ 3-5 มิลลิเมตร มาแช่ในสารละลาย LS บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 30 นาทีในหลอด cryotube และแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำมาละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.1.10 ผลของระยะเวลาในการแช่ในสารละลาย PVS3 ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้ใช้กลุ่มยอดที่ precondition ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 วัน นำมาตัดปลายยอดให้มีขนาด 1-2 มิลลิเมตร แล้วจึงแช่ในสารละลาย LS บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วแช่ในสารละลาย PVS3 ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5 1 2 และ 3 ชั่วโมง แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลว 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 1.2 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.1.11 ผลของระยะเวลาในการแช่สารละลาย LS และสารละลาย PVS 3 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้ใช้กลุ่มยอดที่ precondition เป็นเวลา 9 วัน นำมาตัดปลายยอดให้มีขนาด 1-2 มิลลิเมตร แช่ในสารละลาย LS เป็นระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0 20 40 60 80 และ 100 นาที แล้วแช่ในสารละลาย PVS3 ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำลงแช่ในไนโตรเจนเหลว 1 ชั่วโมง แล้วจึงละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 1.2 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.1.12 ผลของการแช่ในสารละลาย cryoprotectant ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ร่วมกับสภาพการเพาะเลี้ยง ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้ใช้กลุ่มยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหาร precondition เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตัดให้ปลายยอดมีขนาด 1-2 มิลลิเมตร แช่ในสารละลาย LS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอด cryotube ขนาด 2 มิลลิลิตร ในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที แล้วแช่ในสารละลาย PVS2 และ PVS3 ที่เย็น และเก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงแช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 1.2 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 10 นาที เพาะเลี้ยงในในที่มืดเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในสภาพการให้แสงปกติเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในที่มีแสง ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.1.13 ผลขององค์ประกอบของสารละลาย cryoprotectant ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้ใช้ชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 3 มิลลิเมตร โดยนำมา pretreatment ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

หลังจากนั้นแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย cryoprotectant ดังนี้คือ PVS2, PVS3 และ PGluD (ประกอบด้วย PEG 8000 เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ Glucose เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ DMSO เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 1.2 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงในอาหารในที่มืดเป็นเวลา 1 คืน จึงย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ในสภาพการให้แสงปกติ บันทึกการสร้างยอดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.1.14 ผลของ glycerol และชนิดน้ำตาลในการ pretreatment ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้ใช้ชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 3 มิลลิเมตร โดยนำมา pretreatment ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม glycerol และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ดังนี้คือ sorbitol, glucose และซูโครส ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นจึงแช่ในสารละลาย LS เป็นเวลา 20 นาที และ PVS2 เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 1.2 โมลาร์ เป็นเวลา 20 นาที เพาะเลี้ยงและบันทึกการสร้างยอดทั้งที่แช่และไม่แช่ในไนโตรเจนเหลวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.2 การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวร่วมกับเทคนิค dehydration

1.2.1 ผลของระยะเวลาในการ dehydration ต่อน้ำหนักและความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

นำชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 3 มิลลิเมตร มาวางในจานเพาะเลี้ยงและวางในตู้ laminar flow ซึ่งมีลมเป่าในแนวขนาน ความเร็วลม 50 ฟุตต่อนาที เป็นเวลาต่าง ๆ คือ 0.5 1 2 3 4 และ 5 ชั่วโมง โดยบันทึกน้ำหนักสดก่อนและหลังวาง แล้วนำชิ้นส่วนใส่ในหลอด cryotube แช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารเหลวสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 1 นาที ซับด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำชิ้นส่วนไปตรวจสอบ

ความมีชีวิตด้วยสารสารละลาย FDA จำนวน 20 ยอด ส่วนที่เหลือเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.2.2 ผลของการ pretreatment ร่วมกับเทคนิค dehydration ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้เปรียบเทียบการ pretreatment ชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง กับการไม่ pretreatment แล้วนำชิ้นส่วนทั้งสองส่วนมา dehydration โดยวางชิ้นส่วนปลายยอดในจานเพาะเลี้ยงในตู้ laminar flow ความเร็วลม 50 ฟุตต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที หรือ จึงแช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสารสารละลาย FDA จำนวน 20 ยอด ส่วนที่เหลือเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.2.3 ผลของระยะเวลาในการ loading treatment ร่วมกับเทคนิค dehydration ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

นำชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 3 มิลลิเมตร มาแช่ในสารละลาย LS ที่ประกอบด้วย glycerol เข้มข้น 2 โมลาร์ ร่วมกับซูโครส เข้มข้น 0.4 โมลาร์ วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0 0.5 1 และ 2 ชั่วโมง แล้วนำชิ้นส่วนมา dehydration โดยวางในตู้ laminar flow ความเร็วลม 50 ฟุตต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ชิ้นส่วนที่ผ่านการเตรียมทั้งหมด นำมาใส่ในหลอด cryotube แช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารเหลวสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 1 นาที ซับด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำชิ้นส่วนไปตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสารสารละลาย FDA จำนวน 20 ยอด ส่วนที่เหลือเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.3 การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวร่วมกับเทคนิค encapsulation

1.3.1 ผลของความเข้มข้นวุ้นอัลจิเนตต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

นำชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 3 มิลลิเมตร มาหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนต (Fluka) ที่ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 1 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ปราศจาก $CaCl_2$ โดยใช้ปิเปตปลายตัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ดูดปลายยอดในวุ้นอัลจิเนต และหยดในสารละลาย $CaCl_2$ $2H_2O$ เข้มข้น 0.28 เปอร์เซ็นต์ วางไว้เป็นเวลา 30 นาที จึงนำเม็ดบีดใส่ในหลอด cryotube และแช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จึงละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ล้างด้วยอาหารเหลวสูตร MS เติมซูโครส 0.3 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 1 นาที ซับด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำชิ้นส่วนไปตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสารสารละลาย FDA จำนวน 20 ยอด ส่วนที่เหลือเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.3.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นวุ้นอัลจิเนตต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกก่อนและหลังแช่ในไนโตรเจนเหลว

นำชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 3 มิลลิเมตร มาหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนต 3 ยี่ห้อ คือ Sigma Fluka และ Wako แต่ละชนิดมี 4 ระดับความเข้มข้น คือ 1 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ปราศจาก $CaCl_2$ โดยใช้ปิเปตปลายตัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ดูดปลายยอดในวุ้นอัลจิเนต และหยดในสารละลาย $CaCl_2$ $2H_2O$ เข้มข้น 0.28 เปอร์เซ็นต์ วางไว้เป็นเวลา 30 นาที จึงนำเม็ดบีดใส่ในหลอด cryotube และแช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จึงละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ล้างด้วยอาหารเหลวสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 1 นาที ซับด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำชิ้นส่วนไปตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสารสารละลาย FDA จำนวน 20 ยอด ส่วนที่เหลือเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.3.3 ผลของการ pretreatment ร่วมกับเทคนิค encapsulation ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้เปรียบเทียบการ pretreatment ชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง กับการไม่ pretreatment แล้วนำชิ้นส่วนทั้งสองส่วนมาหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนต (Sigma) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ปราศจาก $CaCl_2$ โดยใช้ปิเปตปลายตัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ดูดปลายยอดในวุ้นอัลจิเนต และหยดในสารละลาย $CaCl_2\ 2H_2O$ เข้มข้น 0.28 เปอร์เซ็นต์ วางไว้เป็นเวลา 30 นาที จึงนำเม็ดบีดใส่ในหลอด cryotube และแช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ อุณหภูมิ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสารสารละลาย FDA จำนวน 20 ยอด ส่วนที่เหลือเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.3.4 ผลของระยะเวลาในการ loading treatment ร่วมกับเทคนิค encapsulation ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังแช่ในไนโตรเจนเหลว

นำชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 3 มิลลิเมตร มาแช่ในสารละลาย LS ที่ประกอบด้วย glycerol เข้มข้น 2 โมลาร์ ร่วมกับซูโครส เข้มข้น 0.4 โมลาร์ วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0 0.5 1 และ 2 ชั่วโมง แล้วนำชิ้นส่วนมาหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนต (Sigma) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ปราศจาก $CaCl_2$ โดยใช้ปิเปตปลายตัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ดูดปลายยอดในวุ้นอัลจิเนต และหยดในสารละลาย $CaCl_2\ 2H_2O$ เข้มข้น 0.28 เปอร์เซ็นต์ วางไว้เป็นเวลา 30 นาที จึงนำเม็ดบีดใส่ในหลอด cryotube และแช่ในไนโตรเจนเหลว แช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ อุณหภูมิ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารเหลวสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 1 นาที ซับด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำชิ้นส่วนไปตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสารสารละลาย FDA จำนวน 20 ยอด ส่วนที่เหลือเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.3.5 ผลของสภาพการเพาะเลี้ยงต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้นำชิ้นส่วนปลายยอดขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร มาหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนต (Sigma) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ปราศจาก $CaCl_2$ โดยใช้ปิเปตปลายตัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ดูดปลายยอดในวุ้นอัลจิเนต และหยดในสารละลาย $CaCl_2$ $2H_2O$ เข้มข้น 0.28 เปอร์เซ็นต์ วางไว้เป็นเวลา 30 นาที จึงนำเม็ดบีดใส่ในหลอด cryotube และแช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณภายใต้สภาพต่าง ๆ ดังนี้คือ เพาะเลี้ยงในที่มีแสงเป็นเวลา 1 วัน เปรียบเทียบกับในที่มืดเป็นเวลา 1 3 หรือ 7 วัน ก่อนย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมและสภาพการเพาะเลี้ยงปกติ แต่ละการทดลองตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสารสารละลาย FDA จำนวน 20 ยอด ส่วนที่เหลือเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด และตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.4 การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวโดยใช้เทคนิคร่วมกัน

1.4.1 ผลของการ pretreatment ร่วมกับเทคนิค encapsulation-vitrification ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้นำกลุ่มตายอดขนาด 3-5 มิลลิเมตรมา มา pretreatment โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0 1 3 และ 5 วัน แล้วหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนต (Sigma) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ปราศจาก $CaCl_2$ โดยใช้ปิเปตปลายตัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ดูดปลายยอดในวุ้นอัลจิเนต และหยดในสารละลาย $CaCl_2$ $2H_2O$ เข้มข้น 0.28 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ LS วางไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงแช่เม็ดบีดในสารละลาย LS บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลาต่าง ๆ คือ 0 0.5 1 2 และ 3 ชั่วโมง จึงแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลาย PVS2 ทิ้ง ล้างชิ้นส่วนด้วยสารละลายที่มีองค์ประกอบของอาหารสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา

10 นาที 1 ครั้ง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.4.2 ผลของการ pretreatment ร่วมกับเทคนิค encapsulation-dehydration ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้ใช้กลุ่มตายอดขนาด 3-5 มิลลิเมตร มา pretreatment ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติมซูโครส 0.3 โมลาร์ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0 1 3 และ 5 วัน แล้วหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนต (Sigma) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ปราศจาก $CaCl_2$ โดยใช้ปิเปตปลายตัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ดูดปลายยอดในวุ้นอัลจิเนต และหยดในสารละลาย $CaCl_2$ $2H_2O$ เข้มข้น 0.28 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ LS วางไว้เป็นเวลา 30 นาที ซับด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำมาวางในจานเพาะเลี้ยงในตู้ laminar flow ที่มีลมเป่าในแนวขนาน ความเร็วลม 50 ฟุตต่อนาที เป็นเวลาต่าง ๆ คือ 0 0.5 1 2 3 4 และ 5 ชั่วโมง แช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลาย PVS2 ทิ้ง ล้างชิ้นส่วนด้วยสารละลายที่มีองค์ประกอบของอาหารสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 10 นาที 1 ครั้ง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.4.3 ผลของชนิดของสารละลายป้องกันความเย็นร่วมกับเทคนิค encapsulation-vitrification ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้นำกลุ่มยอดที่ precondition ในอาหารสูตร 1/2 MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตัดปลายยอดให้มีขนาด 1-2 มิลลิเมตร หุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนต (Sigma) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ปราศจาก $CaCl_2$ โดยใช้ปิเปตปลายตัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ดูดปลายยอดในวุ้นอัลจิเนต และหยดในสารละลาย $CaCl_2$ $2H_2O$ เข้มข้น 0.28 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ LS วางไว้เป็นเวลา 30 นาที แช่ในสารละลาย LS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงแช่ในสารละลาย PVS2 และ PVS3 ที่เย็น และวางไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายน้ำแข็งโดยแช่ใน

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 1.2 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 10 นาที เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.4.4 ผลของระยะเวลาในการ dehydration ร่วมกับเทคนิค encapsulation-dehydration ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้นำกลุ่มยอดที่ precondition ในอาหารสูตร 1/2 MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตัดปลายยอดให้มีขนาด 1-2 มิลลิเมตร หุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนต (Sigma) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ปราศจาก $CaCl_2$ โดยใช้ปิเปตปลายตัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ดูดปลายยอดในวุ้นอัลจิเนต และหยดในสารละลาย $CaCl_2$ $2H_2O$ เข้มข้น 0.28 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ LS วางไว้เป็นเวลา 30 นาที ซับด้วยกระดาษกรอง แล้วจึงวางในจานเพาะเลี้ยงในตู้ laminar flow ความเร็วลม 50 ฟุตต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 2 3 4 หรือ 5 ชั่วโมง จึงแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอด ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.4.5 ผลของการ cold acclimatization ร่วมกับเทคนิค encapsulation-dehydration ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษานี้นำกลุ่มยอดมาเพาะเลี้ยงที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 4±1 องศาเซียส (cold acclimatization) ภายใต้ความเข้มแสงต่ำ เป็นเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ ตัดชิ้นส่วนปลายยอดให้มีขนาด 1-2 มิลลิเมตร หุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนต (Sigma) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสูตร MS ปราศจาก $CaCl_2$ โดยใช้ปิเปตปลายตัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ดูดปลายยอดในวุ้นอัลจิเนต และหยดในสารละลาย $CaCl_2$ $2H_2O$ เข้มข้น 0.28 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ LS วางไว้เป็นเวลา 30 นาที pretreatment เม็ดบีดในอาหารเหลวสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.75 โมลาร์ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ซับด้วยกระดาษกรอง แล้วจึงวางในจานเพาะเลี้ยงในตู้ laminar flow เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จึงแช่ในไนโตรเจนเหลว

เป็นเวลา 20 นาที ละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ทำการ rehydrate ในอาหารเหลวโดยแช่ไว้เป็นเวลา 10 นาที และเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรเพิ่มปริมาณยอด (แต่ลดความเข้มข้นของวุ้นจาก 0.75 เปอร์เซ็นต์ ลงเป็น 0.7 เปอร์เซ็นต์) ตรวจสอบการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

2. ศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในหลอดทดลองโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต

2.1 การเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดในสภาพอุณหภูมิต่ำ

ตัดปลายยอดหญ้าแฝกให้มีขนาด 2-3 มิลลิเมตร เตรียมชิ้นส่วนด้วยเทคนิคต่าง ๆ 3 เทคนิค คือ vitrification (แช่ชิ้นส่วนปลายยอดในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 0-120 นาที แล้วล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 1.2 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 10 นาที) dehydration (วางชิ้นส่วนปลายยอดในจานเพาะเลี้ยงในตู้ laminar flow เป็นระยะเวลา 0.5 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง) และ encapsulation (โดยหุ้มชิ้นส่วนปลายยอดด้วยวุ้นอัลจิเนต (Sigma) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์) แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอดในตู้แช่ (ซึ่งมีแสงรำไร) ที่ตั้งอุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1-12 เดือน นำชิ้นส่วนที่ระยะเวลาต่าง ๆ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอดในสภาพปกติ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบอัตราการสร้างยอด จำนวนยอด ความยาวยอด และการแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD

2.2 การเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดในสูตรอาหารระดับต่าง ๆ ร่วมกับ PBZ

ตัดปลายยอดหญ้าแฝกให้มีขนาด 2-3 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติ และปรับระดับขององค์ประกอบลงหนึ่งในสี่ (3/4 MS) ครึ่งหนึ่ง (1/2 MS) และสามในสี่ (1/4 MS) ร่วมกับเติม PBZ ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0 1.89 3.78 และ 7.56 ไมโครโมลาร์ (หรือ 0 0.25 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในสภาพการให้แสงปกติ เป็นระยะเวลา 2 และ 12 เดือน ตรวจสอบอัตราการสร้างยอด จำนวนยอด ความยาวยอด และการแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD

2.3 การเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดในอาหารเติมพาโคลบิวทราโซล

ตัดปลายยอดหญ้าแฝกให้มีขนาด 2-3 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีระดับธาตุอาหารที่เหมาะสมจากการศึกษาที่ 2.2 เติมพาโคลบิวทราโซลความเข้มข้น 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพปกติ และในสภาพที่อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 เดือน ตรวจสอบอัตราการสร้างยอด ความยาวยอด และการแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD

3. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RAPD

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ และตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ

สกัดดีเอ็นเอจากใบหญ้าแฝกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพิ่มปริมาณ (ชุดควบคุม) และจากต้นที่เก็บรักษาเชื้อพันธุ์ด้วยวิธีต่าง ๆ โดยใช้วิธี CTAB ที่มีการดัดแปลงเล็กน้อย โดยนำใบน้ำหนัก 100 มิลลิกรัม มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว เติม extraction buffer (ประกอบด้วย CTAB เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ Na-EDTA pH 8.0 เข้มข้น 0.5 โมลาร์ PVP เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ NaCl เข้มข้น 8.12 เปอร์เซ็นต์ Tris–HCl pH 8 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ และ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม chloroform ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ล้างตะกอนด้วยเอธานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง ทำให้แห้งโดยวางไว้ข้ามคืน (ประมาณ 12 ชั่วโมง) และละลายตะกอนด้วนสารละลาย TE buffer (Tris–HCl pH 7.5 เข้มข้น 1 โมลาร์ และ Na-EDTA pH 7.0 เข้มข้น 0.25 โมลาร์) ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้นอากาโรส ที่ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 1 เท่า ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ และใช้ λDNA เป็นมาตรฐาน ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบนเจลหลังย้อมสีด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (ปริมาณ 20 นาโนกรัม) ไปทำปฏิกิริยา PCR ตามเทคนิค RAPD

3.2 **การเพิ่มปริมาณยีโนมิคดีเอ็นเอโดยเทคนิค** RAPD

นำไพรเมอร์ขนาดความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ ของบริษัท Operon Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวน 7 ชนิด คือ OPJ4 OPN15 OPAB01 OPAB09 OPAB14 OPR3 และ OPR12 มาคัดเลือกว่าไพรเมอร์ใดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของหญ้าแฝกได้ด้วยเทคนิค PCR ในปฏิกิริยาปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ ดีเอ็นเอต้นแบบ 20 นาโนกรัม dNTP 2.5 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ 0.2 ไมโครโมลาร์, *Taq* DNA polymerase 1.0 ยูนิต การสังเคราะห์ดีเอ็นเอทำด้วยเครื่อง BIOER XP cycler โดยตั้งโปรแกรม PCR เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และตั้งจำนวน 35 รอบคือที่ระดับ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (สำหรับการ denaturation) 37 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (สำหรับการ annealing) 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที (สำหรับ primer extension) และรอบที่ 36 สำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากทำ PCR นำสารละลายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ 12.5 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้นอากาโรส ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 0.5 เท่า ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เทียบขนาดดีเอ็นเอด้วย DNA ladder marker ขนาด 100 คู่เบส ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบนเจลหลังย้อมสีด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20-30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10-15 นาที

บทที่ 3

ผล

1. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในไนโตรเจนเหลว

1.1 การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวร่วมกับเทคนิค vitrification

1.1.1 ผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกที่ผ่านการแช่ในสารละลาย PVS2

จากการล้างชิ้นส่วนปลายยอดที่ผ่านการแช่ในสารละลาย PVS2 ด้วยอาหารสูตร MS เติมซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ (0.1-0.7 โมลาร์) จำนวน 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งแช่นาน 1 นาที พบว่า ซูโครสความเข้มข้น 0.1 หรือ 0.3 โมลาร์ ให้ความมีชีวิตสูงสุด 95 เปอร์เซ็นต์ และความมีชีวิตลดลงเมื่อความเข้มข้นของซูโครสเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกที่ผ่านการแช่ในสารละลาย PVS2

ความเข้มข้นซูโครส (โมลาร์)	ความมีชีวิต (%)
0.1	95
0.3	95
0.5	85
0.7	85

1.1.2 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการละลายน้ำแข็งต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

การละลายน้ำแข็งในชิ้นส่วนปลายยอดหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลวทันทีด้วยการแช่ cryotubes ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ให้ความมีชีวิต

85 เปอร์เซ็นต์ การเพิ่มเวลาในการแช่เป็น 2 นาที ส่งเสริมให้อัตรารอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการแช่ที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 หรือ 2 นาที (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการละลายน้ำแข็งต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

การละลายน้ำแข็ง	ความมีชีวิต (%)
30 ^{0}ซ, 1 นาที	85
30 ^{0}ซ, 2 นาที	100
40 ^{0}ซ, 1 นาที	100
40 ^{0}ซ, 2 นาที	100

1.1.3 ผลของระยะเวลาในการแช่ในสารละลาย PVS2 ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลาในการแช่สารละลาย PVS2 มีผลอย่างเห็นได้ชัดต่อความมีชีวิตและการสร้างยอดทั้งก่อนและหลังการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดย พบว่า ในสภาพปกติ (ไม่แช่ในไนโตรเจนเหลว) อัตราการสร้างยอดหรือความมีชีวิตลดลงตามสัดส่วนของระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยอัตราการสร้างยอดลดลงเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่เป็นเวลา 60 นาที แสดงว่าระยะเวลาในการแช่ในสารละลาย PVS2 มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ในทางตรงข้ามเมื่อมีการแช่ในไนโตรเจนเหลวร่วมด้วย พบว่า ความมีชีวิตเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการแช่เพิ่มขึ้น โดยสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่เป็นระยะเวลา 120 นาที แสดงว่าสารละลาย PVS2 มีส่วนในการช่วยป้องกันความเสียหายของเนื้อเยื่อในสภาพที่เย็นจัด (-196 องศาเซลเซียส) อย่างไรก็ตามชิ้นส่วนดังกล่าวไม่มีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ โดยพบว่าชิ้นส่วนดังกล่าวเปลี่ยนเป็นสีซีดและตายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2-3 วัน ดังนั้นอาจต้องอาศัยปัจจัยอื่นร่วมด้วยเพื่อส่งเสริมการ regrowth เป็นพืชต้นใหม่ (ตารางที่ 3, รูปที่ 1)

ตารางที่ 3 ผลของระยะเวลาในการแช่ในสารละลาย PVS2 ต่อความมีชีวิตและการสร้างยอดของชิ้นส่วนปลายยอดที่แช่และไม่แช่ในไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลา (นาที)	การสร้างยอด (%)		ความมีชีวิต (%)*
	- LN	+ LN	+ LN
0	100	0	0
1	100	0	0
15	90	0	45.45
30	70	0	55.56
45	70	0	66.67
60	30	0	70
75	30	0	90
90	30	0	80
105	10	0	90
120	10	0	100

***** ตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสารละลาย FDA จำนวน 10 ชิ้น/หน่วยการทดลอง

-LN ไม่แช่ในไนโตรเจนเหลว

+LN แช่ในไนโตรเจนเหลว

รูปที่ 1 การสร้างยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดที่ผ่านการแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลาต่าง ๆ บนอาหารสูตร MS เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก) ไม่แช่ในไนโตรเจนเหลว (ข) แช่ในโตรเจนเหลว

1.1.4 ผลของการ pretreatment ร่วมกับเทคนิค vitrification ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

จากการ pretreatment ชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกในอาหารเติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ร่วมกับเทคนิค vitrification ก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว พบว่าให้ความมีชีวิต 95 เปอร์เซ็นต์ ไม่ต่างกับการไม่ pretreatment (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลของการ pretreatment ร่วมกับเทคนิค vitrification ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

pretreatment	ความมีชีวิต (%)
-	95
+	95

1.1.5 ผลของระยะเวลาการ pretreatment ร่วมกับเทคนิค vitrification ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ชิ้นส่วนทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีซีดและตาย ภายใน 2-3 วันหลังจากเพาะเลี้ยง

1.1.6 ผลของระยะเวลาในการ loading treatment ร่วมกับเทคนิค vitrification ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

การแช่ชิ้นส่วนปลายยอดในสารละลาย LS ร่วมกับเทคนิค vitrification มีความจำเป็น โดยพบว่า การแช่เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ให้อัตรารอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ หลังเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ในขณะที่การไม่แช่ชิ้นส่วนปลายยอดในสารละลาย LS ให้อัตรารอดชีวิตต่ำ (27.27 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลของระยะเวลาในการ loading treatment ร่วมกับเทคนิค vitrification ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

เวลาในการแช่สารละลาย LS (ชั่วโมง)	ความมีชีวิต (%)
0	27.27
0.5	95.45
1.0	100.00
2.0	94.12

1.1.7 ผลของสภาพการเพาะเลี้ยงต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ชิ้นส่วนทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีซีดและตาย ภายใน 2-3 วันหลังจากเพาะเลี้ยง

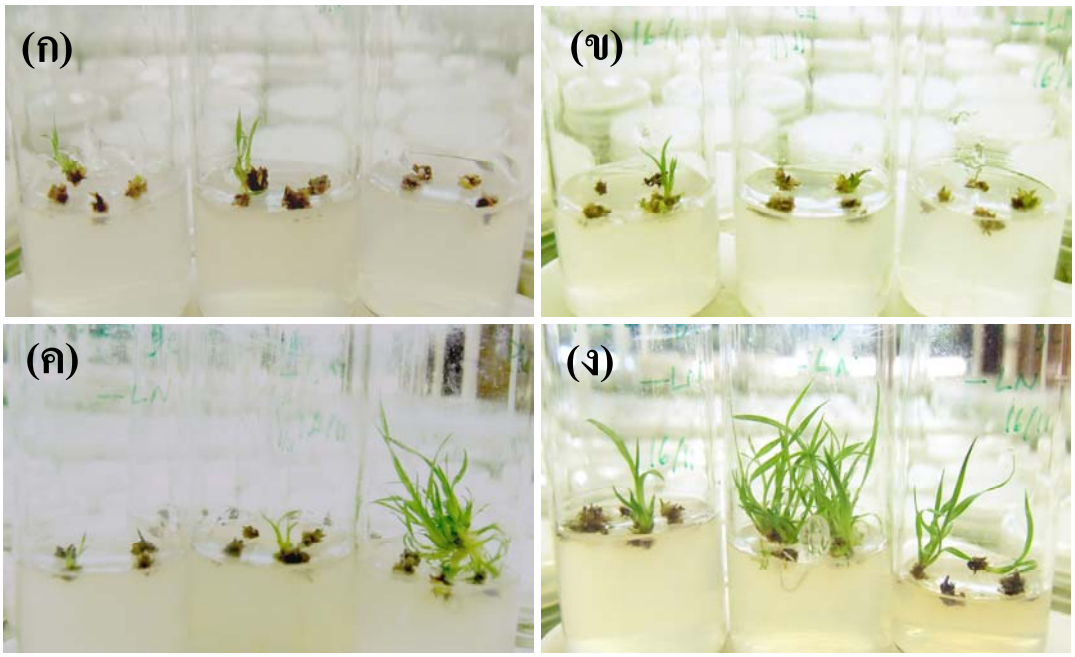
1.1.8 ผลของอุณหภูมิและชนิดของสารละลาย cryoprotectant ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

การแช่ชิ้นส่วนในสารละลายทั้งสองชนิด (PVS2 และ PVS3) ในที่อุณหภูมิต่ำ (5 องศาเซลเซียส) ให้อัตราการสร้างยอดหรือจำนวนยอดสูงกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยที่สารละลาย PVS3 ให้อัตราการสร้างยอดสูงกว่า PVS2 ทั้งที่อุณหภูมิ 5 และ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งการแช่ชิ้นส่วนปลายยอดในสารละลาย PVS3 ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ให้อัตราการสร้างยอดสูงสุด 75 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 3.33 ยอดต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 6, รูปที่ 2)

ตารางที่ 6 ผลของอุณหภูมิและชนิดของสารละลาย PVS ต่อการสร้างยอดของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกก่อนและหลังเก็บในไนโตรเจนเหลว

หน่วยการทดลอง	การสร้างยอด (%)	
	-LN	+LN
PVS2, 5 ^{0}ซ	25 (5)	0
PVS2, 25 ^{0}ซ	25 (2)	0
PVS3, 5 ^{0}ซ	75 (3.33)	0
PVS3, 25 ^{0}ซ	30 (2.5)	0

ตัวเลขในวงเล็บเป็นจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน



รูปที่ 2 ยอดที่พัฒนาจากชิ้นส่วนปลายยอดที่ผ่านการแช่ในสารละลาย PVS2 และ PVS3 ที่อุณหภูมิ 5 และ 25 องศาเซลเซียส บนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก) PVS2, 25 ^{0}ซ (ข) PVS3, 25 ^{0}ซ (ค) PVS2, 5 ^{0}ซ, (ง) PVS3, 5 ^{0}ซ

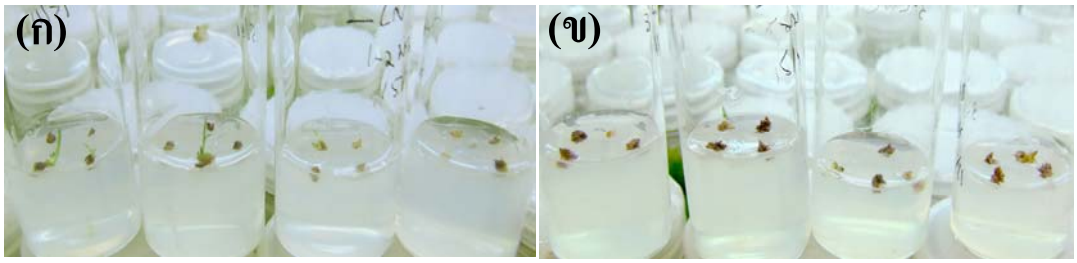
1.1.9 ผลของขนาดของปลายยอดต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลวหลว

ชิ้นส่วนขนาดเล็ก (1-2 มิลลิเมตร) ให้อัตราการสร้างยอด และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนสูงกว่าชิ้นส่วนขนาด 3-5 มิลลิเมตร คือ 25 เปอร์เซ็นต์ และ 2 ยอดต่อชิ้นส่วนตามลำดับ (ตารางที่ 7) ลักษณะยอดแสดงดังรูปที่ 3

ตารางที่ 7 ผลของขนาดชิ้นส่วนปลายยอดต่อการสร้างยอดก่อนและหลังเก็บในไนโตรเจนเหลว

ปลายยอด (มิลลิเมตร)	การสร้างยอด (%)	
	-LN	+LN
1-2	25.00 (2)	0
3-5	18.75 (1.33)	0

ตัวเลขในวงเล็บเป็นจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน



รูปที่ 3 ลักษณะยอดที่พัฒนาจากชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 1-2 มิลลิเมตร (ก) และ 3-5 มิลลิเมตร (ข) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.1.10 **ผลของระยะเวลาในการแช่ในสารละลาย** PVS3 **ที่อุณหภูมิ** 5 **องศาเซลเซียสต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว**

1.1.11 **ผลของระยะเวลาในการแช่สารละลาย** LS **ร่วมกับสารละลาย** PVS 3 **ที่อุณหภูมิ** 5 **องศาเซลเซียส ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว**

1.1.12 **ผลของการแช่ในสารละลาย** cryoprotectant **ที่อุณหภูมิ** 0 **องศาเซลเซียสร่วมกับสภาพการเพาะเลี้ยง ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว**

การศึกษาในข้อ 1.1.10-1.1.12 ชิ้นส่วนทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีชีดและตาย ภายใน 2-3 วันหลังจากเพาะเลี้ยง

1.1.13 **ผลขององค์ประกอบของสารละลาย** cryoprotectant **ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว**

การ pretreatment ชิ้นส่วนปลายยอดในอาหารสูตร 1/2 MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 1 คืน แล้วมาแช่ในสารละลาย cryoprotectant ที่มีองค์ประกอบของสารต่าง ๆ พบว่า PGluD ให้อัตรารอดชีวิตสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน

(จากการสังเกตพบว่า ชิ้นส่วนยังมีสีเขียวปกติ) อย่างไรก็ตาม เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ชิ้นส่วนเปลี่ยนเป็นสีซีดและไม่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลขององค์ประกอบสารละลาย cryoprotectants ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝก

สารละลาย cryoprotectants	(%) ความมีชีวิต 6 วัน	(%) ความมีชีวิต 6 สัปดาห์
PVS2	46.67	0
PVS3	38.09	0
PGluD	80.00	0

PVS2 (glycerol เข้มข้น 30% ethylene glycol เข้มข้น 15% DMSO เข้มข้น 15% และซูโครส 0.4 M ในอาหารสูตร MS)

PVS3 (glycerol เข้มข้น 50% ซูโครส เข้มข้น 50%)

PGluD (PEG-8000 เข้มข้น 10% Glucose เข้มข้น 10 % DMOS เข้มข้น 10%)

1.1.14 ผลของ glycerol และชนิดน้ำตาลในการ pretreatment ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

จากการ pretreatment ชิ้นส่วนปลายยอดในอาหารเติม glycerol และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 3 วัน แล้วมาผ่านกระบวนการตามเทคนิค vitrification พบว่า glycerol ให้ความมีชีวิตของชิ้นส่วนสูงสุด 77.78 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน (จากการสังเกตชิ้นส่วนมีสีเขียวและบางส่วนเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล) รองลงมาคือ glucose ส่วน sorbitol ส่วนใหญ่มีสีน้ำตาล ในขณะที่ซูโครสชิ้นส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งหมด (ตารางที่ 9) อย่างไรก็ตาม ชิ้นส่วนทั้งหมดไม่มีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ส่วนชิ้นส่วนที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่าชิ้นส่วนทั้งหมดมีสีซีด

ตารางที่ 9 ผลของ glycerol และชนิดของน้ำตาลต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกก่อนและหลังแช่ในไนโตรเจนเหลว หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน

สาร และน้ำตาล	ชิ้นส่วนที่มีสีเขียว (%)	
	-LN	+LN
Glycerol	77.78	0 (ซีด)
Sorbitol	6.67	0 (ซีด)
Glucose	33.18	0 (ซีด)
Sucrose	0 (สีน้ำตาล)	0 (ซีด)

1.2 การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวร่วมกับเทคนิค dehydration

1.2.1 ผลของระยะเวลาในการ dehydration ต่อน้ำหนักและความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

การ dehydration เป็นเวลานานขึ้นส่งผลให้มีการสูญเสียความชื้นเพิ่มขึ้น หลังจาก 3 ชั่วโมง น้ำหนักในปลายยอดคงที่ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความมีชีวิตหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า การ dehydration ไม่มีผลต่อความมีชีวิตของปลายยอด ทุกระดับของการ dehydration ให้ความมีชีวิตของปลายยอด 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10) แม้ว่าจะ พบการติดสีแดงร่วมด้วยในการ dehydrated เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 2 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ยอดทั้งหมดไม่สามารถพัฒนาให้พืชต้นใหม่ได้

ตารางที่ 10 ผลของระยะเวลาในการ dehydration ต่อน้ำหนักและความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

เวลาในการ dehydration (ชั่วโมง)	น้ำหนักลดลง (%)	ความมีชีวิต (%)
0.5	25	100
1	25	100
2	40	100*
3	100	100*
4	100	100*
5	100	100*

* การติดสีจะมีส่วนที่เขียว และ แดง

1.2.2 ผลของการ pretreatment ร่วมกับเทคนิค dehydration ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

การ pretreatment ชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝก ก่อนการ dehydration ไม่ส่งเสริมอัตรารอดชีวิตหลังการแช่ในไนโตรเจนเหลว แต่ทำให้ความมีชีวิตลดลง (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ผลของการ pretreatment ร่วมกับเทคนิค dehydration ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

pretreatment	ความมีชีวิต (%)
-	94.74
+	89.29

1.2.3 ผลของระยะเวลาในการ loading treatment ร่วมกับเทคนิค dehydration ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

การแช่ชิ้นส่วนปลายยอดในสารละลาย LS ก่อนการ dehydration ไม่ส่งเสริมอัตรารอดชีวิตหลังการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยการแช่และไม่แช่ในสารละลาย LS ให้ผลไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ผลของระยะเวลาในการ loading treatment ร่วมกับเทคนิค dehydration ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

เวลาในการแช่สารละลาย LS (ชั่วโมง)	ความมีชีวิต (%)
0	100
0.5	100
1.0	100
2.0	100

1.3 การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวร่วมกับเทคนิค encapsulation

1.3.1 ผลของความเข้มข้นวุ้นอัลจิเนตต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

การหุ้มชิ้นส่วนปลายยอดด้วยวุ้นอัลจิเนตก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลวส่งเสริมอัตรารอดชีวิตหลังจากผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยความเข้มข้น 3 หรือ 4 เปอร์เซ็นต์ ให้ความมีชีวิตของชิ้นส่วนหลังการแช่ในไนโตรเจนเหลวสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ และความมีชีวิตลดลงเมื่อความเข้มข้นของวุ้นอัลจิเนตลดลง โดยการไม่หุ้มชิ้นส่วนพบว่าความมีชีวิตเป็นศูนย์ อย่างไรก็ตาม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนดังกล่าวมีสีซีดและตาย ไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ผลของความเข้มข้นวุ้นอัลจิเนตต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ความเข้มข้น (%)	ความมีชีวิต (%)	
	เริ่มต้น	2 สัปดาห์
0	0	0
1	20	0
2	60	0
3	80	0
4	80	0

1.3.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของวุ้นอัลจิเนตต่ออัตรารอดชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดก่อนและหลังแช่ในไนโตรเจนเหลว

จากการหุ้มชิ้นส่วนปลายยอดด้วยวุ้นอัลจิเนต 3 ยี่ห้อ คือ Sigma Fluka และ Wako แต่ละชนิดมี 4 ระดับความเข้มข้น คือ 1 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนต Wako เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ให้การสร้างยอดสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม การหุ้มด้วยวุ้น Sigma 3 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการสร้างยอดสูง 70 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอดสูงกว่า (0.57 ยอด/ชิ้นส่วน) (ตารางที่ 14) เมื่อสังเกตเปรียบเทียบความใสและความแข็ง พบว่า Wako มีความใสและแข็งมากที่สุด รองลงมาคือ Sigma และ Fluka ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาความยากง่ายในการปฏิบัติการ พบว่า Sigma หยดได้ง่ายกว่า Wako และ ได้เม็ด bead ที่กลมสวยมากกว่า Fluka (รูปที่ 4) อย่างไรก็ตามเม็ดบีดหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลวไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ โดยเปลี่ยนเป็นสีซีดและตาย

ตารางที่ 14 ผลของชนิดและความเข้มข้นของวุ้นอัลจิเนตต่อการสร้างยอดของชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร MS เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้นวุ้นอัลจิเนต (%)	การสร้างยอด (%)		
	SIGMA	WAKO	FLUKA
1	60 (0)	40 (0.25)	50 (0.60)
2	50 (0.80)	40 (0.00)	40 (0.75)
3	70 (0.57)	30 (0.33)	40 (0.50)
4	60 (0.50)	80 (0.13)	30 (0.33)

ตัวเลขในวงเล็บเป็นจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วน

WAKO SIGMA FLUKA

รูปที่ 4 ลักษณะของเม็ดบีดจากการหุ้มชิ้นส่วนปลายยอดด้วยวุ้นอัลจิเนตยี่ห้อต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

1.3.3 ผลของการ pretreatment ร่วมกับเทคนิค encapsulation ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังแช่ในไนโตรเจนเหลว

การ pretreatment ชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝก ก่อนการ encapsulation ไม่ส่งเสริมอัตรารอดชีวิตหลังการแช่ในไนโตรเจนเหลว แต่ทำให้ความมีชีวิตลดลง (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ผลของการ pretreatment ร่วมกับเทคนิค encapsulation ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

pretreatment	ความมีชีวิต (%)
-	71.43
+	61.90

1.3.4 ผลของระยะเวลาในการ loading treatment ร่วมกับเทคนิค encapsulation ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังแช่ในไนโตรเจนเหลว

การแช่ชิ้นส่วนปลายยอดในสารละลาย LS ก่อนการ encapsulation ไม่ส่งเสริมอัตรารอดชีวิตหลังการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยการแช่และไม่แช่ในสารละลาย LS ให้ผลไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ผลของระยะเวลาในการ loading treatment ร่วมกับเทคนิค dehydration ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

เวลาในการแช่สารละลาย LS (ชั่วโมง)	ความมีชีวิต (%)
0	100
0.5	100
1.0	100
2.0	100

1.3.5 ผลของสภาพการเพาะเลี้ยงต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลวในที่มืดเป็นเวลา 1 วันก่อนย้ายไปเลี้ยงในสภาพการให้แสงปกติให้อัตรารอดชีวิต 10 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาพการให้แสงโดยตรงทันที อย่างไรก็ตาม เมื่อเลี้ยงในที่มืดเป็นระยะเวลานานขึ้น พบว่าอัตรารอดชีวิตลดลง โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ความมีชีวิตเป็น 0 แต่ชิ้นส่วนดังกล่าวไม่มีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ โดยเปลี่ยนเป็นสีซีด และตาย (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 ผลของสภาพการเพาะเลี้ยงต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

สภาพการเพาะเลี้ยง	ความมีชีวิต (%)	การสร้างยอด (%)
ที่มีแสง 1 วัน	5.0	0
ที่มืด 1 วัน	10.0	0
ที่มืด 3 วัน	5.0	0
ที่มืด 7 วัน	0.0	0

1.4 ผลของการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวโดยใช้เทคนิคร่วมกัน

1.4.4 ผลของระยะเวลาในการ dehydration ร่วมกับเทคนิค encapsulation-dehydration ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

จากการวางชิ้นส่วนปลายยอดที่ผ่านการหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนตในตู้ laminar flow เป็นระยะเวลาต่าง พบว่า ระยะเวลา 3-5 ชั่วโมง ให้ความมีชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว ส่วนระยะเวลาสั้นลงให้ความมีชีวิตลดลง ตามลำดับ (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 ผลของระยะเวลาการ dehydrated ในตู้ laminar flow ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดที่ผ่านการหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนต หลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความมีชีวิต (%)
1	61.11
2	95.00
3	100.00
4	100.00
5	100.00

สำหรับวิธีการดังต่อไปนี้ คือ

ผลของการ pretreatment **ร่วมกับเทคนิค** encapsulation-dehydration **ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว**

ผลของการทำ cold acclimatization **ร่วมกับเทคนิค** encapsulation-dehydration **ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว**

ผลของการ pretreatment **ร่วมกับเทคนิค** encapsulation-vitrification **ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว**

ผลของชนิดของสารละลายป้องกันความเย็นร่วมกับเทคนิค encapsulation-vitrification **ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว**

ให้ผลทำนองเดียวกัน คือชิ้นส่วนที่ผ่านการศึกษาและเก็บในไนโตรเจนเหลวไม่สามารถ regrowth เป็นพืชต้นใหม่ได้ โดยชิ้นส่วนทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีซีดและตาย

2. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในหลอดทดลองโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต

2.1 การเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดในสภาพอุณหภูมิต่ำ

จากการเตรียมชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 2-3 มิลลิเมตร ด้วยเทคนิค 3 เทคนิค คือ 1) vitrification (โดยแช่ชิ้นส่วนปลายยอดในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 0-120 นาที แล้วล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 1.2 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 10 นาที) 2) dehydration (โดยวางชิ้นส่วนปลายยอดในตู้ laminar flow เป็นระยะเวลา 0.5 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง) และ 3) encapsulation (โดยหุ้มชิ้นส่วนปลายยอดด้วยวุ้นอัลจิเนต เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์) แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอดในตู้แช่ที่มีแสงรำไรและตั้งอุณหภูมิที่ 4±1 องศาเซลเซียส พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน ชิ้นส่วนเริ่มเปลี่ยนเป็นสีชีด จึงทำการย้ายมาเลี้ยงในสภาพปกติเป็นเวลา 4-8 สัปดาห์ แต่ชิ้นยังคงชีดและไม่มีการพัฒนาเป็นยอด (รูปที่ 5)

รูปที่ 5 ชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากผ่านการเตรียมชิ้นส่วนด้วยเทคนิคต่าง ๆ (ก) ชุดควบคุม (ข) vitrification dehydration และ encapsulation และเก็บในตู้ควบคุม อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 เดือน

2.2 การเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดในสูตรอาหารระดับต่าง ๆ ร่วมกับ PBZ

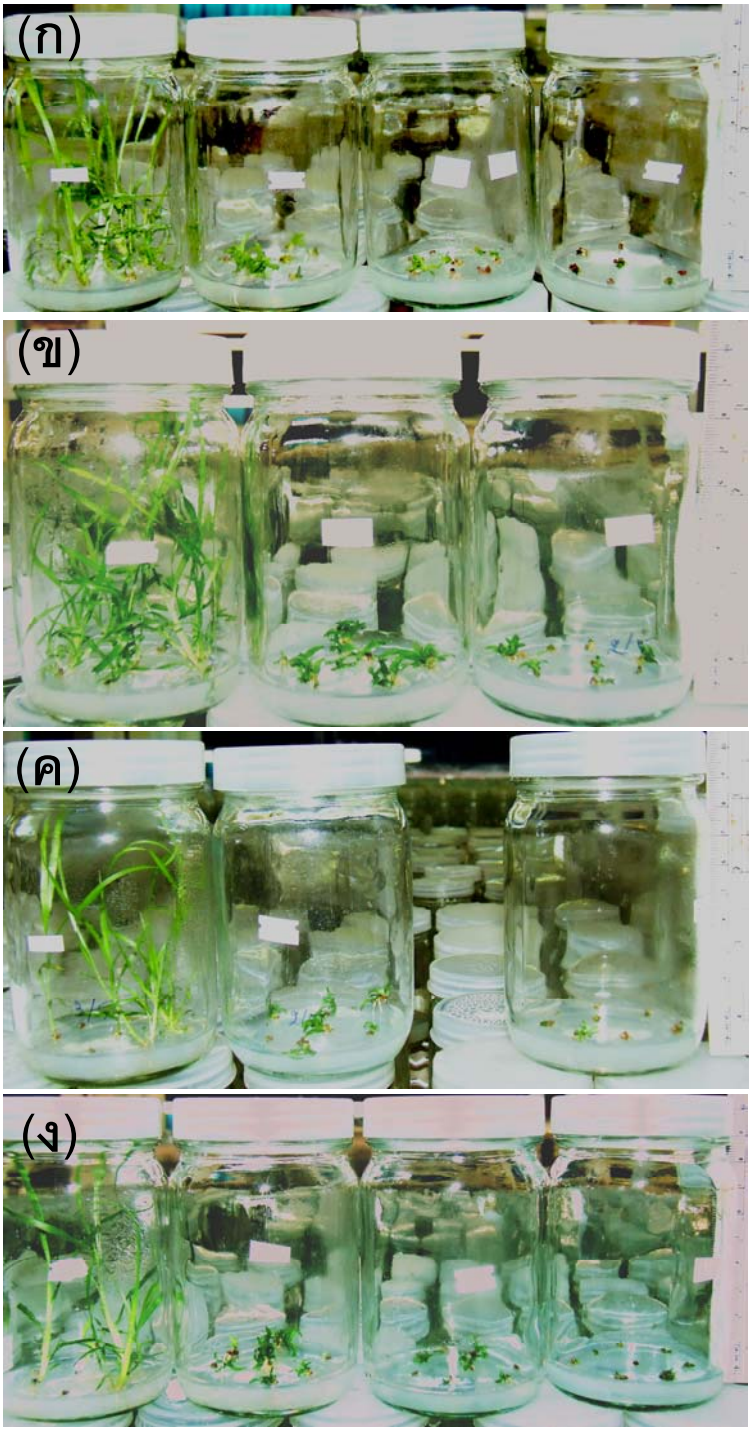
จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกขนาด 2-3 มิลลิเมตรในอาหารความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับเติมพาโคลบิวทราโซลความเข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า อัตราการสร้างยอดสูงระหว่าง 71-100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความยาวยอดในอาหารที่ไม่เติมพาโคลบิวทราโซล (ทุกความเข้มข้นของธาตุอาหาร) ความสูงอยู่ในช่วง 10-40 มิลลิเมตร ในขณะที่การเติมพาโคลบิวทราโซลด้วยความยาวยอดจะอยู่ในช่วง 1-6 มิลลิเมตร การเติมพาโคลบิวทราโซลความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดที่ยืดยาวน้อยที่สุด 1-2 มิลลิเมตร จำนวนยอดเฉลี่ย 1 ยอดต่อชิ้นส่วน (ตารางที่ 19 รูปที่ 6) เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 12 เดือน พบว่า อัตราการสร้างยอด (ยอดที่รอดชีวิต) ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากยอดที่พัฒนาในช่วงแรกเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือตายบ้าง หรือมีการปนเปื้อนบ้าง อัตรารอดชีวิตของยอดหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน ในอาหารสูตร 1/2 MS ร่วมกับ PBZ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สูงสุด 62.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.2 ยอดต่อชิ้นส่วน ความยาวยอด 2-5 มิลลิเมตร ส่วนอาหารที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงเป็น 1/2 MS และ 3/4 MS และที่ไม่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบ (MS) ปราศจากสารพาโคลบิวทราโซล ให้การเจริญของยอดเร็วมาก ความยาวยอดสูงจนชนฝาขวด การเติมพาโคลบิวทราโซลร่วมด้วยสามารถชะลอการเจริญของยอดหญ้าแฝก โดยความยาวยอดสูงสุด ที่ 5-12 มิลลิเมตร (1/4MS + PBZ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร) (ตารางที่ 19, รูปที่ 7 ก-ง)

ตารางที่ 19 ผลของความเข้มข้นของธาตุอาหารและพาโคลบิวทราโซลต่อการสร้างยอด จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนและความยาวยอดในการเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดในหลอดทดลองเป็นเวลา 2 และ 12 เดือน

ธาตุอาหาร	PBZ (มก./ล.)	การสร้างยอด (%)		จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน		ความยาวยอด (มม)	
		2 เดือน	12 เดือน	2 เดือน	12 เดือน	2 เดือน	12 เดือน
MS	0	81.60	0	1	-	10-35	-
	0.25	87.50	0	1	-	1-6	-
	0.5	79.17	-	1	-	1-5	-
	1.0	70.83	-	1	-	1-2	-
3/4 MS	0	87.5	6.25	1	1	10-35	> 100
	0.25	91.67	0	1	-	2-6	-
	0.5	84.50	54.17	1	2.06	1-5	3-10
	1.0	-	-	-	-	-	-
1/2 MS	0	62.50	25.00	1	1	20-30	> 100
	0.25	100	-	1	-	2-5	-
	0.5	-	-	-	-	-	-
	1.0	87.5	62.50	1	2.2	2-3	2-5
1/4 MS	0	87.50	62.50	1	1	10-40	~60
	0.25	100	56.25	1	1.3	2-5	5-12
	0.5	87.50	-	1	-	1-3	-
	1.0	87.50	-	1	-	1-2	-

- ปนเปื้อน หรือ ไม่ตรวจสอบ

0 สีน้ำตาล หรือ ตาย



รูปที่ 6 ลักษณะของยอดที่พัฒนาจากชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับการเติมพาโคลบิวทราโซลความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน

(ก) MS (0, 0.25, 0.5,1.0 มก./ล. PBZ) (ข) 3/4 MS (0, 0.25, 0.5 มก./ล. PBZ)

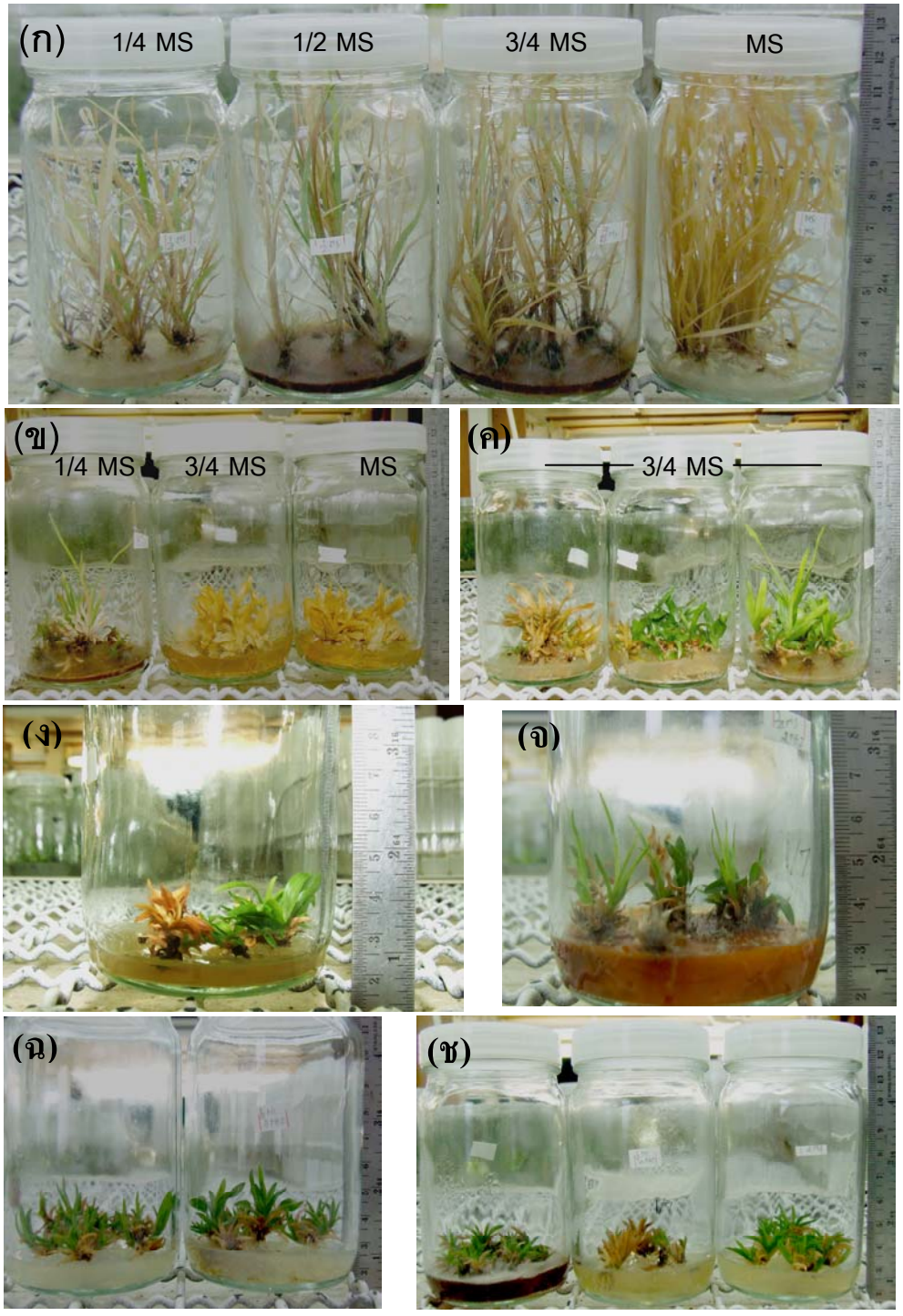
(ค) 1/2 MS (0, 0.25, 1.0 มก./ล. PBZ) (ง) 1/4 MS (0, 0.25, 0.5, 1.0 มก./ล. PBZ)

2.3 การเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดในอาหารเติมพาโคลบิวทราโซล

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร 1/4 MS เติมพาโคลบิวทราโซลความเข้มข้น 2-4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพการเพาะเลี้ยงปกติ (อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส) หรือ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน พบว่า พาโคลบิวทราโซล เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการสร้างยอดรวม และจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 75 เปอร์เซ็นต์ และ 3.76 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ และความยาวยอด 2-6 มิลลิเมตร (ตารางที่ 20 รูปที่ 7 จ ฉ ช) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ชิ้นส่วนเปลี่ยนเป็นสีซีดและตายตั้งแต่เดือนที่สองหลังจากเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 20 ผลของสภาพการเก็บรักษาร่วมกับอาหาร 1/4 MS เติมพาโคลบิวทราโซลในการเก็บชิ้นส่วนปลายยอดในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 12 เดือน

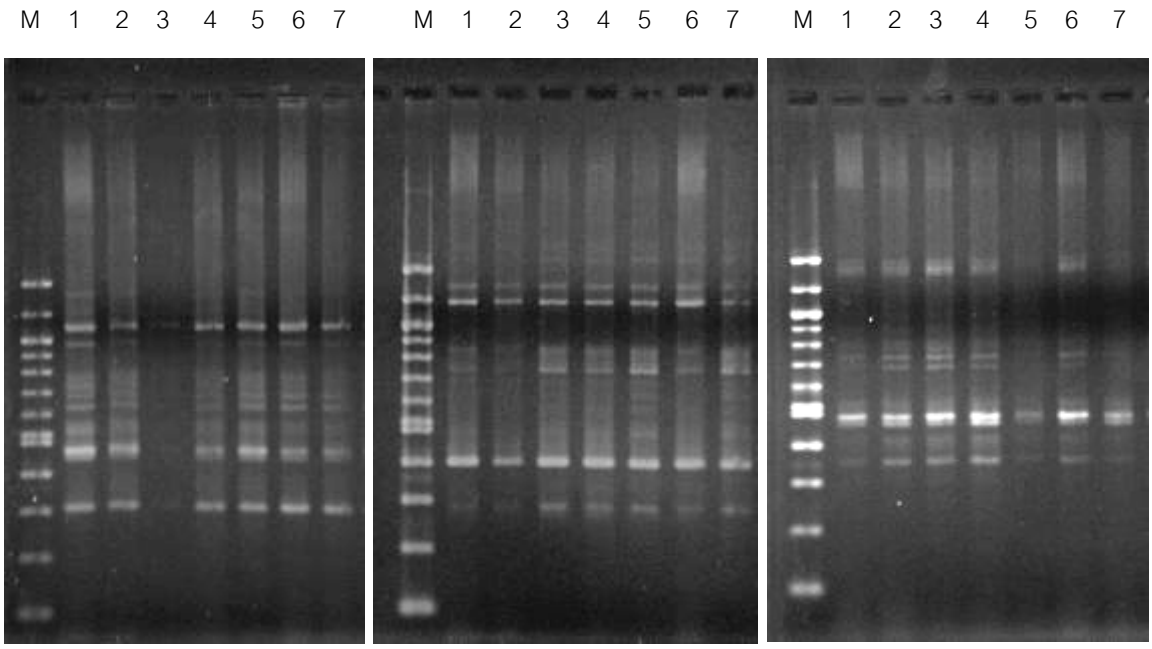
PBZ	การสร้างยอด (%)		จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน		ความยาวยอด (มม)	
(มก./ล.)	27±1 °ซ	4±1 °ซ	27±1 °ซ	4±1 °ซ	27±1 °ซ	4±1 °ซ
2	50.0	0	3.25	-	3-7	-
3	75.0	0	3.76	-	2-6	-
4	62.5	0	2.88	-	2-4	-



รูปที่ 7 ยอดที่พัฒนาจากชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารเติม MS ร่วมกับ PBZ เป็นเวลา 12 เดือน (ก) PBZ เข้มข้น 0 มก./ล. (ข) PBZ เข้มข้น 0.25 มก./ล. (ค) 3/4 MS ร่วมกับ PBZ เข้มข้น 0.5 มก./ล. (ง) 1/2 MS ร่วมกับ PBZ เข้มข้น 1 มก./ล. (จ) 1/4 MS ร่วมกับ PBZ เข้มข้น 2 มก./ล. (ฉ) 1/4 MS ร่วมกับ PBZ เข้มข้น 3 มก./ล.(ช) 1/4 MS ร่วมกับ PBZ เข้มข้น 4 มก./ล.

3. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RAPD

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมต้นที่เก็บรักษาในหลอดทดลองในสภาพชะลอการเจริญเติบโต เป็นเวลา12 เดือน เปรียบเทียบกับต้นที่เพาะเลี้ยงปกติ โดยใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 7 ไพรเมอร์ พบว่า มีจำนวน 3 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหญ้าแฝกได้ และให้แถบดีเอ็นเอในลักษณะ monomorphic โดยที่จากการวิเคราะห์ดังกล่าวปรากฏแถบดีเอ็นเอของต้นที่เก็บรักษาในหลอดทดลองเหมือนกับต้นควบคุม แสดงว่าไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม (รูปที่ 8)



(ก) **(ข)** **(ค)**

รูปที่ 8 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPJ4 (ก) OPN15 (ข) และ OPAB09 (ค) ในต้นหญ้าแฝกที่เก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในหลอดทดลองในสภาพชะลอการเจริญเติบโต เป็นเวลา 12 เดือน โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (DNA ladder) เลนที่ 1 เป็นต้นควบคุม เลน 2-7 เป็นดีเอ็นเอตัวอย่างที่เก็บรักษา

บทที่ 4

วิจารณ์

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพมีบทบาทสำคัญทั้งในด้านการคัดเลือก การจำแนกลักษณะต่าง ๆ การขยายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์ โดยเฉพาะการเก็บรักษา และแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชมีวัตถุประสงค์หลัก 2 ประการคือ เพื่อรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชที่มีลักษณะเฉพาะหรือที่ต้องการ ขณะนี้มีหลายประเทศสามารถพัฒนากระบวนการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ระยะยาวโดยวิธี cryopreservation แทนวิธีการแบบดั้งเดิม (*in situ* และ *ex situ* โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ลดการเจริญเติบโต) อย่างไรก็ตามต้องมีการพัฒนาทางเลือกหลายทางเพื่อให้เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด ดังนั้นการเก็บอนุรักษ์เชื้อพันธุ์เป็นหลักประกันว่าจะไม่มีการสูญหายของแหล่งพันธุกรรมพืช และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรได้อย่างยั่งยืน ทั้งทางด้านการขยายพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ และแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์พืชได้ในอนาคต

ในกรณีของหญ้าแฝกนั้นแหล่งพันธุกรรมจะอยู่ในสภาพธรรมชาติที่เจริญเติบโตในพื้นที่ต่าง ๆ ยังไม่มีการเก็บรักษาในสภาพควบคุม (*ex situ*) สำหรับการศึกษาเทคนิคต่าง ๆ ในการเก็บรักษาในหลอดทดลองในสภาพการชะลอการเจริญเติบโตและในไนโตรเจนเหลวนั้น รายงานฉบับนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกโดยใช้หญ้าแฝกพันธุ์สงขลา 3 จุดประสงค์เริ่มต้นผู้วิจัยต้องการศึกษาในส่วนของการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวและได้สืบค้นข้อมูล ถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ และประสบผลสำเร็จในพืชหลายชนิดในเขตร้อน โดยเฉพาะที่เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เพื่อมาปรับใช้กับหญ้าแฝก อย่างไรก็ตาม ขณะนี้ไม่สามารถที่จะ regrowth ชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในไนไตรเจนเหลวได้ โดยชิ้นส่วนดังกล่าวเปลี่ยนเป็นสีซีดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2-3 วัน แม้ว่าจะเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 2-3 เดือน ชิ้นส่วนดังกล่าวก็ไม่มีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบข้อมูลขั้นต้นที่มีผลต่ออัตรารอดชีวิตของชิ้นส่วนก่อนการเก็บในไนโตรเจนเหลว

ขั้นตอนการเตรียมชิ้นส่วนพืชก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลวมีความสำคัญมากซึ่งการเตรียมชิ้นส่วนที่เหมาะสมส่งผลให้มีอัตรารอดชีวิตหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลวสูง จากการศึกษาเทคนิคต่าง ๆ ในการเตรียมชิ้นส่วน พบว่า เทคนิค dehydration เป็นเทคนิคที่ลดปริมาณน้ำในชิ้นส่วนโดยวางไว้ในตู้ laminar flow เป็นเวลา 0.5-5 ชั่วโมง ให้อัตรารอดชีวิตหลังจากแช่ใน

ไนโตรเจนเหลว (ตรวจสอบด้วยการย้อมความมีชีวิตด้วยสารละลาย FDA) 100 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าการวางไว้เป็นเวลาตั้งแต่ 3-5 ชั่วโมง ซึ่งพบว่า ปริมาณน้ำในชิ้นส่วนปลายยอด (ขนาด 3 มิลลิเมตร) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือลดลงอีก ดังนั้นการลดความชื้นด้วยวิธีนี้สามารถทำได้ตั้งแต่ 0.5 ชั่วโมง ส่วนเทคนิคการหุ้มห่อชิ้นส่วน (encapsulation) ด้วยวุ้นอัลจิเนต พบว่า วุ้นอัลจิเนตยี่ห้อ Sigma เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และแช่ในสารละลาย $CaCl_2$ เป็นเวลา 30 นาที ให้เม็ดบีทกลมสวย และให้อัตราการสร้างยอดสูง 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 0.57 ยอดต่อชิ้นส่วน ส่วนเทคนิค vitrification เป็นเทคนิคที่ลดปริมาณน้ำในชิ้นส่วนโดยใช้สาร cryoprotectant ความเข้มข้นสูง ซึ่งประกอบด้วยสารหลายชนิด บางชนิดอาจเป็นพิษกับชิ้นส่วนได้ จากการศึกษาระยะเวลาในการแช่ในสารละลาย PVS2 [เป็นสารที่พัฒนาโดย Sakai และคณะ (1990) และประสบผลสำเร็จในพืชหลายชนิด] และตรวจสอบความมีชีวิตและอัตราการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ทั้งที่แช่และไม่แช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่า การแช่เป็นระยะเวลา 0-45 นาที ให้อัตราการสร้างยอดสูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อแช่เป็นเวลา 60 นาที อัตราการยอดลดลงเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าระยะเวลาในการแช่สารละลาย PVS2 มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ในทางตรงข้ามเมื่อมีการแช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่า ความมีชีวิตเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นโดยสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่เป็นระยะเวลา 120 นาที แสดงว่าสารละลาย PVS2 มีส่วนในการช่วยป้องกันความเสียหายของเนื้อเยื่อในสภาพที่เย็นจัด อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ โดยพบว่าชิ้นส่วนดังกล่าวเปลี่ยนเป็นสีซีดและตาย ดังนั้นอาจต้องอาศัยปัจจัยอื่นร่วมด้วยเพื่อส่งเสริมการ regrowth เป็นพืชต้นใหม่

จากรายงานความสำเร็จในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชแต่ละชนิด พบว่า โดยทั่วไปปัจจัยที่ส่งเสริมความมีชีวิตรอดหลังผ่านกระบวนการเก็บในไนโตรเจนเหลว ประกอบด้วย ชิ้นส่วนที่นำมาใช้ (ชนิด ขนาด โครงสร้างและลักษณะทางกายภาพของชิ้นส่วน) เทคนิคหรือวิธีการในการเตรียมชิ้นส่วนเพื่อให้มีความทนต่ออุณหภูมิต่ำเมื่อมีการแช่ในไนโตรเจนเหลว ตลอดจนการละลายน้ำแข็ง และเพาะเลี้ยง ซึ่งแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด โดยปัจจุบันเทคนิคที่อยู่บนพื้นฐานของ vitrification ได้รับการพัฒนาและดัดแปลงเพื่อใช้ในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวในพืชหลายชนิด เนื่องจากการ vitrified มีการใช้สาร cryoprotectants ความเข้มข้นสูง ดังนั้นกุญแจสำคัญที่จะประสบผลสำเร็จในการใช้เทคนิคนี้ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ คือ การระมัดระวังในกระบวนการลดหรือปรับปริมาณน้ำให้เหมาะสมในขณะเดียวกันต้องป้องกันผลกระทบจากความเป็นพิษของสารและการเปลี่ยนแปลงออสโมติค (Takaki *et al*., 1997) ดังนั้นเทคนิคนี้จะประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ซึ่งอาจจะส่งเสริมให้ชิ้นส่วนมีชีวิตรอดหลังจากการเก็บรักษา โดยอาจจะมี

การ preconditioning ต้นหรือกลุ่มยอดในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลหรือสารออสโมติคัม หรืออาจจะเพาะเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิต่ำ การ pretreatment ชิ้นส่วนในอาหารเติม ซูโครส หรือ ABA และหรือการ loading treatment ก่อนการ vitrified ในสาร cryoprotectants อย่างไรก็ตาม ชิ้นส่วนที่นำมาศึกษาเป็นปัจจัยที่สำคัญเริ่มต้นต่อความสำเร็จ Takagi และคณะ (1997) เปรียบเทียบขนาดของเผือกต่อการทนต่อสารประกอบ PVS2 โดยแช่เป็นระยะเวลา 10-60 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า ปลายยอดขนาด 0.8, 2 มิลลิเมตร และ ตาข้าง 1-1.5 มิลลิเมตร มีอัตรารอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่ใน PVS2 เป็นเวลา 20 นาที อย่างไรก็ตาม หลังจากแช่นานกว่า 30 นาที ความมีชีวิตของชิ้นส่วนค่อย ๆ ลดลงโดยขนาดชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 0.8 มิลลิเมตร ลดลงมากที่สุด และเมื่อแช่เป็นเวลา 60 นาที ความมีชีวิตเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ 65 เปอร์เซ็นต์ และ 80 เปอร์เซ็นต์ ในชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 0.8 มิลลิเมตร 2 มิลลิเมตร และตาข้าง ตามลำดับ ในกรณีของหญ้าแฝกได้เปรียบเทียบขนาดของชิ้นส่วนตายอด 2 ขนาด ร่วมกับการ loading และ vitrified ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 30 นาที พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 1-2 มิลลิเมตร ให้อัตราการสร้างยอด 25 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอดเฉลี่ย 2 ยอดต่อชิ้นส่วน สูงกว่าชิ้นส่วนขนาด 3-5 มิลลิเมตร และแช่ชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 3 มิลลิเมตร ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 0-45 นาที โดยไม่แช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่าให้อัตราการสร้างยอดสูง 70-100 เปอร์เซ็นต์ และความมีชีวิตสูงสุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่ในไนโตรเจนเหลว ในขณะที่ Panis และคณะ (2005) รายงานขนาดฐานของเนื้อเยื่อส่วนยอดต่ออัตรารอดชีวิตหลังการเก็บรักษาของกล้วยพันธุ์ Williams (AAA group) พบว่า ขนาด 1 มิลลิเมตร ให้อัตรารอดชีวิตสูงสุด 65.8 เปอร์เซ็นต์ ขนาดที่ใหญ่กว่านี้ให้อัตรารอดชีวิตลดลงตามลำดับ ส่วนขนาดเล็กกว่านี้ไม่เหมาะสมเนื่องจากเสี่ยงต่อความเสียหายเนื่องจากการตัด จะเห็นได้ว่าขนาดของชิ้นส่วนปลายยอดของพืชแต่ละชนิดสามารถทนต่อความเป็นพิษของสารละลาย cryoprotectants แตกต่างกัน ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากความแตกต่างของโครงสร้างและระยะพัฒนาการทางสรีรวิทยาของพืชนั้น ๆ

การ pretreatment และ loading treatment ชิ้นส่วน (ก่อนแช่ใน PVS2) เพื่อเป็นการเตรียมชิ้นส่วนให้ทนต่อการสูญเสียน้ำจากการ vitrified โดยเซลล์มีการปรับตัวด้วยการเปลี่ยนแปลงขนาดเซลล์ แวคิวโอล และผนังเซลล์ และส่งเสริมอัตรารอดชีวิตหลังจากเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว การ pretreatment สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดพืชและชิ้นส่วนที่เก็บรักษา เช่น เติมซูโครสความเข้มข้นสูงในอาหารเพาะเลี้ยง หรือการลดความชื้นบางส่วน หรือการให้อากาศเย็น (cold pretreatment) อย่างไรก็ตาม โดยส่วนใหญ่นิยมใช้น้ำตาลซูโครส

Engelmann และคณะ (1995) กล่าวว่าการ pretreatment ในอาหารเติมน้ำตาลซูโครส เป็นการเพิ่มการสร้างและสะสมแป้งบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ และเพิ่มออสโมติคัม ช่วยป้องกันความเสียหายในระหว่างการสูญเสียน้ำและการแข็งตัวในไนโตรเจนเหลว ส่วนการ loading treatment คือการแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย LS (ประกอบด้วย glycerol เข้มข้น 2 โมลาร์ ร่วมกับน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 0.4 โมลาร์) จากการ pretreatment ชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกในอาหารเติมน้ำตาลซูโครสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ร่วมกับเทคนิค 3 เทคนิค ต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่า การ pretreatment ชิ้นส่วนปลายยอดร่วมกับเทคนิค vitrification ให้ผลไม่แตกต่างจากการไม่ pretreatment ในขณะที่ชิ้นส่วนที่ pretreatment แล้วนำมา dehydration หรือ encapsulation ให้ความมีชีวิตลดลง แม้ว่าจะมีการศึกษาระยะเวลาในการ pretreatment และหรือร่วมกับเทคนิค encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration ก็พบว่าไม่ส่งเสริมการรอดชีวิตหรือการ regrowth เป็นพืชต้นใหม่หลังจากเก็บในไนโตรเจนเหลว อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาระยะเวลาในการแช่ในสารละลาย LS ร่วมกับเทคนิค 3 เทคนิค พบว่า เทคนิค vitrification จำเป็นต้องแช่ชิ้นส่วนปลายยอดในสารละลาย LS โดยการแช่เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ให้อัตรารอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ หลังแช่ในไนโตรเจนเหลว ในขณะที่การไม่แช่ชิ้นส่วนปลายยอดในสารละลาย LS ให้อัตรารอดชีวิตต่ำ (27.27 เปอร์เซ็นต์) ส่วนเทคนิค dehydration หรือ encapsulation ไม่มีความจำเป็นต้องแช่ในสารละลาย LS เนื่องจากให้อัตรารอดชีวิตไม่ต่างกัน ทำนองเดียวกับการรายงานผลของ LS ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในเขตร้อนหลายชนิด (Thinh *et al*., 1999; 2000; Sakai *et al*., 2002) และพืชเขตหนาวหลายชนิด (Sakai *et al*., 2002) แม้ว่าจะมีรายงานความสำเร็จในการเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดเผือก ด้วยการ precondition กลุ่มยอด ในอาหารเติมซูโครสความเข้มข้นสูง 120 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และ pretreatment ชิ้นส่วนปลายยอดในอาหารเติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ ข้ามคืน (ประมาณ 6 ชั่วโมง) ก่อนแช่ในสารละลาย LS และ PVS2 ว่าส่งเสริมความมีชีวิตหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว แต่ในหญ้าแฝก พบว่า ชิ้นส่วนซีดตายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน จากการศึกษาทั้งหมดนี้ผู้วิจัยสันนิษฐานว่าซูโครสเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วน หญ้าแฝกค่อนข้างอ่อนไหวต่อสารละลายน้ำตาลซูโครส ทำนองเดียวกับปลายยอดมันสำปะหลังซึ่งอ่อนไหวต่อการเพิ่มความเข้มข้นของซูโครส (Charoensub *et al*., 1999) จากการเปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลและ glycerol ในการ pretreatment ชิ้นส่วนเป็นเวลา 3 วัน ก่อนแช่ในสารละลาย LS เป็นเวลา 20 นาที และ PVS2 เป็นเวลา 20 นาที โดยไม่แช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่า glycerol ให้ความมีชีวิตของชิ้นส่วนสูงสุด 77.78 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยง

เป็นเวลา 4 วัน (จากการสังเกตชิ้นส่วนมีสีเขียว และบางส่วนเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล) รองลงมาคือ glucose ส่วน sorbitol ส่วนใหญ่มีสีน้ำตาล ในขณะที่น้ำตาลซูโครสส่งผลให้ชิ้นส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งหมด Bajaj (1995) รายงานว่าสารแต่ละชนิดมีความเป็นพิษต่อเยื่อหุ้มเซลล์ต่างกัน เนื่องจากผลกระทบจากการแตกตัว โดยการซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ต่างกัน นอกจากนี้การตอบสนองต่อน้ำตาลดังกล่าวแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด นอกจากนี้พบว่า การทำ cold acclimatization โดยเพาะเลี้ยงกลุ่มยอดในที่อุณหภูมิต่ำ (4±1 องศาเซลเซียส) ภายใต้ความเข้มแสงต่ำเป็นเวลา 1-4 สัปดาห์ ร่วมกับเทคนิค encapsulation-dehydration ไม่ส่งเสริมการรอดชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝก

การปรับปริมาณน้ำในแช่ชิ้นส่วนโดยใช้เทคนิค vitrification โดยใช้สารละลาย cryoprotectants นั้น ชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบ ระยะเวลาในการแช่ นอกจากนี้ในพืชบางชนิดอุณหภูมิที่แช่มีผลต่ออัตรารอดชีวิตของชิ้นส่วนหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว แม้ว่ามีรายงานประสบผลสำเร็จจากการใช้ PVS2 ในพืชหลายชนิด อย่างไรก็ตามในพืชบางชนิดพบว่าไม่สามารถทนต่อความเป็นพิษได้จึงมีการศึกษาองค์ประกอบของสารอื่น ๆ เช่น Wang และคณะ (2005) รายงานการเก็บรักษาปลายยอดมะละกอ (*Carica papaya*) จำนวน 6 สายพันธุ์ โดยทรีตปลายยอดด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย glycerol 2 M และ ซูโครส 0.4 M ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วปรับปริมาณน้ำด้วยการแช่ใน PVS2 ดัดแปลงโดยมีองค์ประกอบดังนี้ polyehyleneglycol-6000 เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ proline เข้มข้น 0.02 โมลาร์ glycerol เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ethylene glycol เข้มข้น 13.6 เปอร์เซ็นต์ DMSO เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และซูโครส เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ในอาหารเหลวสูตร MS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แช่ในไนโตรเจนเหลวอย่างน้อย 1 สัปดาห์ พบว่า ปลายยอดทั้ง 6 สายพันธุ์ สามารถเจริญเติบโตระหว่าง 48-93 เปอร์เซ็นต์ จากการเปรียบเทียบ สาร PVS2 และ PVS3 ในหญ้าแฝก ผลการศึกษาขั้นต้นพบว่า อุณหภูมิในการแช่ร่วมกับชนิดของสาร มีผลต่ออัตรารอดชีวิตของชิ้นส่วนก่อนการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยการแช่ชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 3 มิลลิเมตร ในสารละลาย PVS3 ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ให้อัตราการสร้างยอดสูงสุด 75 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 3.33 ยอดต่อชิ้นส่วน แต่เมื่อนำมาแช่ในไนโตรเจนเหลวด้วย พบว่า ชิ้นส่วนไม่มีการพัฒนา แม้ว่าจะศึกษาเพิ่มเติมโดยเปรียบเทียบระยะเวลาในการ loading ชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 1-2 มิลลิเมตร ก่อนแช่ใน PVS3 ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส หรือเปรียบเทียบระยะเวลาในการแช่ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ตลอดจนลดอุณหภูมิในการแช่เป็น 0 องศาเซลเซียส แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลว ก็ยังให้ผลทำนองเดียวกันคือชิ้นส่วนไม่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้

จากการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของสารละลาย cryoprotectants พบว่า PGluD (ประกอบด้วย PEG 8000 เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์, Glucose เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ DMSO เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) ให้อัตรารอดชีวิตสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ PVS2 และ PVS3 ให้ 46.67 และ 38.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อดูถึงองค์ประกอบของสารแล้วจะเห็นว่า PGluD ไม่มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบเลย จึงอาจจะทำให้ความมีชีวิตสูงกว่า PVS2 หรือ PVS3 ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบด้วย ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงค่อนข้างแน่ใจว่าชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกอ่อนไหวต่อน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง

ในส่วนของการละลายน้ำแข็งก็มีความสำคัญไม่ด้อยไปกว่ากระบวนการเตรียมชิ้นส่วนข้างต้น โดยพบว่า การละลายน้ำแข็งอย่างรวดเร็วโดยแช่หลอด cryotube ที่อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ให้ความมีชีวิตต่ำกว่าที่เวลา 2 นาที ซึ่งให้อัตรารอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 หรือ 2 นาที ซึ่งจากการสังเกตจะพบว่าการละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที น้ำแข็งยังละลายไม่หมด ซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้อัตรารอดชีวิตลดลงเนื่องจากความเสียหายของชิ้นส่วนจากการเกิดผลึกน้ำแข็งอีกครั้งหนึ่ง ในการศึกษาครั้งต่อไปอาจทดลองล้างชิ้นส่วนด้วยน้ำตาลชนิดอื่น ๆ แทนน้ำตาลซูโครสหรือใช้สารประกอบอื่นร่วมกับลดความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสลงด้วย ในส่วนของการเพาะเลี้ยงเพื่อส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ จากการศึกษาสภาพการเลี้ยง พบว่า การเลี้ยงในที่มืดก่อนเป็นระยะเวลา 1 วันจึงเปลี่ยนอาหาร และย้ายไปเลี้ยงในสภาพปกติ มีแนวโน้มว่าจะให้อัตราการรอดชีวิตสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาพปกติทันที

แม้ว่าการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นไม่สามารถชักนำพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลวได้ และไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าเกิดจากปัจจัยตัวใด ทั้งนี้เนื่องจากแต่ละปัจจัยหรือแต่ละขั้นตอนมีผลต่อเนื่องกัน และล้วนแต่มีผลต่อความสำเร็จในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว สำหรับการศึกษาต่อไปในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์หญ้าแฝกโดยใช้ชิ้นส่วนปลายยอด โดยใช้เทคนิคบนพื้นฐานของ vitrification นั้น อาจจะศึกษาเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของสารหรือน้ำตาลเพิ่มเติม ตั้งแต่การ pretreatment องค์ประกอบของสาร cryoprotectants และสารละลายล้างชิ้นส่วนโดยเฉพาะ glycerol นอกจากนี้ต้องตรวจสอบความมีชีวิตและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ทุกขั้นตอนเพื่อให้ทราบว่าปัจจัยหรือขั้นตอนไหนมีผลต่อการรอดชีวิตของชิ้นส่วนหรือไม่อย่างไร แม้ว่าโดยธรรมชาติหญ้าแฝกมีการปรับตัวได้ดีสามารถเจริญเติบโตได้แม้ในที่มีปริมาณน้ำฝน มากกว่า 3,000 มิลลิเมตร หรือน้อยกว่า 300 มิลลิเมตร นอกจากนี้สามารถมีชีวิตรอดได้ในพื้นที่ที่มีอุณหภูมิสูงถึง 46 องศาเซลเซียส

(ใน Fujian ประเทศจีน) และที่อุณหภูมิในเขตหนาว (winter temperatures) -9 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม การเก็บรักษาในสภาพเย็นที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ต้องมีการพัฒนาและปรับใช้เพื่อให้เหมาะสมและสามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุ์หญ้าแฝกสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ในระยะยาว Johnson และคณะ (2007) รายงานว่า อาการ cryo-injury เป็นลักษณะที่เกิดเนื่องจาก oxidative stress และ ethylene stress โดยที่อุณหภูมิต่ำจะมีการเกิดอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species : ROS) เช่น superoxide radical (O_2__) hydrogen peroxide (H_2O_2) hydroxyl radical (_OH) ซึ่งทำให้เกิดการ oxidative ทำลายไลปิด โปรตีน และดีเอ็นเอ การสร้าง ROS เป็นสัญญาณให้พืชมีการปรับตัวโดยผลิตสารแอนติออกซิเดน นอกจากนี้อุณหภูมิต่ำมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ และการสร้างเอธิลีน เมื่อมีการสร้างเอธิลีนเป็นสัญญาณว่าเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหาย จากการศึกษาเปรียบเทียบใน *Ribes* 2 ชนิด คือ *Ribes nigrum* (tolerance to cryopreservation) และ *R. ciliatum* (sensitive to cryopreservation) ในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า *R. nigrum* มีการตอบสนองโดยมีการผลิตหรือสะสมสารประกอบฟีนอล (antioxidant) เช่น แอนโธไซยานิน เพิ่มขึ้น และสามารถรักษาสัดส่วนของคลอโรฟิลล์ a:b ตลอดการเก็บรักษาและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยที่ไม่ซีดขาว ซึ่งชนิดที่ไม่ทนไม่มีการตอบสนองดังกล่าว และเมื่อตรวจสอบปริมาณการสร้างเอธิลีน พบว่าชนิดที่ทนมีการสร้างน้อยกว่าชนิดที่ไม่ทน ซึ่งการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า antioxidant status และการสะสมสารประกอบฟีนอล อาจจะบ่งชี้การทนต่อการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากการเก็บรักษา Steyn และคณะ (2002) อ้างโดย Johnson และคณะ (2007) รายงานว่าแอนโธไซยานินมีบทบาทในการป้องกันจากสภาพเครียดเนื่องจากอุณหภูมิต่ำดังนี้คือ

(1) antioxidants (2) compatible osmolytes during dehydration/freezing (3) protectants against photooxidation และแอนโธไซยานินช่วยลด photo-inhibition และการซีด (chlorophyll bleaching) ในใบ ดังนั้นการเติมสาร antioxidants ในกระบวนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวในพืชที่ไม่ทนต่ออุณหภูมิต่ำอาจส่งเสริมอัตรารอดชีวิตหรือการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังการเก็บรักษาได้ อย่างเช่นในเซลล์แขวนลอยของ *O. sativa* และ *Euglena gracilis* (Fleck *et al*., 2000; Benson *et al*., 1995 อ้างโดย Johnson *et al*., 2007) อย่างไรก็ตาม การดัดแปลงหรือปรับใช้จำเป็นต้องมีการศึกษาชนิดของสารเพื่อให้เหมาะสมกับพืชชนิดนั้น ๆ

ในส่วนของการศึกษาการเก็บรักษาในหลอดทดลองโดยการเพาะเลี้ยงในสภาพชะลอการเจริญเติบโตนั้นสามารถทำได้หลายเทคนิค เช่น การลดความเข้มแสง หรือเพาะเลี้ยงในที่มืด การลดอุณหภูมิ หรือลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลง ร่วมกับการเติมออสโมติคัมหรือสารชะลอการเจริญเติบโต สำหรับรายงานฉบับนี้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ขั้นต้นในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์หญ้าแฝกพันธุ์สงขลา 3 โดยศึกษา 2 ปัจจัยหลักคือ เพาะเลี้ยงในที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) และเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบธาตุอาหารความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการเติมพาโคลบิวทราโซล พบว่า การลดความเข้มข้นขององค์ประกอบธาตุอาหารสูตร MS ลงเป็น 1/4 MS ร่วมกับเติมพาโคลบิวทราโซล เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพการเพาะเลี้ยงปกติ (อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 12 เดือน ให้อัตราการสร้างยอดรวม และจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 75 เปอร์เซ็นต์ และ 3.76 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ และความยาวยอด 2-6 มิลลิเมตร (ตารางที่ 20 รูปที่ 7 จ ฉ ช) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ชิ้นส่วนเปลี่ยนเป็นสีซีดและตายตั้งแต่เดือนที่สองหลังจากเพาะเลี้ยง จะเห็นได้ว่าชิ้นส่วนปลายยอดค่อนข้างอ่อนไหวต่ออุณหภูมิต่ำ แม้ว่าจะมีการปรับปริมาณน้ำในชิ้นส่วนโดยใช้เทคนิคพื้นฐาน 3 เทคนิค คือ vitrification dehydration และ encapsulation ก่อนเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่พบว่าชิ้นส่วนซีดตายและไม่มีการพัฒนาเป็นยอด สำหรับสารชะลอการเจริญเติบโตนั้นมีผลโดยตรงต่อการเจริญของพืชทั้งนี้เนื่องมาจากสารในกลุ่มดังกล่าวยับยั้งการทำงานของสารควบคุมการเจริญ เติบโตในกลุ่ม ออกซิน ไซโตไคนิน ตลอดจนจิบเบอเรลลินซึ่งส่งเสริมการแบ่งเซลล์ สารในกลุ่มชะลอการเจริญเติบโตมีหลายชนิด เช่น กรดแอบซิซิค พาโคลบิวทราโซล น้ำตาลในรูปแอลกอฮอล์ เช่น แมนนิทอล ซอร์บิทอล และโพลีเอทธิลีนไกลคอล เป็นต้น ในกรณีของสารพาโคลบิทราโซล

มีกลไกในการชะลอการเจริญโดยยับยั้งการสร้างกรดจิบเบอเรลลิคในวิถีไอโสพรีนอยด์ด้วยการยับยั้งเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเมทาบอลิซึมการสร้างกรดดังกล่าว (Ninnenmann *et al.,* 1964) ส่งผลให้การยืดยาวของปล้องลดลง จึงเห็นข้อและปล้องสั้น (Hazarika, 2003; Chaney, 2006) ใบมีขนาดเล็กและหนา ทั้งนี้เนื่องจากพาโคลบิวทราโซลยับยั้งการขยายขนาดของแผ่นใบ (Chaney, 2006) เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงหญ้าแฝกในอาหารเติมพาโคลบิวทราโซล ส่งผลให้ลำต้นเตี้ยแคระกว่าต้นในชุดควบคุมอย่างน้อย 10 เท่า ใบไม่ยาวเหมือนพืชตระกูลหญ้าทั่วไป หดสั้นความกว้างใบเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังหนาเพิ่มขึ้นด้วย อย่างไรก็ตาม การใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปทำให้ยอดและใบไหม้ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ในการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในระยะปานกลางนอกจากจะใช้พาโคลบิวทราโซลแล้วยังมีรายงานการใช้น้ำตาลแอลกอฮอล์

อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้ไม่ได้ทดสอบผลของน้ำตาลซอร์บิทอล ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์หญ้าแฝกในระยะปานกลางโดยใช้ซอร์บิทอลระดับความเข้มข้นต่าง ๆ หรืออาจใช้สารชะลอการเจริญเติบโต (พาโคลบิวทราโซล) ร่วมกับซอร์บิทอลเพื่อเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ให้นานขึ้น

แม้ว่าจะมีการประยุกต์ใช้วิธีการต่าง ๆ ในการเตรียมชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกเพื่ออนุรักษ์เชื้อพันธุ์ในระยะยาวในไนโตรเจนเหลว แต่ก็ไม่ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (ไม่แสดงผลการทดลอง) และปลายยอด พัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ การปรับปริมาณน้ำด้วยวิธีการใช้สารละลายน้ำตาลซูโครส สารละลาย PVS2 หรือ PVS3 สารละลายโลดดิ้ง ตลอดจนสารละลายที่ใช้ป้องกันความเย็น ช่วยป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ในสภาพเย็นยิ่งยวด และยังปรับโครงสร้างของเซลล์โดยเฉพาะผนังเซลล์ให้มีความเหนียวและทนทานต่อการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำ ส่งผลให้อัตรารอดชีวิตของเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบในแคลลัส และปลายยอดมีชีวิตอยู่ได้ เมื่อตรวจสอบด้วยสารละลาย FDA แต่กิจกรรมของเซลล์ในระยะต่อมาไม่สามารถที่จะแบ่งและสร้างโปรตีนที่จำเป็นต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าหญ้าแฝกมีความอ่อนไหวต่อความเย็นมาก เพราะจากการศึกษาเก็บรักษาในระยะปานกลางในสภาพที่ให้อุณหภูมิต่ำ (4-10 องศาเซลเซียส) ก็ไม่สามารถที่จะเจริญเป็นพืชต้นใหม่ได้หลังจากนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเพิ่มปริมาณยอด อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้ทำการย้อมด้วยสารละลาย FDA ทั้งชิ้นส่วนซึ่งผลที่ได้อาจคลาดเคลื่อน ดังนั้นในการตรวจสอบความมีชีวิตครั้งต่อไปอาจต้องมีการตัด (section) ชิ้นส่วนปลายยอดให้มีขนาดเล็ก ๆ โดยเฉพาะให้ตัดผ่านชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด หรือตรวจสอบเฉพาะการ regrowth เป็นพืชต้นใหม่ในอาหารเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม จนถึงขณะนี้วิธีการเดียวที่จะเป็นไปได้ในการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์หญ้าแฝกก็คือการชะลอการเจริญเติบโตในอาหารที่ดัดแปลงโดยการเติมพาโคลบิวทราโซล

การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของชิ้นส่วนที่เก็บรักษา หรือต้นพืชที่ผ่านกระบวนการเก็บรักษาเป็นระยะเวลาต่าง ๆ นั้นนับว่ามีความสำคัญยิ่ง ทั้งนี้เพื่อเป็นการประกันว่าวิธีการเก็บรักษานั้นไม่ส่งเสริมความแปรปรวนของพันธุกรรมพืชที่เก็บรักษา วิธีการทางชีวโมเลกุลนับเป็นวิธีการที่มีความน่าเชื่อถือ และทำได้รวดเร็วทุกระยะของการทดลอง ตั้งแต่แคลลัส ต้นอ่อน และต้นโตที่ย้ายลงดินปลูก วิธีการ RAPD เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้กันแพร่หลาย ทั้งนี้เพราะไม่มีความจำเป็นต้องทราบลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สามารถใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มเข้าไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอช่วงใดช่วงหนึ่ง แล้วนำมาตรวจสอบความแตกต่าง

วิธีการนี้ไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสีติดฉลากไพรเมอร์ ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน ให้ผลได้รวดเร็ว และต้นทุนไม่สูง นอกจากนี้ RAPD ยังนิยมใช้ในการตรวจสอบความสอบความแปรปรวนของต้นพืชที่ได้จากการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายพืช เช่น มังคุด (Te-chato, 2000) ปาล์มน้ำมัน (ธนวดี, 2551) จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหญ้าแฝกที่เก็บรักษาในระยะเวลาปานกลาง (ในอาหารเติมพาโคลบิวทราโซล) ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 7 ชนิด พบว่า มี 3 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และดีเอ็นเอที่ได้เป็นแบบ monomorphic และไม่พบความแตกต่าง ระหว่างต้นควบคุม (ต้นที่ดูแลในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณในสภาพการเพาะเลี้ยงปกติ) และต้นที่พัฒนาจากชิ้นส่วนยอดที่เก็บรักษาในหลอดทดลองทุกหน่วยการทดลองและไม่พบความแปรปรวนในแต่ละต้น (จากการตรวจสอบในทรีตเม้นที่ให้ปริมาณดีเอ็นเอเพียงพอ) ซึ่งจากผลดังกล่าวทำให้ทราบข้อมูลขั้นต้นถึงความเป็นไปได้ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์หญ้าแฝกในหลอดทดลอง โดยสามารถยืดระยะเวลาในการย้ายเลี้ยง และเป็นการเก็บแหล่งพันธุ์กรรมของหญ้าแฝกซึ่งปลอดเชื้อ และมีศักยภาพหรือความสามารถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ไว้ใช้ประโยชน์ตามที่ต้องการ อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาต่อไปจำเป็นต้องมีการเพิ่มจำนวนซ้ำและจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้น เพื่อลดข้อจำกัดในการปนเปื้อน และทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานขึ้น นอกจากนี้สามารถดัดแปลงวิธีการเพื่อให้สามารถเก็บรักษาหญ้าแฝกพันธุ์อื่น ๆ ด้วย และอาจเพิ่มความเชื่อมั่นในการตรวจสอบความแปรปรวนของต้นที่เก็บรักษาโดยเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบ หรือใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น AFLP หรือ SSR

บทที่ 5

สรุป

1. ศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในไนโตรเจนเหลว

1.1 การหุ้มห่อชิ้นส่วนปลายยอด (ขนาด 3 มิลลิเมตร) ด้วยวุ้นอัลจิเนต (Sigma) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และแช่ในสารละลาย $CaCl_2$ เข้มข้น 0.28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที ให้เม็ดบีดที่มีคุณภาพดี กลม สีใส และอัตราการสร้างยอดหลังจากนำไปเพาะเลี้ยงสูง 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 0.57 ยอดต่อชิ้นส่วน

1.2 การ dehydration ชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 3 มิลลิเมตร ในจานเพาะเลี้ยงในตู้ laminar flow เป็นเวลา 0-5-5 ชั่วโมง ให้อัตรารอดชีวิต (100 เปอร์เซ็นต์) ไม่แตกต่างกัน

1.3 การ vitrification ชิ้นส่วนขนาดเล็ก (1-2 มิลลิเมตร) ให้อัตราการสร้างยอด 25 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอดเฉลี่ย 2 ยอดต่อชิ้นส่วน สูงกว่าชิ้นส่วนขนาดใหญ่ 3-5 มิลลิเมตร

1.4 การ pretreatment ชิ้นส่วนปลายยอดขนาด 3 มิลลิเมตร ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม glycerol เข้มข้น 0.3 โมลาร์ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นจึงแช่ในสารละลาย LS เป็นเวลา 20 นาที และ PVS2 เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารสูตร MS เติมซูโครส เข้มข้น 1.2 โมลาร์ เป็นเวลา 20 นาทีให้ความมีชีวิตสูงสุด 77.78 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน

1.5 การแช่ชิ้นส่วนปลายยอดในสารละลาย LS ที่ประกอบด้วย glycerol เข้มข้น 2 โมลาร์ ร่วมกับ ซูโครส เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ร่วมกับเทคนิค vitrification เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ให้อัตรารอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ หลังเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ในขณะที่การไม่แช่ชิ้นส่วนปลายยอดในสารละลาย LS ให้อัตรารอดชีวิตต่ำ (27.27 เปอร์เซ็นต์)

1.6 ระยะเวลาในการแช่ในสารละลาย PVS2 มีผลต่ออัตรารอดชีวิตของชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝก โดยในสภาพปกติ (ไม่แช่ในไนโตรเจนเหลว) อัตราการสร้างยอดหรือความมีชีวิตลดลงตามสัดส่วนของระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยอัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือ 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่เป็นเวลา 60 นาที ในทางตรงข้ามเมื่อมีการแช่ในไนโตรเจนเหลว ส่งเสริมให้ความมีชีวิตเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นโดยสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่เป็นระยะเวลา 120 นาที

1.6 การแช่ชิ้นส่วนปลายยอดในสารละลาย PVS3 ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ให้อัตราการสร้างยอดสูงสุด 75 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 3.33 ยอดต่อชิ้นส่วน

1.7 การแช่ชิ้นส่วนปลายยอดที่ผ่านการ pretreatment ในอาหารสูตร 1/2 MS เติมซูโครส เข้มข้น 0.3 โมลาร์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในสารละลาย PGluD (ประกอบด้วย PEG 8000 เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ Glucose เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ DMSO เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ให้อัตรารอดชีวิตสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน

1.8 การละลายน้ำแข็ง ชิ้นส่วนปลายยอดหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลวทันทีด้วยการแช่ cryotubes ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที หรือแช่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 หรือ 2 นาที แล้วล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารสูตร MS เติมซูโครส 0.3 โมลาร์ โดยแช่ไว้เป็นเวลา 1 นาที ให้อัตรารอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์

1.9 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลวในที่มืดเป็นเวลา 1 วันก่อนย้ายไปเลี้ยงในสภาพการให้แสงปกติให้อัตรารอดชีวิต 10 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาพการให้แสงโดยตรง

2. ศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในหลอดทดลองโดยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร 1/4 MS เติมพาโคลบิวทราโซล เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการสร้างยอดรวม และจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 75 เปอร์เซ็นต์ และ 3.76 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ และความยาวยอด 2-6 มิลลิเมตร ในสภาพการเพาะเลี้ยงปกติ (อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 12 เดือน ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ชิ้นส่วนเปลี่ยนเป็นสีซีดและตายตั้งแต่เดือนที่สองหลังจากเพาะเลี้ยง

3. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RAPD

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมต้นที่เก็บรักษาในหลอดทดลองเป็นเวลา 12 เดือน เปรียบเทียบกับต้นที่ผ่านการเพาะเลี้ยงปกติ โดยใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 7 ไพรเมอร์ พบว่า มีจำนวน 3 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหญ้าแฝกได้ แถบดีเอ็นเอของต้นที่เก็บรักษาในหลอดทดลองเหมือนกับต้นควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บรักษา แสดงว่าไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. 2541. ความรู้เรื่องหญ้าแฝก. กรุงเทพ : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ธนวดี พรหมจันทร์. 2551. การชักนำเอ็มบริโอซุดที่สองและการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต้นปาล์มน้ำมันที่พัฒนาโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธัญพิสิษฐ์ พวงจิก. 2544. ผลของสารแพคโคลบิวทราโซลต่อการปลูกสาวน้อยประแป้งเป็นไม้กระถาง. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 9 : 28-35.

มาลี กาญจนภูมิ. 2532. หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สงขลา : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เยาวพา จิระเกียรติกุล. 2546. ผลของสาร Paclobutrazol ต่อการเจริญเติบโตของดาวกระจาย. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 : 1-8.

สำนักงานคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ. 2539. รายงานการสัมมนาหญ้าแฝกนานาชาติ 2539 เรื่อง Vetiver grass for environment protection and other usages. สำนักงานคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ.

Ahuja, S., Mandal, B. B., Dixit, S. and Srivastava, P. S. 2002. Molecular, phenotypic and biosynthetic stability in *Dioscorea floribunda* plants derived from cryopreserved shoot tips. Plant Science 163 : 971-/977.

Attree, S. M., Pomeroy, M. K. and Fowke, L. C. 1995. Development of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum, and their tolerance to drying and frozen storage. Journal of Experimental Botany 46 : 433-439.

Bai, S. and Chaney, W. 2001. Gibberellin synthesis inhibitors affect electron transport in plant mitochondria. Plant Growth Regulation 35 : 257-262.

Bajaj, Y. P. S. 1995. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry. (ed. Y. P. S., Bajaj) Vol. 32, pp. 3-18. New York : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Bajaj Y. P. S. and Reinert, J. 1977. Cryobiology of plant cell cultures and establishment of gene-bank. *In* Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. (eds. J. Reinert and Y. P. S. Bajaj) pp. 756-789. New York : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Bessembinder, J. J. E., Staritsky, G. and Zandvoort, E. A. 1993. Long-term *in vitro* storage of *Colocasia esculenta* under minimal conditions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33 : 121-127.

Borges, M., Ceiro, W., Meneses, S., Aguilera, N., V´azquez, J., Infante, Z. and Fonseca, M. 2004. Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76 : 87–90.

Burch, P. L., Wells, R. H. and Kline, W. N. 1996. Red maple and silver maple growth evaluated 10 years after application of paclobutrazol tree growth regulator. Journal of Arboriculture 22 : 61–66.

Chaney, W. R. 2006. Growth retardants: A promising tool for managing urban trees. Perdue University [Online] Available from: http://www.ces.perdue /extmedia/FNR/FNR-252-W.pdf. (access on 2 January 2006).

Charoensub, R., Phaniri, S., Sakai, A. and Youngmanitchai, W. 1999. Cryopreservation of cassava *in vitro*-grown shoot tip cooled to -196 ^{o}C by vitrification. Cryo-Letters 20 : 89-94.

Chen, J., Hall, D. and Luca, V. D. 2005. Effects of the growth retardant paclobutrazol on large-scale micropropagation of daylily (*Hemerocallis* spp.). *In Vitro* Cell Development Biology 41: 58-62.

Chomchalow, N. 2003. Vibrant Versatile Vetiver: An Archive of Useful Information on Vetiver. PRVN Special Bull. No. 2003/1, Office of the Royal Development Projects Board, Bangkok, Thailand. conservation of aroid germplasm at reduced temperatures and under osmotic stress. *In* Plant Tissue Culture and Its Agricultural Applications. (eds L.A. Withers and P.G. Alderson) pp. 277-284. London : Buttersworth.

Cornejo, M. J., Wong, V. L. and Blechl, A. E. 1995. Cryopreserved callus : a source of protoplast for rice transformation. Plant Cell Reports 14 : 210-214.

Demeulemeester, M. A. C., Rademacher, W., Mierop, A. V. D. and Proft, M. P. D. 1995. Influence of gibberellin biosynthesis inhibitors on stem elongation and floral initiation on *in vitro* chicory root explants under dark and light conditions. Plant Growth Regulation 17 : 47-52.

Dumet, D., Engelmann, F., Chabrillange, N. and Duval, Y. 1993. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. Plant Cell Reports 12 : 352-355.

Eliasson, M. K., Beyl, C. A. and Barker, P. A. 1994. *In vitro* responses and acclimatization of *Prunus serotina* with paclobutrazol. Plant Growth Regulation 13 : 137-142.

Engelmann, F. 1997. *In vitro* conservation methods. *In* Biotechnology and Plant Genetic Resources : Conservation and Use. (eds. B.V. Ford-Lloyd, H.J. Newbury and J.A. Callow) pp. 119-162. London : CABI.

Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. *In* Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current Research Pprogress and Application. (eds. F. Engelmann and H. Takagi) pp. 8-20. Rome, Italy : IPGRI.

Engelmann, F., Assy-Bah, B., Bagniol, S., Dumet, D. and Michaux-Ferriere, N. 1995. Cryopreservation of date palm, oil palm and coconut. *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry. (ed. Y. P. and S. Bajaj) Vol. 32, pp. 236-244. Verlag Berlin Heidelberg : Springer.

FAO. 1996. Report on the state of world's plant genetic resources –International Technical Conference on Plant Genetic Resources, Leipzig, Germany, FAO, Rome.

Frety, A., Jahne, J. and Lorz, H. 1992. Cryopreservation of embryogenic suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). Botanica Acta 105 : 140-145.

Frety, A. and Lorz, H. 1995. Cryopreservation of *in vitro* cultures of barley (*Hordeum vulgare* L. and *H. murinum* L.) and transgenic cells of wheat (*Triticum aestivium* L.). Journal of Plant Physiology 146 : 489-496.

George, M. M. and Subramanian, M. A. 1999. High frequency regeneration of *Vetiveria zizanioides* (L.) via mesocotyl culture. Phytomorphology 49 : 309-313.

Gonzalez-Benito, M. E., Martin, C. Iriondo, J. M. and Perez, C. 1999. Conservation of the rare and endangered plants endemic to Spain. *In* Plant Conservation Biotechnology. (ed. E.E. Benson.) pp. 251-262. London : Taylor and Francis.

Hazarika, B. N. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. Current Science 85 : 1704-1712.

Helliot, B., Panis, B., Poumay, Y., Swennen, R., Lepoivre, P. and Frison, E. 2002. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.) Plant Cell Reports 20 : 1117–1122.

Ishikawa, M., Tandonb, P., Suzuki, M. and Ciampid, A. Y. 1996. Cryopreservation of suspension cultured cells bromegrass (*Bromus inermis* Leyss) using slow prefreezing and vitrification procedures. Plant Science 120 : 81-88.

Johnston, J. W., Harding, K. and Benson, E. E. 2007. Antioxidant status and genotypic tolerance of *Ribes in vitro* cultures to cryopreservation. Plant Science 172 : 524–534.

Keever, G. J., Foster, W. J. and Stephenson, J. C. 1990. Paclobutrazol inhibits growth of woody landscape plants. Journal of Environmental Horticulture 8 : 41–47.

Keshavachandran, R. and Khader, M. A. 1997. Growth and regeneration of vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash) callus tissue under varied nutritional status. *In* Biotechnology of Species, Medicinal and Aromatic Plants. Proceedings of National Seminar on Biotechnology of Species, Medicinal and Aromatic Plants. (eds. S. Edison, K. V. Ramana, B. Sasikumar and K. N. Babu). pp. 60-64. India : Calicut.

Kostenyuk, I., Oh, B. J. and So, I. S. 1999. Induction of early flowering in *Cymbidium niveo-marginatum* mak *in vitro*. Plant Cell Reports 19 : 1-5.

Leupin, R. E., Leupin, M., Ehret, C., Erismann, K. H. and Witholt, B. 2000. Compact callus induction and plant regeneration of a non-flowering vetiver from Java. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 62 : 115-123.

Malaurie, B, Trouslot, M. F. and Berthaud, J. 1998. Conservation etechange de germoplasme chez les ignames (*Dioscorea* spp.). *In* L 'igname, Plante Seculaire et Culture d'avenir. (eds. J. Berthaud, N. Bricas, and J. L. Marchand) pp. 135–161. France : Montpellier.

Matsumoto, T., Mochida, K., Itamura, H. and Sakai, A. 2001. Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. Plant Cell Reports 20 : 398-402.

Morris, G. J. 1981. Cryopreservation: An Introduction to Cryopreservation in Culture Collections. Cambridge : Institute of Terrestrial Ecology.

Mucciarelli, M., Gallino, M., Scannerini, S. and Maffei, M. 1993. Callus induction and plant regeneration in *Veteveria zizanioides*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35 : 267-271.

Nagaraju, V., Bhowmik, G. and Parthasarathy, V. A. 2002. Effect of paclobutrazol and sucrose *in vitro* cormel formation in gladiolus. Acta Botany Croat 61:27-33.

Nair, N. G. and Chandrababu, S. 1994. A slow growth medium for *in vitro* conservation of edible yams. Journal Root Crops 20 : 68–69.

Ninnenmann, H., Zeevaart, J.A.D., Kende, H. and Lang, A. 1964. The plant growth retardant CCC as inhibitor of gibberellin synthesis in *Fusarium moniliforme*. Planta 61 : 229-235.

Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y. and Matsuzawa, T. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. Plant Science 91 : 67-73.

Panis, B., Piette, B. and Swennen, R. 2005. Droplet vitrification of apical meristem: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. Plant Science. 168 : 45-55.

Pennycooke, J. C. and Towill, L. E. 2000. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. Plant Cell Reports 19 : 733-737.

Prasertsongskun, S. 2003. Plant regeneration from callus of vetiver (*Vetiveria zizanioides* Nash). Songklanakarin Journal of Science and Technology 25 : 637-642.

Raina, D. H. 1996. Cryopreservation for the Conservation of Native Australian Endangered Plants. Kuala Lumpur : Plant Biotechnology Laboratory, University Kebangsaan Malaysia.

Rao, N. K. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology 3 : 136-145.

Reinhoud, P. J., Schrijnemakers, E. W. M., Van Iren, F. and Kijne, J. W. 1995. Vitrification and heat-shock treatment improve cryopreservation of tobacco cell suspensions compared to two step freezing. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42 : 261-267.

Reinhoud, P. J, Van Iren, F. and Kijne, J. W. 2000. Cryopreservation of undifferentiated plant cells. *In* Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current research Progress and Application. (eds F. Engelmann, H. Takagi) pp 91-102. Rome : IPGRI.

Sakai, A., Kobayashi, S. and Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. brasilniensis Tanaka) by vitrification. Plant Cell Reports 9 : 30-33.

Sakai, A., Matumoto, T. Hirai, D. and Charoensub, R. 2002. Survival of tropical apices cooled to -196 $^{\circ}$C by vitrification. *In* Plant Cold Hardiness: Gene Regulation and Genetic Engineering. (eds H. Li Paul, and P. E. Ttapio). pp. 109-120. New York : Kluwer Academic Publishers/Plenum Press.

Smith, E. F., Roberts, A. V. and Mottley, J. 1990. The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil. Plant Cell Tissue and Organ Culture 21: 133-140.

Sreenath, H. L., Jagadishchandra, K. S. and Bajaj, Y. P. S. 1994. XXVII *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash (vetiver grass): *In vitro* culture, regeneration and the production of essential oils. *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry. (ed. Y. P. S. Bajaj) pp. 403-421. Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag.

Soulange, J. G., Sanmukhiya, V. M. R. and Seeburrun, S. D. 2007. Tissue culture and RAPD analysis of *Cinnamomum camphora* and *Cinnamomum verum*. Biotechnology 6 : 239-244.

Takagi, H. 2000. Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species. *In* Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current Research Progress and Application. (eds F. Engelmann and H. Takagi) pp. 178-193. Rome, Italy : IPGRI.

Takagi, H., Thinh, N. T., Islam, O. M. Senboku, T. and Sakai, A. 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.

Taylor, M., Lesione, E. and Masibalavu, V. 2001. *In vitro* genebank study. TaroGen Taro Conservation Strategy Workshop, SUVA, October 2001, pp. 33-53.

Te-chato, S. 2000. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in somaclones of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Thai Journal of Agricultural Science 33:137-145.

Thinh, N. T., Takaki, H. and Yahima, S. 1999. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tip of banana (*Musa* spp.) by vitrification method. Cryo-Letters 20 : 163-174.

Thinh, N. T., Takagi, H. and Sakai, A. 2000. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of some vegetatively propagated tropical monocots by vitrification. *In* Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current Research Progress and Application. (eds. F. Engelmann and H. Takagi) pp. 227–232, Rome : IPGRI.

Tsukazaki, H., Mii, M., Tokuhara, K. and Ishikawa, K. 2000. Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. Plant Cell Reports 19 : 1160-1164.

Uragami, A. 1991. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) cultured *in vitro*. Research Bulletin of the Hokkaido National Agricultural Experimental Station 156 : 1-37.

Vicient, C. M. and Martinez, F. X. 1998. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 10 : 1-12.

Vietmeyer, N. D. 1996. Organizing vetiver's next steps to global acceptance. Proceedings of the First International Conference on Vetiver a Miracle Grass. (eds. N. Chomchalow and H. V. Henle) pp. 18-26. Bangkok : The Chaipattana Foundation.

Vietmeyer, N. D. and Ruskin, F. R. 1993. Vetiver Grass. A Thin Green Line Againt Erosion. Washington. D. C. : National Academy Press.

Wang, S. Y., Steffens, G. L., and Faust, M. 1986. Effect of paclobutrazol on accumulation of carbohydrates in apple wood. HortScience 21 : 1419–1421.

Wang, Y. L., Fan, M. J. and Liaw, S. I. . 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. Botanical Bulletin of Academia Sinica 46 : 29-34.

Wang, Z. Y., Legris, G., Nagel, J., Potrykus, I. and Spangenberg, G. 1994. Cryopreservation of embryogenic cell suspension in *Festuca* and *Lolium* species. Plant Science 103 : 903-106.

Wieland, W. F. and Wample R. L. 1985. Effects of paclobutrazol on growth, photosynthesis and carbohydrate content of Delicious apples. Scientia Horticulturae 26 :139–147.

William, R. and Chaney, A. 2005. Paclobutrazol treatment can leave a tree more stress tolerant. Reprint fro*m* GOLFDOM. : An ADvanstar Plublication

Withers, L. A., Engelmann, F. 1997. *In vitro* conservatipon of plant genetic resources. *In* Biotechnology in Agriculture. (ed. A. Altman) pp. 57-88. New York : Marcel Dekker Inc.

Wood, B. W. 1984. Influence of paclobutrazol on selected growth and chemical characteristics of young pecan seedlings. HortScience 19 : 837–839.

Yu, L. X. and Hquyen, H. T. 1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice (*Oryza sativa* L.) Theoretical and Applied Genetics 87 : 668-672.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS)

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ธาตุอาหารหลัก	
NH_4NO_3	1650.00
KNO_3	1900.00
KH_2PO_4	170.00
$CaCl_2.2H_2O$	440.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00
ธาตุอาหารรอง	
KI	0.83
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.H_2O$	16.90
$ZnSO_4.7H_2O$	10.60
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
Na_2EDTA	37.30
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	0.10
Glycine	2.00
ซูโครส (กรัม)	30.00
วุ้น (กรัม)	7.50
pH	5.7

ตารางภาคผนวกที่ 2 ไพรเมอร์และลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมหญ้าแฝก จากบริษัท Operon Technologies

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ------> 3')
OPJ-4	CCGAACACGG
OPN-15	CAGCGACTGT
OPAB-01	CCGTCGGTAG
OPAB-09	GGGCGACTAC
OPAB-14	AAGTGCGACC
OPR-3	ACACAGAGGG
OPR-12	ACAGGTGCGT

ภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ และสารละลายอื่น ๆ

1. CTAB บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- CTAB	2.0	กรัม
- PVP-40	1.0	กรัม
- NaCl	8.12	กรัม
- 0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0)	62.5	มิลลิลิตร
- 1.0 M Tri-HCl (pH 8.0)	10.0	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่าสารจะละลายหมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ และเติมสาร 2-Mercapthoetanol 2 เปอร์เซ็นต์ ก่อนทำการสกัดดีเอ็นเอทุกครั้ง

2. TE บัฟเฟอร์

- 1.0 M Tri-HCl (pH 7.5)	500	ไมโครลิตร
- 0.25 M Na_2- EDTA (pH 7.0)		

3. TAE บัฟเฟอร์ (เข้มข้น 50 เท่า ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

- Tris base 121.1 กรัม
- Glacial acetic acid 28.5 มิลลิลิตร
- 0.5 M Na_2- EDTA (pH 8.0) 50.0 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อ เมื่อนำมาใช้ต้องเจือจางเป็น 1 เท่า

4. TBE บัฟเฟอร์ (เข้มข้น 5 เท่า ปริมาตร 4000 มิลลิลิตร)

- Tris base 216.0 กรัม
- Boric acid 110.0 กรัม
- 0.5 M Na_2 EDTA (pH 8.0) 80.0 มิลลิลิตร

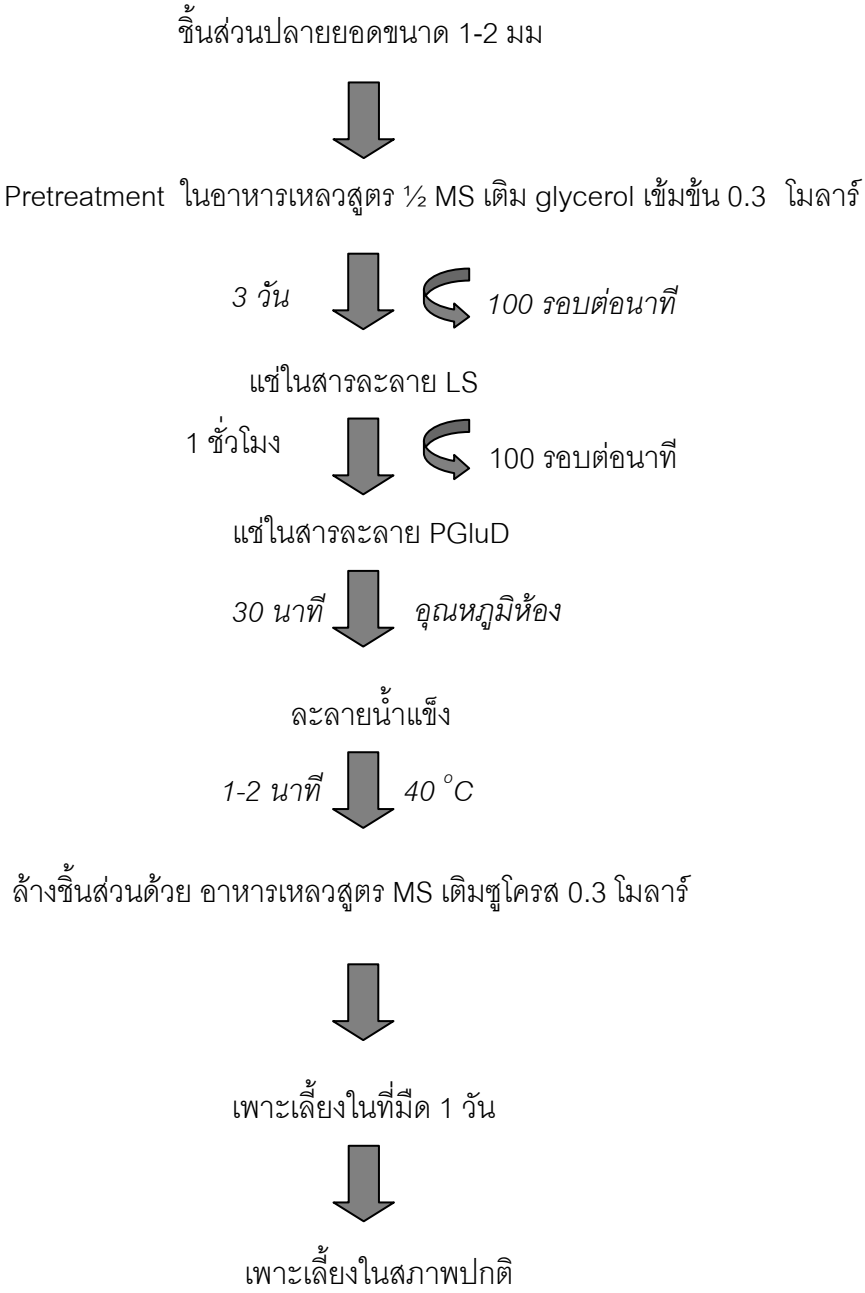
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 4 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อ เมื่อนำมาใช้ต้องเจือจางเป็น 1 เท่า

5. Ethidium bromide

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

Ethidium bromide 1 กรัม

เมื่อนำมาใช้ต้องเจือจางความเข้มข้น โดยใช้สารละลาย 40 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร



รูปภาคผนวกที่ 1 ขั้นตอนการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝกในไนโตรเจนเหลว โดยใช้เทคนิค vitrification.

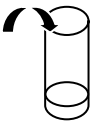
เตรียมสารละลาย FDA 25x (FDA 5 มก ใน acetone 1 มล)

เจือจางสารละลาย FDA เป็น 1x

(FDA $_{(25x)}$ 0.1 มล+อาหารเหลว/น้ำกลั่น 2.4 มล)

ชิ้นส่วนปลายยอด

ที่ต้องการตรวจสอบ



FDA $_{(1x)}$: อาหารเหลว (= 1:1)

15 นาที

ตรวจสอบอัตรารอดชีวิต

การเรืองแสงสีเขียวภายใต้แสง UV ภายใต้กล้อง

รูปภาคผนวกที่ 2 วิธีการย้อมความมีชีวิตด้วยสารละลาย FDA

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4743001

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2540
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2544

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนการศึกษาประเภทผู้มีผลการเรียนดีเด่นระดับบัณฑิตศึกษา (ปริญญาเอก) จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์