บทนำ

เนื่องจากหญ้าแฝกเป็นที่ทราบกันในประเทศไทยว่าเป็นพืชมหัศจรรย์ ที่ใช้กันเพื่ออนุรักษ์ดินและน้ำ (Suebsiri, 1996) ทั้งนี้เพราะมีการแตกกอที่แน่น มีอายุยืน มีระบบรากที่กว้างและแผ่ลึกปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดน้ำมันหอมระเหย ประดิษฐ์หัตถกรรมต่างๆ (Vietmeyer, 1996) และยังใช้ผลิตเป็นหญ้าแฝกแผ่นอัดในปัจจุบัน

พื้นที่ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวมทั้งภาคใต้ของประเทศไทย เป็นพื้นที่ลาดเอียง หรือภูเขาอยู่มากกว่า 50% พื้นที่ดังกล่าวมีความเสี่ยงต่อการพังทะลายของหน้าดินอันเนื่องมาจากการกัดเซาะของน้ำฝนที่รุนแรงมาก ทำให้หน้าดินเกิดความเสียหายเป็นจำนวนมากมายมหาศาล (Vietmeyer, 1996) การแก้ปัญหาที่ผ่านมาเป็นการปลูกพืชต่างๆ เพื่อป้องกันการชะล้าง หรือพังทะลายของหน้าดิน และการปลูกพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจขวางแนวลาดชัน อย่างไรก็ตามพืชที่ปลูกมีระบบรากไม่ดี ทำให้การยึดเกาะดินไม่ดีจึงยังคงทำให้หน้าดินเกิดความเสียหาย

ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงมีพระราชดำริของโครงการ/กิจกรรมนี้กับหม่อมราชวงศ์แชมแจ่มจรัส รัชนี คณะทำงานโครงการพัฒนาหญ้าแฝกเพื่อเป็นพืชเศรษฐกิจโครงการหลวงณ ศาลาเริงวังไกลกังวล อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เมื่อวันที่ 21 กุมภาพันธ์ 2546 สรุปประเด็นสำคัญของพระราชดำริดังนี้ **ให้ทุกหน่วยงานและหน่วยราชการที่มีศักยภาพในการขยายพันธุ์ให้ความร่วมมือกับกรมพัฒนาที่ดินในการผลิตหญ้าแฝกที่มีคุณภาพ แจกจ่ายกลุ่มเป้าหมายที่ต้องการให้พอเพียง และหากดำเนินการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องหมั่นหมุนเวียนกลับมาเริ่มจากต้นแม่พันธุ์เพราะหากขยายพันธุ์หลายช่วงต่อเนื่องกันมากเกินไปจะทำให้กล้าหญ้าแฝกอ่อนแอได้ ควรพิจารณาให้การสนับสนุนงบประมาณการผลิตหญ้าแฝกให้เพียงพอ**

จากพระราชดำริตอนหนึ่งที่ว่าหากดำเนินการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องหมั่นหมุนเวียนกลับมาเริ่มจากต้นแม่พันธุ์เพราะหากขยายพันธุ์หลายช่วงต่อเนื่องกันมากเกินไปจะทำให้กล้าหญ้าแฝกอ่อนแอได้ ทั้งนี้เพราะความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่อาจเกิดขึ้นในหลอดทดลองซึ่งมีสาเหตุมาจากสารควบคุมการเจริญเติบโต สภาพแวดล้อมการเพาะเลี้ยงที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซมหรือยีโนไทป์แล้วทำให้ฟีโนไทป์ที่แสดงออกมาเปลี่ยนแปลงไป แม้ว่าจะมีการเก็บรักษาพันธุกรรมในแปลงปลูก หรือในสภาพธรรมชาติโดยกรมพัฒนาที่ดิน หรือหน่วยงานอื่นๆ ของรัฐ แต่มีความเสี่ยงต่อการกลายพันธุ์สูงอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมที่รุนแรง (น้ำท่วม แห้งแล้ง เป็นต้น) นอกจากนี้การเก็บรักษาด้วยวิธีดังกล่าวต้องใช้พื้นที่มาก เสียค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาสูง ในกรณีที่ต้องมีการรื้อแปลงปลูกเพื่อเก็บใหม่ทำให้มีความยุ่งยากเสี่ยงต่อการสูญเสียพันธุกรรมอีกด้วย ดังนั้นการเก็บรักษาพันธุกรรมของหญ้าแฝกที่มีพันธุกรรม (ระบบราก) หรือโคลนที่ดีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองในสภาพต่างๆ โดยเฉพาะในไนโตรเจนเหลวช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม และสามารถที่จะนำมาใช้เป็นวัสดุพืชเริ่มต้นเพื่อการขยายพันธุ์อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป ไม่ต้องไปเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงตั้งแต่ขั้นต้นใหม่

การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

การเก็บรักษาพันธุกรรมของพืชทำได้ในระยะสั้น ปานกลาง ถึงระยะเวลาที่ยาวนาน ในระยะเวลสั้นถึงปานกลางนั้นทำโดยการชะลอการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชในสภาพปลอดเชื้อภายในหลอดทดลองในอาหารสูตรดัดแปลงที่ลดองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยง หรือร่วมกับการเติมสารชะลอการเจริญเติบโต หรือเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ12-25°ซ (Maruyama *et al.*,1997) หรือดัดแปลงโดยใช้สารออสโมติคัมเช่นซอร์บิทอล (Ford *et al.*, 2000) ที่มีผลต่อการดูดน้ำและธาตุอาหารได้ช้าลง ปัจจุบันการเก็บรักษาพันธุกรรมของพืชที่มีประสิทธิภาพ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรม คือวิธี cryopreservation (Bajaj, 1995; Sakai, 1995; Towill, 1990 อ้างโดย Pennycooke and Towill, 2000) ซึ่งเป็นวิธีการเก็บไว้ในโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °ซ. อย่างไรก็ตามการนำเอาชิ้นส่วนพืชแช่ลงในไนโตรเจนเหลวโดยไม่มีการลดอุณหภูมิที่ถูกต้องและเหมาะสมนั้น ทำให้เซลล์พืชได้รับอันตรายจากความเย็นจัด เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้เครื่องลดอุณหภูมิที่ควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ซึ่งมีราคาแพง ไม่คุ้มค่ากับการเก็บรักษาจึงได้ประยุกต์ใช้วิธีการเตรียมชิ้นส่วนก่อนการเก็บรักษาโดยวิธีที่ง่ายและทำได้สะดวก วิธีดังกล่าวคือ การ encapsulation, dehydration และ vitrification ซึ่งอาจใช้วิธีการใดวิธีการหนึ่งเพียงลำพังหรือใช้ร่วมกัน ผลสำเร็จจากการใช้วิธีการดังกล่าวมีรายงานในพืชจำนวนมากที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น เผือก (Takagi *et al.*, 1997), พืชสกุล *Cedrela* (Maruyama *et al.*, 1997), เชอร์รี่ (Niino *et al.*, 1997), สะระแหน่ (Hirai and Sakai, 1999), ฮอป (Martinez *et al.*, 1999), กล้วยไม้ *Doritaenopsis* (Tsukazaki *et al.*, 2000), มันเทศ (Pennycooke and Towill, 2000), แอบเปิ้ล (Paul *et al.*, 2000), บีท (Vandenbussche *et al.*, 2000), ปอบลา (Lambardi *et al.*, 2000), อาฟัลฟา (Shibli *et al.*, 2001) เป็นต้น จากความสำเร็จกับพืชข้างต้นนี้หากนำมาประยุกต์ใช้เก็บรักษาเชื้อพันธุ์หญ้าแฝกเพื่อประสิทธิภาพในการเก็บรักษาต่อไป

โดยทั่วไปชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในหลอดทดลองโดยวิธีการข้างต้นนั้นอาจเป็นปลายยอด (Takagi *et al.*, 1997; Maruyama *et al.*, 1997; Niino *et al.*, 1997; Hirai and Sakai, 1999; Pennycooke and Towill, 2000; Paul *et al.*, 2000; Vandenbussche and De Proft, 2000; Lambardi *et al.*, 2000; Shibli *et al.*, 2001) แคลลัส เนื้อเยื่อเอ็มบริโอนิค (Ford *et al.*, 2000) เซลล์ซัสเพนชั่น (Tsukazaki *et al.*, 2000) โซมาติคเอ็มบริโอ ไซโกติคเอ็มบริโอ (Santos and Stushnoff, 2002) เป็นต้น อย่างไรก็ตามการใช้ชิ้นส่วนที่มีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด เช่นปลายยอด เอ็มบริโอ มีประสิทธิภาพสูงกว่า ทั้งนี้เพราะสามารถที่จะพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ภายหลังการเก็บรักษาได้สูง จนถึงปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์หญ้าแฝก คงมีเพียงรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าแฝก (คณะทำงานวางผังแม่บทการพัฒนาและรณรงค์การใช้หญ้าแฝก, 2536; Leupin *et al.*, 2000 Prasertsongskun, 2003;) และจากผลสำเร็จของการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่เกี่ยวกับเพศ (ช่อดอก) และชิ้นส่วนที่ไม่เกี่ยวกับเพศ (หน่อและใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง) ช่วยให้การใช้วัสดุดังกล่าวเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อเป็นไปได้สูง และแม้ว่ายังไม่มีรายงานการชักนำกระบวนการโซมาติคเอ็มบริโอเจนิซิสจากการเพาะเลี้ยงหญ้าแฝกก็ตาม แต่การใช้ compact callus ซึ่งภายในมีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญส่วน

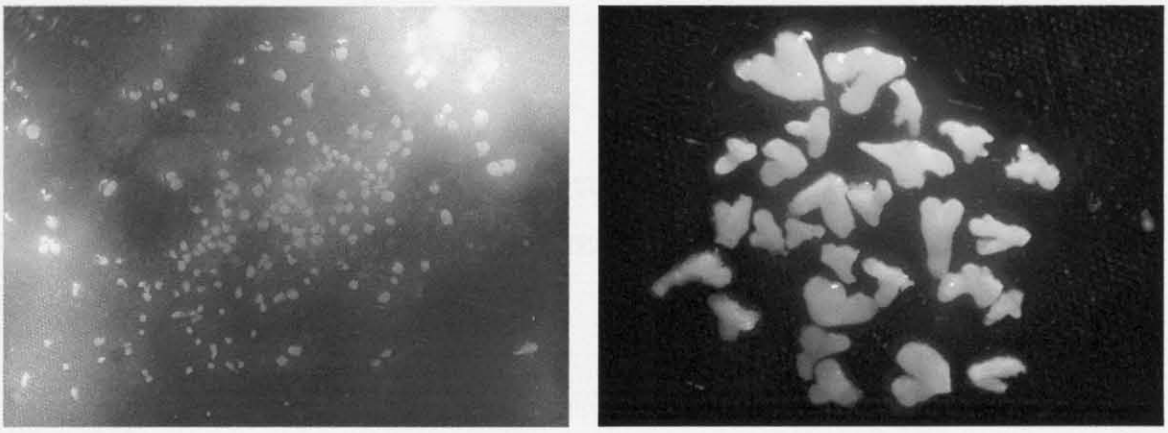
ยอด (organogenic tissue) นับว่ามีประโยชน์ นอกจากนี้ผู้เสนอโครงการยังได้เสนอโครงการ **"การผลิตเมล็ดเทียมหญ้าแฝกเพื่อปลูกอนุรักษ์ดินและน้ำ"** ในโครงการดังกล่าวเป็นการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และซัสเพนชั่น การนำเอาผลที่ได้จากโครงการนี้ (โซมาติคเอ็มบริโอ หรือ embryonic tissue) มาเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมคาดว่าให้ผลดีกว่า compact callus

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระหว่างการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์นั้นอาจเกิดขึ้นได้ แม้ว่าอัตราการเกิดจะต่ำ (1-5%) ดังนั้นเพื่อความมั่นใจว่าพันธุกรรมพืชที่เก็บรักษาอยู่นั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงจำเป็นจะต้องมีการประเมินผลซึ่งสามารถทำได้โดยดูลักษณะทางสัณฐาน เช่นรูปร่างของใบ สี และขนาดของใบเป็นต้น (Uma *et al.*, 2003) เครื่องหมายทางชีวเคมี (ไอโซไซม์) (สมปอง เตชะโต และคณะ, 2538: มงคล แซ่หลิม และคณะ, 2546) และเครื่องหมายทางโมเลกุล (ดีเอ็นเอ) คือ random amplified polymorphic DNA หรือ RAPD (Te-chato, 2000; Te-chato, *et al.*, 2000; Shasany *et al.*, 2002; Grzebelus *et al.*, 2002) สามารถใช้ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่อาจจะเกิดขึ้นได้

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุพืช

ใช้หญ้าแฝกพันธุ์สงขลา 3 เป็นตัวอย่างพืชในการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ นำใบอ่อนหญ้าแฝกมาชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ซัสเพนชั่นและเพิ่มปริมาณโซมาติคเอ็มบริโอจำนวนมาก (รูปที่ 1) เพื่อนำมาใช้หุ้มห่อเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว นอกจากนี้ยังได้นำปลายยอดของหญ้าแฝกมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำการสร้างยอดรวมบนอาหารแข็ง เพิ่มปริมาณยอดจำนวนมากโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในลักษณะ batch culture (รูปที่ 2 ก) หรือเลี้ยงในไบโอรีแอคเตอร์อย่างง่าย (รูปที่ 2 ข) จากนั้นเก็บรวบรวมปลายยอดมาใช้เพื่อเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วยกระบวนการต่างๆ ต่อไป



รูปที่ 1 Somatic embryo ระยะต่างๆ ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นของหญ้าแฝก

ก

ข

รูปที่ 2 ยอดของหญ้าแฝกที่เพิ่มปริมาณในอาหารเหลวแบบ batch culture (ก) และในไบโอรีแอคเตอร์อย่างง่าย (ข)

วัสดุสารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหาร MS

2. สารเคมีที่ใช้เตรียมชิ้นส่วนพืช (ต้นอ่อน ปลายยอด) ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ประกอบด้วยสารเคมีที่ใช้ปรับสภาพของน้ำภายในเซลล์ และรักษาแรงดันออสโมติคของเซลล์ไม่ให้เกิดความเสียหายอันเนื่องมาจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เช่น น้ำตาลซูโครส ไกลเซอรอล เอทธิลีนไกลคอล ไดเมทธิลซัลฟอกไซด์

3. สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ภายหลังการเก็บเกี่ยวในไนโตรเจนเหลว ในการศึกษานี้ใช้ fluorescein diacetate (FDA)

4. สารควบคุมการเจริญเติบโต ประกอบด้วย ∝-naphthaleneacetic acid (NAA) และ 6-benzyladenine (BA)

วัสดุเครื่องแก้ว

ใช้เครื่องแก้วชนิดต่างๆ ดังนี้คือ ขวดเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ ฟลาสค์ขนาด 125 มล จานเพาะเลี้ยงเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. หลอดทดลองขนาด 25x150 มม

อุปกรณ์

อุปกรณ์การตัด ย้ายเลี้ยง ประกอบด้วยปากคีบ ด้ามมีดและใบมีดผ่าตัด

ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ถังไนโตรเจนเหลวขนาดบรรจุ 40 ลิตร

cryotube ขนาดความจุ 2.5-5 มล

วิธีการศึกษา

1. การเก็บรักษาในระยะเวลาปานกลาง

1.1 การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

นำโซมาติคเอ็มบริโอ และเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น ตลอดจนปลายยอด มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเติม NAA 0.1 มก/ล ร่วมกับ BA 0.5 มก/ล จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 14-16°ซ เป็นเวลา 12 เดือน โดยในแต่ละเดือนหลังการเก็บนำมาออกมาเพาะเลี้ยงที่สภาพปกติ (อุณหภูมิ 26±4°ซ ให้แสง 1,500 ลักซ์ 14 ชั่วโมง) ต่ออีกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ในแต่ละระยะเวลาการเก็บรักษาทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 25 ชิ้นส่วน (ในหนึ่งซ้ำประกอบด้วย 5 ขวด เพาะเลี้ยงขวดละ 5 ชิ้นส่วน) ตรวจผลความสามารถในการสร้างแคลลัส การงอก หรือการสร้างยอดรวมในแต่ละระยะเวลการเก็บรักษา

1.2 การเก็บรักษาในอาหารเติมสารชะลอการเจริญเติบโต

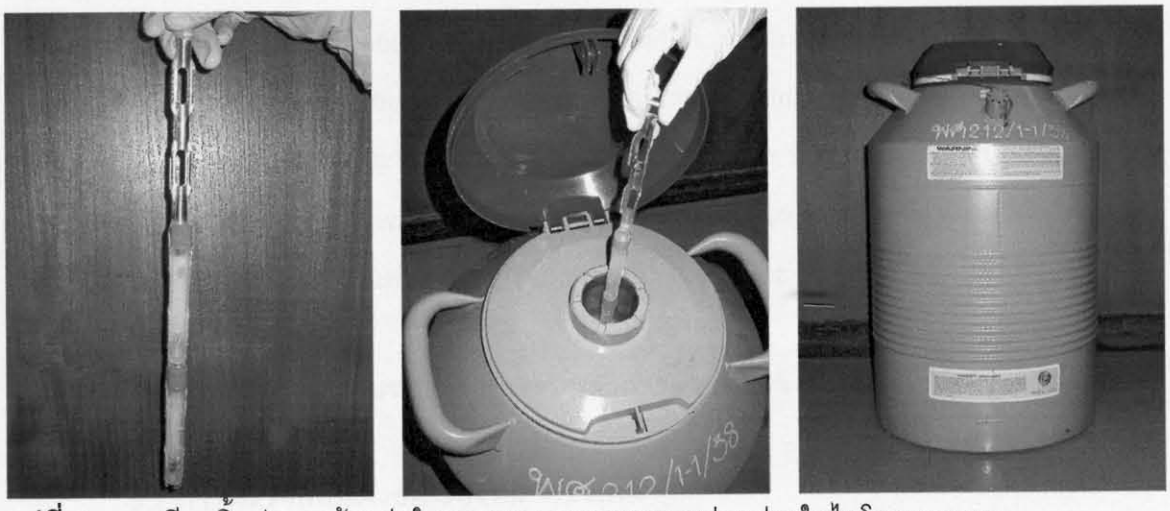
นำโซมาติคเอ็มบริโอ และเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น ตลอดจนปลายยอด มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเติม NAA 0.1 มก/ล ร่วมกับ BA 0.5 มก/ล อาหารทั้งสองสูตรเติมสารชะลอการเจริญเติบโต 2 ชนิดคือ กรดแอบซิซิค (ABA) หรือพาโคลบิวทราโซล (PBZ) ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน สำหรับ ABA ใช้ความเข้มข้นในช่วง 0.1-1.0 มก/ล สำหรับ PBZ ใช้ความเข้มข้นในช่วง 0.025-0.1 มก/ล ในแต่ละความเข้มข้นของ ABA และ PBZ ทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 25 ชิ้นส่วน (ในหนึ่งซ้ำประกอบด้วย 5 ขวด เพาะเลี้ยงขวดละ 5 ชิ้นส่วน) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน ตรวจผลความสามารถในการสร้างแคลลัส การงอก หรือการสร้างยอดรวมโดยการย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมแต่ปราศจากสารชะลอการเจริญเติบโตทั้งสองเป็นเวลา 4 สัปดาห์

2. การเก็บรักษาในระยะยาว (ในไนโตรเจนเหลว)

2.1 Vitrification

นำโซมาติคเอ็มบริโอ และเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชัน ตลอดจนปลายยอด มาแช่ในสารละลาย PVS2 ซึ่งประกอบด้วย glycerol 30% ethylene glycol 15% dimethylsulfoxide

(DMSO) 15% และ sucrose 0.4 M ปริมาตร 1.5 มล ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอด cryotube ปริมาตร 2 มล วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 1, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 และ 120 นาที แล้วนำหลอด cryotube มาบรรจุใส่รางเสตนเลส นำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลวขนาด 40 ลิตร นาน 1 ชม (ขั้นตอนแสดงในรูปที่ 3)เมื่อครบเวลานำมา thawing โดยนำชิ้นส่วนมาแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40° ซ. นาน 2 นาที แล้วตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสารละลาย FDA จำนวน 20 ยอด ส่วนที่เหลือตรวจสอบการเกิดยอดโดยการเพาะเลี้ยงลงในอาหารชักนำการงอก (สูตร MS (Murashige and Skoog) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเติม NAA 0.1 มก/ล ร่วมกับ BA 0.5 มก/ล) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละเวลาทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 20 ชิ้น



รูปที่ 3 การเตรียมชิ้นส่วนหญ้าแฝกในสารละลาย PVS2 และจุ่มแช่ลงในไนโตรเจนเหลว

2.2 Encapsulation

นำโซมาติคเอ็มบริโอ เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น และปลายยอดมามาลอยบนสารผสม Na-alginate ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4% (w/v) ร่วมกับ glycerol ความเข้มข้น 2 M และ sucrose ความเข้มข้น 0.4 M ต่อจากนั้นนำปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูดมาผสมกับสารผสมกันระหว่าง $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0.1 M ร่วมกับ glycerol ความเข้มข้น 2 M และน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 0.4 M ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำไปแช่ไนโตรเจนเหลวนาน 1 ชม. เมื่อครบเวลานำมา thawing แล้วตรวจสอบความมีชีวิตและการเกิดยอดโดยวิธีการเดียวกับ 2.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละความเข้มข้นของ Na-alginate ทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 20 bead

2.3 Dehydration

นำโซมาติคเอ็มบริโอ เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น และปลายยอดมา dehydrate ในตู้ laminar flow หรือใส่ในโถดูดความชื้น ที่ 10 ระดับเวลา คือ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ชม. ต่อจากนั้นนำแต่ละทรีทเมนต์ ไปแช่ในไนโตรเจนเหลวนาน 1 ชม. เมื่อครบเวลานำมา thawing แล้วตรวจสอบความมีชีวิต และการเกิดยอดตามวิธีการในข้อ 2.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละวิธีและระยะเวลา ทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 20 ชิ้น

2.4 Combintion

โดยเปรียบเทียบการใช้วิธีร่วมกันระหว่าง การเตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการ encapsulation, dehydration และ vitrification ที่เหมาะสมจากการทดลองข้างต้นมาศึกษา ดังนั้นหน่วยการทดลองประกอบด้วย dehydration ร่วมกับ encapsulation vitrification ร่วมกับ encapsulation dehydration ร่วมกับ vitrification และ dehydration ร่วมกับ vitrification และ encapsulation หลังจากเตรียมชิ้นส่วนด้วยวิธีการเตรียมร่วมกันของแต่ละวิธีแล้ว นำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวนาน 1 ชม. เมื่อครบเวลานำมา thawing แล้วตรวจสอบความมีชีวิต และการเกิดยอดตามวิธีการในข้อ 2.1 ทำการทดลองแบบ CRD แต่ละหน่วยการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 20 ชิ้น

3. การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมหลังการเก็บรักษา

3.1 การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายชีวเคมี

เก็บตัวอย่างต้นอ่อนหรือใบอ่อนจากต้นหญ้าแฝกที่พัฒนาหลังการเก็บรักษาให้มีน้ำหนักในช่วง 0.1-0.5 มก. นำมาบดในสารละลายสกัดซึ่งประกอบด้วย ปริมาตร 5 เท่าของน้ำหนักใบพืช ในโกร่งเย็นจนละเอียด แล้วจึงนำของเหลวที่ได้เทใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟปั่นเหวี่ยงด้วยไมโครเซนตริฟิวก์ที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟที่สะอาด แล้วแยกเอ็นไซม์ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟริซิสแนวตั้ง ใช้ตัวกลางเป็นเจลโพลีอะคริลาไมด์แบบไม่ต่อเนื่อง ภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที ตรวจสอบเอ็นไซม์ในระบบแอลฟาเอสเตอเรส (α-esterase;EST) ย้อมสีในที่มืด บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบ/นาที จนเห็นแถบไซโมแกรมชัดเจน ไม่เปลี่ยนแปลง แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง บันทึกผลทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของไซโมแกรม

3.2 การตรวจสอบโดยเครื่องหมายโมเลกุล

สำหรับการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลใช้เทคนิค RAPD (random amplify polymorphic DNA) เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค mini-prep ตามวิธีการที่รายงานโดย

Te-chato (2000) ซึ่งมีวิธีการโดยสรุปคือเก็บตัวอย่างชิ้นส่วนหญ้าแฝก (ใบอ่อน/ต้นอ่อน) หลังการเก็บรักษา 20 มก ใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟ นำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (Tris-EDTA) กำจัดสิ่งเจือปนที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ออกด้วยแอมโมเนียมอะซีเตท ปั่นตกตะกอนแยกส่วนที่เป็นดีเอ็นเอออกมาแล้วตกตะกอนด้วยไอโสโปรพานอล จากนั้นปั่นตะกอนดีเอ็นเอ ล้าง และเก็บรักษาไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ TE ในขั้นตอนต่อมาก็เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มด้วยปฏิกิริยา PCR (polymerase chain reaction) สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้คือ 10-mer primer ของ Operon Technology (Inc. Alameda, California) ตามวิธีการของ Te-chato (2000) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำ 26 รอบดังนี้คือ 3 cycles of 1 min at 94^{o}C, 1 min at 41^{o}C, 1 min at 72^{o}C ตามด้วย 22 cycles, each of 30 sec at 94^{o}C, 1 min at 41^{o}C, 2 min at 72^{o}C และจบด้วย 1 cycle of 10 min at 72^{o}C แยกผลลัพท์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิคอิเลคโตรฟอริซิสโดยใช้เจลอากาโรสเข้มข้น 2% ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE (0.5X Tris-Boric-EDTA) ย้อมสีเจลด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์

ผลการศึกษา

1. การเก็บรักษาในระยะเวลาปานกลาง

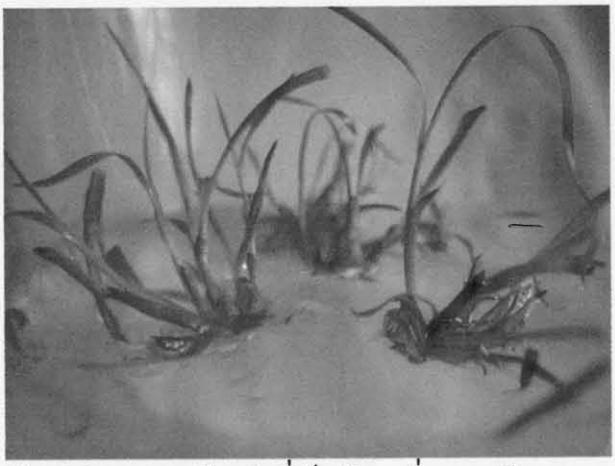
ในการศึกษานี้ พบว่า เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เซลล์ซัสเพนชัน ตลอดจนต้นอ่อนที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนที่เก็บรักษาโดยการชะลอการเจริญเติบโตในสูตรอาหารที่ลดองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงไม่สามารถที่จะชะลอการเจริญเติบโต ส่วนการเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ หรือการให้สารชะลอการเจริญเติบโตเป็นต้นสามารถชะลอการเจริญเติบโตได้ภายในเวลา 12 เดือน (1ปี) โดยอัตราการรอดชีวิตและการพัฒนาให้ยอดใหม่ดังนี้คือ

1.1 การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

หลังเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 14-16 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาต่าง ๆ ให้อัตรารอดชีวิตแตกต่างกันในช่วง 6-40% โดยเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้นให้อัตราการรอดชีวิตลดลง (ตารางที่ 1) การเก็บรักษาปลายยอดที่อุณหภูมิดังกล่าวข้างต้นเป็นเวลา 4 เดือน ให้อัตรารอดชีวิตเหลือเพียง 6% และมีความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นใหม่ 80% (รูปที่ 4) ดังนั้นควรมีการย้ายเลี้ยงทุก 3 เดือน

ตารางที่ 1 ผลของการให้อุณหภูมิ 14-16 องศาเซลเซียสเป็นเวลาต่าง ๆ ต่ออัตรารอดชีวิตและการสร้างยอดใหม่หลังย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตร MS ที่ปราศจากสารดังกล่าวเติม NAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร

เวลาการให้อุณหภูมิต่ำ (เดือน)	อัตราการรอดชีวิต (%)	อัตราการสร้างยอดรวม (%ของอัตรารอดชีวิต)
0	100	100
1	33.33	92.3
2	40.00	91.6
3	26.67	85.5
4	6.67	83.3



รูปที่ 4 การเจริญใหม่ของยอดหญ้าแฝกที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือน หลังจากย้ายไปเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิปกติในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA เข้มข้น 1มิลลิกรัม/ลิตร

1.2 การเก็บรักษาในอาหารเติมสารชะลอการเจริญเติบโต

จากการเพาะเลี้ยงปลายยอดหญ้าแฝกในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วยน้ำตาลแมนนิทอล และสารพาโคลบิวทราโซล (PBZ) ความเข้มข้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือนพบว่า อัตราความมีชีวิตหลังการเก็บรักษาในแมนิทอล 85% สูงกว่า PBZ ซึ่งให้อัตรารอดชีวิต 30% (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของสารชะลอการเจริญเติบโตต่ออัตรารอดชีวิตและการสร้างยอดรวมหญ้าแฝกเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตร MS ที่ปราศจากสารดังกล่าวเติม NAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร

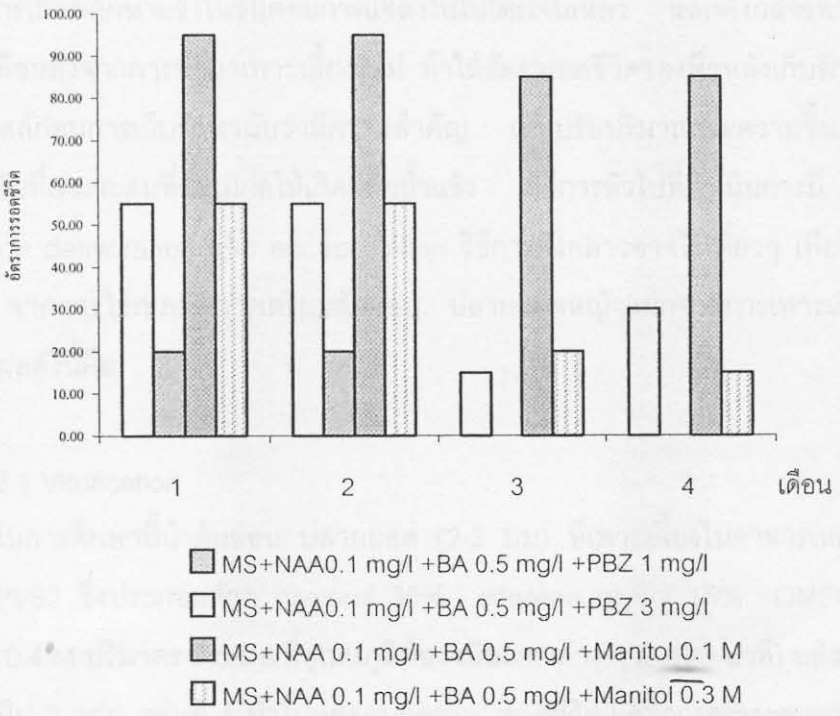
สารชะลอการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น	ความมีชีวิต (%)	จำนวนยอดเฉลี่ย
ชุดควบคุม	0	100	>50
Mannitol (M)	0.1	85	6.5
	0.3	15	3.5
PBZ (มก/ล)	1	30	2.5
	3	0	0

ตารางที่ 3 ผลของสารชะลอการเจริญเติบโตต่ออัตรารอดชีวิตและการสร้างยอดรวมหญ้าแฝกเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลาต่าง ๆ แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตร MS ที่ปราศจากสารดังกล่าวเติม NAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร

สารชะลอการเจริญเติบโต	ความมีชีวิต(%) หลังเก็บรักษาเป็นเวลา			
	1	2	3	4 เดือน
ชุดควบคุม	100	100	100	100
Mannitol (M)				
0.1	95	95	85	85
0.3	55	55	20	15
PBZ (มก/ล)				
1.0	55	55	15	30
3.0	20	20	0	0

อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารชะลอการเจริญเติบโตที่สูงขึ้น และระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้นส่งผลให้ความมีชีวิตลดลงโดยเฉพาะในอาหารเติม PBZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม/ลิตรที่เก็บรักษาเป็นเวลาตั้งแต่ 3 เดือนขึ้นไปไม่สามารถที่จะให้อัตรารอดชีวิตของปลายยอดได้ (ตารางที่ 3 รูปที่ 5)

การเก็บรักษาหญ้าแฝกในอาหารสูตรต่างๆ



รูปที่ 5 อัตราการรอดชีวิต (%) โดยเฉลี่ยเมื่อนำยอดหญ้าแฝกวางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เมื่อวางเลี้ยงเป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน

2. การเก็บรักษาระยะยาว

เป็นการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวดในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียส ซึ่งในสภาพดังกล่าวเป็นการหยุดกิจกรรมของเซลล์อย่างสมบูรณ์ สิ่งที่สำคัญมากในการเก็บด้วยวิธีนี้คือการเกิดผลึกน้ำแข็งในขั้นตอนการแช่ลงในไนโตรเจนเหลว ผลึกดังกล่าวทำความเสียหายกับเซลล์พืชหลังจากการนำมาเพาะเลี้ยงใหม่ ทำให้อัตรารอดชีวิตของพืชหลังเก็บรักษาลดลง การเตรียมเซลล์ก่อนการเก็บรักษานับว่ามีความสำคัญ เพื่อปรับปริมาณน้ำ/ความชื้นภายในเซลล์ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมที่จะไม่ก่อให้เกิดผลึกน้ำแข็ง วิธีการทั่วไปที่ดำเนินการมี 3 วิธีคือ vitrification dehydration และ encapsulation วิธีการดังกล่าวอาจใช้เดี่ยวๆ เพียงลำพัง หรือใช้ร่วมกัน จากการใช้เทคนิคการเตรียมต้นอ่อน ปลายยอดหญ้าแฝกจากการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการต่างๆ ให้ผลดังนี้คือ

2.1 Vitrification

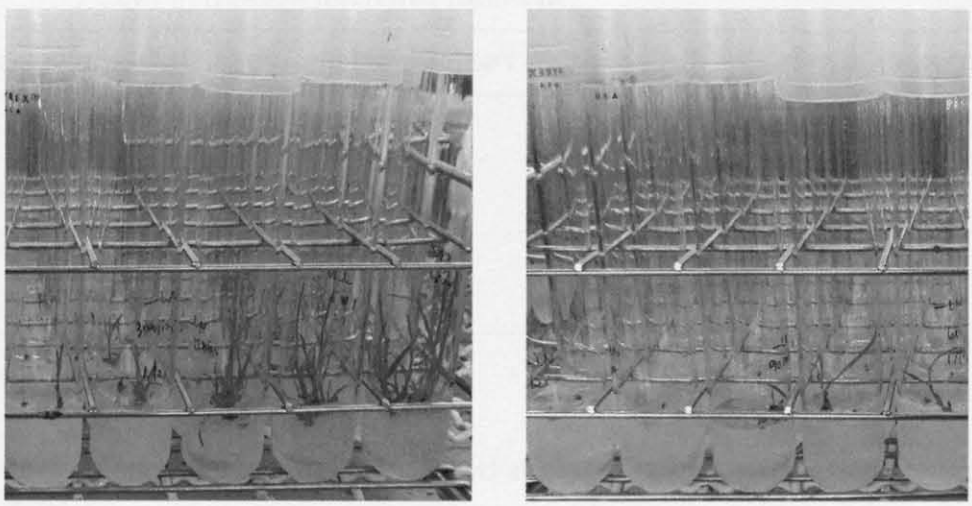
ในการศึกษานี้นำต้นอ่อน ปลายยอด (2-3 มม) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมาแช่ในสารละลาย PVS2 ซึ่งประกอบด้วย glycerol 30% ethylene glycol 15% DMSO 15% และ sucrose 0.4 M ปริมาตร 1.5 มล.ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาต่าง ๆ (0-120 นาที) หลังจากนั้นแบ่งชิ้นส่วนพืชเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 นำไปทดสอบอัตราการรอดชีวิต และการสร้างยอดรวม อีกกลุ่มหนึ่งนำไปใส่ในหลอด cryotube หลอดละ 20 ชิ้นที่มีสารละลาย PVS2 ปริมาตร 1 มล. จุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที เป็นเวลา 1 ชม. แล้วนำมาละลายทันที ที่อุณหภูมิ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลาย PVS2 ออก จากนั้นนำมาตรวจสอบความมีชีวิตและการสร้างยอดรวมเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น สำหรับการสร้างยอดรวมนั้นใช้โซมาติคเอ็มบริโอ และปลายยอดจำนวน 20 ชิ้น/หน่วยการทดลอง มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA 0.1 มก/ล ร่วมกับ BA 0.5 มก/ล เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่า การ vitrification เป็นเวลาสั้น (0-1 นาที) ส่งผลให้เซลล์เสียหายและตายหลังจากที่เก็บในไนโตรเจนเหลว ระยะเวลาที่นานขึ้นให้อัตรารอดชีวิตสูงขึ้น ระยะที่เหมาะสมในการทำ vitrification คือ 75-120 นาที ให้อัตรารอดชีวิตของเซลล์หลังการเก็บรักษา 80-100% (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตามเมื่อนำไปชักนำยอดรวมในอาหารสูตรอาหารข้างต้น พบว่า สามารถสร้างยอดรวมได้ 1-4% (รูปที่ 6)

ตารางที่ 4 ผลของระยะเวลาในการแช่ในสารละลาย vitrification ต่ออัตรารอดชีวิตและการ regrowth ของชิ้นส่วนปลายยอดก่อนและหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลา (นาที)	อัตรารอดชีวิต (%)*		การพัฒนาเป็นยอดใหม่ (regrowth) (%)**	
	- LN	+ LN	- LN	+ LN
0	100	0	100	0
1	100	0	100	0
15	40	45.45	90	0
30	70	66.67	70	0
45	80	55.56	70	0
60	70	70	30	0
75	80	90	30	1.05
90	100	80	30	3.20
105	100	90	10	3.02
120	100	100	10	4.25

* ตรวจสอบความมีชีวิตจำนวน 15 ชิ้น/หน่วยการทดลอง

** เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA 0.1 มก/ล และ BA 0.5 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ก ข

รูปที่ 6 การเตรียมโซมาติคเอ็มบริโอ/ยอดอ่อนด้วยวิธี vitrification แล้วนำไปตรวจสอบการสร้างยอดรวม (ก) หรือนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนแล้วชักนำการสร้างยอดรวมในอาหารสูตร MS เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข)

ห้องสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

การดัดแปลงวิธี vitrification

ในการศึกษานี้นำปลายยอด (2-3 มม) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมา preculture ในอาหารสูตร ½ MS เติมซูโครส 0.3 M เป็นเวลา 16 ชม. ก่อนมาแช่ในสารละลาย LS (glycerol 2 M ร่วมกับ sucrose 0.4 M) หยดในสารละลาย $CaCl_2.2H_2O$ ที่ประกอบด้วยสารละลาย LS เป็นระยะเวลาต่าง ๆ คือ 0, 10, 20, 30 และ 40 นาที แล้วแช่ในสารละลาย PVS2 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 75 นาที แล้วจึงนำยอดใส่ในหลอด cryo vial หลอดละ 20 ชิ้นที่มีสารละลาย PVS2 ปริมาตร 1 มล. จุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชม. แล้วนำมาละลายทันที ที่อุณหภูมิ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลาย PVS2 ออกแล้วเติมอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม sucrose 1.2 M เป็นเวลา 20 นาที จึงนำมาย้อมความมีชีวิตด้วยสารละลาย FDA จำนวน 20 ยอด ส่วนที่เหลือเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรเพิ่มปริมาณยอด จำนวน 20 ยอด บันทึกการสร้างยอดรวม หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า วิธีการดังกล่าวไม่สามารถที่จะปรับปรุง หรือเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวให้สูงกว่าวิธีการเดิมที่ไม่ได้ดัดแปลงแต่อย่างใด อัตรารอดชีวิตของชิ้นส่วนที่แช่เป็นเวลา 10 นาที มีเพียง 7.5% (ตารางที่ 5) การสร้างยอดรวมก็ไม่ประสบผลสำเร็จ

ตารางที่ 5 ผลของการเตรียมชิ้นส่วนก่อนการ vitrification ในสารละลาย LS เป็นเวลาต่าง ๆ ต่ออัตราการอดชีวิต และการสร้างยอดรวม

เวลาการจุ่มแช่ (นาที)	อัตรารอดชีวิต (%)	การสร้างยอดรวม (%)
0	5	0
10	7.5	0
20	2.5	0
30	0	0

2.2 Dehydration

ดัดปลายยอดหญ้าแฝกแล้ว dehydrate โดยการวางผึ่งลมไว้ในตู้ย้ายเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่มีความเร็วลมในอัตรา 80-90 ฟุตต่อวินาที เป็นเวลาต่างๆ ตรวจสอบน้ำหนักของชิ้นส่วนที่ลดลง นำปลายยอดที่ผ่านการปรับความชื้นระดับต่างๆ ใส่ในหลอด cryotube หลอดละ 20 ชิ้น จุ่มลงในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาละลายทันที ที่อุณหภูมิ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จึงนำมาย้อมความมีชีวิตด้วยสารละลาย FDA จำนวน 15 ยอด ส่วนที่เหลือเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรเพิ่มปริมาณยอด จำนวน 15 ยอด บันทึกการสร้างยอดรวม หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และอัตรารอดชีวิตของชิ้นส่วนหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

วิธีการ dehydration ตั้งแต่ 30 นาทีเป็นต้นไป ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ในชิ้นส่วนยอดที่เก็บรักษามีอัตรารอดชีวิต 100% เท่ากัน (ตารางที่ 6) ไม่ปรากฏการสร้างยอดรวมหลังจากการเก็บรักษา

ตารางที่ 6 ผลของระยะเวลาในการ dehydrate ต่อน้ำหนักที่ลดลงของชิ้นส่วนปลายยอด และอัตรารอดชีวิตของชิ้นส่วนหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลา (ชม)	น.น.ที่ลดลง (มก)	อัตรารอดชีวิต (%)	การสร้างยอดรวม (%)*
0.5	20	100	0
1	60	100	0
2	50	100	0
3	50	100	0
4	50	100	0
5	70	100	0

*เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA 0.1 มก/ล และ BA 0.5 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์

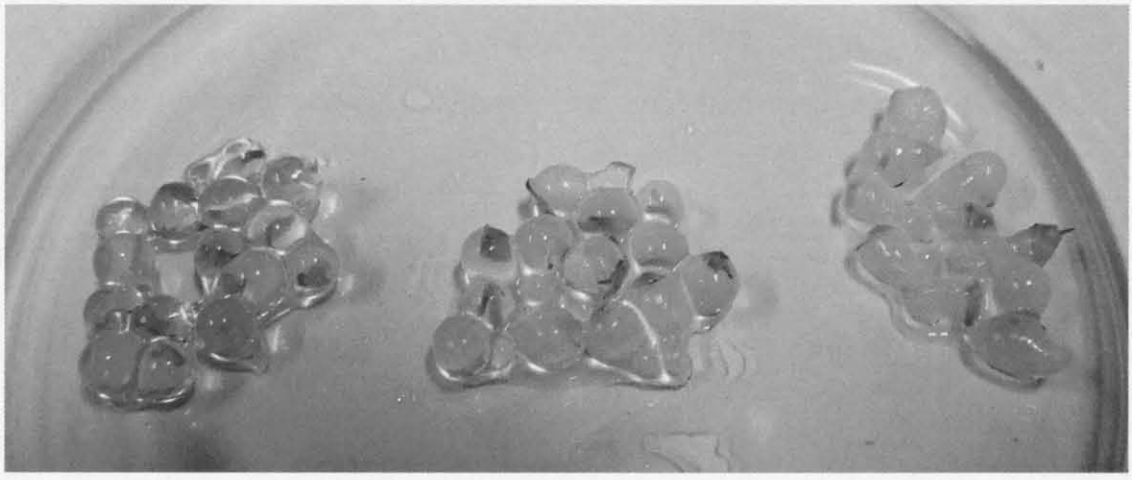
2.3 Encasulation

จากการหุ้มชิ้นส่วนปลายยอดด้วยวุ้นอัลจิเนต 3 ยี่ห้อ คือ Sigma, Fluka และ Wako แต่ละชนิดมี 4 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 2, 3 และ 4% พบว่า ทุกชนิดและความเข้มข้น ให้อัตรารอดชีวิต หลังจากย้อมด้วยสารละลาย FDA 100% อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบความใสและความแข็ง พบว่า Wako มีความใสและแข็งมากที่สุด รองลงมาคือ Sigma และ Fluka ตามลำดับ และเช่นเดียวกันในความยากง่ายของการปฏิบัติ พบว่า Wako และ Sigma ได้เม็ด bead ที่กลมสวยมากกว่า Fluka (รูปที่ 7) เมื่อนำ bead ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม NAA 0.1 มก/ล ร่วมกับ BA 0.5 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า วุ้นอัลจิเนตความเข้มข้น 3 และ 4 % ให้อัตราการสร้างยอดรวมสูงที่สุด 80 % (ตารางที่ 7) อย่างไรก็ตามจำนวนยอดที่มีการพัฒนาหรือการยืดยาวเป็นยอดปกติต่ำ ในขณะที่อัลจิเนตของบริษัท Sigma หรือ Fluka ความเข้มข้น 2 % ให้จำนวนยอดที่ยืดยาวปกติเฉลี่ย สูงสุด 0.8 และ 0.75 ยอดตามลำดับ (รูปที่ 8) จึงเลือกใช้วุ้น Fluka มา encapsulate ยอดหญ้าแฝกเพื่อการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว หลังการหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนตจาก Fluka 3-4% และเก็บรักษาในไนโตรเจนเป็นเวลา 1 ชั่วโมงพบว่าชิ้นส่วนปลายยอดมีอัตรารอดชีวิตสูงถึง 80% (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 ผลของชนิดและความเข้มข้นวุ้นต่ออัตรารอดชีวิตและการยืดยาวของยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดหญ้าแฝก

ความเข้มข้น (%)	อัตรารอดชีวิต (%)		
	Sigma	Wako	Fluka
1	60 (0.5)	40 (0.25)	50 (0.6)
2	50 (0.8)	40 (0.00)	40 (0.75)
3	70 (0.57)	30 (0.33)	40 (0.5)
4	60 (0.5)	80 (0.13)	30 (0.33)

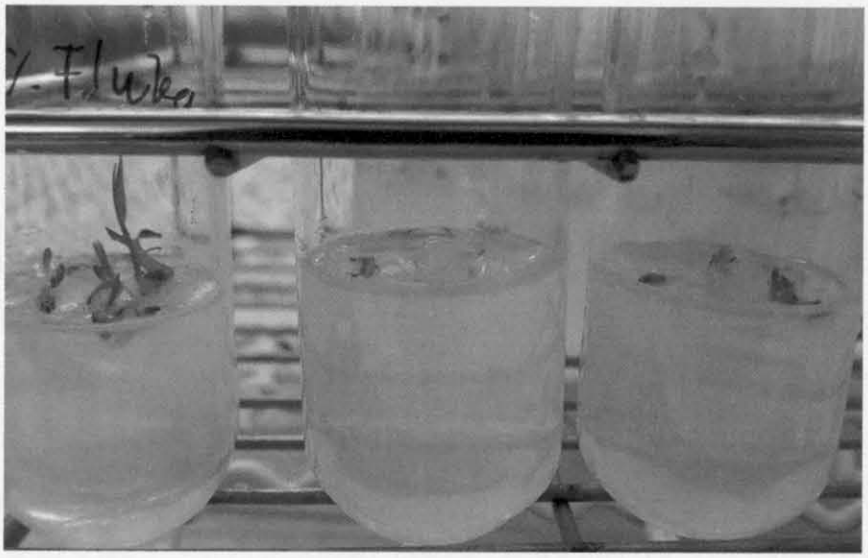
ตัวเลขในวงเล็บเป็นยอดที่ยืดยาว 0.5-2 ซ.ม. เฉลี่ยจากชิ้นส่วนที่เริ่มพัฒนาเป็นตายอดหรือยอด



ก ข ค

รูปที่ 7 การ encapsulate ปลายอดด้วยวุ้นแอลจีเนทเข้มข้น 2% จากบริษัทต่างๆ

ก. Sigma ข. Wako ค. Fluka



ก ข ค

รูปที่ 8 การทดสอบการงอกของปลายยอดที่ผ่านการหุ้มด้วยวุ้นชนิดต่างๆ เข้มข้น 2% ในหลอดทดลองในอาหารวุ้นที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

ก. Sigma/Fluka ข และ ค Wako

ตารางที่ 8 ผลของความเข้มข้นวุ้นอัลจิเนตต่ออัตรารอดชีวิตและการสร้างยอดรวมของชิ้นส่วนปลายยอด

ความเข้มข้นอัลจิเนต (%)*	อัตรารอดชีวิต (%)*
1	20
2	60
3	80
4	80
ไม่หุ้ม	0

* อัลจิเนต (Fluka)

และเมื่อเพาะเลี้ยง (จำนวน 15 ชิ้น/หน่วยการทดลอง) ในอาหารสูตร MS เติม NAA 0.1 มก/ล ร่วมกับ BA 0.5 มก/ล เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนมีสีซีดและไม่สามารถที่จะเพิ่มปริมาณได้ในทุกความเข้มข้นของวุ้น Fluka

2.4 Combination

2.4.1 Encapsulation-Vitrification

ในการศึกษานี้นำปลายยอด (2-3 มม) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมา preculture ในอาหารสูตร ½ MS เติมซูโครส 0.3 M เป็นเวลา 16 ชม. ก่อนเปรียบเทียบกับการไม่ preculture แล้วนำมาหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนต (Fluka 3%) ที่ประกอบด้วยสารละลาย LS (glycerol 2 M ร่วมกับ sucrose 0.4 M) หยดในสารละลาย $CaCl_2.2H_2O$ ที่ประกอบด้วยสารละลาย LS เป็นเวลา 30 นาที แล้วทรีตด้วยสารละลาย LS โดยวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชม. แล้วแช่ในสารละลาย PVS2 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำ bead ใส่ในหลอด cryo vial หลอดละ 20 bead ที่มีสารละลาย PVS2 ปริมาตร 4 มล. จุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชม. แล้ว warming ที่อุณหภูมิ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลาย PVS2 ออกแล้วเติมอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม sucrose 1.2 M เป็นเวลา 10 นาที จึงนำมาแกะเอาวุ้นออกและย้อมความมีชีวิตด้วยสารละลาย FDA พบว่า อัตรารอดชีวิตสูงถึง 95% ในขณะที่การไม่เตรียมตามขั้นตอนข้างต้นชิ้นส่วนไม่มีชีวิตรอดเลย อย่างไรก็ตามเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรเพิ่มปริมาณยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ไม่พบการสร้างยอดใหม่เกิดขึ้น (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ผลการเตรียมชิ้นส่วนหญ้าแฝกก่อนการเก็บด้วยวิธี 2 ขั้นตอน Encapsulation-Vitrification ต่ออัตราการรอดชีวิตและการสร้างยอดใหม่

Treatment	Viability (%)	Regrowth (%)
No preculture	0	0
Preculture	95	0

2.4.2 Encapsulation-dehydration

ในการศึกษานี้นำปลายยอด (2-3 มม) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมา preculture ในอาหารสูตร ½ MS เติมซูโครส 0.3 M เป็นเวลา 16 ชม. แล้วนำมาหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนต (Fluka 3%) ที่ประกอบด้วยสารละลาย LS (glycerol 2 M ร่วมกับ sucrose 0.4 M) หยดในสารละลาย $CaCl_2.2H_2O$ ที่ประกอบด้วยสารละลาย LS เป็นเวลา 30 นาที ซับด้วยกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อ แล้ววางในจานเพาะเลี้ยงภายในตู้ laminar flow เป็นระยะเวลาต่าง ๆ คือ 1, 2, 3, 4 และ 5 ชม. แล้วจึงนำ bead ใส่ในหลอด cryo vial หลอดละ 20 bead จุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา

1 ชม. แล้ว warming ที่อุณหภูมิ 40±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จึงนำมาแกะเอาวุ้นออก และย้อมความมีชีวิตด้วยสารละลาย FDA พบว่า การผึ่งแห้งต้นอ่อน/ยอดที่หุ้มด้วยวุ้นแอลจิเนต ทุกเวลาให้อัตรารอดชีวิต โดยเฉพาะระยะเวลาที่นานกว่า 1 นาที ส่งผลให้อัตรารอดชีวิต 100% อย่างไรก็ตามหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บนอาหารชักนำยอดรวมไม่สามารถชักนำการเจริญใหม่ได้ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ผลของการผึ่งแห้งต้นอ่อน/ยอดที่หุ้มด้วยวุ้นแอลจิเนตเป็นระยะเวลาต่างๆ ต่ออัตรารอดชีวิต และการเจริญใหม่บนอาหารชักนำยอดรวมหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Time (min)	Viability (%)	Regrowth (%)
1	61.11	0
2	95	0
3	100	0
4	100	0
5	100	0

3. การตรวจสอบความแปรปรวนจากการเพาะเลี้ยงและการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์

3.1 การตรวจสอบทางชีวเคมี

จากการนำใบของหญ้าแฝกในหลอดทดลองอายุ 2 เดือน มาตรวจสอบความแปรปรวนโดยเทคนิคไอโซไซม์ 2 ระบบคือ เอสเตอเรสและเปอร์ออกซิเดส พบว่า ทั้งสองระบบสามารถย้อมติดสีได้ชัดเจน (รูปที่ 9ก และ ข) โดยระบบเปอร์ออกซิเดสให้รูปแบบของไอโซไซม์ที่ชัดเจน และมีจำนวนแถบของไซโมแกรมที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 11)

จากการศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ โดยศึกษาจากจำนวนแถบสีและตำแหน่งของแถบสี พบว่าเอสเทอเรสให้แถบเอนไซม์มากที่สุดทั้งหมด 3 ตำแหน่ง (รูปที่ 9ก) เช่นเดียวกันกับออกซิเดสให้แถบเอนไซม์เท่ากับ 3 ตำแหน่ง (รูปที่ 9ข)

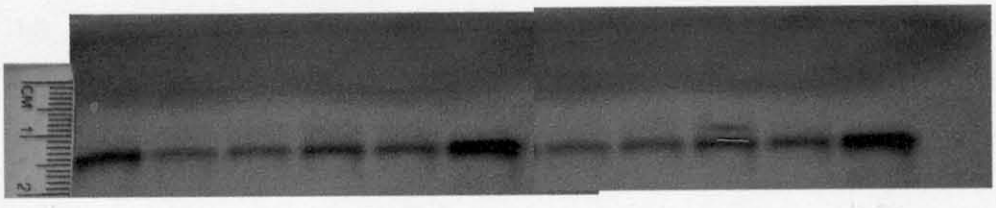
ตารางที่ 11 ผลของอัตราส่วนของชิ้นส่วนพืชต่อ Extraction buffer ต่อจำนวนโซนของไอโซไซม์ที่ย้อมด้วยระบบเอนไซม์ 2 ระบบ

ระบบเอนไซม์	สัดส่วนตัวอย่างพืช : extraction buffer	จำนวนแถบสี (ตำแหน่ง)	การติดสี
EST	1:5	1	+++
PER	1:5	3	+++

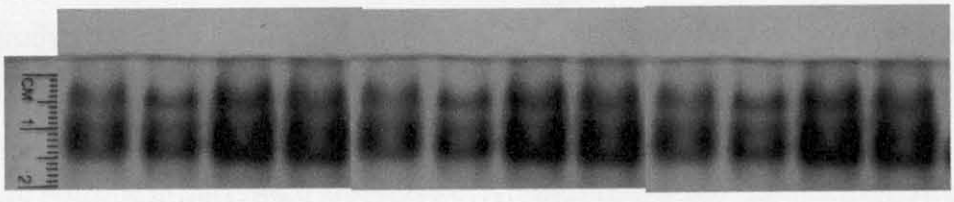
หมายเหตุ : PER : เปอร์ออกซิเดส EST : เอสเตอเรส

+++ : ติดสี และแยกแถบสีได้ชัดเจน ++ : ติดสี และแยกแถบสีได้ปานกลาง

+ : ติดสี ชัดเจนน้อย หรือเป็นปื้น - : ไม่ติดสี



ก

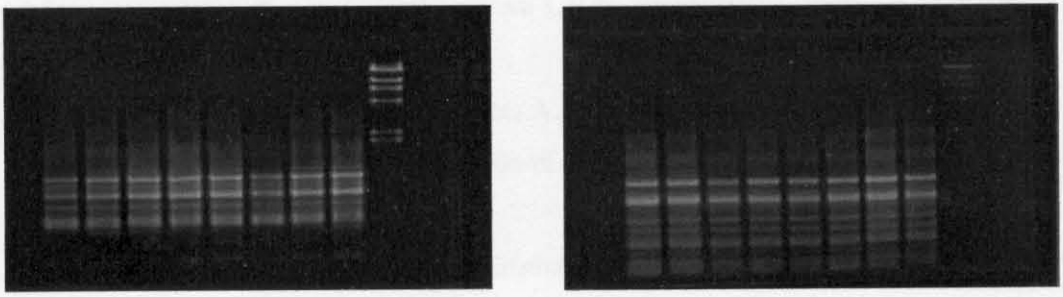


ข

รูปที่ 9 รูปแบบไอโซไซม์จากใบอ่อนของหญ้าแฝก ก) เอสเตอเรส และ ข) เปอร์ออกซิเดส ของใบอ่อนหญ้าแฝกในหลอดทดลอง

3.2 การตรวจสอบทางชีวโมเลกุล

จากการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปลายยอด และต้นอ่อนที่ผ่านการเก็บรักษามาเป็นระยะเวลาหนึ่ง (2 เดือน) นำไปเพิ่มปริมาณ และตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอดังกล่าว พบว่าในขั้นต้นด้วยไพรเมอร์ที่ทดสอบให้รูปแบบที่เหมือนต้นแม่เดิมที่ไม่ผ่านกระบวนการเก็บรักษา (รูปที่ 10)



ก ข

รูปที่ 10 รูปแบบดีเอ็นเอของต้นหญ้าแฝกที่เก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในระยะปานกลาง (ก) เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ OPB08 และระยะยาวในไนโตรเจนเหลว (ข) เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ OPB01

เนื่องจากตัวอย่างที่เก็บรักษานั้นอาจสั้นเพียง 2 เดือน ในขณะนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการเตรียมชิ้นส่วนเพื่อส่งเสริมการเก็บรักษาในไนโตรเจนเป็นเวลานานถึง 1 ปี จากนั้นจึงใช้ชิ้นส่วนพืชที่เก็บรักษาเป็นเวลา 1 ปี มาตรวจสอบอีกครั้ง นอกจากนี้จะใช้ไพรเมอร์ตัวอื่นที่มากขึ้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าผลลัพท์ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายหลังการเก็บรักษา