รายงานโครงการวิจัย

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์หญ้าแฝกที่มีศักยภาพในการอนุรักษ์ดินและน้ำของภาคใต้

Germplasm Preservation of Vetiver Grass for Land and Water Conservation in the South

โดย

สมปอง เตชะโต

ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ

ภาควิชาพืชศาสตร์ **มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

คณะทรัพยากรธรรมชาติ **วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา**

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเก็บรักษาชิ้นส่วนเริ่มต้นในรูปแบบต่างๆ ในระยะปานกลาง และระยะยาวในไนโตรเจนเหลว ด้วยวิธีการต่างๆ แล้วนำมาชักนำการงอกในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ในสภาพปกติ พบว่า เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เซลล์ซัสเพนชัน ตลอดจนต้นอ่อนที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนที่ผ่านกระบวนการชะลอการเจริญเติบโตทุกวิธีการไม่สามารถที่จะพัฒนาให้ยอดใหม่ได้จึงใช้ปลายยอดที่ชักนำจากยอดรวมในหลอดทดลองเป็นวัสดุพืชเริ่มต้นในการเก็บรักษาอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ **การเก็บรักษาปลายยอดในอาหารเติมแมนนิทอลเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ให้อัตราความมีชีวิต 85% สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นๆ หลังจากเก็บรักษาในระยะปานกลาง 6 เดือนโดยไม่ต้องมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ และคาดว่าหากเก็บรักษาเป็นเวลา 1 ปีโดยไม่มีการเปลี่ยนถ่ายอาหารยังคงให้อัตรารอดชีวิตสูงกว่า 50% เมื่อพิจารณาการเก็บรักษาในระยะยาวในไนโตรเจนเหลว พบว่า** การ vitrification ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 75-120 นาที ให้อัตรารอดชีวิตของเซลล์หลังการเก็บรักษา 80-100% และอัตราการเจริญเป็นพืชต้นใหม่ในช่วง 1-4% ส่วนวิธีการดัดแปลงอื่นๆ หรือการใช้วิธีร่วมกันในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ให้อัตรารอดชีวิตของเนื้อเยื่อพืชสูงกว่า 50% แต่ไม่สามารถที่จะเจริญเป็นพืชต้นใหม่ได้ เมื่อนำต้นที่เก็บรักษาเชื้อพันธุ์มาขยายพันธุ์ในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณและตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางด้านชีวเคมีและโมเลกุลเครื่องหมาย random amplified polymorphic DNA (RAPD) พบว่ายังคงมีความสม่ำเสมอของปลายยอด หรือต้นอ่อนที่เก็บรักษาสูง และเหมือนกับต้นที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งไม่ผ่านการเก็บรักษา

Abstract

Germplasm conservation in medium and long term (in liquid nitrogen) of vetiver grass was carried out using various starting plant materials in combination with conserved methods. The results showed that conservation of embryogenic callus, suspension cells including somatic embryos induced from young leaf could not regenerate new shoots. So, shoot apices from multiple shoot (induced *in vitro*) were used as initial explant for conservation. In medium term, conserved shoot apices on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.5 mg/l ∝-naphthaleneacetic acid (NAA), 1 mg/l benzyladenine (BA) and 0.1 M mannitol resulted in the highest survival rate and regeneration of new shoots at 85% after culture for 6 months without subculture. It is suspected that after conservation shoot apices in this medium for 1 year survival rate or regeneration of new shoots will be more than 50%. In case of long term conservation in liquid nitrogen (LN), vitrification of the shoot apice in PVS2 for 75-120 min gave survival rate at 80-100%. However, recovery rate or regeneration frequency of a new shoot was very low at 1-4%. The other methods of apex preparation or combine methods gave survival rate at higher than 50%. Unfortunately, recovery of new shoot was not obtained. Conserved shoots, both in medium and long term, proliferated in proliferation medium were uniform and high fidelity after analysis by isozyme and random amplified polymorphic (RAPD) markers.

คำนำ

การขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะของหญ้าแฝกประสบผลสำเร็จในหลายห้องปฏิบัติการ และมีบทบาทสำคัญในการผลิตต้นกล้าปลูกในอนาคตในสภาพพื้นที่ลาดชันเพื่อการอนุรักษ์ดิน และน้ำ เนื่องจากเป็นเทคนิคการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ ดังนั้นการประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวเพื่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในหลอดทดลองหรือในสภาพปลอดเชื้อทำได้ง่ายทั้งในระยะสั้น ปานกลาง และระยะยาว วิธีการนี้จะช่วยแก้ปัญหาการกลายพันธุ์หหรือการสูญหายของพันธุ์อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม หลังจากเก็บรักษาแล้วหากต้องการขยายพันธุ์ก็สามารถทำได้อย่างรวดเร็วและทันที นอกจากนี้แล้วการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์หญ้าแฝกที่อาจเกิดขึ้นในอนาคตก็สามารถที่จะทำได้สะดวก เนื่องจากอยู่ในสภาพปลอดเชื้อจึงไม่มีความจำเป็นต้องกักกันที่ด่านกักกันพืชจนเกิดความเสียหายต่อหญ้าแฝก โครงการนี้ใช้เวลา 2 ปี และเป็นโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (กปร) ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช)

จากผลความสำเร็จเบื้องต้นในการเก็บรักษา/อนุรักษ์เชื้อพันธุ์ของหญ้าแฝก คาดว่าหญ้าแฝกพันธุ์ต่าง ๆ สามารถที่จะเก็บรักษาเชื้อพันธุ์หญ้าแฝกที่มีความสามารถในการปรับตัวและเจริญได้ดีต่อสภาพแวดล้อมของแต่ละพื้นที่ไว้ใช้ประโยชน์ในอนาคต หากต้องการใช้ประโยชน์ตอบสนองพระราชดำริ ก็สามารถเข้าสู่กระบวนการขยายพันธุ์หญ้าแฝกด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงในไบโอรีแอคเตอร์อย่างง่าย และรวดเร็วป้องกันการสูญพันธุ์

สมปอง เตชะโต
รองศาสตราจารย์
ภาควิชาพืชศาสตร์

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	4
บทคัดย่อ	2
Abstract	3
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	6
สถานที่ทำวิจัย	6
ระยะเวลาการทำวิจัย	6
ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัย	6
บทนำ	7
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	9
วิธีการศึกษา	11
การเก็บรักษาในระยะเวลาปานกลาง	11
การเก็บรักษาในระยะยาว (ในไนโตรเจนเหลว)	11
การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมหลังการเก็บรักษา	13
ผลการศึกษา	14
การเก็บรักษาในระยะเวลาปานกลาง	14
การเก็บรักษาในระยะยาว (ในไนโตรเจนเหลว)	18
การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมหลังการเก็บรักษา	25
เอกสารอ้างอิง	27

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีเซลล์ร่างกายให้เป็นต้นอ่อนโดยกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซิส และเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในรูปของโซมาติคเอ็มบริโอ/เอ็มบริออยด์ หรือเอ็มบริโอเจนิคเซลล์/แคลลัส
2. เพื่อพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในระยะปานกลาง และระยะยาวของหญ้าแฝก โดยก่อให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อยที่สุด

สถานที่ทำวิจัย

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก
ภาควิชาพืชศาสตร์
คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
หาดใหญ่ สงขลา

ระยะเวลาการทำวิจัย

2 ปี โดยเริ่มต้นในเดือน ตุลาคม 2547 และสิ้นสุดในเดือน กันยายน 2549

ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัย

1. ผลิตบัณฑิตปริญญาเอกในสาขาวิชาเอกพืชศาสตร์ที่มีความชำนาญพิเศษในเรื่องการขยายพันธุ์และเก็บรักษาเชื้อพันธุ์หญ้าแฝก ขณะนี้ประกอบธุรกิจส่วนตัวทางด้านการค้าพันธุ์ไม้ ในจังหวัดสงขลา
2. เผยแพร่ผลงานวิจัยในลักษณะของโปสเตอร์ ในงานมอ.วิชาการ (1 เรื่อง) และงานวันเกษตรแห่งชาติ (2 เรื่อง)
3. อนุรักษ์เชื้อพันธุ์หญ้าแฝก ป้องกันการสูญหายของพันธุ์ และการกลายพันธุ์อันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และหากต้นที่ได้จากการขยายพันธุ์อ่อนแอลงเมื่อไรก็พร้อมที่จะนำเชื้อพันธุ์ที่อนุรักษ์ไว้มาขยายทดแทนได้ทันที

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**

จากพระราชดำริตอนหนึ่งที่ว่า**หากดำเนินการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะต้องหมั่นหมุนเวียนกลับมาเริ่มจากต้นแม่พันธุ์เพราะหากขยายพันธุ์หลายช่วงต่อเนื่องกันมากเกินไปจะทำให้กล้าหญ้าแฝกอ่อนแอได้** ทั้งนี้เพราะความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่อาจเกิดขึ้นในหลอดทดลองซึ่งมีสาเหตุมาจากสารควบคุมการเจริญเติบโต สภาพแวดล้อมการเพาะเลี้ยงที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซมหรือยีโนไทป์แล้วทำให้ฟีโนไทป์ที่แสดงออกมาเปลี่ยนแปลงไป แม้ว่าจะมีการเก็บรักษาพันธุกรรมในแปลงปลูก หรือในสภาพธรรมชาติโดยกรมพัฒนาที่ดิน หรือหน่วยงานอื่นๆ ของรัฐ แต่มีความเสี่ยงต่อการกลายพันธุ์สูงอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมที่รุนแรง (น้ำท่วม แห้งแล้ง เป็นต้น) นอกจากนี้การเก็บรักษาด้วยวิธีดังกล่าวต้องใช้พื้นที่มาก เสียค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาสูง ในกรณีที่ต้องมีการรื้อแปลงปลูกเพื่อเก็บใหม่ทำให้มีความยุ่งยากเสี่ยงต่อการสูญเสียพันธุกรรมอีกด้วย ดังนั้นการเก็บรักษาพันธุกรรมของหญ้าแฝกที่มีพันธุกรรม (ระบบราก) หรือโคลนที่ดีร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดทดลองในสภาพต่างๆ โดยเฉพาะในไนโตรเจนเหลวช่วยป้องกันการ

เปลี่ยนแปลงพันธุกรรม และสามารถที่จะนำมาใช้เป็นวัสดุพืชเริ่มต้นเพื่อการขยายพันธุ์อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป ไม่ต้องไปเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงตั้งแต่ขั้นต้นใหม่

การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

การเก็บรักษาพันธุกรรมของพืชทำได้ในระยะสั้น ปานกลาง ถึงระยะเวลาที่ยาวนาน ในระยะเวลสั้นถึงปานกลางนั้นทำโดยการชะลอการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชในสภาพปลอดเชื้อภายในหลอดทดลองในอาหารสูตรดัดแปลงที่ลดองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยง หรือร่วมกับการเติมสารชะลอการเจริญเติบโต หรือเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ12-25^{o}ซ (Maruyama *et al.,*1997)หรือดัดแปลงโดยใช้สารออสโมติคัมเช่นซอร์บิทอล (Ford *et al.,* 2000) ที่มีผลต่อการดูดน้ำและธาตุอาหารได้ช้าลง ปัจจุบันการเก็บรักษาพันธุกรรมของพืชที่มีประสิทธิภาพไม่มีการเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรม คือวิธี cryopreservation (Bajaj, 1995; Sakai, 1995; Towill, 1990 อ้างโดย Pennycooke and Towill, 2000) ซึ่งเป็นวิธีการเก็บไว้ไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ –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 จนถึงปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาการเก็บรักษา

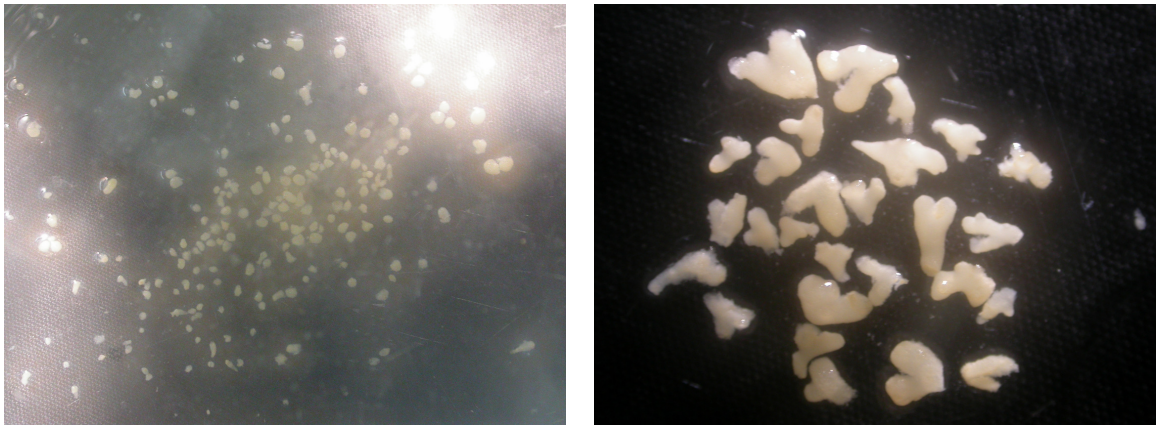
เชื้อพันธุ์หญ้าแฝก คงมีเพียงรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าแฝก (คณะทำงานวางผังแม่บทการพัฒนาและรณรงค์การใช้หญ้าแฝก, 2536; Leupin *et al.,* 2000 Prasertsongskun, 2003;) และจากผลสำเร็จของการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่เกี่ยวกับเพศ (ช่อดอก) และชิ้นส่วนที่ไม่เกี่ยวกับเพศ (หน่อ และใบอ่อนที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง) ช่วยให้การใช้วัสดุดังกล่าวเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อเป็นไปได้สูง และแม้ว่ายังไม่มีรายงานการชักนำกระบวนการโซมาติคเอ็มบริโอเจนิซิสจากการเพาะเลี้ยงหญ้าแฝกก็ตาม แต่การใช้ compact callus ซึ่งภายในมีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด (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 แล้วจึงนำของเหลวที่ได้เทใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟปั่นเหวี่ยงด้วยไมโครเซน

ตริฟิวก์ที่ 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 และเก็บรักษาไว้ในสารละลายบัเฟอร์ 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 ส่วนการเลี้ยงที่

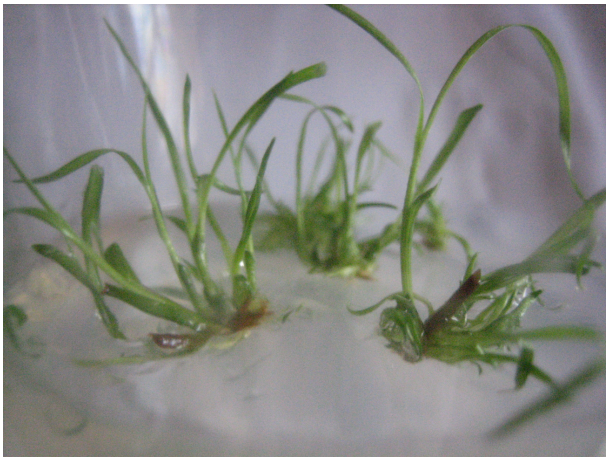
อุณหภูมิต่ำ หรือการให้สารชะลอการเจริญเติบโตเป็นต้นสามารถชะลอการเจริญเติบโตได้ภายในเวลา 12 เดือน (1ปี) โดยอัตราการรอดชีวิตและการพัฒนาให้ยอดใหม่ดังนี้คือ

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 องศาเซลเซียสเป็นเวลาต่างๆ 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) ความเข้มข้นต่างๆ 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

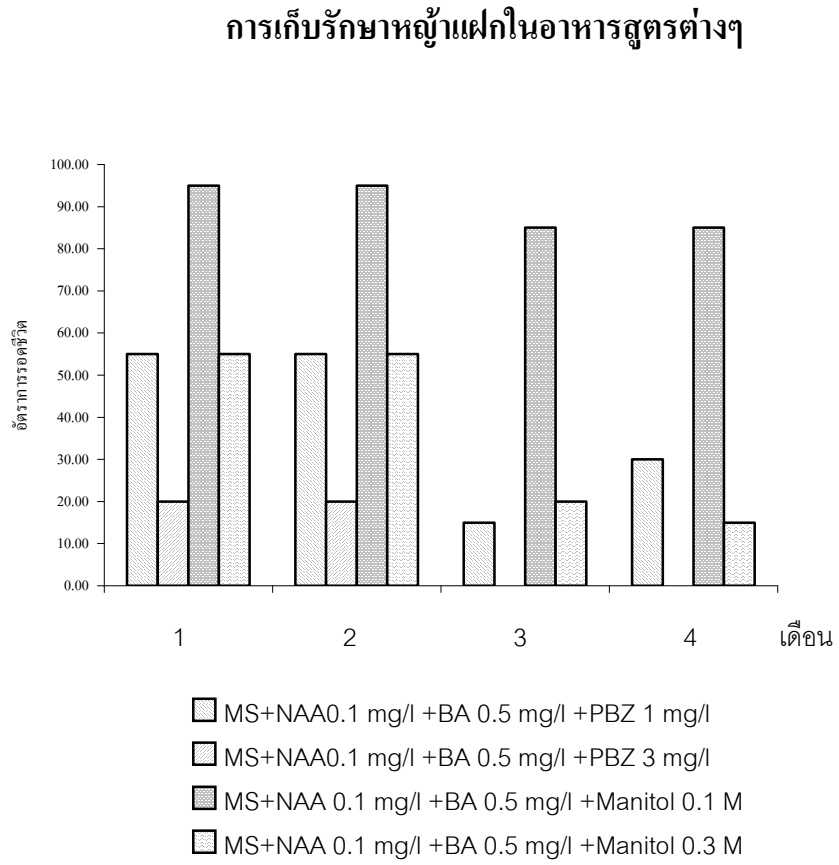
สารชะลอการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น	ความมีชีวิต (%)	จำนวนยอดเฉลี่ย
ชุดควบคุม	0	100	>50
Mannitol (M)	0.1	85	6.5
	0.3	15	3.5
PBZ (มก/ล)	1	30	2.5
	3	0	0

ตารางที่ 3 ผลของสารชะลอการเจริญเติบโตต่ออัตรารอดชีวิตและการสร้างยอดรวมหญ้าแฝกเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลาต่างๆ 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)



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

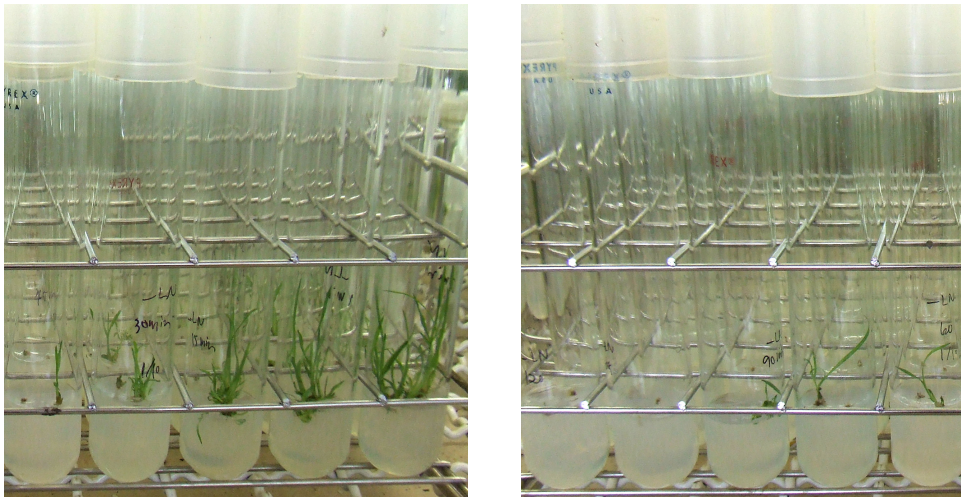
ในการศึกษานี้นำต้นอ่อน ปลายยอด (2-3 มม) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมาแช่ในสารละลาย PVS2 ซึ่งประกอบด้วย glycerol 30% ethylene glycol 15% DMSO 15% และ sucrose 0.4 M ปริมาตร 1.5 มล.ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาต่าง ๆ (0-120 นาที) หลังจากนั้นแบ่งชิ้นส่วนพืชเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 นำไปทดสอบอัตราการรอดชีวิต และการสร้างยอดรวม 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)

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

ตัดปลายยอดหญ้าแฝกแล้ว 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

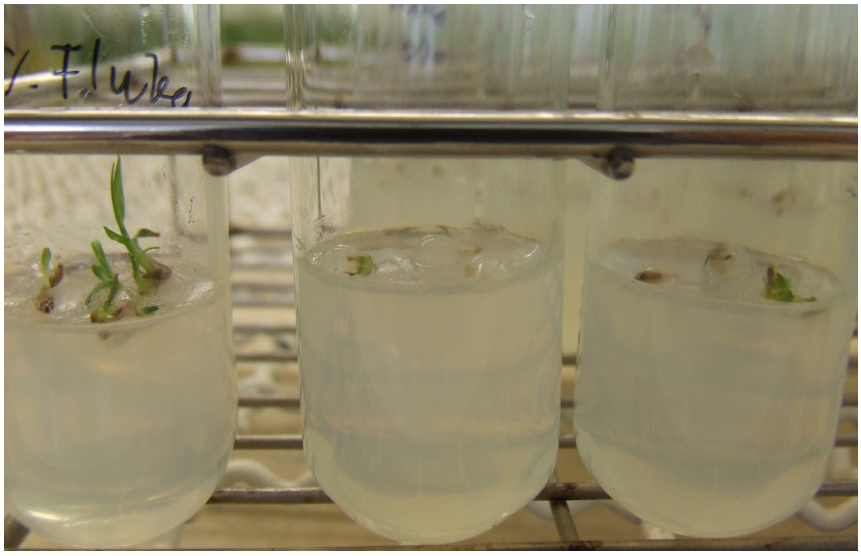
ความเข้มข้น (%)	อัตรารอดชีวิต (%)		
	Sigma	Wako	Fluka
1	60 (0.5)	40 (0.25)	50 (0.6)
2	50 (0.8)	40 (0.00)	40 (0.75)
3	70 (0.57)	30 (0.33)	40 (0.5)
4	60 (0.5)	80 (0.13)	30 (0.33)

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. จุ่มแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 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)

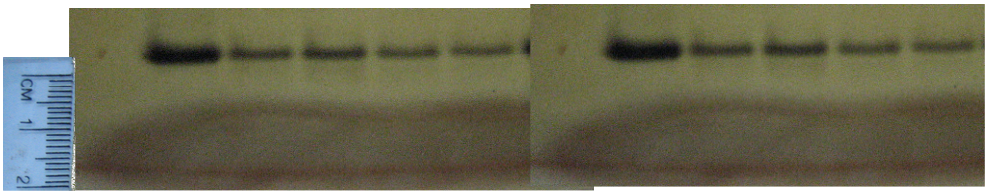
ตารางที่ 11 ผลของอัตราส่วนของชิ้นส่วนพืชต่อ Extraction buffer ต่อจำนวนโซนของไอโซไซม์ที่ย้อมด้วยระบบเอนไซม์ 2 ระบบ

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

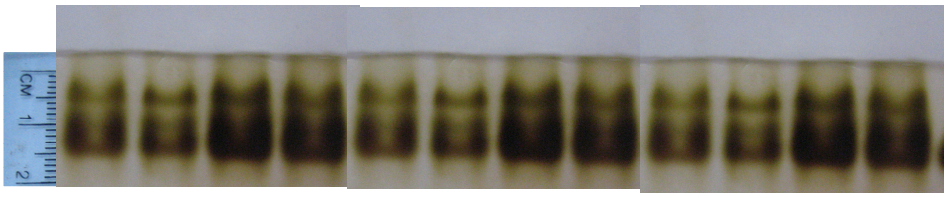
หมายเหตุ : PER : เปอร์ออกซิเดส EST : เอสเตอเรส

+++ : ติดสี และแยกแถบสีได้ชัดเจน ++ : ติดสี และแยกแถบสีได้ปานกลาง

+ : ติดสี ชัดเจนน้อย หรือเป็นปื้น - : ไม่ติดสี



ก

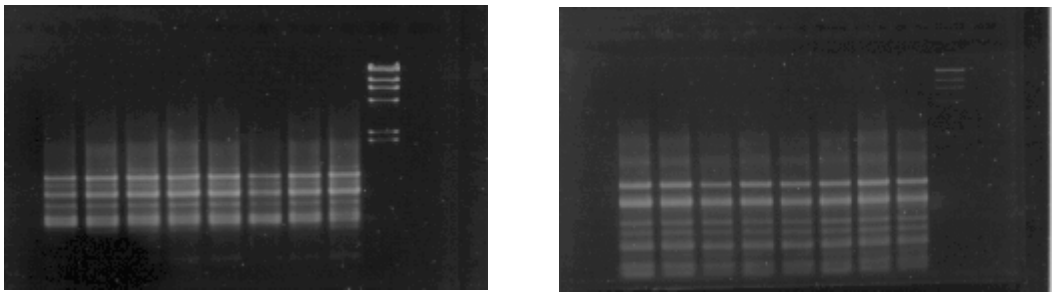


ข

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

เอกสารอ้างอิง

คณะทำงานวางแผนแม่บทการพัฒนาและรณรงค์การใช้หญ้าแฝก. 2536. แผนแม่บทการพัฒนาและรณรงค์การใช้หญ้าแฝกอันเนื่องมาจากพระราชดำริ. กองแผนงาน กรมพัฒนาที่ดิน หน้า 124-132.

มงคล แซ่หลิม สมปอง เตชะโต และ สุธีรา ถาวรรัตน์. 2546. การเจริญของส้มจุกบนต้นตอลูกผสมส้มสามใบที่ได้จากเพาะเมล็ดและปักชำกิ่ง. ว. สงขลานครินทร์. 25:715-727.

สมปอง เตชะโต วันทนา นวรังสรรค์ และมงคล แซ่หลิม. 2538. การตรวจสอบ *Lansium domesticum* Correa. โดยเทคนิคไอโซไซม์. ว. สงขลานครินทร์. 17:355-361.

Bajaj, Y.P.S. 1995. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. *In* Biotechnology in Agriculture and

Forestry : Cryopreservation of plant germplasm 1 (ed. Y.P.S. Bajaj) Vol. 32, pp 3-28. Berlin :Springer-Verlag

Ford, C.S., Jones, N.B. and Staden, J.V. 2000. Cryopreservation and plant regeneration from somatic embryos of *Pinus patula*. Plant Cell Reports 19: 610–615.

Grzebelus, D., Baranski, R., Kotlinska, T. and Michalik, B. 2002. Assessment of genetic diversity in a carrot (*Daucus carota* L.) germplasm collection. Plant Genetic Resources Newsletter 130:51-53.

Hirai, D. and Sakai, A. 1999. Cryopreservation of *in vitro*-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification. Plant Cell Reports 19: 150-155.

Lambardi, M., Fabbri, A. and Caccavale, A. 2000. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips. Plant Cell Reports 19:213-218.

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

Maruyama, E., Kinoshita, I., Ishii, K. and Ohba, K. 1997. Germplasm conservation of the tropical forest trees, *Cedrele odoratal*.,*Guazum crinita* Mart. and *Jacaranda minosaeflia* D. Don. by shoot tip encapsulation in calcium–alginate and storage at 12-25°C. Plant Cell Reports 16: 393 – 396

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

Niino, T., Tashiro, K., Suzuki, M., Ohuchi, S., Magoshi, J. and Akihama,T. 1997. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification. Scientia Horticulture 70: 155-163.

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 8: 768-774.

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

Prasertsongskun, S. 2003. Plant regeneration from callus of vetiver (*Vetiveria zizanioides* Nash). Songklanakarin J. Sci. Technol. 25:637-642.

Sakai, A. 1995. Cryopreservatio of germplasm of woody plants. *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry: Cryopreservation of Plant Germplasm 1. (ed. Y.P.S. Bajaj) Vol. 32, pp 53-69. Berlin Heidelberg Germany:Springer-Verlag.

Santos, I.R.I. and Stushnoff, C. 2002. Cryopreservation of embryonic axes of *Citrus* species by encapsulation-dehydration. Plant Genetic Resources Newsletter 131:36-41.

Sayamanonta, R. 1996. Vetiver grass and the Doi Tung development project. Proceedings of the First International Conference on Vetiver a Miracle Grass (eds. N. Chomchalow and H.V.Henle, 1998) pp. 41-43, The Chaipattana Foundation, Bangkok.

Shasany, A.K., Srivastava, A., Bahl, J.R., Shama, S., Kumar, S. and Khanuja, S.P.S. 2002. Genetic diversity assessment of *Mentha spicata* L. germplasm through RAPD analysis. Plant Genetic Resources Newsletter 130:1-5.

Shibli, R.A., Haagenson, D.M., Cunningham, S.M., Berg, W.K. and Volenec, J.J. 2001. Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sative* L.) cells by encapsulation-dehydration. Plant Cell Reports 20: 445-450.

Suebsiri, B. 1996. The use of vetiver hedge in soil and water conservation system under the Royal Project Foundation. Proceedings of the First International Conference on Vetiver a Miracle Grass (eds. N. Chomchalow and H.V.Henle, 1998) pp. 27-29, The Chaipattana Foundation, Bangkok.

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

Te-chato. 2000. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in somaclones of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Thai J. Agric. Sci. 33:137-145.

Te-chato, S., Lim, M. and Masahiro, M. 2000. Diversity of *Garcinia* spp. And interspecies relationships by DNA analysis. *In* Integration of Biodiversity and Genome Technology for Crop Improvement (eds. K. Oono, T. Komatsuda, K. Kadowaki and D. Vaughan) pp 63-68. Tsukuba: Japan.

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

Vandenbussche, B., Weyens, G. and De Proft, M. 2000. Cryopreservation of *in vitro* sugar beet (*Beta vulgaris* L.) shoot tips by a vitrification technique. Plant Cell Reports 19: 1064-1068.

Uma, S., Selvarajan, S., Sathiamoorthy, S., Kumar, A.R. and Durai, P. Evaluation of banana germplasm for the leaf industry and for suitability to different growing environments in India. Plant Genetic Resources Newsletter 134:26-32.

Vietmeyer, N. D. 1996. Organizing vetiver's next steps to global acceptance. Proceedings of the First International Conference on Vetiver a Miracle Grass (eds. N. Chomchalow and H.V.Henle, 1998) pp. 18-26, The Chaipattana Foundation, Bangkok.