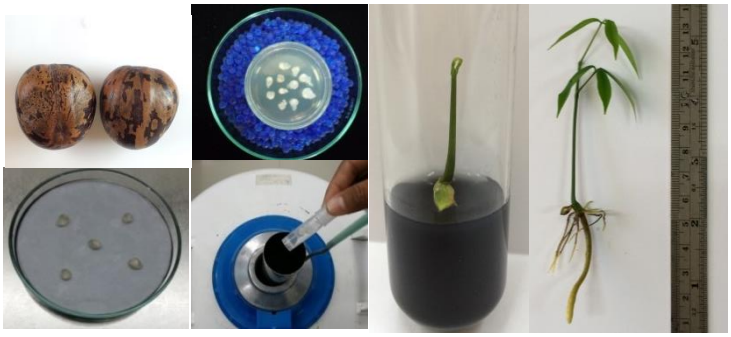
รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเอ็มบริโอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองในไนโตรเจนเหลว

Optimization of Cryopreservation Technique of Early Introduced Rubber Tree's Embryo



คณะนักวิจัย

ดร.กรกช นาคคนอง

รศ.ดร.จรัสศรี นวลศรี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเอ็มบริโอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองในไนโตรเจนเหลว

Optimization of Cryopreservation Technique of Early Introduced Rubber Tree's Embryo

คณะนักวิจัย
ดร.กรกช นาคคนอง
รศ.ดร.จรัสศรี นวลศรี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญสำหรับประเทศไทย เมล็ดยางพาราเป็นเมล็ดจำพวก recalcitrant จึงไม่สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน จึงได้ทำการศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอ็มบริโอยางพาราในไนโตรเจนเหลวเพื่อการอนุรักษ์ โดยเทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification, dehydration และ encapsulation-dehydration ผลจากการศึกษาพบว่า เอ็มบริโอของยางพาราที่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ โดยมีการทำ preculture เอ็มบริโอยางพาราในอาหาร MS ที่เติม sucrose ความเข้มข้น 0.3 M เป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำไปศึกษาด้วยเทคนิค cryopreservation

สำหรับเทคนิค vitrification ศึกษาระยะเวลาในการแช่ loading solution (0.8 M sucrose + 1M glycerol) และ plant vitrification solution (PVS2 และ PVS3) พบว่า อัตราการรอดชีวิตและการเจริญเป็นต้นใหม่สูงสุด ที่ 88.87% และ 66.33% ตามลำดับ สามารถทำได้โดยการแช่เอ็มบริโอใน loading solution เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำมาแช่ในสารละลาย PVS2 (30% (w/v) glycerol, 15% (w/v) ethylene glycol and 15% (w/v) dimethyl sulfoxide) เป็นเวลา 120 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แล้วจึงแช่ในไนโตรเจนเหลว 24 ชั่วโมง ละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ล้างชิ้นส่วนด้วย อาหารเหลว MS เติมซูโครส 1.2 M เป็นเวลา 20 นาที และวางเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 0.6-0.7 µM kinetin, 1.0 µM NAA, 1.4 µM GA and ผงถ่าน 4 g/l

ส่วนการทำ dehydration พบว่าการลดความชื้นด้วยการวางเอ็มบริโอที่ไม่หุ้ม alginate ภายใต้ laminar flow (air drying dehydration) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจน ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงที่สุด คือ 80.72% และ 69.72% ตามลำดับ ส่วนการลดความชื้นด้วยการวางเอ็มบริโอที่หุ้มด้วย alginate (encapsulation-dehydration) ภายใต้ laminar flow (air drying dehydration) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจน ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงที่สุด คือ 37.50% และ 27.98% ตามลำดับ โดยความชื้นของเอ็มบริโอจะถูกลดให้อยู่ในระดับประมาณ 15% ส่วนการลดความชื้นด้วย silica gel ไม่พบอัตราการรอดชีวิต

คำหลัก: ยางพารา, การเก็บรักษาพันธุ์พืชแบบแช่แข็ง, เมล็ดเทียม, encapsulation-dehydration, encapsulation-vitrification

Abstract

Rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is an important commercial crop, especially in Thailand. Rubber seeds are recalcitrant; therefore, they cannot be stored for long time. Cryopreservation technique of rubber tree embryo was studied as it could be used as a guideline for genetic conservation. Four methods of cryopreservation; vitrification, encapsulation-vitrification, dehydration and encapsulation-dehydration were studied. The results found that the cryopreserved embryonic axes were able to develop into the whole plants. The optimal conditions were precultured embryonic axes for 3 days in MS medium supplemented with 0.3 M sucrose before used for cryopreservation technique.

For vitrification, the effect of dehydration time in loading solution (0.8 M sucrose + 1M glycerol) and plant vitrification solutions (PVS2 and PVS3) were studied. The highest survival rate (88.87%) and regrowth (66.33%) were achieved when the precultured zygotic embryos were loaded with loading solution for 20 min and exposed to PVS2 which consisted of 30% (w/v) glycerol, 15% (w/v) ethylene glycol and 15% (w/v) dimethyl sulfoxide in MS liquid medium for 120 min at 0 ˚C. Then the embryonic axes were plunged into liquid nitrogen (LN) for 24 h. After thawing at about 40˚C for 2 min, embryonic axes were washed with MS liquid medium containing 1.2 M sucrose for 20 min and cultured on recovery medium (MS agar medium with 0.6-0.7 µM kinetin, 1.0 µM NAA, 1.4 µM GA and 4 g/l activated charcoal)

For dehydration, precultured zygotic embryos were dehydrated by sterile airflow in a laminar flow cabinet for 3 h. Survival rate and regrowth after freezing was 80.72% and 69.72%, respectively for naked zygotic embryos. The cryopreservation by encapsulation-dehydration method was successfully done by leaving encapsulated embryonic axes in a laminar flow for 4 h. before plunging into LN. The survival rate and regrowth of encapsulated zygotic embryos were 37.50% and 27.98%, respectively. Moisture content of naked embryonic axes was about 15%. However, embryonic axes dehydrated by silica gel did not survive at all.

Keywords: rubber tree, cryopreservation, encapsulation, encapsulation-dehydration, encapsulation-vitrification

สารบัญ

เรื่อง	**หน้า**
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
1. บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
2. การตรวจเอกสาร	3
3. วิธีดำเนินการวิจัย	14
4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	20
5. สรุปและข้อเสนอแนะ	38
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	46

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารละลาย vitrification	8
ตารางที่ 2 ผลของระยะเวลาในการแช่สาร loading solution และ PVS2 ต่ออัตราการรอดชีวิต และการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอยางพารา ที่ไม่หุ้มวุ้นอัลจิเนทหลังผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	24
ตารางที่ 3 ผลของระยะเวลาในการแช่สาร loading solution และ PVS3 ต่ออัตราการรอดชีวิต และการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอยางพารา ที่ไม่หุ้มวุ้นอัลจิเนทหลังผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	25
ตารางที่ 4 ผลของระยะเวลาในการแช่สาร loading solution และ PVS2 ต่ออัตราการรอดชีวิต และการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอยางพารา ที่หุ้มวุ้นอัลจิเนทหลังผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	29
ตารางที่ 5 ผลของระยะเวลาในการแช่สาร loading solution และ PVS3 ต่ออัตราการรอดชีวิต และการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอยางพารา ที่หุ้มวุ้นอัลจิเนทหลังผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	30
ตารางที่ 6 ผลของวิธีการลดความชื้นต่ออัตราการรอดชีวิตและการพัฒนาเป็นต้นใหม่ ของเอ็มบริโอยางพาราที่หุ้มวุ้นอัลจิเนท (encapsulation-dehydration) หลังผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	33
ตารางที่ 7 ผลของวิธีการลดความชื้นต่ออัตราการรอดชีวิตและการพัฒนาเป็นต้นใหม่ ของเอ็มบริโอยางพาราที่ไม่หุ้มวุ้นอัลจิเนท (dehydration) หลังผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	33

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 1 เมล็ดยางพารา และเอ็มบริโอยางพาราที่ใช้ในการทดลอง 15

ภาพที่ 2 การเตรียมเมล็ดเทียม (encapsulation) เอ็มบริโอยางพาราที่ใช้ในการทดลอง 16

ภาพที่ 3 ขั้นตอนการเก็บรักษาเอ็มบริโอยางพาราในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี vitrification และ encapsulation-vitrification 17

ภาพที่ 4 ขั้นตอนการเก็บรักษาเอ็มบริโอยางพาราในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี dehydration และ encapsulation-dehydration 19

ภาพที่ 5 ผลของระยะเวลาในการทำ preculture บนอาหารสูตร MS ที่เติม 0.3 M ต่ออัตราการรอดชีวิตและการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอยางพารา ที่ผ่านการลดความชื้นภายใต้ larminar flow เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และแช่ในไนโตรเจนเหลว 21

ภาพที่ 6 การพัฒนาของเอ็มบริโอยางพาราอายุ 4 สัปดาห์ ที่ผ่านการปรับสภาพโดยการทำ vitrification โดยแช่ใน loading solution เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นจึงแช่ในสารละลาย PVS2 ที่ 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที และแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 26

ภาพที่ 7 การพัฒนาของเอ็มบริโอยางพาราอายุ 4 สัปดาห์ ที่ผ่านการปรับสภาพโดยการทำ vitrification โดยแช่ใน loading solution เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นจึงแช่ในสารละลาย PVS3 ที่ 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที และแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 27

ภาพที่ 8 เอ็มบริโอยางพาราที่หุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนทอายุ 3 สัปดาห์ ที่ผ่านการปรับสภาพ โดยการทำ vitrification โดยแช่ใน loading solution เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นจึงแช่ในสารละลาย PVS2 (A) และ PVS3 (B) ที่ 120 นาที และแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 31

ภาพที่ 9 การพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอยางพาราที่หุ้มวุ้นอัลจิเนทและลดความชื้น ภายใต้ laminar air-flow เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 34

ภาพที่ 10 การพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอยางพาราที่ไม่หุ้มวุ้นอัลจิเนทที่ผ่านการทำ dehydration ในระยะเวลาที่ต่างกัน ได้แก่ A: 0 ชั่วโมง, B: 2 ชั่วโมง, C: 3 ชั่วโมง, D: 4 ชั่วโมง และ E: 5 ชั่วโมง 35

บทที่ 1
บทนำ

ยางพาราเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย ปัจจุบันไทยเป็นประเทศผู้ผลิตยางพารามากที่สุดในโลก รวมทั้งมีความสำคัญกับชีวิตความเป็นอยู่ของประชากรไทยในหลายจังหวัดที่ประกอบอาชีพการทำสวนยางพารา โดยทั่วไปการขยายพันธุ์ยางพาราทำได้โดยการนำต้นพันธุ์ดีมาติดตาบนต้นตอ ซึ่งต้นตอได้มาจากการนำเมล็ดยางพาราพันธุ์พื้นเมืองมาเพาะ เนื่องจากยางพันธุ์พื้นเมืองมีระบบรากที่แข็งแรง เจริญเติบโตได้ดี และที่สำคัญคือมีความสามารถทนทานต่อการเข้าทำลายของโรครากต่างๆได้ เนื่องจากในอดีตมีการส่งเสริมการปลูกยางพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูง เช่น พันธุ์ RRIM600 หรือ BPM24 ทดแทนยางพันธุ์พื้นเมืองที่ให้ผลผลิตน้อย ทำให้ยางพาราพันธุ์พื้นเมืองถูกโค่นทำลายไปเป็นจำนวนมาก ในปัจจุบันต้นตอที่ใช้ส่วนใหญ่จึงได้มาจากเมล็ดพันธุ์ดี คือ RRIM600 ซึ่งระบบรากมีความแข็งแรงน้อย และอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของโรครากหลายชนิด โดยเฉพาะโรครากขาวที่กำลังมีการระบาดรุนแรงในหลายจังหวัดทางภาคใต้ ได้แก่ ชุมพร, สุราษฎร์ธานี, ระนอง, นครศรีธรรมราช, สงขลา, กระบี่ และสตูล (อยุทธ์ และเสมอใจ, 2554) ดังนั้นการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์พื้นเมืองจึงมีความสำคัญ เพื่อใช้เป็นแหล่งของต้นตอในการปลูกสร้างสวนยางพารา หรือใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยต่อไป แต่เนื่องจากยางพาราพันธุ์พื้นเมืองให้ผลผลิตน้ำยางค่อนข้างต่ำ จึงถูกละเลยจากเกษตรกรส่วนใหญ่ การปลูกสร้างสวนยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่มีพื้นที่ขนาดใหญ่เพื่อใช้เป็นแหล่งผลิตต้นตอยางพาราที่เพียงพอต่อความต้องการจึงทำได้ยาก นอกจากนี้ปัญหาที่สำคัญในการเก็บรักษาเมล็ดยางพาราคือ เมล็ดยางพาราจะสูญเสียความงอกได้อย่างรวดเร็วภายใน 20 วันหลังจากร่วงจากต้น โดยเมล็ดยางพาราจะเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว เนื่องจากอาหารสะสมส่วนใหญ่ในเมล็ดยางพารามีองค์ประกอบจำพวกไขมัน นอกจากข้อจำกัดของการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ยางพาราดังกล่าวแล้ว ยังมีปัญหาในเรื่องการติดเมล็ดน้อยและไม่แน่นอน หรือในบางปีไม่สามารถติดเมล็ดได้ เนื่องจากอิทธิพลของสภาพอากาศที่แปรปรวนไปในปัจจุบัน การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในระยะยาว สามารถทำได้ทั้งในและนอกหลอดทดลอง ซึ่งการเก็บรักษาในสภาพนอกหลอดทดลองมีข้อจำกัดในเรื่องค่าใช้จ่าย การดูแลรักษา การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ และพื้นที่การเก็บรักษาต้องมีขนาดใหญ่ ดังนั้นการนำเทคนิคในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชด้วยการแช่เยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว หรือ Cryopreservation ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถทำการเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชได้ในระยะยาว ไม่มีข้อจำกัดในเรื่องดังกล่าว โดยจะต้องมีการเตรียมความพร้อมให้กับชิ้นส่วนพืชให้ทนทานต่อการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำประมาณ -196 องศาเซลเซียส ได้แก่ วิธีการปรับสภาพ (Preculture) การดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) หรือการใช้สารป้องกันความเย็นเพื่อปรับสภาพน้ำและออสโมติคของเซลล์ (Cryoprotectant หรือ Vitrification) และในปัจจุบันมีการใช้เทคนิคการห่อหุ้ม

ชิ้นส่วน (encapsulation) ที่จะเก็บรักษาในวุ้นอัลจิเนท เพื่อป้องกันอันตรายให้แก่เนื้อเยื่อพืชที่อยู่ภายใน โดยประยุกต์เทคนิคต่างๆ เข้าด้วยกัน ได้แก่ การรักษาพันธุ์พืชแบบแช่เยือกแข็ง โดยวิธีการหุ้ม และดึงน้ำออก (encapsulation-dehydration method) หรือ การเก็บรักษาพันธุ์พืชแบบแช่เยือกแข็ง โดยวิธีการหุ้ม และป้องกันไม่ให้เกิดผลึกน้ำแข็งด้วยสารเคมีบางชนิด (encapsulation-vitrification method) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชหลายชนิด แต่ยังต้องมีการศึกษาถึงวิธีการที่เหมาะสมในแต่ละพืช โดยเทคนิคทั้งสองประเภทยังไม่มีการศึกษาในยางพารา ดังนั้นการศึกษาถึงวิธีการที่เหมาะสม และปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมยางพาราพันธุ์พื้นเมืองด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง จึงอาจนำไปสู่การผลิตต้นกล้ายางพาราที่สามารถใช้เป็นต้นตอที่ดี เพื่อการปลูกสร้างสวนยางพาราอย่างยั่งยืน

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลในการเตรียมชิ้นส่วนพืชต่อการเก็บรักษาเอ็มบริโอยางพาราในไนโตรเจนเหลว

2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมยางพาราโดยเทคนิค dehydration, encapsulation-dehydration, vitrification และ encapsulation-vitrification

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกยางพารา ในปี 2556 ทั้งสิ้น ประมาณ 22.2 ล้านไร่ โดยผลผลิตยางพาราส่วนใหญ่อยู่ที่ภาคใต้ ซึ่งมีพื้นที่ปลูก 13.9 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 62.8 ของประเทศ และปัจจุบันมีการขยายพื้นที่การปลูกสู่ภูมิภาคอื่นๆ มากขึ้น โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ปลูก 4.4 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 19.8 ซึ่งเป็นอันดับ 2 ของประเทศ รองลงมาได้แก่ ภาคกลาง และภาคเหนือ มีพื้นที่ปลูก 2.6 และ 1.2 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 11.8 และ 5.5 ของประเทศ ตามลำดับ (สำนักพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, 2558)

ในอดีตการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ยางพาราจะให้ความสำคัญกับเรื่องของพันธุ์ดีที่จะนำมาติดตาบนต้นตอ ไม่ว่าจะเป็นการคัดเลือกพันธุ์ที่ให้ผลผลิตน้ำยางหรือเนื้อไม้สูง รวมไปถึงลักษณะอื่นๆ ที่เป็นเป้าหมายของนักปรับปรุงพันธุ์เช่น ต้านทานต่อการเข้าทำลายของโรคสำคัญของยางพารา การปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นต้น แต่ในระยะหลังที่ประเทศไทยมีนโยบายขยายพื้นที่ปลูกยางพารา จากเดิมที่ปลูกกันมากทางภาคใต้และสามจังหวัดในภาคตะวันออก ไปยังภูมิภาคอื่นๆ ของประเทศ เช่น ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวมทั้งการปลูกทดแทนสวนยางเก่าและขยายพื้นที่ในภาคใต้เอง เนื่องจากแรงจูงใจในเรื่องของราคายางที่ค่อนข้างสูง ทำให้ความต้องการวัสดุปลูกยางพาราซึ่งได้แก่ต้นตอตายาง หรือยางชำถุงสูงขึ้นอย่างมาก ในทางกลับกันต้นยางพันธุ์พื้นเมืองหรือพันธุ์ดั้งเดิมที่เคยใช้เป็นต้นตอค่อยๆ หายไปเพราะถูกโค่นเกือบหมด เหลืออยู่บ้างเฉพาะในบางพื้นที่เท่านั้น ประโยชน์ที่ชัดเจนของการใช้ยางพื้นเมืองเป็นต้นตอเนื่องจากพันธุ์เหล่านั้นเป็นพันธุ์ผสมเปิด มีฐานพันธุกรรมกว้าง ระบบรากมีความแข็งแรง ทนทานต่อโรครากได้ดี ในปัจจุบันคาดกันว่ายางที่ปลูกในประเทศไทยขณะนี้ ประมาณ 75 % เป็นพันธุ์ RRIM600 ที่เหลือเป็นพันธุ์ดีชนิดอื่นเช่น RRIT251 BPM24 และGT1 เป็นต้น ดังนั้นต้นตอส่วนใหญ่ในปัจจุบันจึงได้มาจากเมล็ดของต้นยางพันธุ์ดีคือ RRIM600 ทำให้เกิดปัญหาเนื่องจากระบบรากของยางพันธุ์ดีจะมีความแข็งแรงน้อยกว่าพันธุ์พื้นเมืองมาก (จรัสศรี และคณะ, 2557) มักมีปัญหาเมื่อปลูกในสภาพดินที่มีธาตุอาหารต่ำ และในอนาคตสิ่งที่ควรระมัดระวังเป็นอย่างยิ่งคือ หากเกิดมีการระบาดของโรคราก ต้นตอพันธุ์ดีทั้งหมดอาจถูกทำลายได้เนื่องจากมีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน เพราะจากการศึกษาเกี่ยวกับการเข้าทำลายของโรคราก เช่น โรครากขาว (white root rot disease) พบว่าไม่มียางพันธุ์ดีหรือพันธุ์แนะนำใดที่ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์ RRIM600 มีความอ่อนแอมาก ซึ่งจะเกิดผลเสียหายร้ายแรงสำหรับการปลูกยางในประเทศ ในหลายปีที่ผ่านมา สวนยางเริ่มได้รับความเสียหายจากโรครากขาวมากขึ้น จากการศึกษาของอยุทธ์ และ

เสมอใจ (2554) ที่ประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจของชาวสวนยางในภาคใต้ เนื่องจากการเข้าทำลายของโรครากขาว พบการระบาดของโรคในสวนยางทุกจังหวัด จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นทำให้เราต้องหันมาให้ความสำคัญกับยางพาราพันธุ์พื้นเมืองหรือพันธุ์ใดๆ ที่มีความเหมาะสมสำหรับเป็นต้นตอที่ดี เพื่อให้การปลูกสร้างสวนยางเป็นไปอย่างยั่งยืน แต่เนื่องจากการปลูกสร้างสวนยางพันธุ์พื้นเมืองขนาดใหญ่เพื่อผลิตเมล็ดสำหรับใช้ผลิตต้นตอเป็นไปได้ยาก เนื่องจากไม่มีแรงจูงใจในเรื่องของผลตอบแทน และการเก็บรักษาเมล็ดยางพาราในระยะยาวไม่สามารถทำได้ การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในไนโตรเจนเหลวจึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมยางพันธุ์พื้นเมืองเพื่อการใช้ประโยชน์ในอนาคต

การเก็บรักษาพันธุ์หรือสายพันธุ์พืช มีความสำคัญต่องานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชและการวิจัยอื่นๆ เป็นอย่างมาก ซึ่งส่วนใหญ่จะทำการเก็บรักษาด้วยเมล็ด โดยทั่วไปเมล็ดพันธุ์พืชจะเก็บรักษาในสภาพที่มีอุณหภูมิและความชื้นต่ำ เพื่อที่จะชะลอการเสื่อมสภาพของเมล็ดพันธุ์พืช โดยเมล็ดพันธุ์พืชต่างชนิดกันมีอัตราการเสื่อมสภาพที่แตกต่างกัน เนื่องจากเมล็ดพันธุ์มีลักษณะทางสัญฐานวิทยาและการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดที่แตกต่างกัน จึงส่งผลให้อายุการเก็บรักษาแตกต่างกันด้วย โดยเมล็ดพันธุ์พืชบางชนิดมีการเสื่อมสภาพช้า จึงมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน ส่วนเมล็ดพันธุ์พืชบางชนิดมีการเสื่อมสภาพของเมล็ดเร็วกว่า ส่งผลให้ระยะเวลาการเก็บรักษาสั้นลงด้วย เมล็ดพันธุ์พืชจะมีอัตราการเสื่อมสภาพต่างกัน เนื่องจากพฤติกรรมการตอบสนองของเมล็ดพันธุ์ต่อการลดความชื้นและอุณหภูมิ ซึ่งโดยทั่วไปสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ 1) เมล็ดพันธุ์กลุ่มออร์โธดอกซ์ (orthodox) เป็นพวกที่ทนต่อสภาพความชื้นต่ำได้ อาจจะถึง 4 % และสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำถึง -20 องศาเซลเซียส โดยเมล็ดพันธุ์ในกลุ่มนี้จะมีอายุการเก็บรักษาหลายเดือนจนถึงหลายปี และ 2) เมล็ดพันธุ์รีคัลซิแตรนท์ (recalcitrant) เป็นเมล็ดที่มีการสูญเสียความมีชีวิตง่ายเมื่อความชื้นต่ำลง และความชื้นวิกฤติที่ทำให้เมล็ดพันธุ์ตายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช ซึ่งอยู่ในช่วง 12-31% เมล็ดพันธุ์พืชในกลุ่มนี้จะไม่ทนทานต่ออุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง ทำให้เมล็ดพันธุ์ในกลุ่มนี้มีอายุการเก็บรักษาสั้น ซึ่งเมล็ดยางพาราจัดอยู่ในเมล็ดพันธุ์แบบรีคัลซิแตรนท์ นอกจากนี้อาหารเลี้ยงต้นอ่อน ส่วนใหญ่ในเมล็ดยางพารามีไขมันเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลทำให้เกิดการเสื่อมสภาพได้เร็วขึ้น เพราะโดยทั่วไปแล้วเมล็ดพันธุ์ที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบหลักจะเสื่อมสภาพเร็วกว่าพวกที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก เนื่องจากเมื่อเกิดการย่อยสลายไขมันที่เก็บสะสมโดยเอนไซม์ในเมล็ดแล้ว จะทำให้เกิดกรดไขมันอิสระ กรดไขมันอิสระที่เพิ่มขึ้นจะเป็นพิษต่อเซลล์ โดยไปมีผลต่อการงอก ทำให้การงอกของเมล็ดพันธุ์ลดลงด้วย โดยพบว่าเมล็ดยางพาราที่หล่นจากต้นจะเสื่อมความงอกอย่างรวดเร็ว โดยมีความมีชีวิตประมาณ 20 วันเท่านั้น (อุดม, 2541)

นอกจากข้อจำกัดของการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ยางพาราดังกล่าวแล้ว ยังมีปัญหาในเรื่องการติดเมล็ดน้อยและไม่แน่นอน หรือในบางปีไม่สามารถติดเมล็ดได้ เนื่องจากอิทธิพลของสภาพอากาศที่แปรปรวนไปในปัจจุบัน ซึ่งข้อจำกัดดังกล่าวเป็นปัญหาสำคัญในการทำการศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพยางพันธุ์พื้นเมืองที่มีระบบรากที่แข็งแรงและสามารถทนทานต่อโรครา เพื่อนำมาใช้เป็นต้นตอที่ดี เนื่องจากในการทดลองจะต้องทำการเก็บรวบรวมเมล็ดยางพาราพันธุ์พื้นเมืองจากหลายแหล่งมาเปรียบเทียบกัน เมื่อมีการติดผลที่ไม่พร้อมกันของยางพาราพันธุ์พื้นเมืองในพื้นที่ต่างๆ จึงเป็นการยากที่จะทำการเปรียบเทียบยางพาราพันธุ์ต่างๆ ในเวลาเดียวกันได้ เนื่องจากเมื่อเก็บเมล็ดยางพารามาแล้ว ก็จะต้องทำการเพาะเมล็ดทันที เพราะเมล็ดยางจะสูญเสียความงอกอย่างรวดเร็ว ด้วยเหตุนี้วิธีการเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เพื่อลดข้อจำกัดของวิธีการใช้เมล็ดในการเก็บรักษาพันธุ์ยางพารา โดยสามารถเก็บรักษาได้ในหลายลักษณะของชิ้นส่วนพืช ไม่ว่าจะเป็นยอด, คัพภะ หรือแคลลัส และสามารถคงความมีชีวิตได้ในระยะเวลายาวนาน โดยเก็บตัวอย่างพืชด้วยเทคนิค cryopreservation คือเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำประมาณ -79 ถึง -196 องศาเซลเซียส (ทัศนี, 2555) เมื่อต้องการนำเนื้อเยื่อมาใช้ ก็ละลายผลึกน้ำแข็งโดยแช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงชักนำให้เนื้อเยื่อพัฒนา และเจริญเติบโตดังเดิม การเก็บในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยม เพราะช่วยแก้ปัญหาในเรื่องแรงงาน พื้นที่ ค่าใช้จ่าย และเวลาที่ใช้ในการเก็บตลอดจนลดปัญหาความเสี่ยงต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การเก็บโดยวิธีนี้เป็นการเก็บที่อาศัยหลักการหยุดกระบวนการทางชีวเคมีต่างๆ ภายในเซลล์ของพืช โดยอาศัยขั้นตอนต่างๆ ในการทำให้เซลล์สามารถทนทานต่อการเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำมากๆ และสามารถนำมาชักนำให้ต้นพืชกลับมามีชีวิตได้ภายหลัง

1. การเก็บรักษาพันธุ์พืชในไนโตรเจนเหลว

การเก็บรักษาพืชในไนโตรเจนเหลว หรือ cryopreservation เป็นเทคนิคการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชในระยะยาวสำหรับอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมของพืช สามารถแก้ไขปัญหาพืชบางชนิด ที่ไม่สามารถเก็บรักษาในรูปของเมล็ด (vegetative-propagated species) ในพืชที่มีเมล็ดแบบ recalcitrant และพืชที่ใกล้สูญพันธุ์ (Engelmann, 2000) โดยการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชในไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิประมาณ -196 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมินี้เซลล์จะหยุดการเจริญเติบโต (Bhojwani and Razdan, 1996) ซึ่งการเก็บรักษาพันธุ์พืชแบบแช่แข็งเป็นวิธีที่หยุดกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ของพืช เมแทบอลิซึมภายในเซลล์จะหยุดนิ่ง ทำให้สามารถขยายเวลาในการเก็บรักษาไว้ (Kartha, 1985) ในทางทฤษฎีนั้นเนื้อเยื่อของพืชจะคงสภาพนั้นไปตลอดกาล และเมื่อนำออกสู่สภาวะปกติเซลล์ต่างๆ จะยังคงมีชีวิต สามารถแบ่งเซลล์มีการเจริญเติบโตและมีการพัฒนาเป็น

ต้นพืชได้ตามปกติ (อารีย์, 2541) การเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งนี้ หลีกเลี่ยงไม่ได้ที่จะเกิดอันตรายจากการขยายตัวของผลึกน้ำแข็ง และจะเป็นสาเหตุการตายของเนื้อเยื่อ ถ้าเกิดขึ้นภายใน (Wolfe and Bryant, 1999) ระหว่างการทำให้เย็นอย่างรวดเร็วในไนโตรเจนเหลว ซึ่งการทำให้เกิดสภาพ vitrification เป็นกระบวนการทางกายภาพ ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการเกิดผลึกน้ำแข็ง โดยการเปลี่ยนแปลงของสารละลายจากสภาพที่เป็นของเหลวให้เป็นของแข็งที่มีสภาพคล้ายกระจกขุ่น หรือกระจกใสในช่วงอุณหภูมิประมาณ -110 องศาเซลเซียส รวมถึงมีการดึงน้ำออกจากเซลล์ ซึ่งมีผลให้ความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้น และค่าความเป็นกรดด่างเปลี่ยนแปลงไป เป็นการป้องกันการเสื่อมของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้คาดว่าจะมีความดันน้ำต่ำกว่าผลึกที่เป็นน้ำแข็ง เป็นการป้องกันการเสียน้ำ และเนื่องจากภายในเซลล์มีความหนืดสูง มีผลในการหยุดปฏิกิริยาเคมีที่ต้องการการเคลื่อนย้ายของโมเลกุล ทำให้เกิดสภาพพักตัวและมีเสถียรภาพเป็นเวลานาน (Sakai, 2000)

2. ขั้นตอนการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในไนโตรเจนเหลว

ความสำเร็จในการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชในไนโตรเจนเหลวจำเป็นต้องมีขั้นตอนการเตรียมชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม เนื่องจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวใช้อุณหภูมิที่ต่ำมาก ซึ่งอาจส่งผลทำให้เซลล์พืชได้รับความเสียหาย และอาจตายในที่สุด เนื่องจากการเกิดผลึกน้ำแข็งทั้งภายในและภายนอกเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่จะนำไปสู่การเกิดสารพิษจำพวกสารอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายกับเซลล์ ทั้งนี้สถานะของน้ำและความสมดุลของออสโมติกคัม สัมพันธ์กับการเคลื่อนที่ของน้ำเข้าออกเซลล์เป็นตัวแปรสำคัญ ดังนั้นการพัฒนาวิธีต่างๆ มาใช้เพื่อปรับสภาพเซลล์ให้มีปริมาณน้ำที่เหมาะสม และสามารถทนต่อสภาพเย็นได้ (สุพัตร, 2550) โดยเซลล์สามารถมีชีวิตรอดและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ โดยต้องคำนึงถึงความแตกต่างในเรื่องชิ้นส่วนและชนิดพืชที่ต้องการเก็บรักษา โดยทั่วไปประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1) การปรับสภาพก่อนการให้ความเย็น (pre-cool conditions) เนื้อเยื่อพืชที่จะนำมาเก็บรักษา โดยวิธีนี้จะต้องนำมาผ่านกระบวนการพิเศษบางอย่าง หรือเรียกได้อีกอย่างว่าพรีโกรต (pregrowth) แม้ขั้นตอนนี้ไม่เกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการแช่แข็ง แต่การปรับสภาพของเซลล์หรือเนื้อเยื่อให้เหมาะสมสามารถช่วยเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์ หลังผ่านกระบวนการแช่แข็งแล้วได้ดีขึ้น ขั้นตอนนี้อาจเป็นการเติมสารเคมีบางชนิดให้แก่เซลล์เพื่อให้ทนทานต่อสภาวะเครียดต่างๆ (อารีย์, 2541) ได้แก่ การเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารเคมีบางชนิด เช่น การวางเลี้ยงในหรือบนอาหารที่มีการเติมน้ำตาล (ซูโครส กลูโคส) หรือน้ำตาลแอลกอฮอล์ (แมนิทอล ซอร์บิทอล) ที่มีความเข้มข้นสูง เนื่องจากน้ำตาลความเข้มข้นสูงส่งผลต่อแรงดันออสโมติก ทำให้ปริมาณน้ำในเซลล์พืชลดลง โดยน้ำตาลที่นิยมมากที่สุด คือ ซูโครส โดยความเข้มข้นและระยะเวลาในการปรับสภาพที่

เหมาะสมนั้น แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดพืช ขนาดชิ้นส่วน และพันธุกรรมพืชด้วย เช่นการศึกษาผลของการทำ preculture ชิ้นส่วนปลายยอดสตรอเบอรี่ โดยการวางเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 M เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า การวางเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.25 M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วยการทำ droplet-vitrification ให้อัตราการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงที่สุด (Pinker *et al.*, 2009) ส่วนการทำ preculture ชิ้นส่วนปลายยอดส้ม โดยการวางเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.1 M เป็นเวลา 3 วัน ตามด้วยการทำ vitrification ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด (Cho *et al.*, 2001) หรือปลายยอดมันสำปะหลัง โดยการวางเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.3 M เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตามด้วยการทำ encapsulation-vitrification ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด (Charoensub *et al.*, 2004) นอกจากนี้อาจใช้การเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิที่ต่ำกว่าปกติ เพื่อกระตุ้นเนื้อเยื่อให้มีการปรับตัว สามารถทนต่อสภาพการเย็นจนแข็งตัวในขณะการเก็บรักษา (แสงจันทร์, 2547)

2) การใช้สารป้องกันอันตรายจากการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotectant) เป็นวิธีการที่ทำให้เนื้อเยื่อมีความต้านทานต่อสภาวะเยือกแข็งมากยิ่งขึ้น โดยใช้สารป้องกันอันตรายจากความเย็นจัดจนเกิดผลึกน้ำแข็ง (แสงจันทร์, 2547) ก่อนการเก็บรักษาในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำมากๆอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จะต้องเติมสารพวก cryoprotectant ลงในอาหารที่เพาะเลี้ยงเพื่อให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อปรับสภาพ permeability และจุดเยือกแข็ง ซึ่งจะทำให้ทนทานต่อการแข็งตัว และการละลายตัว หลังการเก็บรักษาได้โดยไม่มีผลกระทบต่อการพัฒนาของเซลล์หรือเนื้อเยื่อ (รังสฤษฏ์, 2541) ซึ่งสารป้องกันความเย็นสามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือสารเคมีประเภทออกฤทธิ์ภายในเซลล์ สารกลุ่มนี้สามารถซึมผ่านเข้าภายในเซลล์ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายในระหว่างการแช่แข็งและการละลาย ได้แก่ glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO) และแอลกอฮอล์หลายชนิด เช่น methanol ethanol propanediol เป็นต้น ซึ่งสารประเภทนี้จะป้องกันอันตรายได้ดี เมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นค่อนข้างสูง (1-4 M) โดยที่แอลกอฮอล์มีอัตราการแพร่เข้าสู่เซลล์สูงสุด รองลงมาคือ DMSO และ glycerol ซึ่งสารประเภทนี้จะมีพิษต่อเซลล์ สารป้องกันความเย็นอีกประเภท คือสารเคมีประเภทออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ จะให้ผลได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำ (0.01-0.2 M) และเป็นพิษน้อยกว่า ได้แก่ polyvinylpyrrolidon (PVP) และน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น sucrose, glucose และ mannitol เป็นต้น

สารป้องกันความเย็นมีประสิทธิภาพสูงมากในการหลีกเลี่ยงการเกิดน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งสาร vitrification เป็นสารป้องกันความเย็นที่มีประสิทธิภาพในการรักษาชิ้นส่วนพืชในระหว่างการแช่แข็งแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารละลาย vitrification

สารละลาย	ส่วนประกอบ	อ้างอิง
PVS1	22% glycerol+15% EG+15% PEG+ 7% DMSO+0.5 M sorbitol	Uragami และคณะ (1990)
PVS2	30% glycerol + 15% DMSO + 15% EG + 13.7% sucrose	Sakai และคณะ (1990)
PVS3	50% glycerol + 50% sucrose	Nishizawa และคณะ (1993)
PVS4	35% glycerol + 20% EG + 20.5% sucrose	Sakai และคณะ (2000)

ที่มา: กำไล (2554)

หมายเหตุ: ethylene glycol (EG), polyethylene glycol (PEG), dimethyl sulfoxide (DMSO)

3) การทำให้เนื้อเยื่อแข็งตัวอย่างช้าๆ (slow freezing) เมื่ออุณหภูมิของการเก็บรักษาลดต่ำลงกว่า 0 องศาเซลเซียส จนถึงประมาณ -100 องศาเซลเซียส จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากเกิดเป็นผลึกน้ำแข็งทั้งภายในและภายนอกเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไซโตพลาสซึมภายในเซลล์จะแข็งตัวและเพิ่มปริมาตรขึ้น ดังนั้น การลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ เป็นการช่วยไม่ให้เซลล์ได้รับอันตรายจากการเกิดผลึกน้ำแข็ง ขณะเดียวกันก็ช่วยดึงน้ำออกจากเซลล์ไปในตัว ในกรณีที่มีการแข็งตัวอย่างรวดเร็วจะทำให้สูญเสียน้ำออกมาได้น้อย เมื่อเกิดผลึกน้ำแข็งและมีปริมาตรเพิ่มขึ้นจะทำให้เซลล์ได้รับความเสียหาย อย่างไรก็ตามถ้าเซลล์สูญเสียน้ำมากเกินไปอาจเกิดความเสียหายได้เช่นกัน ดังนั้นอัตราการอยู่รอดของเซลล์จึงขึ้นกับสมดุลระหว่างอัตราการลดลงของอุณหภูมิอย่างช้าๆ กับอัตราการสูญเสียน้ำออกไปจากเซลล์ด้วย และอัตราการอยู่รอดดังกล่าวนี้ขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อที่เก็บรักษา (รังสฤษฏ์, 2540)

4) การเก็บรักษาไว้ในที่เย็นจัด (freeze storage) หลังจากทำให้เซลล์แข็งตัวอย่างช้าๆ แล้วต้องย้ายไปเก็บไว้ที่เย็นจัด (ต่ำกว่า -100 องศาเซลเซียส) เพื่อป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์อีกครั้งหนึ่ง ในทางปฏิบัติเพื่อความสะดวกจึงนิยมเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวที่ -196 องศาเซลเซียส หรือในไอของไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapour) ที่ -150 องศาเซลเซียส (รังสฤษฏ์, 2540)

5) การละลายผลึกน้ำแข็ง (thawing) เมื่อต้องการนำเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวมาใช้ ต้องนำเนื้อเยื่อที่เก็บแช่แข็งมาละลาย ซึ่งปกติทำโดยการจุ่มภาชนะเก็บ ลงในน้ำสะอาดปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำเนื้อเยื่อไปเลี้ยงบนอาหารปกติต่อไป สำหรับเนื้อเยื่อ

ที่เก็บแช่แข็งโดยการ encapsulation ก็เพียงนำออกวางในอุณหภูมิห้องธรรมดา เมื่อน้ำแข็งละลายหมด ก็นำเนื้อเยื่อไปเลี้ยงในอาหารปกติและชักนำให้เกิดต้นต่อไป (อารีย์, 2541)

6) การทำให้เนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตได้อีก (recovery) เนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอนต่างๆ ข้างต้นมาแล้ว อาจมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเซลล์และมักจะอ่อนแออย่างยิ่งต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นตามมา จึงต้องปรับสภาพการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้องการอาหารเพาะเลี้ยงพิเศษที่แตกต่างจากสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงก่อนเก็บรักษา (รังสฤษฎ์, 2540) ความมีชีวิตของเนื้อเยื่อหลังการแช่แข็ง เป็นข้อบ่งชี้ถึงความสำเร็จของวิธีการ ดังนั้นการวัดความมีชีวิต (viability) จึงเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก ซึ่งสามารถทำได้โดยการย้อมสีด้วย FDA (fluorescein diacetate) เซลล์พืชมีเอนไซม์ esterase จะย่อยโมเลกุลของ FDA แล้วให้สารเรืองแสงสีเขียวเมื่อดูด้วยกล้อง UV (อารีย์, 2541)

3. การพัฒนาเทคนิค cryopreservation

การพัฒนาเทคนิค cryopreservation สมัยก่อนจะอาศัยความเย็น เพื่อชักนำให้เกิดการดึงน้ำออกจากเซลล์ แต่เทคนิคสมัยใหม่จะเน้นการเกิดสภาพ vitrification (Engelmann, 2000) วิธีการนี้เกี่ยวข้องกับการแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลายของสารป้องกันผลึก (cryoprotectant) ที่มีความเข้มข้นสูง ป้องกันการทำลายของเนื้อเยื่อ เนื่องจากผลึกน้ำทั้งที่เกิดในเซลล์ (intracellular crystallization) และนอกเซลล์ (extracellular crystallization) ซึ่งการเกิด vitrification จะมีลักษณะคล้ายกระจก ไม่เกิดผลึกน้ำแข็งที่จุดเยือกแข็งของน้ำ (freezing point) (Bajaj, 1995)แต่พบว่าสารละลายที่ใช้จะมีอันตรายต่อพืช และระยะเวลาที่แช่มีความสำคัญต่อการฟื้นคืนสภาพของพืช (Reed *et al.*, 2000) ส่วนวิธี encapsulation-dehydration มีการพัฒนาขึ้นโดย Fabre and Dereuddre (1990) เป็นวิธีการที่ประยุกต์มาจากการผลิตเมล็ดเทียม (artificial seed) นำชิ้นส่วนพืชมาหุ้มใน alginate bead แล้วเตรียมสภาพเนื้อเยื่อในสารละลายที่มีซูโครส ประมาณ 1 ถึง 7 วัน จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยการเป่าลมด้วย lamina flow หรือใช้ซิลิกาเจลให้น้ำลดลงเหลือประมาณ 20% ของน้ำหนักสด แล้วทำการแช่ไนโตรเจนเหลว (Engelmann, 2000) โดยชิ้นส่วนที่ถูกหุ้มด้วย alginate bead จะช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำออกไป และง่ายต่อการหยิบจับขณะเคลื่อนย้าย (Takagi, 2000) อย่างไรก็ตามก็พบว่าจะมีอัตราการรอดต่ำกว่าวิธี vitrification (Matsumoto *et al.*, 1995) ซึ่งทำให้เกิดการพัฒนาวิธี encapsulation-vitrification เป็นวิธีการผสมผสานระหว่างวิธี vitrification และ encapsulation โดยชิ้นส่วนพืชนำมาหุ้มด้วย alginate bead แล้วดึงน้ำออกโดยแช่สารละลาย cryoprotectant เหมือนวิธี vitrification (Engelmann, 2000) โดย alginate bead

จะมีส่วนในการป้องกันการสูญเสียน้ำ และป้องกันออสโมติก เมื่อแช่ในสารละลายของ vitrification (Hirai and Sakai, 2000)

ข้อดี การเก็บรักษาแบบแช่แข็ง คือ ใช้พื้นที่น้อย รวมทั้งเก็บรักษาได้เป็นเวลานาน (ในทางทฤษฎีเก็บไว้โดยไม่จำกัดเวลา) และเนื้อเยื่ออยู่ในสภาพที่ถูกยับยั้งการเจริญ จึงเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมได้ต่ำ ข้อเสีย คือ ต้องใช้อุปกรณ์ในการลดอุณหภูมิ เนื้อเยื่อต้องมีการเริ่มเจริญใหม่ ก่อนการขยายพันธุ์ นอกจากนี้ยังใช้กับเนื้อเยื่อที่มีการจัดเรียงโครงสร้างของเซลล์ที่แน่นอนแล้วไม่ค่อยได้ผล และยังต้องมีการพัฒนาวิธีการที่ใช้เฉพาะสำหรับแต่ละพืช (สมยศ, 2541)

3.1 การรักษาพันธุ์พืชแบบเก็บแช่แข็งโดยวิธี dehydration

การเก็บรักษาด้วยวิธีการนี้เป็นการลดปริมาณน้ำในเซลล์ เพื่อการป้องกันไม่ให้น้ำในเซลล์ของเนื้อเยื่อพืชนั้นเกิดการแข็งตัวในขณะที่ทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวางชิ้นส่วนพืชในตู้ย้ายเลี้ยง และเป่าด้วยลมความเร็ว 80-90 ฟุตต่อนาที หรือวางในโถปรับความชื้น (desiccator) ที่บรรจุซิลิกาเจล ที่ระยะเวลาที่เหมาะสม โดยต้องคำนึงถึงปริมาณน้ำที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อพืช หากเนื้อเยื่อสูญเสียน้ำมากเกินไป อาจส่งผลต่อการรอดชีวิต และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่หลังจากการเก็บรักษา ดังนั้นจึงต้องพิจารณาทั้งชนิดของพืช ขนาดของชิ้นส่วนของพืชก่อนที่จะนำมาทำการทดลอง (อารีย์, 2541) เช่น การเก็บรักษาเอ็มบริโอ *Handroanthus serratifolius* โดยการวางชิ้นส่วนพืชในตู้ย้ายเลี้ยง เป็นเวลา 0-300 นาที หลังจากแช่ในไนโตรเจนแล้ว พบว่า ช่วงเวลาในการลดความชื้นเป็นปัจจัยสำคัญต่ออัตราการรอดชีวิต โดยจะต้องลดความชื้นให้อยู่ในระดับ 10% ก่อนที่จะทำการเก็บรักษาไนไนโตรเจนเหลว (Souza *et al.*, 2014)

3.2 การรักษาพันธุ์พืชแบบเก็บแช่แข็งโดยวิธี vitrification

เป็นเทคนิคการปรับปริมาณน้ำโดยใช้สารเคมี และสารละลายที่ปกป้องเนื้อเยื่อจากความเย็นในขณะแช่ไนโตรเจนเหลว เพื่อป้องกันอันตรายจากความเย็นจนเกิดผลึกน้ำแข็ง (แสงจันทร์, 2547) โดยสารละลายที่ใช้มีผลในการดึงน้ำออกจากเซลล์ ซึ่งจะช่วยลดความเสียหายที่เกิดขึ้นจาก osmotic stress ซึ่งเป็นผลทำให้เกิด chemical toxicity (นวลทิพย์ และคณะ, 2553) ซึ่งสารเคมีที่ใช้นี้มีทั้งที่สามารถซึมผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์หรืออาจห่อหุ้มอยู่ภายนอก สารเคมีที่ใช้เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำในเซลล์ตกผลึกแข็งตัวจะมีความเข้มข้นสูง จึงป้องกันไม่ให้เกิดการแข็งตัวของน้ำในเซลล์ เซลล์จึงไม่ได้รับความเสียหาย (อารีย์, 2541) สารที่ใช้ป้องกันอันตรายจากการเกิดผลึกน้ำแข็งมีหลายชนิด เช่น ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ซูโครส กลูโครส เอทิลีนไกลคอล โพลีเอทิลีนไกลคอล กลีเซอรอล โพรลีน และสารประกอบไฮครอกไซลิกบางชนิด เป็นต้น ส่วนการใช้สารเคมีนั้นจะแตกต่างกันไปตามแต่ละสูตร เช่น สารละลาย PVS2 จะประกอบไปด้วย กลีเซอรอล (glycerol) 30% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์

(DMSO) 15% เอทิลีนไกลคอล (ethylene glycol) 15% และ PVS3 ซึ่งประกอบด้วย กลีเซอรอล 50% และ ซูโครส 50% เช่น ในการเก็บรักษาเมล็ดของกล้วยไม้ดินพันธุ์ *Bletilla striata* Rchb.f. โดยนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร New Dogashima (ND) เป็นระยะเวลา 10 วัน หลังจากนั้นทำการเตรียมเนื้อเยื่อโดยการเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ที่มีน้ำตาลซูโครส 0.3 M ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นเติมสารกลีเซอรอล 2 M และซูโครส 0.4 M (loading solution) เป็นระยะเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลาย PVS2 ความเข้มข้นสูง เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลว 30 นาที และนำเอ็มบริโอมาทำการละลายอย่างรวดเร็ว นำมาล้างด้วยอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร ND ร่วมกับซูโครส 0.2 M (unloading solution) เป็นระยะเวลา 20 นาที แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ND พบว่าการพัฒนาของเอ็มบริโอไปเป็นต้นปกติ โดยมีอัตราส่วนการรอดชีวิต 60% (Ishikawa *et al.*, 1997) หรือในการเก็บรักษาเซลล์ของกล้วยไม้พันธุ์ Doritaenpsis cv. New Toyohashi โดยทำการเตรียมเซลล์ในอาหารสูตร ND ที่มีซูโครส 0.1 M และ abscisic acid (ABA) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติมสารที่มีส่วนประกอบของ กลีเซอรอล 2 M และซูโครส 4 M เป็นระยะเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และทำการเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 1-3 ชั่วโมง (Tsukazaki *et al.*, 2000)

3.3 การรักษาพันธุ์พืชแบบเก็บแช่แข็งโดยวิธี encapsulation-dehydration

การเก็บโดยวิธีการนี้ทำโดยการนำเมล็ดเทียมที่ได้จากการเคลือบชิ้นส่วนของพืชด้วยสารอัลจิเนท จากนั้นนำไปทำให้สูญเสียน้ำด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การใช้สารซิลลิกาเจล การใช้น้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นสูง ก่อนการเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (สมยศ, 2541) เช่น การเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดของต้นฮ็อบ หลังจากตัดชิ้นส่วนปลายยอดแล้ว หุ้มด้วยสารอัลจิเนทที่มีน้ำตาลซูโครส 0.5 โมล ทำการเพาะเลี้ยงก่อนเป็นเวลา 2 วัน บนอาหารแข็งที่ประกอบด้วย ซูโครส 0.75 M ทำการดึงน้ำออกด้วยซิลิกาเจลภายในตู้ laminar air-flow เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ตามด้วยการทำให้แข็งตัวอย่างรวดเร็วในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 60 นาที และเมื่อทำการละลายอย่างช้าๆ พบว่าปลายยอดมีเปอร์เซ็นต์ความรอดชีวิต 80% (Martinez *et al.*, 1999) นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค encapsulation-dehydration มาใช้ในการเก็บรักษา ovule และ somatic embryo ของส้ม โดยการทำ preculture บนอาหารเหลวที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.75 M เป็นเวลา 1 วัน ลดความชื้นภายใต้ laminar air-flow ให้เหลือ 20-25% หลังแช่ในไนโตรเจนเหลวให้อัตราการรอดชีวิตสูงถึง 75% (Gonzalez-Arnao *et al.*, 2003)

3.4 การรักษาพันธุ์พืชแบบเก็บแช่แข็งโดยวิธี encapsulation-vitrification

การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้มีพื้นฐานมาจากการเก็บแช่แข็งโดยการป้องกันไม่ให้เกิดผลึกน้ำแข็ง แต่มีการนำวิธีการเข้ามาเพิ่ม คือการเคลือบชิ้นส่วนของพืชด้วยสารอัลจิเนทก่อน ซึ่งการเคลือบชิ้นส่วนพืชด้วยสารอัลจิเนทก่อนทำการเก็บแช่แข็งนั้น จะช่วยลดความเป็นพิษที่ชิ้นส่วนของพืชจะต้องสัมผัสสารเคมีโดยตรงได้ (สมยศ, 2541) เช่น ในการเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดที่ได้จากการเลี้ยงต้นตอของ horseradish ทำการเคลือบชิ้นส่วนปลายยอดด้วยวุ้นอัลจิเนทที่มีน้ำตาลซูโครส 0.5 M แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 0.5 M ในที่มีแสงนาน 1 วัน จากนั้นเติมสารละลายสูตร PVS2 ที่มีน้ำตาลซูโครส 0.5 M ที่อุณหภูมิ 0 หรือ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานต่างๆกัน ก่อนจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว หลังจากทำละลายอย่างรวดเร็วในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วน้ำก้อนอัลจิเนทไปล้างในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 1.2 M เป็นเวลา 40 นาที นำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS นาน 1 คืน แล้วย้ายลงเลี้ยงบนอาหารใหม่อีก 2 ครั้ง พบว่าการใช้สารละลายสูตร PVS2 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ปลายยอดมีอัตราการรอดชีวิต 69% ส่วนการใช้สารละลาย PVS2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิต 40% (Phunchindawan *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้เทคนิค encapsulation-vitrification ในการเก็บรักษาปลายยอดมันสำปะหลัง พบว่า การเลี้ยงปลายยอดในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 0.3 M เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำปลายยอดมาหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนท แล้วแช่ในสาร 2 M glycerol ผสมกับ 0.6 M sucrose เป็นเวลา 90 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงนำไปแช่ในสาร PVS2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังแช่ในไนโตรเจนเหลวให้อัตราการรอดชีวิต 80% (Charoensub *et al*., 2004)

4. การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมยางพารา

การศึกษาการเก็บรักษาเอ็มบริโอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองในสภาพอุณหภูมิต่ำในหลอดทดลอง (short term storage) โดยอรุณี และ สมปอง (2535) ได้ทำการเก็บรักษาเอ็มบริโอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3% และสาร cryoprotectant 2 ชนิด ได้แก่ แมนนิทอล หรือ ซอร์บิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถเก็บรักษาเอ็มบริโอได้เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เอ็มบริโอที่เก็บรักษาในอาหารที่เติมแมนนิทอลเข้มข้น 0.05 M ให้ความมีชีวิตสูงสุด 72.96% รองลงมาคือ การเก็บรักษาในอาหารที่เติมซอร์บิทอลเข้มข้น 0.05 M ให้ความมีชีวิตหลังการเก็บรักษา 57.00%

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมยางพาราด้วยเทคนิค cryopreservation เพื่อเก็บรักษาชิ้นส่วนต่างๆ ได้แก่ เอ็มบริโอ, embryogenic callus และแคลลัส

ที่ชักนำมาจากอับละอองเกสร (anther) โดย Normah และ Chin (1995) ได้ทำการศึกษาการลดความชื้นเอ็มบริโอยางพาราด้วยเทคนิค dehydration ต่อมา Engelmann et al (1997) ศึกษาการเก็บรักษา embryogenic callus ของยางพาราพันธุ์ PB260 และ PR107 โดยการนำชิ้นส่วนมาทำ preculture ในอาหารเหลว MS ที่เติมซูโครส 1.0 M และ DMSO 10% เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ 0 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิที่อัตราเร็ว 0.2 $^{\circ}C \cdot min^{-1}$ จนถึงอุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงทำการแช่ไนโตรเจนเหลว พบว่าให้ความมีชีวิต (viability) 49% (Yap *et al.*, 1998) ศึกษาผลของการทำ preculture ด้วยการวางเลี้ยงเอ็มบริโอยางพาราบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสความเข้มข้น 0.3, 0.5, 0.7 และ 0.9 M แล้วทำการหุ้มด้วยอัลจิเนท หลังผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5 M ส่งผลให้ความมีชีวิตสูงขึ้น โดยมีความชีวิตประมาณ 30% แต่ที่ความเข้มข้น 0.7 และ 0.9 M ส่งผลให้ความมีชีวิตลดลง (Sam, 1999) ได้ทำการศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาเอ็มบริโอยางพาราโดยวิธี vitrification โดยแช่ในสาร PVS2 เป็นเวลา 80 นาที พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตเพียง 13.4% นอกจากนี้ Zhou *et al*. (2012) ได้ศึกษาการเก็บรักษาแคลลัสที่ชักนำมาจากอับละอองเกสร ของยางพาราโดยวิธี vitrification พบว่าการทำ preculture บนอาหาร MS ที่เติมซูโครส 5% (w/v) และ DMSO 5% (v/v) เป็นเวลา 3 วัน แช่สาร loading solution (60% PVS2) เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และดึงน้ำออกด้วยการแช่ใน PVS2 40 นาที หลังแช่ในไนโตรเจนเหลวแล้วมีความมีชีวิต 71.7%

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 พืชทดลอง

เมล็ดพันธุ์ยางพาราพื้นเมืองที่ได้จากพื้นที่จังหวัดสงขลา คัดเลือกเมล็ดที่มีลักษณะสมบูรณ์ และเพิ่งตกใหม่ นำมาฟอกฆ่าเชื้อและแกะเอาเฉพาะส่วนของเอ็มบริโอ

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เตาแก๊ส
- อุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ กระบอกตวง จานเพาะเลี้ยง ปิเปต หลอดทดลอง ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 8 ออนซ์
- อุปกรณ์โลหะ เช่น ปากคีบ ด้ามมีด และใบมีดผ่าตัด
- ช้อนตักสาร
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
- เตาอบความร้อนแห้ง
- ตู้ย้ายเลี้ยง
- ถังเก็บไนโตรเจน
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

3.1.3 สารเคมี

- สารเคมีในการฟอกฆ่าเชื้อ เช่น คลอรอกซ์ แอลกอฮอล์ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ และสารลดแรงตึงผิว tween20
- สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสูตร MS
- สารเคมีที่ใช้ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ โซเดียวไฮดรอกไซด์ (NaOH) และ กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ kinetin, NAA (α-naphthaleneacetic acid), GA (gibberellic acid)
- สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนด้วยเทคนิคต่างๆ ในการเก็บในไนโตรเจนเหลว

- สาร PVS2 ซึ่งประกอบด้วย glycerol 30%, DMSO 15%, ethylene glycol 15% และ sucrose 13.7%

- สาร PVS3 ซึ่งประกอบด้วย glycerol 50% และ sucrose 50%

- ผงถ่าน

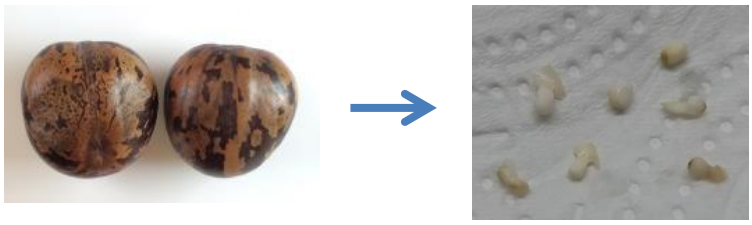
- โซเดียมอัลจิเนท

- แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 2H_2O$)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืช

นำเมล็ดยางพารามาเตรียมชิ้นส่วนพืชโดยทำการฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีของ Ighere และคณะ (2011) แยกเอาส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดออก ทำความสะอาดผิวภายนอกของเมล็ดส่วนในด้วยการปล่อยให้น้ำประปาไหลผ่านประมาณ 2 นาที แล้วจึงทำการล้างน้ำที่ผสม tween 20 หลังจากนั้นจึงแช่ใน เอทานอล 70% เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 2% เป็นเวลา 15 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ และฟอกอีกครั้งด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 1% เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 5 ครั้ง หลังจากนั้นจึงตัดเอาเฉพาะชิ้นส่วนเอ็มบริโอ (embryo) จากเมล็ดยางพารา (ภาพที่ 1)



Rubber seeds Mature zygotic embryos

ภาพที่ 1 เมล็ดยางพารา และเอ็มบริโอยางพาราที่ใช้ในการทดลอง

3.2.2 การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการปรับสภาพ (preculture) ให้กับเซลล์พืช

นำเอ็มบริโอยางพาราที่ได้มาปรับสภาพเซลล์โดยวางเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.3 M เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเซลล์

3.2.3. การทำเมล็ดเทียม (encapsulation)

นำตัวอย่างเอ็มบริโอมาหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนท โดยนำเอ็มบริโอมาผสมในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากแคลเซียมคลอไรด์ (calcium-free medium) ที่เติมสารละลายโซเดียมอัลจิเนทความ

เข้มข้น 3% (w/v) แล้วหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 100 mM โดยการเขย่าขวดเป็นระยะๆ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้โซเดียมอัลจิเนทก่อตัวขึ้นเป็นเมล็ดเทียม หลังจากนั้นล้างเมล็ดเทียมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 3-5 นาที จึงนำไปใช้ในการทดลอง

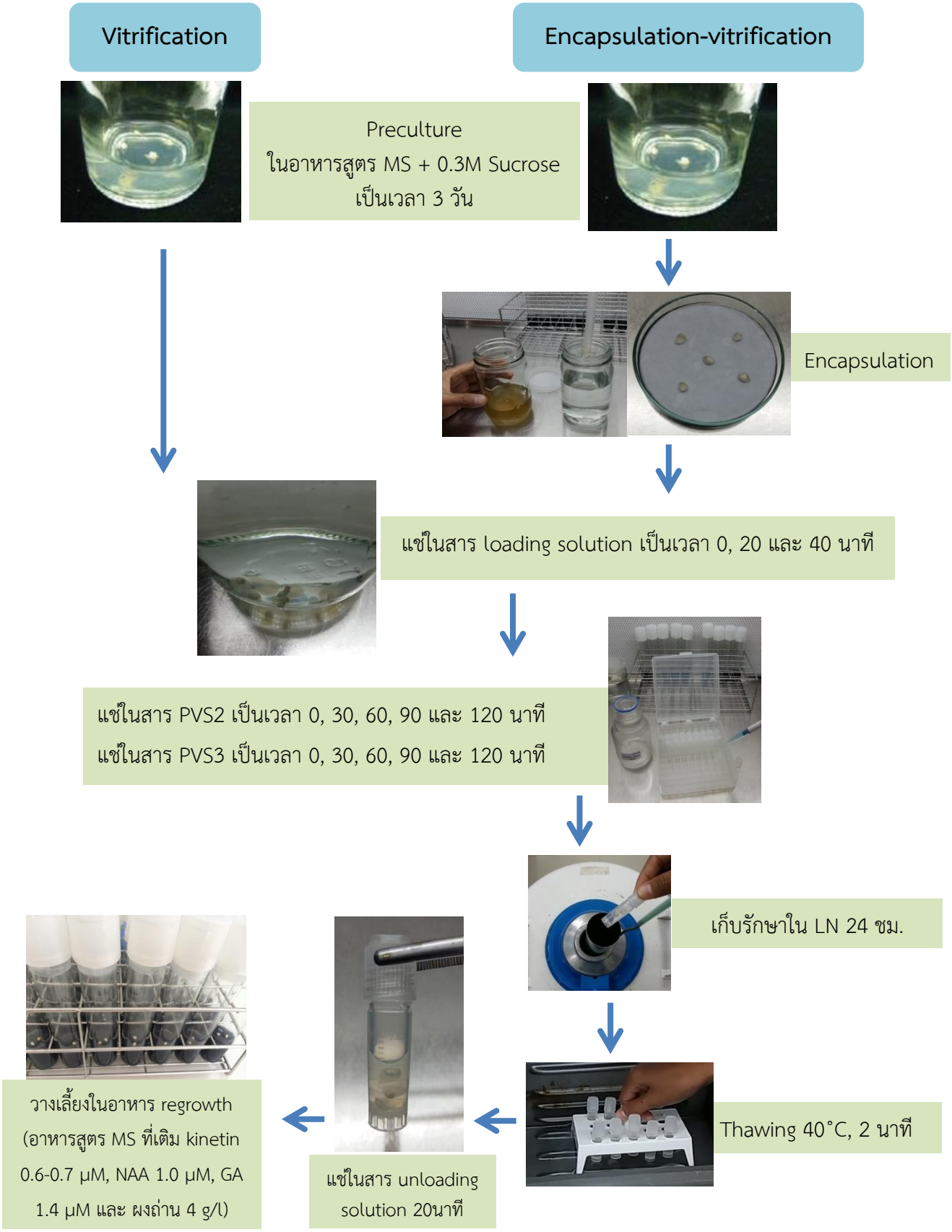
ภาพที่ 2 การเตรียมเมล็ดเทียม (encapsulation) เอ็มบริโอยางพาราที่ใช้ในการทดลอง

3.2.4 การศึกษาสารเคมี และระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำ vitrification และ encapsulation-vitrification

- นำเอ็มบริโอที่ผ่านการทำ preculture มาแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 หุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนท และกลุ่มที่ 2 เอ็มบริโอยางพาราที่ไม่ผ่านการหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนท แช่ในอาหารเหลวสูตร MS เติมกลีเซอรอล 2.0 M และน้ำตาลซูโครส 0.4 M (loading solution หรือ osmoprotective solution) เปรียบเทียบระยะเวลาในการแช่ที่ 0, 20, และ 40 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

- ย้ายเอ็มบริโอที่ผ่านการแช่ loading solution มาแช่ในสารละลาย vitrification PVS2 (ซึ่งประกอบด้วย glycerol 30%, DMSO 15%, ethylene glycol 15% และ sucrose 13.7%) และ PVS3 ซึ่งประกอบด้วย (glycerol 50% และ sucrose 50%) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบระยะเวลาในการแช่ที่ 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที

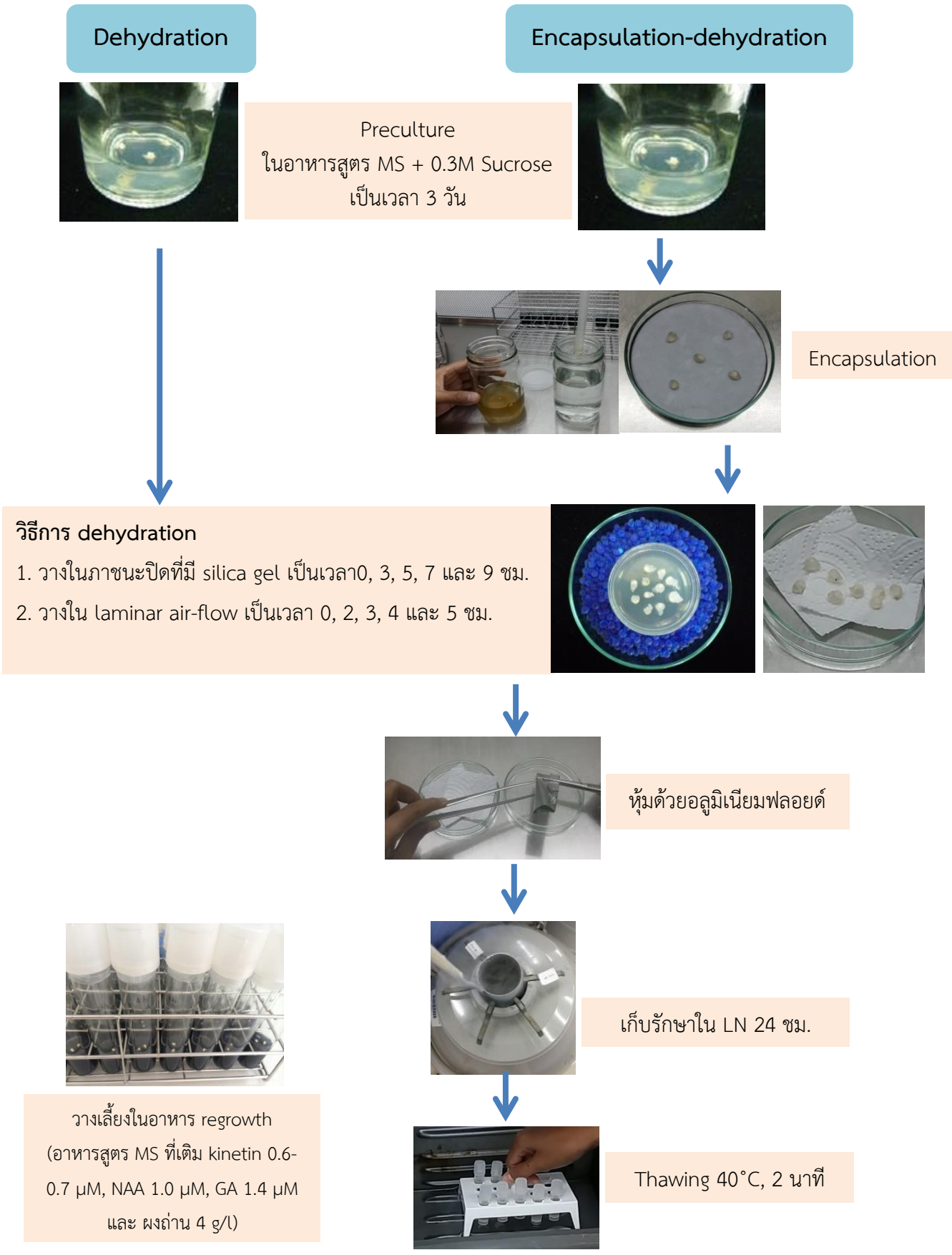
- นำเมล็ดเทียมที่ได้มาบรรจุใน cryotube ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ ซ้ำละ 9 เอ็มบริโอ แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเมล็ดเทียมที่ผ่านการแช่เยือกแข็งมาละลายผลึกน้ำแข็งด้วยการแช่ในน้ำอุ่น อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลาย vitrification ทิ้ง แล้วแช่เมล็ดเทียมในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารละลายซูโครส 1.2 M เป็นเวลา 20 นาที และวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 0.6-0.7 µM, NAA 1.0 µM, GA 1.4 µM และ ผงถ่าน 4 g/l ดังแสดงในภาพที่ 3 ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT (Duncan’s multiple range tests)



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการเก็บรักษาเอ็มบริโอยางพาราในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี vitrification และ encapsulation-vitrification

3.2.5 การศึกษาวิธีการ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำ dehydration และ encapsulation-dehydration

นำเอ็มบริโอที่ผ่านการทำ preculture มาแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 หุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนท และกลุ่มที่ 2 เอ็มบริโอยางพาราที่ไม่ผ่านการหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนท ทำการเปรียบเทียบวิธีการดึงน้ำออก 2 วิธี ได้แก่ การผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ที่มีลมเป่าด้วยความเร็ว 80-90 ฟุตต่อนาที ที่ระยะเวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการลดความชื้นในภาชนะปิดที่มีซิลิกาเจล โดยนำซิลิกาเจลมาอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำเอ็มบริโอยางพารามาวางเพื่อลดปริมาณน้ำในเซลล์ที่ระยะเวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0, 3, 5, 7 และ 9 ชั่วโมง บรรจุชิ้นส่วนพืชในอลูมิเนียมฟอยล์ ก่อนทำการเก็บรักษาในสภาวะต่ำกว่าจุดเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเมล็ดเทียมที่ผ่านการแช่เยือกแข็งมาละลายผลึกน้ำแข็งด้วยการแช่ในน้ำอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 0.6-0.7 µM, NAA 1.0 µM, GA 1.4 µM และ ผงถ่าน 4 g/l ดังแสดงในภาพที่ 4 ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต จำนวนวันที่เริ่มงอก และการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 เอ็มบริโอ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการเก็บรักษาเอ็มบริโอยางพาราในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี dehydration และ encapsulation-dehydration

บทที่ 4

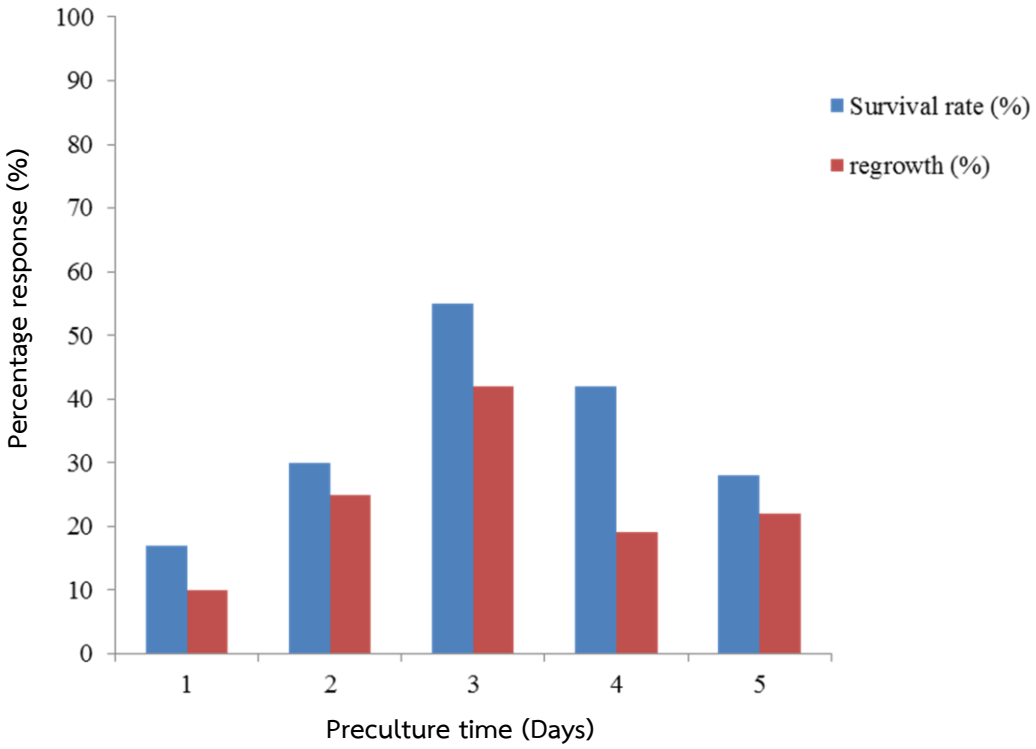
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และระยะเวลา ที่ใช้ในการปรับสภาพให้กับเซลล์พืช

เนื้อเยื่อพืชทุกแบบและทุกชนิดสามารถจะเก็บแช่แข็งได้ แล้วสามารถนำมาชักนำให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ เซลล์ที่เหมาะสมต่อการเก็บแช่แข็งควรเป็นเซลล์ขนาดเล็กที่กำลังเจริญอย่างรวดเร็วมีช่องว่างในเซลล์น้อย ซึ่งจะมีน้ำในเซลล์น้อยด้วย เช่น เนื้อเยื่อเอ็มบริโอภายในเมล็ดซึ่งเซลล์มีขนาดเล็ก กำลังเจริญเติบโตและมีน้ำน้อย จึงเหมาะที่จะเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง นอกจากนี้เอ็มบริโอยังมีความพร้อมที่จะเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ง่าย โดยไม่ต้องผ่านการชักนำยอดหรือราก ในการทดลองนี้จึงได้เลือกชิ้นส่วนจากเอ็มบริโอภายในเมล็ดยางพารามาใช้ในการทดลอง การปรับสภาพเพื่อให้ชิ้นส่วนพืชทนต่อสภาพอุณหภูมิต่ำก่อนการทำ cryopreservation โดยการเติมสาร cryoprotectant ลงในอาหารเพาะเลี้ยงก่อน เพื่อให้เซลล์และเนื้อเยื่อได้ปรับสภาพ ส่งผลให้เนื้อเยื่อทนต่อการแข็งตัวและการละลายหลังการเก็บรักษา โดยที่ไม่มีผลกระทบต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อ โดยสารเคมีที่ใช้เป็น cryoprotectant ในกลุ่มที่มีความเป็นพิษน้อย และมีการใช้กันอย่างแพร่หลายคือ น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น ซูโครส กลูโคส แมนนิทอล เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ ซูโครสเป็นน้ำตาลตัวหนึ่งที่นิยมใช้ เพราะหาง่ายและราคาไม่แพง จากการศึกษา พบว่า ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 0.3 M ในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสที่ความเข้มข้น 0.3 M เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปลดความชื้นใน laminar air-flow เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลว ให้ผลการทดลองดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงที่สุด คือ 55% และ 42% ตามลำดับ (ภาพที่ 4) สอดคล้องกับการทดลองของ Yap และคณะ (1998) ที่ได้เปรียบเทียบการปรับสภาพเอ็มบริโอยางพาราด้วยน้ำตาลซูโครส พบว่าการทำ preculture โดยการวางเลี้ยงเอ็มบริโอในอาหาร MS ที่เติมซูโครส 0.3 M ให้ความมีชีวิตสูงที่สุดใกล้เคียงกับที่ความเข้มข้น 0.5 M นอกจากนี้ Yap และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาผลของการทำ preculture ปลายยอดชะมวง (*Garcinia cowa*) ด้วยการวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสความเข้มข้น 0.3 M เป็นเวลา 0-3 วัน พบว่าการวางเลี้ยงปลายยอดส้มแขกในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสความเข้มข้น 0.3 M เป็นเวลา 3 วัน ให้การรอดชีวิตสูงถึง 30.0% เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ทำ preculture ที่ไม่พบการรอดชีวิตหลังผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว

การนำชิ้นส่วนพืชมาเพาะเลี้ยงในที่ที่อุณหภูมิต่ำกว่าปกติในที่มืด ร่วมกับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง เพื่อกระตุ้นการปรับตัวให้ทนต่อสภาพการแช่แข็ง อาหารที่มี

ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงช่วยในการลดปริมาณน้ำภายในเซลล์ ทำให้มีการสะสมน้ำตาลภายในเซลล์เพื่อป้องกันความเสียหายของโปรตีนและเยื่อหุ้มเซลล์ที่ได้รับความเสียหายในระหว่างการสูญเสียน้ำและการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (Panis *et al.*, 1996; Miao *et al.*, 2005) โดยปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมอยู่ประมาณ 0.1-1 M เป็นเวลา 1-5 วัน ขึ้นอยู่กับระบบการเพาะเลี้ยงและชนิดของพืช แต่น้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษต่อพืช (Wu *et al.*, 2003)



ภาพที่ 5 ผลของระยะเวลาในการทำ preculture บนอาหารสูตร MS ที่เติม 0.3 M ต่ออัตราการรอดชีวิตและการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอยางพาราที่ผ่านการลดความชื้นใน larminar flow เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และแช่ในไนโตรเจนเหลว

2. ผลของวิธีการและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำ vitrification และ encapsulation-vitrification

จากการศึกษาวิธีการดึงน้ำออกจากเอ็มบริโอยางพาราที่ผ่านการหุ้ม alginate และเอ็มบริโอยางพาราที่ไม่ผ่านการหุ้ม alginate ด้วยวิธี vitrification เมื่อนำเอ็มบริโอยางพาราที่ผ่านการปรับสภาพเซลล์โดยการวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสที่ความเข้มข้น 0.3 M มาทำการแช่ในสาร loading solution โดยนำเอ็มบริโอแช่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมกลีเซอรอล 2 M และน้ำตาลซูโครส 0.4 M เปรียบเทียบระยะเวลาในการแช่ที่ 0, 20 และ 40 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำเอ็มบริโอที่ผ่านการทำ loading treatment ที่ระยะเวลาต่างๆ มาแช่ในสารละลาย vitrification ได้แก่ PVS2 และ PVS3 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบระยะเวลาในการแช่ที่ 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที นำเอ็มบริโอที่ได้มาบรรจุใน cryotube ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ ซ้ำละ 9 ชิ้น แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว นำเอ็มบริโอที่ผ่านการแช่เยือกแข็งมาละลายผลึกน้ำแข็งด้วยการแช่ในน้ำอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลาย vitrification ทิ้ง แล้วแช่เอ็มบริโอในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารละลายซูโครส 1.2 M เป็นเวลา 20 นาที และวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 0.6-0.7 µM, NAA 1.0 µM, GA 1.4 µM และผงถ่าน 4 g/l ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ ในการทดลองครั้งแรกได้ทำ vitrification ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเอ็มบริโอยางพาราสูญเสียความมีชีวิต เนื่องจากสาร PVS2 มีค่าโมลาลิตี้ (molarity) ที่ความเข้มข้น 7.8 M และมีความเป็นพิษสูง มีผลทำให้ชิ้นส่วนพืชได้รับความเสียหายระหว่างขั้นตอนการดึงออก ในการทดลองสามารถลดระดับความเป็นพิษ โดยการลดเวลาในการแช่ในสารละลาย PVS2 (Mandal and Sharma, 2007) และการดึงน้ำออกที่ 0 องศาเซลเซียส แทนอุณหภูมิห้องจะช่วยลดระดับความเป็นพิษของสารละลายต่อชิ้นส่วนพืชในระหว่างการเกิดสภาพแก้ว (vitrification) และการเพิ่มช่วงเวลาในการแช่สารป้องกันความเย็นจะทำให้สารละลายเข้าไปภายในเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น (Sakai *et al*., 2000) ในการทดลองครั้งนี้จึงเลือกทำ vitrification ที่ 0 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาระยะเวลาในการแช่สาร loading solution ที่ 0, 20 และ 40 นาที และศึกษาระยะเวลาในการแช่สาร PVS2 ที่ระยะเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที พบว่าระยะเวลาในการแช่สาร loading solution ที่เหมาะสมคือ 20 นาที และการแช่สาร PVS2 ที่ 120 นาที ให้อัตราการรอดชีวิตและความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงสุด 88.87% และ 66.33% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ที่สัปดาห์ที่ 4 หลังการแช่ไนโตรเจนเหลว ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในพืชล้มลุกหลายชนิดเช่น วาซาบิ (Matsumoto *et al.*, 1994) เผือก (Takagi *et al.*, 1997) กล้วย กล้วยไม้และสับปะรด (Thinh, 1997) โดยสาร loading solution มีผลอย่างมากในการเกิดความทนทานต่อการ

สูญเสียน้ำ ในช่วงอุณหภูมิต่ำ (Nishizawa *et al.,* 1993) อย่างไรก็ตามช่วงการแช่สาร loading solution ที่ระยะเวลา 20 นาที สาร glycerol มีโอกาสน้อยที่จะเข้าไปยัง cytosol เนื่องจากสารซูโครส ในสาร loading solution จะทำให้เกิดการสะสมของสารป้องกันอุณหภูมิต่ำใน cytosol และป้องกันการเกิด plasmolysis (Matsumoto *et al.*, 1998) นอกจากนี้การแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลาย PVS2 โดยตรงจะส่งผลให้ความดัน osmotic เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว และชิ้นส่วนพืชเกิดการสูญเสียน้ำมากเกินไป ทำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดภาวะแห้ง การใช้ loading solution (2 M glycerol และ 0.4 M sucrose) แช่ชิ้นส่วนพืชก่อน สามารถทำให้ชิ้นส่วนพืชมีความทนทานต่อภาวะแห้งได้ (Schoenweiss *et al.*, 2005) โดยในระหว่างการแช่ชิ้นส่วนพืชใน loading solution เซลล์จะสูญเสียน้ำเกิด plasmolyse และเกิดการแพร่กระจายของ glycerol ใน cytosol ซึ่งจะเพิ่มความทนทานต่อการสูญเสียน้ำ โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ และความเสถียรของเยื่อหุ้มเซลล์

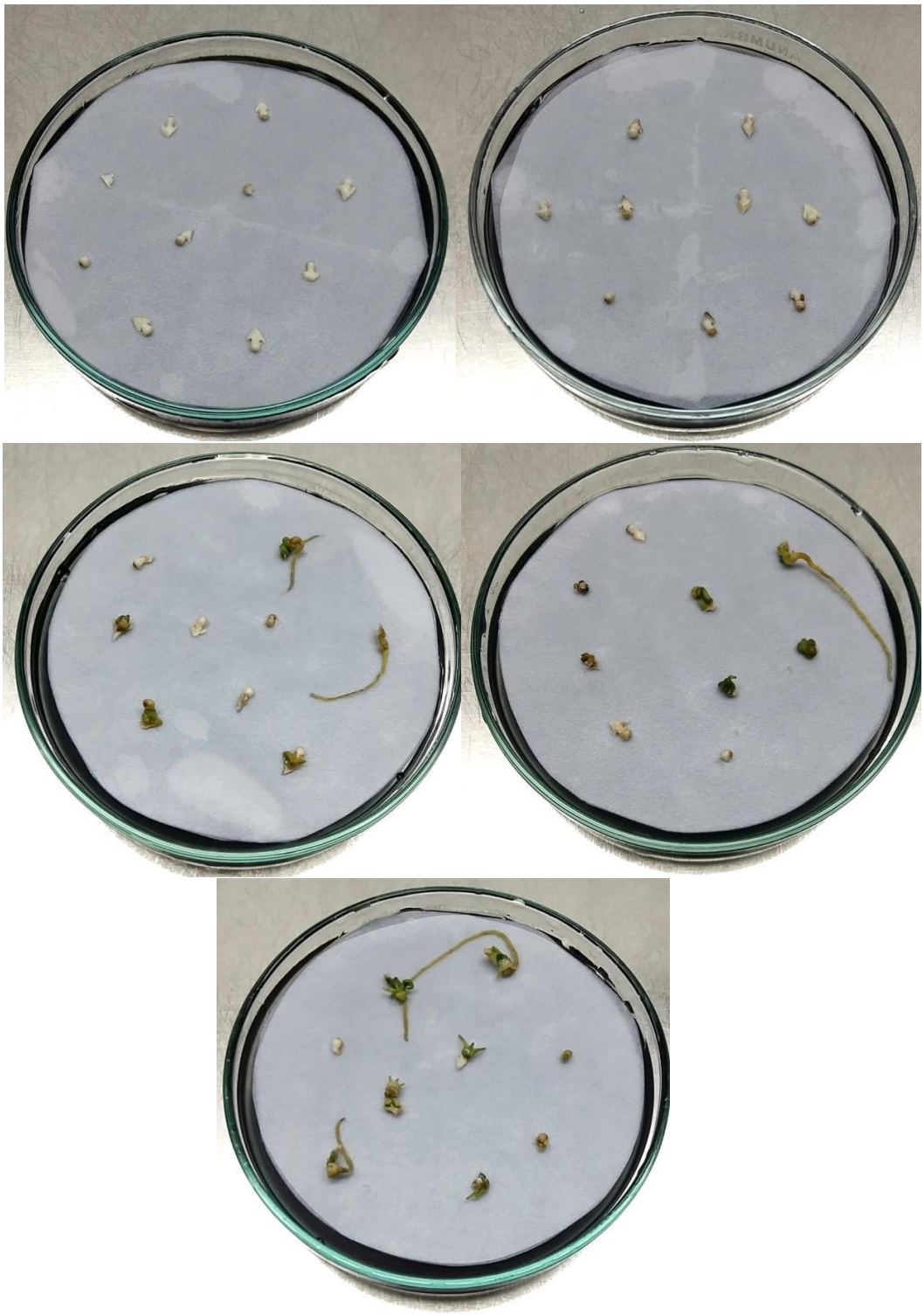
การแช่เนื้อเยื่อพืชในสารละลายที่มีองค์ประกอบและความเข้มข้นเหมาะสม ซึ่งเมื่อถูกทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วในไนโตรเจนเหลว สารละลายจะเปลี่ยนสภาพจากของเหลวไปเป็นแก้ว โดยไม่เกิดผลึกน้ำแข็ง ที่จะทำให้เซลล์ได้รับอันตราย โดยสาร vitrification solution ที่นิยมใช้ในพืชคือ PVS2 และ PVS3 จากการศึกษาเปรียบเทียบสาร vitrification 2 ชนิด ได้แก่ PVS2 และ PVS3 (ภาพที่ 6-8) พบว่าการใช้สารละลาย PVS2 ให้อัตราการรอดชีวิตมากกว่าการใช้สารละลาย PVS3 โดยการแช่สารละลาย PVS2 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาทีให้อัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 88.87% รองลงมาคือ การแช่สารละลาย PVS2 เป็นเวลา 90 นาที และ 60 นาที ให้อัตราการรอดชีวิต 66.67 และ 55.55% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ส่วนการแช่ PVS3 เป็นเวลา 120 นาที ให้อัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 33.33% รองลงมาคือ การแช่สารละลาย PVS3 เป็นเวลา 90 นาที ให้อัตราการรอดชีวิต 22.22% (ตารางที่ 3) แตกต่างจากการศึกษาของ Sajini และคณะ (2011) เปรียบเทียบการทำ vitrification โดยการใช้ PVS1, PVS2 และ PVS3 ในการเก็บรักษาเอ็มบริโอมะพร้าว พบว่าการวางเลี้ยงเอ็มบริโอมะพร้าวในอาหาร Y3 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.6 M เป็นเวลา 3 วัน และแช่ในสารละลาย PVS3 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว แล้วนำออกมาละลายอย่างรวดเร็ว ใช้ unloading ในอาหารเหลวที่เติมน้ำตาลซูโครส 1.2 M เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ให้อัตราการรอดชีวิต 70-80% ขึ้นอยู่กับขนาดและน้ำหนักของเอ็มบริโอนั้น และมีอัตราการเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ 20-25% ส่วนสาร PVS1 และ PVS2 ไม่พบการรอดชีวิตของเอ็มบริโอมะพร้าว

ตารางที่ 2 ผลของระยะเวลาในการแช่สาร loading solution และ PVS2 ต่ออัตราการรอดชีวิต และการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอยางพาราที่ไม่หุ้มวุ้นอัลจิเนท หลังผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

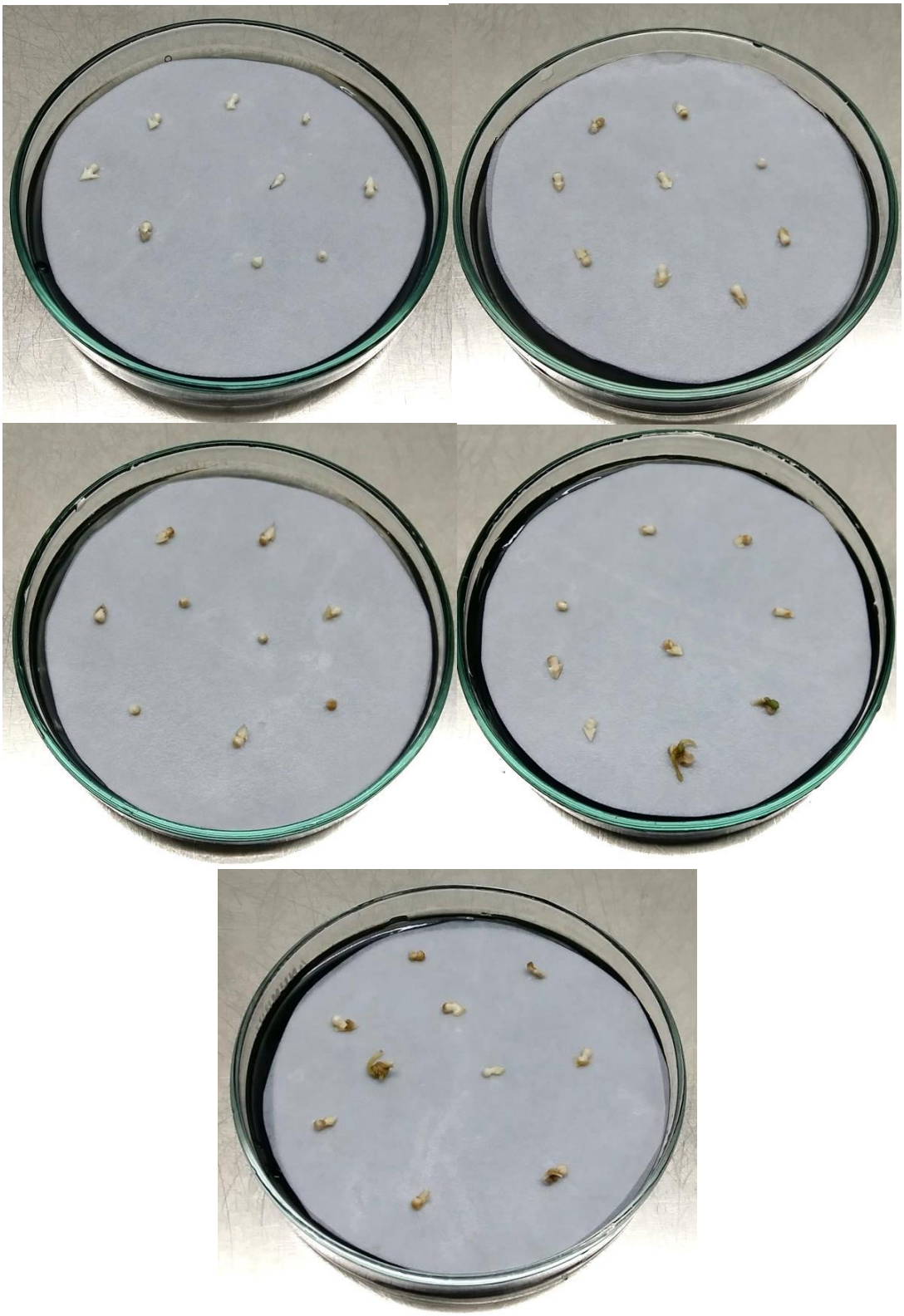
PVS2 (mins)	Loading solution (mins)	LN+		LN-	
		Survival rate (%)	Regrowth (%)	Survival rate (%)	Regrowth (%)
0	0	0	0	100.00	100.00
	20	0	0	93.33	93.33
	40	0	0	90.00	90.00
30	0	0	0	96.67	96.67
	20	0	0	93.33	93.33
	40	0	0	93.33	93.33
60	0	0	0	96.67	93.33
	20	55.55	33.37	96.67	96.67
	40	0	0	93.33	90.00
90	0	0	0	96.67	96.67
	20	66.67	53.33	93.33	90.00
	40	0	0	90.00	90.00
120	0	0	0	96.67	96.67
	20	88.87	66.33	96.67	93.33
	40	0	0	90.00	90.00

ตารางที่ 3 ผลของระยะเวลาในการแช่สาร loading solution และ PVS3 ต่ออัตราการรอดชีวิต และการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอยางพาราที่ไม่หุ้มวุ้นอัลจิเนท หลังผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

PVS3 (mins)	Loading solution (mins)	LN+		LN-	
		Survival rate (%)	Regrowth (%)	Survival rate (%)	Regrowth (%)
0	0	0	0	100.00	100.00
	20	0	0	93.33	93.33
	40	0	0	90.00	90.00
30	0	0	0	96.67	96.67
	20	0	0	83.33	83.33
	40	0	0	83.33	83.33
60	0	0	0	86.67	83.33
	20	0	0	86.67	86.67
	40	0	0	83.33	80.00
90	0	0	0	80.00	80.00
	20	23.33	16.67	83.33	80.00
	40	0	0	80.00	80.00
120	0	0	0	86.67	86.67
	20	33.33	30.00	86.67	86.67
	40	0	0	83.33	80.00



ภาพที่ 6 การพัฒนาของเอ็มบริโอยางพาราอายุ 4 สัปดาห์ ที่ผ่านการปรับสภาพโดยการทำ vitrification โดยแช่ใน loading solution เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นจึงแช่ในสารละลาย PVS2 ที่ 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที และแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 7 การพัฒนาของเอ็มบริโอยางพาราอายุ 4 สัปดาห์ ที่ผ่านการปรับสภาพโดยการทำ vitrification โดยแช่ใน loading solution เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นจึงแช่ในสารละลาย PVS3 ที่ 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที และแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาร PVS2 มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเอ็มบริโอยางพารา ที่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวมากกว่าไม่แช่สาร PVS2 โดยเอ็มบริโอยางพาราที่ไม่แช่สาร PVS2 มีลักษณะสีขาวซีด และสูญเสียความมีชีวิต (ภาพที่ 6) สาร PVS2 มีส่วนสำคัญในการป้องกันผลึกน้ำแข็งในไนโตรเจนเหลว จากการมีความเข้มข้นของซูโครสสูง มีผลให้มีการดึงน้ำบางส่วนออกจากเซลล์แล้วสารประกอบ PVS2 จะเข้าไปแทนน้ำภายในเซลล์พืช และล้อมรอบผนังเซลล์พืช ทำให้เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงสารประกอบภายในกลายสภาพเป็น vitrification ไม่เกิดผลึกทิ่มแทงเซลล์ แต่สาร PVS2 จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่สภาพอุณหภูมิปกติ (Wolfe and Bryant, 1999) ดังนั้น เมื่อออกจากการแช่ไนโตรเจนเหลว ต้องทำการแช่สาร unloading solution เพื่อดึงสาร PVS2 ออกจากเซลล์ไม่ให้เกิดอันตรายกับเซลล์พืช จากการทดลองพบว่า เอ็มบริโอยางพาราสามารถมีชีวิตอยู่ได้ 3 สัปดาห์ แต่การพัฒนาเป็นต้นใหม่เกิดขึ้นอย่างช้าๆ ดังนั้นอาจต้องมีการพัฒนาเทคนิคในการเก็บรักษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมหลังผ่านไนโตรเจนเหลว

ส่วนเทคนิค encapsulation-vitrification เมื่อเปรียบเทียบกับ vitrification แล้วไม่พบการรอดชีวิตของเอ็มบริโอยางพารา (ตารางที่ 4-5) และค่อนข้างจะซับซ้อนในการทำงานกว่าเล็กน้อย แต่เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับชิ้นส่วนพืช ที่เปราะบางเพื่อใช้อุปกรณ์เสริมในการเคลื่อนย้ายชิ้นส่วน แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนพืชและความเหมาะสมของงานด้วย จากการทดลองพบว่า เอ็มบริโอที่ไม่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วง 76.67-95.55% ทุกช่วงเวลาในการแช่สาร loading solution สังเกตได้จากเอ็มบริโอของยางพารามีสีขาวอมเหลือง มีการขยายตัวใหญ่ขึ้น พร้อมที่จะพัฒนาและเจริญเติบโต ส่วนเอ็มบริโอยางพาราที่ผ่านการหุ้มด้วยอัลจิเนทเมื่อผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวไม่พบการรอดชีวิต ทุกช่วงเวลาในการแช่สาร loading solution และทุกระยะเวลาการแช่สาร PVS2 และ PVS3 โดยเอ็มบริโอจะมีสีขาวซีดและกลายเป็นสีน้ำตาลในที่สุด อาจเป็นเพราะช่วงเวลาในการแช่สาร loading solution และ PVS2/PVS3 น้อยเกินไป เนื่องจากต้องผ่านชั้นของอัลจิเนท ทำให้สาร cryoprotectants ประเภทออกฤทธิ์ภายในเซลล์ ได้แก่ DMSO และ glycerol ไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปภายในเซลล์ ทำให้การป้องกันการยืดตัวของเซลล์และปกป้องการเปลี่ยนแปลงของระบบเยื่อหุ้มเซลล์บกพร่อง ส่วนสารประเภทออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ เช่น น้ำตาลซูโครสที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์มีประสิทธิภาพลดลงทำให้น้ำภายในเซลล์เปลี่ยนเป็นผลึกน้ำแข็งทิ่มแทงเซลล์จนเสียหาย (Engelmann, 2000) ต่างกับการทำ vitrification โดยใช้เอ็มบริโอยางพาราที่ไม่หุ้มอัลจิเนทที่ยังพบเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จในการเก็บรักษาหลังผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว ผลการทดลองที่ได้แตกต่างจากการทดลองของ (Tanaka *et al.*, 2004) ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บรักษา vitrification และ encapsulation-vitrification ในพืช Gentian พบว่าวิธี encapsulation-vitrification ให้ผลความมีชีวิตสูงกว่า และฟื้นคืนสภาพเร็วกว่า โดยเทคนิค vitrification ให้อัตราการรอดชีวิต 49% ส่วนเทคนิค encapsulation-vitrification ให้อัตราการรอดชีวิต 73.7% โดยช่วงเวลา

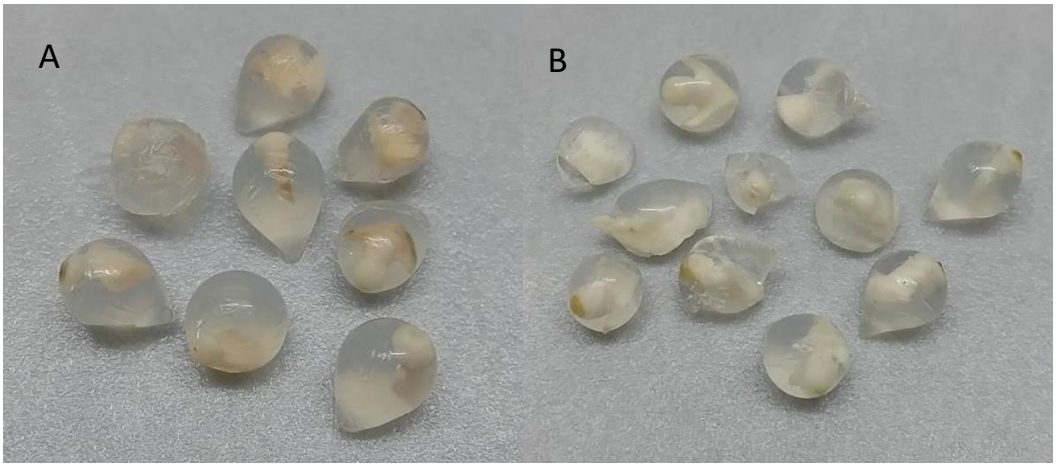
ในการแช่ PVS2 ที่เหมาะสม มีความสำคัญต่อการอัตราการรอดชีวิต โดยเทคนิค vitrification มีช่วงเวลาที่เหมาะสมในการแช่สาร PVS2 ที่ 30-40 นาที ส่วนเทคนิค encapsulation-vitrification ต้องใช้เวลามากกว่า โดยมีช่วงเวลาที่เหมาะสมในการแช่สาร PVS2 ที่ 100-140 นาที

ตารางที่ 4 ผลของระยะเวลาในการแช่สาร loading solution และ PVS2 ต่ออัตราการรอดชีวิต และการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอยางพาราที่หุ้มวุ้นอัลจิเนทหลังผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

PVS2 (mins)	Loading solution (mins)	LN+		LN-	
		Survival rate (%)	Regrowth (%)	Survival rate (%)	Regrowth (%)
0	0	0	0	95.55	92.22
	20	0	0	91.11	90.00
	40	0	0	90.00	86.67
30	0	0	0	96.67	93.33
	20	0	0	90.00	87.77
	40	0	0	95.55	91.11
60	0	0	0	93.33	89.67
	20	0	0	96.67	90.00
	40	0	0	93.37	83.33
90	0	0	0	91.11	81.11
	20	0	0	90.00	81.11
	40	0	0	89.67	83.33
120	0	0	0	91.11	86.67
	20	0	0	90.00	83.33
	40	0	0	86.67	81.11

ตารางที่ 5 ผลระยะเวลาในการแช่สาร loading solution และ PVS3 ต่ออัตราการรอดชีวิต และการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอยางพาราที่หุ้มวุ้นอัลจิเนทหลังผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

PVS3 (mins)	Loading solution (mins)	LN+		LN-	
		Survival rate (%)	Regrowth (%)	Survival rate (%)	Regrowth (%)
0	0	0	0	93.33	93.33
	20	0	0	91.37	86.67
	40	0	0	92.22	86.67
30	0	0	0	91.11	86.67
	20	0	0	93.33	83.33
	40	0	0	90.00	83.33
60	0	0	0	93.33	89.67
	20	0	0	89.67	81.11
	40	0	0	83.33	80.00
90	0	0	0	90.00	86.67
	20	0	0	86.67	81.11
	40	0	0	86.67	80.00
120	0	0	0	89.67	86.67
	20	0	0	86.67	83.33
	40	0	0	80.00	76.67



ภาพที่ 8 เอ็มบริโอยางพาราที่หุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนทอายุ 3 สัปดาห์ ที่ผ่านการทำ vitrification โดยแช่ใน loading solution เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นจึงแช่ในสารละลาย PVS2 (A) และ PVS3 (B) ที่ 120 นาที และแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. ผลของวิธีการและระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำ dehydration และ encapsulation-dehydration

จากการศึกษาวิธีการลดความชื้นเอ็มบริโอยางพาราที่ผ่านการหุ้มอัลจิเนท และเอ็มบริโอยางพาราที่ไม่ผ่านการหุ้มอัลจิเนท เมื่อนำเอ็มบริโอที่ผ่านการปรับสภาพเซลล์โดยการวางเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสที่ความเข้มข้น 0.3 M มาทำการผึ่งลมในตู้ย้ายเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อที่มีลมเป่าด้วยความเร็ว 80-90 ฟุตต่อนาที ที่ระยะเวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการลดความชื้นในภาชนะปิดที่มีซิลิกาเจล เพื่อลดปริมาณน้ำในเซลล์ที่ระยะเวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0, 3, 5, 7 และ 9 ชั่วโมง บรรจุชิ้นส่วนพืชในอลูมิเนียมฟลอยล์ก่อนทำการเก็บรักษาในสภาวะต่ำกว่าจุดเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว จากการศึกษาพบว่า การทำ dehydration ด้วยการลดความชื้นโดยการวางเอ็มบริโอที่หุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนทภายใต้ laminar air-flow เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจน ให้อัตราการรอดชีวิต และการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงที่สุด คือ 37.50% และ 27.98% ตามลำดับ (ตารางที่ 6) และสามารถพัฒนาเป็นต้นยางพาราที่สมบูรณ์ได้ (ภาพที่ 9) ส่วนการลดความชื้นด้วยการวางเอ็มบริโอที่ไม่หุ้มวุ้นอัลจิเนท ภายใต้ laminar air-flow เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจน ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงที่สุด คือ 80.72% และ 69.72% ตามลำดับ (ตารางที่ 7) และมีการพัฒนาเป็นต้นยางพาราที่สมบูรณ์

เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 9) โดยความชื้นของเอ็มบริโอจะถูกลดให้อยู่ในระดับประมาณ 15% ส่วนการลดความชื้นด้วยซิลิกาเจล ไม่พบอัตราการรอดชีวิต ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับการเปรียบเทียบวิธีลดความชื้นในเอ็มบริโอส้ม ด้วยการวางภายใต้ laminar air-flow และการลดความชื้นด้วยซิลิกาเจล พบว่า การลดความชื้นภายใต้ laminar air-flow ให้อัตราการรอดชีวิตสูงกว่าการลดความชื้นด้วยซิลิกาเจล (Al Zoubi and Normah, 2012) จากการทดลองการทำ encapsulation-dehydration ให้อัตราการรอดชีวิตค่อนข้างต่ำ เพียง 37.50% และการพัฒนาเป็นต้นใหม่ 27.98% เมื่อเทียบกับเอ็มบริโอที่ไม่หุ้มวุ้นอัลจิเนท ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Peran และคณะ (2006) ที่ทำการเก็บรักษาเอ็มบริโอ *Ekebergia capensis*, Sparrm. ซึ่งเป็นเมล็ดจำพวก recalcitrant พบว่าการดึงน้ำออกโดยวิธี fast drying เป็นเวลา 20 นาที ให้อัตราการรอดชีวิต 80% เมื่อเทียบกับการนำเอ็มบริโอมาหุ้มด้วยวุ้นอัลจิเนท แล้วดึงน้ำออกด้วยวิธีเดียวกัน แต่ต้องใช้เวลาถึง 3 ชั่วโมง เพื่อดึงน้ำออกให้อยู่ในระดับเดียวกัน แต่หลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลวแล้วไม่พบการรอดชีวิตของเอ็มบริโอเลย

เทคนิคการทำให้แห้งมีขั้นตอนที่ง่ายมาก โดยการทำให้ชิ้นส่วนพืชแห้งโดยการเป่าลมด้วย laminar air-flow หรือใช้ซิลิกาเจลซึ่งเทคนิคนี้จะขึ้นอยู่กับระดับความชื้นของชิ้นส่วนที่เก็บรักษา ความชื้นเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการรอดชีวิต โดยทั่วไปความชื้นของชิ้นส่วนที่เก็บรักษาจะอยู่ที่ประมาณ 10-20% ของน้ำหนักสด เช่น การเก็บรักษาเอ็มบริโอของข้าวโพดด้วยการลดความชื้นได้ต่ำกว่า 13% ก่อนการแช่ในไนโตรเจนเหลว (Wen and Song, 2007) Lambardi และคณะ (2004) รายงานว่าเอ็มบริโอส้มสามารถรอดชีวิตได้ที่ระดับความชื้นน้อยกว่า 20% การศึกษาการเก็บรักษาปลายยอดของ *Paeonia lactiflora* พบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยการผึ่งลมใน laminar air-flow เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (Seo *et al.*, 2007) นอกจากนี้ Wang และคณะ (2000) เปรียบเทียบผลระหว่างการใช้ซิลิกาเจลและการวางภายใต้ตู้ย้ายเลี้ยง เพื่อลดความชื้นปลายยอดขององุ่น (*Vitis vinifera*) เพื่อเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า อัตราการรอดชีวิตขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำภายในเซลล์ ไม่ได้ขึ้นกับวิธีการที่ทำให้เนื้อเยื่อสูญเสียน้ำ โดยปริมาณน้ำที่ทำให้ชิ้นส่วนพืชรอดชีวิตในการเก็บรักษาแบบ encapsulation-dehydration คือตั้งแต่ 15-25% นอกจากนี้ Kaviani (2010) ศึกษาการทำ encapsulation-dehydration ในเอ็มบริโอของ *Melia azedarach* L. พบว่า การลดความชื้นในระดับที่เหมาะสมที่ประมาณ 15-20% เป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้การเก็บรักษาชิ้นส่วนในไนโตรเจนเหลวประสบความสำเร็จ

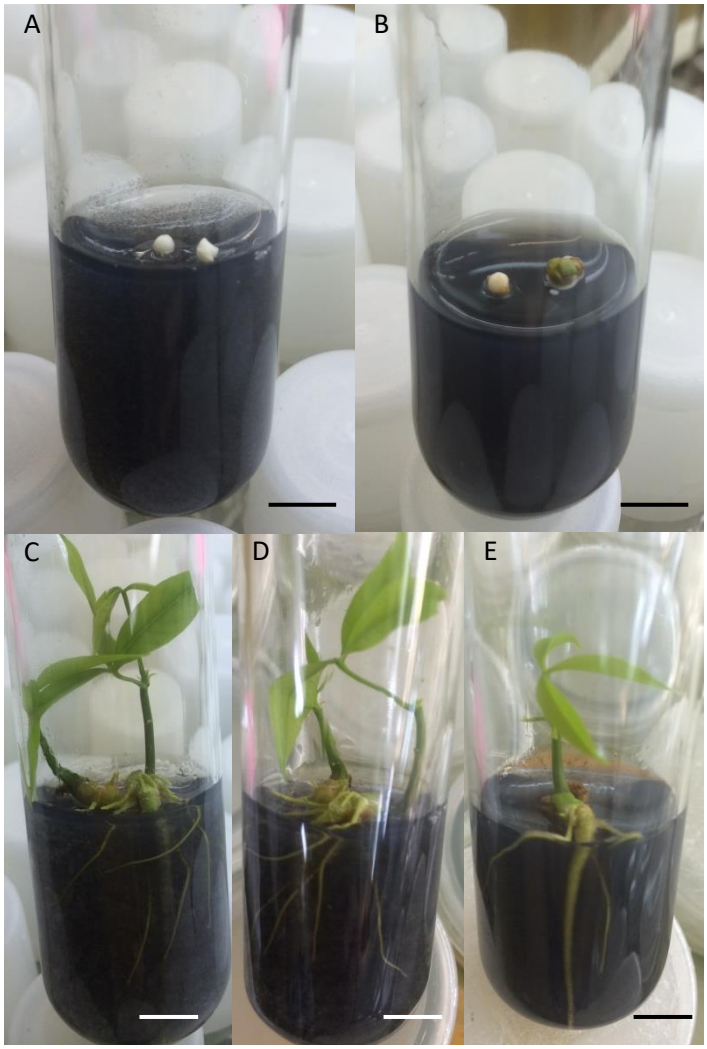
ตารางที่ 6 ผลของวิธีการลดความชื้นต่ออัตราการรอดชีวิตและการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอยางพาราที่หุ้มวุ้นอัลจิเนท (encapsulation-dehydration) หลังผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Dehydration method	Dehydration time (h)	Moisture content (%)	Survival rate (%)	Regrowth (%)
silica gel	0	62.50	0	0
	3	33.00	0	0
	6	19.12	0	0
	9	15.74	0	0
	12	12.32	0	0
air dying	0	62.32	0	0
	2	35.03	12.32	7.08
	3	25.12	27.05	16.85
	4	15.54	37.50	27.98
	5	12.05	32.03	15.05

ตารางที่ 7 ผลของวิธีการลดความชื้นต่ออัตราการรอดชีวิตและการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอยางพาราที่ไม่หุ้มวุ้นอัลจิเนท (dehydration) หลังผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Dehydration method	Dehydration time (h)	Moisture content (%)	Survival rate (%)	Regrowth (%)
silica gel	0	62.50	0	0
	3	28.17	0	0
	6	17.05	0	0
	9	12.75	0	0
	12	11.05	0	0
air dying	0	62.32	0	0
	2	25.23	33.03	7.08
	3	15.32	80.72	69.72
	4	13.25	67.50	57.05
	5	12.05	60.05	42.37

ภาพที่ 9 การพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอยางพาราที่หุ้มวุ้นอัลจิเนทและลดความชื้นภายใต้ laminar air-flow เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 10 การพัฒนาเป็นต้นใหม่ของเอ็มบริโอยางพาราที่ไม่หุ้มวุ้นอัลจิเนทที่ผ่านการทำ dehydration ในระยะเวลาที่ต่างกัน ได้แก่ A: 0 ชั่วโมง, B: 2 ชั่วโมง, C: 3 ชั่วโมง, D: 4 ชั่วโมง และ E: 5 ชั่วโมง

จากผลการศึกษาเกี่ยวกับการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชชนิดต่างๆ ในไนโตรเจนเหลว พบว่าให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันในแต่ละพืชและชิ้นส่วนที่ใช้ในการทดลอง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมที่สุดสำหรับพืชที่ต้องการเก็บรักษา จากรายงานความสำเร็จในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชแต่ละชนิด พบว่า โดยทั่วไปปัจจัยที่ส่งเสริมความมีชีวิตรอดหลังผ่านกระบวนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ประกอบด้วย 1) ชิ้นส่วนที่นำมาใช้ (ชนิด ขนาด โครงสร้างและลักษณะทางกายภาพของชิ้นส่วน) โดยชิ้นส่วนที่นำมาใช้จะต้องมีขนาดเล็ก (Panis *et al.*, 2005) 2) เทคนิคที่นำมาใช้ในการปรับสภาพชิ้นส่วนก่อนการลดความชื้น เพื่อให้มีความทนทานต่อสภาพอุณหภูมิต่ำเมื่อมีการแช่ในไนโตรเจนเหลว เช่น การทดลองของ กำไล (2554) เปรียบเทียบการเก็บ

รักษาเอ็มบริโอหวายน้ำผึ้ง หวายกำพวน และหวายขี้ไก่ ในไนโตรเจนเหลว ทั้ง 3 วิธีการ คือ vitrification, encapsulation-dehydration และ encapsulation-vitrification พบว่า วิธีการ vitrification และ encapsulation-vitrification ไม่พบการรอดชีวิต โดยวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาเอ็มบริโอหวายในไนโตรเจนเหลว คือ encapsulation-dehydration ทำได้โดยการปรับสภาพเอ็มบริโอด้วยการทำ preculture บนอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.3 M เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเอ็มบริโอมาทำ encapsulation และแช่ใน loading solution ในระยะเวลาต่างๆ กัน ตามด้วยการลดความชื้นด้วยซิลิกาเจลหนัก 50 กรัม/เอ็มบริโอ 20 ชิ้น ในระยะเวลาต่างๆ กัน เพื่อลดปริมาณน้ำในเซลล์ แล้วจึงนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งระยะเวลาในการแช่ loading solution การดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยซิลิกาเจลจะแตกต่างออกไปตามชนิดของเอ็มบริโอหวายที่นำมาเก็บรักษา นอกจากนี้ Pornchuti และ Thammasiri (2008) ศึกษาการเก็บรักษากล้วยไม้เอื้องเงินแดง (*Dendrobium cariniferum* Rchb. F.) ในไนโตรเจนเหลวโดยวิธี encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration พบว่า เมื่อนำโพรโตคอร์ม มาผ่านกระบวนการ encapsulation-vitrification ด้วยการแช่เมล็ดเทียมในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 0-180 นาที เปรียบเทียบกับการทำ encapsulation-dehydration โดยวางเมล็ดเทียมในตู้ laminar air-flow นาน 0-5 ชั่วโมง แล้วเก็บในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 วัน เมื่อนำออกมาละลายน้ำแข็งและวางเลี้ยงบนอาหารแข็ง พบว่า วิธี encapsulation-vitrification โดยการแช่เมล็ดเทียม ใน PVS2 นาน 60 นาที ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบด้วย triphenyl tetrazolium chloride (TTC) ส่วนวิธี encapsulation-dehydration ไม่พบการรอดชีวิต ในขณะที่ การศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาชิ้นส่วนปลายยอดของ wild shih (*Artemisia herba-alba* Asso.) ด้วยเทคนิค encapsulation-dehydration ให้อัตราการรอดชีวิต 40% และ การพัฒนาเป็นต้นใหม่ 6% หลังแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยชิ้นส่วนปลายยอดดังกล่าวผ่านการทำ preculture ในอาหาร MS ที่เติมซูโครส 0.1 M เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนเทคนิค encapsulation-vitrification ด้วยการแช่ PVS2 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้อัตราการรอดชีวิต 68% และการพัฒนาเป็นต้นใหม่ 12% โดยชิ้นส่วนปลายยอดผ่านการทำ preculture ในอาหาร MS ที่เติมซูโครส 0.3 M เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Sharaf *et al.*, 2011) นอกจากนี้การเก็บรักษาปลายยอดราสเบอรรี่ (*Rubus idaeus* L.) ด้วยเทคนิค encapsulation-vitrification ให้อัตราการรอดชีวิต 85% และการพัฒนาเป็นต้นใหม่ 75% มากกว่าการใช้เทคนิค encapsulation-dehydration ซึ่งให้อัตราการรอดชีวิต 65% และการพัฒนาเป็นต้นใหม่ 50% (Wang *et al.*, 2005) การเก็บรักษาปลายยอดแอปเปิ้ล (*Malus X domestica* Borkh.) ด้วยเทคนิค encapsulation-dehydration ให้อัตราการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงถึง 83.7% หลังแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยชิ้นส่วนปลายยอดดังกล่าวผ่านการทำ preculture ในอาหาร MS ที่เติมซูโครส 0.75 M เป็นเวลา 3 วัน ที่

อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และผ่านการทำ dehydration ภายใต้ laminar air-flow เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ส่วนการทำ encapsulation-vitrification ปลายยอดแอปเปิ้ลโดยใช้สาร cryoprotective mixture ซึ่งประกอบด้วย 180% (w/v) sucrose และ ethylene glycol 120% (w/v) ให้อัตราการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงถึง 64-77% หลังแช่ในไนโตรเจนเหลว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์แอปเปิ้ล (Paul *et al.*, 2000) ดังนั้นกุญแจสำคัญที่จะทำให้การเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชในไนโตรเจนเหลวประสบความสำเร็จ คือ การระมัดระวังในกระบวนการปรับลดปริมาณน้ำให้เหมาะสม ในขณะเดียวกันต้องป้องกันผลกระทบจากความเป็นพิษของสารและการเปลี่ยนแปลงออสโมติกด้วยในกรณีของการทำ vitrification

ในการเก็บรักษาเอ็มบริโอยางพาราในครั้งนี้ ถึงแม้ว่าวิธีการเก็บรักษาด้วยเทคนิค encapsulation-dehydration และ encapsulation-vitrification อาจให้ผลการรอดชีวิตที่ต่ำหรือไม่รอดชีวิตเลย และไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าเกิดจากปัจจัยหรือขั้นตอนใด ทั้งนี้เนื่องจากแต่ละปัจจัยหรือแต่ละขั้นตอนมีผลต่อเนื่องกัน ซึ่งล้วนส่งผลต่อความสำเร็จในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว อย่างไรก็ตามพบว่า การเก็บรักษาเอ็มบริโอยางพาราด้วยวิธี vitrification ให้อัตราการรอดชีวิตที่ดี ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่าย ไม่ยุ่งยากซับซ้อนเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค encapsulation-dehydration และ encapsulation-vitrification นอกจากนี้ยังพบว่าในการทดลองจะต้องคัดเลือกใช้เมล็ดยางพาราที่เพิ่งตกใหม่ และทำการทดลองทันที เนื่องจากเมล็ดยางพาราสูญเสียความงอกเร็วมาก หากใช้เมล็ดที่ตกมานานแล้ว เอ็มบริโอภายในที่นำมาใช้อาจสูญเสียความมีชีวิตตั้งแต่เริ่มทำการทดลองทำให้ผลการทดลองผิดพลาดได้ นอกจากนี้ยังต้องระวังในขั้นตอนการตัดเอาเอ็มบริโอออกจากเมล็ด เนื่องจากอาจทำให้เอ็มบริโอฉีกขาด เมื่อนำมาวางเลี้ยงบนอาหารเพื่อให้พัฒนาเป็นต้นใหม่อาจได้ต้นที่ไม่สมบูรณ์

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการเก็บรักษาเอ็มบริโอยางพาราในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation) ทั้ง 4 วิธี คือ vitrification, encapsulation-vitrification, dehydration และ encapsulation-dehydration พบว่าวิธีที่สามารถเก็บรักษาเอ็มบริโอยางพาราได้ดี คือ vitrification และ dehydration โดยการปรับสภาพเอ็มบริโอยางพาราด้วยการทำ preculture บนอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.3 M เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

สำหรับการทำ vitrification ได้ทดลองเปรียบเทียบระหว่าง PVS2 และ PVS3 พบว่าการใช้ PVS2 ให้อัตราการรอดชีวิตมากกว่าการใช้ PVS3 และจากการศึกษาระยะเวลาในการแช่สาร loading solution และ plant vitrification solution (PVS2/PSV3) พบว่า การนำเอ็มบริโอมาผ่านกระบวนการ vitrification ด้วยการแช่ใน loading solution เป็นเวลา 20 นาที ตามด้วยการแช่สาร PVS2 เป็นเวลา 120 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปแช่ไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นละลายน้ำแข็งโดยแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ล้างชิ้นส่วนด้วยอาหารเหลว MS ที่เติมซูโครสความเข้มข้น 1.2 M เป็นเวลา 20 นาที และวางเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม kinetin 0.6-0.7 µM, NAA 1.0 µM, GA 1.4 µM และ ผงถ่าน 4 g/l ให้การรอดชีวิต และการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงที่สุด คือ 88.87% และ 66.33% ตามลำดับ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน จากการสังเกตพบว่าเอ็มบริโอที่ผ่านการทำ vitrification จะมีการพัฒนาเป็นต้นใหม่ค่อนข้างช้าเมื่อเปรียบเทียบกับการทำ dehydration

ในส่วนของการทำ encapsulation-dehydration พบว่าการลดความชื้นด้วยการวางเอ็มบริโอที่หุ้มด้วยอัลจิเนท ภายใต้ laminar air-flow เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนให้การรอดชีวิต และการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงที่สุด คือ 37.50% และ 27.98% ตามลำดับ ส่วนการลดความชื้นด้วยการวางเอ็มบริโอที่ไม่หุ้มอัลจิเนทภายใต้ laminar air-flow เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจน ให้การรอดชีวิต และการพัฒนาเป็นต้นใหม่สูงที่สุด คือ 80.72% และ 69.72% ตามลำดับ โดยความชื้นของเอ็มบริโอจะถูกลดให้อยู่ในระดับประมาณ 15% ส่วนการลดความชื้นด้วยซิลิกาเจลไม่พบอัตราการรอดชีวิต

นอกจากนี้ยังพบว่าเมล็ดยางพาราที่นำมาใช้ในการเตรียมเอ็มบริโอยางพารามีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นใหม่อย่างมาก ในการทดลองจะต้องคัดเลือกเมล็ดที่เพิ่งตกใหม่ โดยสังเกตได้จากน้ำหนักของเมล็ด เนื่องจากเมล็ดที่ตกแล้วเป็นเวลานานจะส่งผล

ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นใหม่ลดลงอย่างมาก ในการศึกษาต่อไปควรทำการศึกษาในยางพาราพันธุ์ต่างๆ เนื่องจากยางพาราในแต่ละพันธุ์อาจให้ผลสำเร็จแตกต่างกัน และอาจใช้สารยับยั้งการเกิดสารอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งสารดังกล่าวสามารถทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระไม่ให้เกิดสารพิษที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ เช่น วิตามินซี หรือ สาร glutathione ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเกิด acyl peroxides ในปฏิกิริยา lipid peroxides reaction บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีผลการทดลองการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยใช้สาร glutathione ในการลด oxidative stress เริ่มแรกนิยมใช้ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมของสัตว์ ต่อมา Wang (2004) ประสบความสำเร็จในการใช้สาร glutathione เก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งปลายยอดของส้ม ด้วยวิธี vitrification โดยค่าเฉลี่ยของการรอดชีวิต และการฟื้นคืนสภาพ อยู่ระดับที่ 83.9% และ 77.8% จึงอาจนำสารเคมีดังกล่าวมาใช้ในการพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาชิ้นส่วนยางพาราในไนโตรเจนเหลวต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กำไล เรียนหัตถกรรม. 2554. การศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาคัพภะหวายในสภาพเย็นยิ่งยวด. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิจัยและพัฒนาการเกษตร) สาขาวิจัยและพัฒนาเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน.

จรัสศรี นวลศรี, อิมรอเฮม ยีดำ, สายัณห์ สดุดี และ รัชนีกร แก้วจุลกาญจน์. 2557. การศึกษาอิทธิพลของต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ต้านทานโรคราก ขาวกับกิ่งตายางพันธุ์ดี. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นวลทิพย์ ชัยลิ้นฟ้า, เบ็ญจา บำรุงเมือง และจีระนันท์ ตาคำ. 2553. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กล้วยไม้เมืองไทย. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะผลิตกรรมการเกษตร. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ทัศนี ขาวเนียม. การเก็บรักษาพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมเทเนอราในไนโตรเจนเหลว และการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม. วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต คณะทรัพยากรธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สมยศ มีสุข. 2541. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กล้วยไม้ไทยพันธุ์แท้บางชนิดโดยเทคนิคเมล็ดเทียม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ. 2547. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

สำนักพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. 2558. สถานการณ์ยางพาราและการปรับตัวของเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ.

อยุทธ์ นิสสภา, เสมอใจ ชื่นจิตต์. 2554. การประเมินความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากโรคราก ขาวในยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อรุณี ม่วงแก้วงาม และ สมปอง เตชะโต. 2535. การเก็บรักษาคัพภะยางพาราในสภาพอุณหภูมิต่ำในหลอดทดลอง. วารสารเกษตร. 8: 273-280.

อุดม พูลเกษ. 2541. ยางพารา. *ใน* พฤกษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ หน้า 196-202. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์อักษรสรรค์. 133 หน้า.

Al Zoubi, O. M. and Normah, M. N. 2012. Desiccation sensitivity and cryopreservation of excised embryonic axes of *Citrus Suhuiensis* cv. Limau Madu, Citrumelo [*Citrus Paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* (l.) Raf.] and *Fortunella polyandra*. Cryoletters 33: 240-250.

Bajaj, Y. P. S. 1995. Cryopreservation of Plant Cell, Tissue and Organ Culture for the Conservation of Germplasm and Biodiversity. In: Cryopreservation of Plant Germplasm I. Springer. p. 3-28.

Bhojwani, S. S. and Razdan, M. K. 1996. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. New York: Elsevier Science Publishing Company Inc.

Charoensub, R., Hirai, D. and Sakai, A. 2004. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of cassava by encapsulation-vitrification method. Cryoletters 25: 51-58.

Cho, E. G., Hor, Y. L., Kim, H. H., Rao, V. R. and Engelmann, F. 2001. Cryopreservation of *Citrus madurensis* zygotic embryonic axes by vitrification: importance of pregrowth and preculture conditions. Cryoletters 22: 391-396.

Engelmann, F. 2000. Importance of Cryopreservation for the Conservation of Plant Genetic. *In*: Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Progress and Applications. Rome: Japanese International Research Centre for Agricultural Sciences and IPGRI, IPGRI. p. 8-20.

Engelmann, F., Lartaud, M., Chabrillange, M. P., Carron, M. P. and Etienne, H. 1997. Cryopreservation of embryogenic calluses of two commercial clones of *Hevea brasiliensis*. Cryoletters 18: 107-116.

Fabre, J. and Dereuddre, J. 1990. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. Cryoletters 11: 413-426.

Gonzalez-Arnao, M. T., Juarez, J., Ortega, C., Navarro, L. and Duran-Vila, N. 2003. Cryopreservation of ovules and somatic embryos of citrus using the encapsulation-dehydration technique. Cryoletters 24: 85-94.

Hirai, D. and Sakai, A. 2000. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* l.) by Encapsulation-vitrification. *In*: Cryopreservation of tropical plant germplasm: current progress and applications Rome: Japanese International Research Centre for Agricultural Sciences and IPGRI, IPGRI. p. 205-211.

Ighere, A. D., Okere, A., Elizabeth, J., Mary, O., Olatunde, F. and Abiodun, S. 2011. *In vitro* culture of *Hevea brasiliensis* (rubber tree) embryo. Journal of Plant Breeding and Crop Science 9: 185-189.

Ishikawa, K., Harata, K., Mii, M., Sakai, A., Yoshimatsu, K. and Shimomura, K. 1997. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. Plant Cell Reports 16: 754-757.

Kartha, K. K. 1985. Meristem Culture and Germplasm Preservation. *In*: Cryopreservation of Plant Cell and Organs. Boca Raton, Florida: CRC Press. p. 115-134.

Kaviani, B. 2010. Cryopreservation by encapsulation-dehydration for long-term storage of some important germplasm: seed of Lily (*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.), embryonic axe of Persian lilac (*Melia azedarach* L.), and tea (*Camellia sinensis* L.). Plant Omics 3: 177-182.

Lambardi, M., De Carlo, A., Biricolti, S., Puglia, A. M., Lombardo, G., Siragusa, M. and De Pasquale, F. 2004. Zygotic and nucellar embryo survival following dehydration/cryopreservation of *Citrus* intact seeds. Cryoletters 25: 81-90.

Mandal, B. B. and Sharma, S. D. 2007. Cryopreservation of *In vitro* Shoot Tips of *Dioscorea deltoidea* Wall., an endangered medicinal plant: Effect of cryogenic procedure and storage duration. Cryoletters 28: 461-470.

Martinez, D., Tames, R. S. and Angeles Revilla, M. 1999. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation/dehydration. Plant Cell Reports 19: 59-63.

Matsumoto, T., Sakai, A. and Yamada, K. 1994. Cryopreservation of i*n vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. Plant Cell Reports 13: 442-446.

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

Matsumoto, T., Takahashi, C., Sakai, A. and Nako, Y. 1998. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of hybrid statice by three different procedures. Scientia Horticulturae 76: 105-114.

Miao, N.-H., Kaneko, Y. and Sugawara, Y. 2005. Ultrastructural implications of pretreatment for successful cryopreservation of oncidium protocorm-like body. Cryoletters 26: 333-340.

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.

Normah, M. N. and Chin, H. F. 1995. Cryopreservation of Germplasm of Rubber (*Hevea brasiliensis*). *In*: Cryopreservation of Plant Germplasm I. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p. 180-190.

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

Panis, B., Totte, N., Van Nimmen, K., Withers, L. A. and Swennen, R. 1996. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. Plant Science 121: 95-106.

Paul, H., Daigny, G. and Sangwan-Norreel, B. S. 2000. Cryopreservation of apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification. Plant Cell Reports 19: 768-774.

Peran, R., Berjak, P., Pammenter, N. W. and Kioko, J. I. 2006. Cryopreservation, encapsulation and promotion of shoot production of embryonic axes of a recalcitrant species *Ekebergia capensis*, Sparrm. Cryoletters 27: 5-16.

Phunchindawan, M., Hirata, K., Sakai, A. and Miyamoto, K. 1997. Cryopreservation of encapsulated shoot primordia induced in horseradish (*Armoracia rusticana*) hairy root cultures. Plant Cell Reports 16: 469-473.

Pinker, I., Halmagyi, A. and Olbricht, K. 2009. Effects of sucrose preculture on cryopreservation by droplet-vitrification of strawberry cultivars and morphological stability of cryopreserved plants. Cryoletters 30: 202-211.

Pornchuti, W. and Thammasiri, K. Cryopreservation of protocorms of *Dendrobium cariniferum* Rchb. F. Proceedings of the Acta Horticulturae; 2008: International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium.

Reed, B. M., DeNoma, J. and Chang, Y. 2000. Application of cryopreservation protocols at a clonal genebank. *In*: Cryopreservation of tropical plant germplasm: current progress and applications. Rome: Japanese International Research Centre for Agricultural Sciences and IPGRI, IPGRI. p. 246-249.

Sajini, K. K., Karun, A., Amarnath, C. H. and Engelmann, F. 2011. Cryopreservation of coconut (*Cocos Nucifera* L.) zygotic embryos by vitrification. Cryoletters 32: 317-328.

Sakai, A. 2000. Development of cryopreservation technology. *In*: Cryopreservation of tropical plant germplasm: Current progress and applications. Rome: Japanese International Research Centre for Agricultural Sciences and IPGRI, IPGRI. p. 1-7.

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

Sakai, A., Matsumoto, T., Hirai, D. and Niino, T. 2000. Newly developed encapsulation-dehydration protocol for plant cryopreservation. Cryoletters 21: 53-62.

Sam, Y. Y. 1999. Cryopreservation of rubber (*Hevea brasiliensis*) zygotic embryos using vitrification technique. Putra Malaysia University.

Schoenweiss, K., Meier-Dinkel, A. and Grotha, R. 2005. Comparison of cryopreservation techniques for long-term storage of ash (*fraxinus excelsior* L.). Cryoletters 26: 201-212.

Seo, M. J., Shin, J. H. and Sohn, J. K. 2007. Cryopreservation of dormant herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) shoot-tips by desiccation. Cryoletters 28: 207-213.

Sharaf, S. A., Shibli, R. A., Kasrawi, M. A. and Baghdadi, S. H. 2011. Cryopreservation of wild Shih (*Artemisia herba-alba* Asso.) shoot-tips by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 108: 437-444.

Souza, A. C., Paiva, R., Silva, L. C., Gallo, C. M., Santos, P. A. A., Pinto, M. C. C. and Paiva, P. D. O. Dehydration and cryopreservation of *Haddroanthus serratifolius* embryos. Proceedings of the Acta Horticulturae; 2014: International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium.

Takagi, H. 2000. Recent development in cryopreservation of shoot apices of tropical species. *In*: Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Progress and Applications. Rome: Japanese International Research Centre for Agricultural Sciences and IPGRI, IPGRI. p. 178-193.

Takagi, H., Tien Thinh, N., 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.

Tanaka, D., Niino, T., Isuzugawa, K., Hikage, T. and Uemura, M. 2004. Cryopreservation of shoot apices of *in-vitro* grown gentian plants: Comparison of vitrification and encapsulation-vitrification Protocols. Cryoletters 25: 167-176.

Thinh, N. T. 1997. Cryopreservation of Germplasm of Vegetatively Propagated Tropical Monocots by Vitrification. Kobe University.

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., Sakai, A. and Nagai, M. 1990. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. Plant Cell Reports 9: 328-331.

Wang, Q., Tanne, E., Arav, A. and Gafny, R. 2000. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63: 41-46.

Wang, Z-C. and Deng, X-X. 2004. Cryopreservation of shoot-tips of *Citrus* using vitrification: effect of reduced form of glutathione. Cryoletters 25: 43-50.

Wang, Q., Laamanen, J., Uosukainen, M. and Valkonen, J. P. T. 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. Plant Cell Reports 24: 280-288.

Wen, B. and Song, S. 2007. Acquisition of cryotolerance in maize embryos during seed development. Cryoletters 28: 109-118.

Wolfe, J. and Bryant, G. 1999. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. Cryobiology 39: 103-129.

Wu, Y. J., Huang, X. L., Xiao, J. N., Li, X. J., Zhou, M. D. and Engelmann, F. 2003. Cryopreservation of mango (*Mangifera indica* L.) embryogenic cultures. Cryoletters 24: 303-314.

Yap, L. V., Hor, Y. L. and Normah, M. N. 1998. Effect of sucrose preculture and subsequent desiccation on cryopreservation of alginate-encapsulated *Hevea brasiliensis* embryo. Proceedings of the IUFRO Seed Symposium 1998 "Recalcitrant seeds" Proceeding of the Conference; 1998 12-15 October 1998; Kuala Lumpur, Malaysia.

Yap, L. V., Noor, N. M., Clyde, M. M. and Chin, H. F. 2011. Cryopreservation of *Garcinia Cowa* shoot tips by vitrification: the effects of sucrose preculture and loading treatment on ultrastructural changes in meristematic cells. Cryoletters 32: 188-196.

Zhou, Q. N., Sun, A. H., Li, Z., Hua, Y. W., Jiang, Z. H., Huang, T. D., Dai, X. M. and Huang, H. S. 2012. Cryopreservation and plant regeneration of anther callus in *Hevea* by vitrification. African Journal of Biotechnology 11: 7212-7217.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962)

Stock	สารเคมี	ปริมาณสารที่ใช (มิลลิกรัมตอลิตร)
Stock1	NH_4NO_3	1,650
	KNO_3	1,900
	$CaCl_2.2H_2O$	440
	$MgSo_4.7H_2O$	370
	KH_2PO_4	170
Stock 2	H_3BO_3	6.2
	$MnSO_4.4H_2O$	22.3
	$ZnSO_4.7H_2O$	1.093
	KI	0.83
	$Na_2.MoO_4.2H_2O$	0.25
	$CuSO_4.5H_2O$	0.025
	$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Stock 3	Na_2-EDTA	37.25
	$FeSO_4.7H_2O$	27.85
Stock 4	Glycine	2
	Nicotinic acid	0.5
	Pyridoxine-HCl	0.5
	Thiamine-HCl	0.1
	Myoinocitol	100

วิธีการเตรียมสารละลาย cryopreservation

1. อาหารสูตร MS (Stock1, 2, 3, 4)
   Sucrose 0.3 M 51.34 กรัม

2. Plant Vitrification Solution Formula 2 (PVS2)
   Glycerol 30% (w/v)
   Ethylene glycol 15% (w/v)
   Dimethyl sulphoxide (DMSO) 15% (w/v)
   Sucrose 0.4 M
   pH 5.7
   ปรับปริมาตรด้วย MS basal medium (Stock 1, 2, 3)

3. Plant Vitrification Solution Formula 3 (PVS3)
   Glycerol 50%
   Sucrose 50%
   pH 5.7
   ปรับปริมาตรด้วย MS basal medium (Stock 1, 2, 3)

4. Loading Solution (LS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
   Glycerol 1 M
   Sucrose 0.8 M
   pH 5.7
   ปรับปริมาตรด้วย MS basal medium (Stock 1, 2, 3)

5. 3% Na-alginate ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
   Na-alginate 3%(v/w)
   Sucrose 0.4 M
   Ca-free MS basal medium (Stock 1-No $CaCl_2$, 2, 3)
   pH 5.7

6. 0.1M $CaCl_2$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

   MS basal medium

Sucrose	0.4 M	13.69 กรัม
$CaCl_2$	0.1 M	1.47 กรัม

   pH 5.7

7. Unloading solution

Sucrose	1.2 M

   pH 5.7

   ปรับปริมาตรด้วย MS basal medium (Stock 1, 2, 3)