บทนำ

การขยายพันธุ์ยางเพื่อเพิ่มผลผลิตในปัจจุบัน เกษตรกรใช้วิธีการปลูกยางพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูง ซึ่งยางพันธุ์ดีมักไม่ทนทานต่อโรคที่มีอยู่ในดิน การเจริญเติบโตของระบบราก ความสามารถในการหาอาหาร และการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมในดินก็มีน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับยางพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นตอ วิธีการผลิตวัสดุปลูกยางที่นิยมทำกันคือการติดตายางพันธุ์ดีลงบนต้นตอยางพันธุ์พื้นเมือง ในปัจจุบันนี้ปัญหาประการสำคัญของการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการนี้คือเมล็ดพันธุ์ยางที่นับวันจะหายากยิ่งขึ้นเพราะเกษตรกรปลูกแต่ยางพันธุ์ดีที่ทางราชการส่งเสริมให้ปลูก และยางพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นตอเหล่านี้มีอัตราการติดเมล็ดต่ำมาก(Hariher และ Ying, 1984) นอกจากนี้เมล็ดพันธุ์ยางไม่สามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลานานเนื่องจากเป็นเมล็ดประเภท recalcitrant seed (วัลลภ สันติประชา 2531) เมล็ดประเภทนี้ไม่สามารถลดความชื้นภายในเมล็ดลงต่ำ ๆ เพื่อการเก็บรักษาได้ เมล็ดจะตายจึงทำให้เกิดปัญหาขาดแคลนเมล็ดพันธุ์ในช่วงที่ไม่ใช่ฤดูกาล ถึงแม้จะอยู่ในช่วงฤดูกาลที่ยางผลิตเมล็ด ก็ไม่สามารถเก็บรักษาเมล็ดเอาไว้ใช้ได้เป็นเวลานานตามความต้องการได้ การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์โดยใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพจึงเป็นวิทยาการสมัยใหม่ที่น่าสนใจในการนำมาดัดแปลง เพื่อการเก็บรักษาไว้ใช้ประโยชน์ได้นานขึ้น แต่การเก็บรักษาทั้งเมล็ดนั้นต้องอาศัยพื้นที่มาก การเก็บรักษาในหลอดทดสอบทั้งเมล็ดไม่เหมาะสม โอกาสปนเปื้อนสูง อัตราการตายสูง จึงต้องเก็บรักษาเฉพาะคัพภะ(embryo)เท่านั้น นอกจากคัพภะแล้วชิ้นส่วนอื่น ๆ ที่สามารถนำมาเก็บรักษาเช่นปลายยอด ข้อ เป็นต้น การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในหลอดทดสอบเป็นการวางเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชบนอาหารสังเคราะห์ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงเพื่อทำให้ชิ้นส่วนพืชมีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด หรือไม่มีเลยแต่ยังคงมีชีวิตอยู่ และสามารถเจริญเติบโตได้เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรองค์ประกอบครบ อย่างไรก็ตามวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในหลอดทดสอบสามารถทำได้หลายวิธี คือ

1. การเก็บรักษาในอาหารที่ดัดแปลงโดยลดองค์ประกอบของสารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ให้อยู่ในระดับต่ำสุดที่ชิ้นส่วนพืชสามารถดำรงชีวิตได้
2. การใช้อุณหภูมิต่ำหรืออุณหภูมิที่ไม่ทำให้เซลล์เป็นน้ำแข็งในการเก็บรักษา
3. การใช้สารป้องกันความเย็น(cryoprotectant) ช่วยป้องกันเซลล์ไม่ให้เป็นอันตรายจากอุณหภูมิเย็นที่เก็บรักษาร่วมกับการเก็บรักษาในที่เย็น
4. การใช้วิธีการใดวิธีการหนึ่งข้างต้นร่วมกัน

โดยทั่วไปแล้วการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ใช้วิธีการดัดแปลงสูตรอาหาร สภาพแวดล้อมในการเลี้ยง และอุณหภูมิต่ำร่วมด้วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บรักษา Sharma(1990) รายงานว่าการเก็บรักษาส่วนข้อแอปเปิ้ล(Malus alba) โดยการเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐาน MS และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้นาน 6 เดือน โดยไม่สูญเสียความมีชีวิต และสามารถนำชิ้นส่วนดังกล่าวมาชักนำให้เกิดยอดรวมได้ในสภาพอุณหภูมิปกติ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำนั้นบางครั้งใช้อุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส คือการเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว ก่อนการเก็บรักษาต้องมีขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงเป็นลำดับก่อนเพื่อป้องกันการเกิดอันตรายต่อเซลล์พืช การลดอุณหภูมิลงนี้มีการทดลองเก็บรักษาปลายยอดสนที่อุณหภูมิ -1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และหลังจากนั้นค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลงในอัตรา 0.8 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง -40 องศาเซลเซียส แล้วเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เขาพบว่าการทำ cold hardening ชิ้นส่วนปลายยอดที่อุณหภูมิ -1 องศาเซลเซียส ก่อนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของชิ้นส่วนพืช เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารสภาพปกติสูงกว่าชิ้นส่วนที่ไม่ผ่านการ cold hardening(Reed, 1990) พืชในเขตร้อนหลายชนิดไม่สามารถปรับตัวต่ออุณหภูมิต่ำได้ เกิดอันตรายที่เรียกว่า chilling injury จึงมีการพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ เพื่อเก็บรักษาพืชเหล่านี้ เช่นการทดลองเก็บรักษาปลายยอดขิงโดยวิธีการหลอมพาราฟิลม์เหลวทับไว้ด้านบน พบว่าสามารถเก็บรักษาได้นานถึง 1 ปี อัตราการรอดชีวิตสูงถึง 70-100 เปอร์เซ็นต์ (Dekkers, 1991) การเพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บรักษาให้สูงขึ้นสามารถทำโดยการใช้สารป้องกันความเย็นร่วมด้วย มีรายงานการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในพืชหลายพืชโดยการใช้สารป้องกันความเย็น เช่นการเก็บรักษาปลายยอดของกล้วยบนอาหารสูตรพื้นฐาน MS ร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมนนิทอลเข้มข้น 0.1 โมลาร์ มีผลทำให้การเจริญเติบโตของยอดกล้วยถูกจำกัดและสามารถเก็บรักษาได้นาน 1 ปี แต่ต้องทำการย้ายเลี้ยงลงอาหารใหม่ทุก ๆ 2-4 เดือน เนื่องจากมีการระเหยและสูญเสียธาตุอาหารไป(Zamora et al., 1989) นอกจากนี้การเก็บรักษาพืชได้นานมากน้อยแตกต่างกันนั้นยังขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืชด้วย กล้วยยีโนม AA และ AAA เก็บรักษาได้นานกว่ากล้วยยีโนม AAB และ BBB เพราะฉะนั้นพันธุกรรมก็มีส่วนสำคัญในการเก็บรักษาด้วยเช่นกัน การเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชนั้นสามารถเก็บรักษาได้นานหลายปี ถ้ามีขั้นตอนในการควบคุมอุณหภูมิและเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันความเย็นที่เหมาะสม ซึ่งสารตัวนี้ช่วยรักษาความดันออสโมติกภายในเซลล์ทำให้ผนังเซลล์แข็งปกป้ององค์ประกอบภายในจากอุณหภูมิเย็น ซอร์บิทอล ไดเมทธิลซัลฟอกไซด์

โพลีเอทธีลีนไกลโคล(PEG) และโพรลีนเป็นสารป้องกันความเย็นที่นิยมใช้ และใช้ร่วมกับน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นที่ใช้แตกต่างกันไปตามชนิดของสาร เช่นการทดลองเก็บรักษาปลายยอดของเบญจมาศในอาหารเติมไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไดเมทธิลซัลฟอกไซด์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถเก็บรักษาปลายยอดได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 87 เปอร์เซ็นต์(Fukai, 1990) การใช้สารป้องกันความเย็นโพรลีนร่วมกันไดเมทธิลซัลฟอกไซด์เก็บรักษาเซลล์ซัสเพนชั่นของ Puccinellia distans L. พบว่ามีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้สารตัวใดตัวหนึ่งเพียงอย่างเดียว(Heszky et al., 1990) นอกจากการเก็บรักษาชิ้นส่วนต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้ว การเก็บรักษาในรูปแแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอก็สามารถทำได้ มีการทดลองเก็บรักษาโซมาติกเอ็มบริโอของ Picea glauca ในหลอดทดลองที่ปิดด้วย serum cap พบว่าโซมาติกเอ็มบริโอมีอัตราการเจริญเติบโตช้ามาก สามารถเก็บรักษาเป็นเวลา 1 ปี(Richard et al., 1990) จากที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นว่าการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในหลอดทดลองสามารถทำได้ในพืชหลายชนิดภายใต้อุณหภูมิต่ำ โดยการดัดแปลงสูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นสารป้องกันความเย็น

ในรายงานฉบับนี้จะได้รายงานผลของสารป้องกันความเย็นชนิด และระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความสามารถในการเก็บรักษาคัพภะ และข้อใบเลี้ยงของยางพันธุ์พื้นเมือง ตลอดจนการเก็บรักษาส่วนปลายยอด และส่วนข้อของยางพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์ GT1 และพันธุ์ PB5/51 ที่อุณหภูมิต่ำ

อุปกรณ์การทดลอง

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้เตรียมอาหาร
   - เครื่องชั่งสารเคมี
   - เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
   - หม้อนึ่งความดัน
   - ตู้ไมโครเวฟ
   - ตู้อบ
   - เครื่องแก้ว

2. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร
   - สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหาร(ภาคผนวก)
   - สารควบคุมการเจริญเติบโต มีดังนี้
     1. Indole -3- acetic acid(IAA)
     2. 6-Benzyladenine(BA)
   - สารป้องกันความเย็นได้แก่ แมนนิทอล ซอร์บิทอล และ ไดเมทธิลซัลฟอกไซด์

3. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการเลี้ยง
   - ตู้ย้ายเลี้ยง
   - เครื่องแก้วประกอบด้วย บีกเกอร์ กระบอกตวง จานเพาะเชื้อ
   - เครื่องมือผ่าตัด ประกอบด้วย มีดผ่าตัด ด้ามมีด และปากคีบ

4. ห้องเย็นที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้

การศึกษาความสามารถในการเก็บรักษาคัพภะยางพันธุ์พื้นเมือง

ทำการเก็บรวบรวมเมล็ดยางพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์ GT1 และพันธุ์ PB5/51 จากสวนของส่วนราชการ และเอกชนมากระเทาะเอาเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นนอกออก จากนั้นทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวภายนอก โดยการจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที และลนไฟ ตัดแยกเฉพาะคัพภะมาวางเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐาน MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) และผงวุ้นเข้มข้น 0.80 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมด้วยสารป้องกันความเย็น 3 ชนิด ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังต่อไปนี้คือ

1.1 ไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 1, 5, 10, 15, และ 20 เปอร์เซ็นต์(ปริมาตรต่อปริมาตร)

1.2 แมนนิทอลความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 โมลาร์

1.3 ซอร์บิทอลความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 โมลาร์

หลังจากเลี้ยงคัพภะในอาหารดังกล่าวข้างต้น นำไปวางเลี้ยงในห้องที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ โดยให้อุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ทำการลดอุณหภูมิลงวันละ 3 องศาเซลเซียส จนถึง 10 องศาเซลเซียส ทำการดูแลรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส คงที่ตลอดภายใต้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 3, 4, 5 และ 6 สัปดาห์ หลังจากเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิเย็นเป็นระยะเวลาที่กำหนด ย้ายคัพภะไปศึกษาความงอกบนอาหารสูตรพื้นฐาน MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้คัพภะงอก วางเลี้ยงในสภาพความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26$\pm$2 องศาเซลเซียส ศึกษาความสามารถในการเก็บรักษาคัพภะในสารป้องกันความเย็นทั้ง 3 ชนิด จากเปอร์เซ็นต์ความงอกหลังจากย้ายคัพภะไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 25 คัพภะ