บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

เอื้องแซะหลวง หรือเอื้องแซะเป็นกล้วยไม้ป่าพื้นเมืองของไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dendrobium scabrilingue* Lindl. (อบฉันท์, 2546) มีชื่อพ้องว่า *Dendrobium gulactanthum* Schlechter., *Dendrobium hedyosmum* Bateman. รวมไปถึง *Dendrobium alboviride* Parish. (Baker and Charles, 1996) จัดอยู่ในวงศ์ของกล้วยไม้ Orchidaceae อยู่ใน Subfamily Epidendroideae tribe Calypsoeae, Subtribe Dendrobiinae (Schuiteman and Vogel, 2000) และจัดอยู่ใน section *Nigrohirsutae* มีลักษณะเด่นคือ ดอกมีกลิ่นหอมและมีขนสีน้ำตาลหรือสีดำตามกาบใบ (ระพี, 2516) เขตการกระจายพันธุ์พบในประเทศ พม่า, ลาว และไทย บริเวณพื้นที่ที่สูงจากระดับน้ำทะเล 2000-4000 ฟุต (610-1220 เมตร) (Baker and Charles, 1996) แหล่งที่พบในประเทศไทย ภาคเหนือพบที่จังหวัดแม่ฮ่องสอน จังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดตาก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบตามป่าดิบแล้งและป่าสน ส่วนในภาคตะวันออกพบที่จังหวัดตราดบริเวณมีที่ความสูงจากระดับน้ำทะเล 1,000 เมตรขึ้นไป (อบฉันท์, 2546)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเอื้องแซะหลวง

ลำต้น ต้นหรือลำลูกกล้วยของเอื้องแซะสูงประมาณ 10 - 20 เซนติเมตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้น 0.6 – 1 เซนติเมตร ผิวของลำต้นเป็นร่องตื้นๆตามความยาวของลำ มีขนสีดำสั้นละเอียดตามลำต้น (อบฉันท์, 2546)

ราก ระบบรากเป็นแบบรากกึ่งอากาศ(semi-epiphytic) (Baker and Charles, 1996)

ใบ ใบยาวประมาณ 8 เซนติเมตร กว้างประมาณ 1.5 เซนติเมตร มีสีเขียวอมเหลืองเล็กน้อยหรือสีเขียวอ่อน ปลายใบเว้าเฉียง กาบใบมีขนสีดำรวมไปถึงใต้แผ่นใบ (ระพี, 2516)

ดอก ดอกมีขนาด 2-3 เซนติเมตร กลีบดอกมีสีขาว กลีบนอกและกลีบในยาวพอๆกันหรือกลีบนอกอาจยาวกว่าเล็กน้อย ปากมี 3 แฉกเห็นได้ชัดเจน หูปากทั้งสองข้างตั้งปลายแหลม พื้นสีขาวมีเส้นสีเขียวขนานกันถี่ๆ แผ่นปากใบมีสีเหลืองหรือเหลืองอมเขียว ดอกจะออกใกล้ๆปลายลำ มีดอก 1-3 ดอก ดอกจะบานลู่ไปด้านหน้า แต่ปลายกลีบผายบานออก เมื่อดอกบานนานหลายวันจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมแสด ดอกมีกลิ่นหอม (ระพี, 2516)

ฝัก มีลักษณะเป็นรูปรี หัวท้ายมน ตัวฝักเกือบกลม ด้านหนึ่งของฝักจะโค้งเป็นครึ่งวงกลม ส่วนอีกด้านจะโค้งน้อยกว่าจนเกือบตรง ขนาดฝักเฉลี่ย 1.3 เซนติเมตร มักพบจุดสีน้ำตาลเล็กๆประปรายบนฝัก (ลักขณา และ เบ็ญจา, 2545)

เมล็ด มีรูปร่างค่อนข้างไปทางทรงกระบอก ด้านปลายมน ด้านโคนส่วนที่ติดกับรก (placenta) เล็กกว่าส่วนกลางเพียงเล็กน้อย ปลายตัดตรง เปลือกหุ้มเมล็ดบางใส เป็นร่างแหเห็นได้ชัดในเมล็ดแก่ ส่วนเมล็ดอ่อนจะเห็นเพียงเส้นตามยาวและบิดเอียง คัพภะมีสีเหลือง ในเมล็ดอ่อนจะเห็นเป็นแถบสีเหลืองยาวเรียวและมีขนาดใหญ่ขึ้นตามลำดับจนปรากฏเป็นรูปกลมรีในเมล็ดแก่เต็มที่ สีของคัพภะจะเหลืองเข้มขึ้นตามลำดับ มีขนาดความกว้างเฉลี่ย 23.52 ± 0.72 ไมครอน ในหนึ่งฝักมีเมล็ดเฉลี่ย 51,673 ± 647 เมล็ด (ลักขณา และ เบ็ญจา, 2545)

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ

การเก็บรักษาพันธุ์หรือการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชนั้นเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุ์พืช โดยปกตินั้นการเก็บรักษาพันธุ์พืชส่วนใหญ่จะเป็นการเก็บในรูปของเมล็ดพันธุ์พืช แต่เมล็ดพันธุ์บางชนิดมีอายุสั้นไม่สามารถเก็บรักษาได้นานแม้ว่าจะเก็บในอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ ในขณะเดียวกันนั้นพันธุกรรมพืชอาจเกิดการสูญหายและเสี่ยงต่อการกลายพันธุ์ได้ Razdan (1994) กล่าวว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการหนึ่งที่นำมาประยุกต์ใช้กับงานด้านการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืช ซึ่งมีข้อดี คือ ใช้พื้นที่น้อย ปราศจากโรคและแมลง สามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากในเวลาอันสั้น การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อนั้นสามารถรักษาความมีชีวิตไว้ได้นานและสามารถใช้เก็บรักษาจากส่วนต่างๆได้ ไม่ว่าจะเป็น โปร โตพลาสต์ เซลล์แขวนลอย ละอองเกสร อับเรณู แคลลัส เนื้อเยื่อ เอมบริโอ เมล็ด และส่วนอวัยวะต่าง ๆ ของพืช (รังสฤษดิ์, 2545)

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ สามารถแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบคือ

1. การชะลอการเจริญเติบโต (slow growth technique) การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้เป็นการเก็บรักษาในระยะเวลาสั้นหรือปานกลาง Ashmore (1997) รายงานว่าสามารถขยายช่วงเวลาการย้ายเลี้ยง (subculture) ออกไปได้ 1- 4 ปีในพืชหลายชนิด วิธีการลดการเจริญเติบโตสามารถทำได้หลายวิธีเช่นโดยวิธีการลดอุณหภูมิ การลดสภาพแสงในการเพาะเลี้ยง การดัดแปลงสภาพบรรยากาศ การปรับแต่งอาหารเพาะเลี้ยงและโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพิ่มตัวยับยั้งการออสโมซิส (osmosis) สำหรับการเพิ่มตัวยับยั้งการออสโมซิสในอาหารเพาะเลี้ยงนั้น สามารถทำได้โดยการเติมน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง เช่นแมนนิทอล (mannitol) (รังสฤษดิ์, 2545) เนื่องจากแมนนิทอลที่มีความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้พืชเกิดความเครียดอันเนื่องมาจากการออสโมซิสจึงมีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโต ดังรายงานของ Lopez *et al.* (1998) ทำการทดลองโดยใช้แมนนิทอล 4 เปอร์เซ็นต์และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสในการลดการเจริญเติบโตของมันฝรั่ง พบว่าสามารถขยาย

เวลาในการเปลี่ยนอาหารออกไปได้ 8 เดือนหรืออาจจะมากกว่า 12 เดือน ซึ่งโดยปกตินั้นมันฝรั่งต้องทำการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงทุก 4 ถึง 8 สัปดาห์ เนาวรัตน์ (2547) ศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของแมนนิทอลที่เหมาะสมในการชะลอการเจริญเติบโตของเอื้องแซะ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์สามารถชะลอการเจริญเติบโตทางความสูง ในรายงานของ Yong *et al.* (2000) ได้ทดลองความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Rehmannia glutinosa* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งในตระกูล Scrophulariaceae ทำการทดลองโดยใช้ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0, 15 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นการเจริญเติบโตจะลดลง อีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการปรับแต่งสูตรอาหารก็คือ การใช้สารชะลอการเจริญเติบโต ดังรายงานของ Chung *et al.* (1999) ได้ทดสอบสารชะลอการเจริญเติบโตกับกล้วยไม้ *Bletilla striata* โดยใช้สารชะลอเจริญการเติบโต 4 ชนิด คือ Uniconazole, Paclobutrazol, Ancymidol และ *N*-dimethyl succinamic acid เติมลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าสารทั้ง 4 ชนิด สามารถลดการเจริญเติบโตของ *Bletilla striata* ได้แต่สาร Uniconazole ส่งผลให้รูปร่างของใบมีลักษณะผิดปกติ เช่นเดียวกันในปีถัดมา Jee *et al.* (2000) ได้ทำการทดลองเพื่อทดสอบความสามารถในการชะลอการเจริญเติบโตของสาร Uniconazole, Paclobutrazol และ ancymidol กับ *Bletilla striata* พบว่า Paclobutrazol ความเข้มข้น 0.4-0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้นเหมาะสำหรับการลดการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามวิธีการเก็บรักษาด้วยวิธีนี้เหมาะสำหรับการเก็บส่วนปลายยอดและต้นที่ชักนำ(plantlets) แล้วเท่านั้น

2. การเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยเทคนิคเมล็ดเทียม (artificial seed technique) เมล็ดเทียมเป็นการเรียกเอมบริออยด์หรือชิ้นส่วนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่เอมบริออยด์เช่น ปลายยอด ปลายราก ตาข้าง และแคลลัส ที่เคลือบด้วยสารที่ทำให้เกิดเจลทำให้มีลักษณะคล้ายกับเมล็ดจริง (Senaratna, 1992) การเก็บรักษาด้วยเทคนิคเมล็ดเทียมนี้เป็นอีกวิธีการหนึ่งเพื่อทดแทนการเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อที่ต้องมีการเปลี่ยนอาหารไปตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา อีกทั้งการเก็บรักษาในรูปของเซลล์แขวนลอย หรือแคลลัส จะมีการพัฒนาเป็นต้นพืชได้ในระดับต่ำ และอาจเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ที่ส่งผลให้เกิดจากการกลายพันธุ์เฉพาะจุด การขาดหายของยีน การเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม หรืออาจเกิดการสูญหายของโครโมโซมบางส่วนหรือทั้งหมด (Grout, 1995) การสูญเสียความตรงตามพันธุ์ซึ่งเกิดจากการผันแปรทางพันธุกรรมไปตามระยะเวลาในการเก็บรักษาที่เพิ่มมากขึ้น (Engelmann, 1991) เมล็ดเทียมจะทำหน้าที่เสมือนเปลือกหุ้มเมล็ด(seed coat) เพื่อป้องกันอันตรายให้แก่เอมบริโอที่อยู่ภายใน (Redenbaugh, 1990) โดยการใช้สารที่ทำให้เกิดเจล เช่น สารอัลจิเนต วุ้น อกาโรส และเจลลาติน นำมาเคลือบชิ้นส่วนของพืช แต่พบว่าสารอัลจิเนตนั้นสามารถทำให้เกิดเป็นแคปซูลและทำให้เอมบริออยด์ยังคงความมีชีวิตได้ดีกว่าชนิดอื่น

นอกจากนี้เมล็ดเทียมยังสามารถใช้เป็นแหล่งของอาหารสะสม เช่น ธาตุอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และองค์ประกอบอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการงอก การเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นอ่อนได้อีกด้วย (Redenbaugh *et al.*, 1987) อีกทั้งยังสามารถผลิตได้จำนวนมากโดยไม่จำกัดช่วงเวลาการผลิต (Ashmore, 1997) แต่ก็มีข้อควรระวังคือ เนื่องจากเมล็ดเทียมมีลักษณะเป็นรูพรุน ทำให้สูญเสียธาตุอาหารที่ละลายน้ำไปก่อนที่รากและยอดจะงอกออกมา อีกทั้งยังแห้งได้ง่ายเมื่อได้รับอากาศจึงทำให้เก็บรักษาได้เพียงระยะเวลาสั้น ๆ ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการระเหยน้ำออกจากอัลจิเนต เพื่อให้มีสภาพกับเหมือนเมล็ดจริง (Redenbaugh *et al.*, 1987) ส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารอัลจิเนตที่ใช้ในการเคลือบนั้นปัจจุบันใช้สารโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรตความเข้มข้น 100 มิลลิโมล โดยใช้เป็นระยะเวลา 30 ถึง 40 นาที (Malemnganba *et al.*, 1996)

Ghosh and Sen (1994) ทดลองเคลือบเอมบริออยด์ของ *Asparagus cooperi* Baker. ด้วยสารอัลจิเนตและทำการเก็บรักษาเมล็ดเทียมไว้ที่อุณหภูมิ 2 และ 4 องศาเซลเซียส พบว่าการเก็บรักษาเมล็ดเทียมที่ 2 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลานาน 15 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดเทียม 28.30 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บรักษาไว้ระยะเวลานาน 60 และ 90 วัน เปอร์เซ็นต์ความงอกลดลงเหลือ 12.30 และ 8.30 เปอร์เซ็นต์ และการเก็บรักษาเมล็ดเทียมที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลานาน 15, 60 และ 90 วัน เมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 30.3, 14.6 และ 11.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในปีถัดมา Piccioni and Standardi (1995) ทดลองเคลือบตาของพืช 6 ชนิด ได้แก่ แอปเปิ้ล, กีวี, Birch, Hawthorn, แบล็คเบอร์รี่ และราสเบอร์รี่ด้วยสารอัลจิเนต จากนั้นนำเมล็ดเทียมที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารที่มีธาตุอาหารและไม่มีธาตุอาหารเพื่อเปรียบเทียบกัน พบว่าเมล็ดเทียมของพืชทั้ง 6 ชนิดสามารถเจริญได้เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารที่มีธาตุอาหารเท่านั้น ส่วน Sushmita et al. (1998) ทำการทดลองเคลือบโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่ได้จากการผสมระหว่าง *Phalaenopsis* cv. Jane และ *Phalaenopsis* cv. Abrae ด้วยสารโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต 100 และ 200 มิลลิโมล จากนั้นนำเมล็ดเทียมที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 2, 3 และ 8 สัปดาห์ ทำการย้ายเมล็ดเทียมลงเลี้ยงบนอาหาร พบว่าการพัฒนาของเมล็ดเทียมที่ใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต 100 มิลลิโมล ให้ผลที่ดีที่สุด ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสามารถช่วยให้เมล็ดเทียมงอกได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและเมล็ดเทียมทุกเมล็ดสามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชได้ แต่อย่างไรก็ตามอัตราการงอกจะลดลงเมื่อทำการเก็บรักษาในระยะเวลาที่ยาวนานออกไป ในปีเดียวกัน Devi *et al.* (1998) ทดลองใช้โปรโตคอร์มของ *Agrostophyllum myrianthum* , *Cymbidium longifolium* , *Phaius tankervilliae* และ *Renanthera imschootiana* ที่มีอายุ 60-70 วัน ทำการเคลือบด้วยสาร

โซเดียมอัลจิเนตและเลี้ยงบนอาหารสูตร Nitch ที่มี IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโปรโตคอร์มที่ไม่ได้ทำการเคลือบก็ทำเช่นเดียวกัน โปรโตคอร์มที่เคลือบจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง, 4 และ -20 องศาเซลเซียส พบว่าโปรโตคอร์มทั้ง 4 ชนิดที่ทำการเคลือบสามารถกลับมาเจริญเติบโตได้ดีกว่าโปรโตคอร์มที่ไม่ได้เคลือบ โปรโตคอร์มที่เคลือบและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องสามารถเจริญเติบโตได้ภายใน 35-40 วัน ส่วนโปรโตคอร์มที่เคลือบและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 200 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความรอดชีวิตถึง 70 เปอร์เซ็นต์ แต่โปรโตคอร์มที่เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสภายหลังการเก็บรักษาไม่สามารถรอดชีวิตทั้งหมด ในปีถัดมา Datta *et al.* (1999) ทดลองเคลือบโปรโตคอร์ม *Geodorum densiflorum* ที่มีอายุ 30 วัน ด้วยสารโซเดียมอัลจิเนต และทดสอบความงอกโดยการเลี้ยงบนอาหารสูตร Modified Knudson C โดยเพิ่มน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์, peptone 2 กรัมต่อลิตร, BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมล็ดเทียมที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 120 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความงอกถึง 88 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโปรโตคอร์มที่ไม่ได้เคลือบนั้นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ภายหลังจากเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะ 30 วัน ในปีถัดมา Munu *et al.* (2002) ได้ทดลองเคลือบโปรโตคอร์มของ *Vanda coerulea* ที่มีอายุ 40 วัน ด้วยโซเดียมอัลจิเนตและนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 120 วัน จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ส่วนโปรโตคอร์มที่ไม่ได้เคลือบเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 30 วันจากนั้นย้ายลงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เช่นเดียวกัน พบว่าโปรโตคอร์มที่เคลือบนั้นสามารถงอกได้ 80 เปอร์เซ็นต์ภายหลังจากการเลี้ยงบนอาหารเป็นระยะเวลา 15-20 วัน สำหรับโปรโตคอร์มที่เคลือบและเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 120 วัน มีเปอร์เซ็นต์ความงอก 72 เปอร์เซ็นต์ และที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วน โปรโตคอร์มที่ไม่ได้เคลือบและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องกับที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 30 วันโปรโตคอร์มทั้งหมดไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

3. การเก็บรักษาแบบแช่แข็งหรือการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation) การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชโดยการเปลี่ยนถ่ายอาหารจำเป็นต้องทำอย่างสม่ำเสมอและต่อเนื่องซึ่งสิ้นเปลืองแรงงานและค่าใช้จ่าย การเก็บเนื้อเยื่อพืชไว้ในอุณหภูมิต่ำมากๆดังเช่นอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสของไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) (Withers, 1985) เป็นการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง ซึ่งหยุดกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ของพืช ไม่มีการแบ่งเซลล์และไม่มีกระบวนการทางเมตาบอลิซึมต่างๆเกิดขึ้นคล้ายกับการพักตัวของเมล็ด ในทางทฤษฎีนั้นเนื้อเยื่อ

ของพืชจะคงสภาพนั้นไปตลอดกาล และเมื่อนำออกสู่สภาวะปกติเซลล์ต่างๆจะยังมีชีวิต สามารถแบ่งเซลล์ มีการเจริญเติบโตและมีการพัฒนาเป็นต้นพืชได้ตามปกติ (Ashmore, 1997)

ซึ่ง Erica (1994) รายงานว่ากระบวนการเก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยทั่วไป สามารถแบ่งออกเป็น 5 วิธีการดังนี้ 1) การปรับสภาพเนื้อเยื่อ (pre-growth) เพื่อที่จะทนต่อสภาพความเครียด เช่น การเติม proline, trehalose, abscisic acid หรือแม้แต่การเติม DMSO (dimethysulfoxide) 1-5 เปอร์เซ็นต์ ช่วยให้เนื้อเยื่อปลายยอดสามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ดีขึ้น 2) การปรับสภาพเนื้อเยื่อให้ทนต่อการแข็งตัว (cryoprotective treatment) ซึ่งอาจเป็นการทำให้เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำ (dehydration) เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำในเซลล์เกิดการแข็งตัวขณะที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว อาจทำโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง การใช้สารดูดความชื้น การใช้ลมจากตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (flow cabinet) เพื่อลดปริมาณน้ำในเซลล์ หรืออีกวิธีการหนึ่งคือ การเติมสารเคมีที่มีความเข้มข้นสูง (cryoprotectants) เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำภายในเซลล์เกิดการแข็งตัวเนื่องจากสารเคมีทำให้ของเหลวภายในเซลล์มีสภาพความเข้มข้นสูง เซลล์จึงไม่แตกขณะที่ทำการแช่แข็ง เรียกวิธีการนี้ว่า Vitrification 3) การแช่แข็งและการเก็บรักษา (freezing) กระบวนการนี้อาจนำเนื้อเยื่อแช่ในไนโตรเจนเหลวทันทีหรืออาจใช้วิธีการค่อยๆลดอุณหภูมิก่อนจนถึงระดับหนึ่งแล้วจึงเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวต่อไป 4) การละลายตัวหลังการเก็บรักษา (thawing) ทำโดยการนำเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาที่อยู่ภายในหลอดทดลองแช่แข็ง (cryovial) ละลายด้วยน้ำสะอาดปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส 5) การชักนำให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตคืนสู่สภาพปกติ (recovery) การทำให้เนื้อเยื่อพืชสามารถกลับสู่ภาวะปกติคือ เนื้อเยื่อพืชยังมีชีวิต สามารถแบ่งเซลล์และมีการเจริญเติบโตเป็นต้นพืชได้ตามปกติ

3.1 การเก็บแบบแช่แข็งโดยวิธี Dehydration การเก็บรักษาด้วยวิธีการนี้เป็นการลดปริมาณน้ำในเซลล์ เพื่อการป้องกันไม่ให้น้ำในเซลล์ของเนื้อเยื่อพืชนั้นเกิดการแข็งตัวในขณะที่ทำการเก็บรักษา สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การผึ่งให้เซลล์แห้ง การใช้สารดูดความชื้น รวมไปถึงการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (อารีย์, 2541) น้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นสูงมีผลต่อแรงดันออสโมติกของเซลล์โดยการทำให้เซลล์สูญเสียน้ำแต่เซลล์ไม่ได้รับความเสียหาย (Engelmann, 1991) ซึ่งในพืชแต่ละชนิดจะใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมแตกต่างกันออกไป ดังนั้นจึงต้องพิจารณาทั้งชนิดของพืช ขนาดชิ้นส่วนของพืชก่อนที่จะนำมาทำการทดลอง ดังเช่นงานทดลองของ Edward *et al.* (1993) ที่นำ immature embryo ของ spring wheat (*Triticum aestivum* L.) เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารยับยั้งการเจริญเติบโต ABA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเก็บไว้ในเครื่อง CRYO-MED ที่สามารถรักษาระดับของอุณหภูมิไว้ที่

อุณหภูมิ -35 องศาเซลเซียส และที่ 60 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะย้ายลงเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำออกมาละลายที่อุณหภูมิห้องก่อนย้ายลงอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเอมบริโอสามารถเจริญและพัฒนาได้ภายใน 3 สัปดาห์หลังจากการเลี้ยง

3.2 การเก็บแบบแช่แข็งโดยวิธี Vitrification เป็นวิธีการเก็บรักษาโดยใช้สารเคมีเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำในเซลล์ตกผลึกแข็งตัวเป็นน้ำแข็ง ซึ่งสารเคมีที่ใช้นี้มีทั้งที่สามารถซึมผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์ (permeable) หรืออาจเพียงห่อหุ้มอยู่ภายนอก โดยสารเคมีที่ใช้กับเนื้อเยื่อพืชเพื่อเก็บแช่แข็งนั้นควรใช้ในความเข้มข้นที่ต่ำก่อนเพื่อให้สารสามารถแทรกตัว (penetrate) ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ จึงใช้สารเคมีหรือสารละลายที่มีความเข้มข้นที่สูงขึ้น จากนั้นพืชจะเกิดการสูญเสียน้ำออกมาอันเนื่องจากผลของแรงดันออสโมซิส ส่งผลให้มีการดูดซึมสารเข้าไปแทนที่น้ำที่สูญเสียออกมาของเหลวภายในเซลล์จึงมีความเข้มข้นสูง หลังจากนั้นจึงทำให้เนื้อเยื่อพืชแข็งตัวอย่างรวดเร็ว (Towill, 1995) ดังนั้นน้ำที่อยู่ในเซลล์จึงมีลักษณะปนร่วนไม่เป็นผลึกน้ำแข็ง เซลล์ของพืชจึงไม่เสียหายหรือได้รับอันตรายจากการแช่แข็ง (Ashmore, 1997) และหลังจากการละลายแล้ว ควรล้างชิ้นส่วนพืชในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1.2 โมล เนื่องจากน้ำตาลซูโครสเข้มข้นสูงนี้ช่วยหลีกเลี่ยงการเกิดกระบวนการ rapid replasmolysis ที่เป็นสาเหตุให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหาย (Fukai, 1994) ส่วนสารเคมีที่ใช้ได้แก่ น้ำตาลซูโครส กลีเซอรอล (glycerol) เอทธิลีนไกลคอล (ethylene glycol) และไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาณการใช้นั้นจะแตกต่างกันไปตามสูตรของสารละลายในแต่ละชนิด ซึ่งสารละลายสูตร PVS2 จะประกอบด้วย กลีเซอรอล (glycerol) เอทธิลีนไกลคอล (ethylene glycol) และไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) 30 15 และ 15 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Fukai, 1994)

Toshikazu *et al.* (1995) นำ Adventitious bud จาก bulb-scale ของลิลลี่ที่ทำการเลี้ยงในห้องทดลอง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 7-30 วัน ให้ความเข้มแสง 60 $\mu mol.m^{2}.s^{-1}$ เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน จากนั้นตัดเนื้อเยื่อเจริญขนาด 1.0 มิลลิเมตร (100 ชิ้น) เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS + ซูโครส 0.3 โมล ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 วัน ย้ายเนื้อเยื่อลงในหลอดทดลอง ทำการเติมสารละลาย กลีเซอรอล 2 โมล + ซูโครส 0.4 โมล ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 20 นาที และที่ 0 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 110 นาที เพื่อทำการเปรียบเทียบ จากนั้นทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง นำออกมาละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ย้ายเนื้อเยื่อลง 1.8 มิลลิลิตร ของซูโครส 1.2 โมล นาน 20 นาที จากนั้นย้ายลงเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มี Filter papers พบว่าสามารถ

เจริญเติบโตได้ 5 วันและหลังย้ายลงเลี้ยงบนอาหาร 4 สัปดาห์ สามารถเจริญไปเป็นยอดได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และยังพบอีกว่าในขั้นการเตรียมเนื้อเยื่อโดยใช้อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลานานมากกว่า 7 วัน จะช่วยเพิ่มการสร้างยอดได้มากขึ้น Ishikawa *et al.* (1997) นำเมล็ดกล้วยไม้ *Bletilla striata* Rchb.f. เลี้ยงในอาหารสูตร New Dogashima (ND) เป็นระยะเวลา 10 วัน หลังจากนั้นทำการเตรียมเนื้อเยื่อโดยการเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ที่มีน้ำตาลซูโครส 0.3 โมล ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในที่มืด เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นเติมสารกลีเซอรอล 2 โมล และซูโครส 0.4 โมลเป็นระยะเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และใช้สารละลาย PVS2 ความเข้มข้นสูงเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นย้ายไปเก็บในไนโตรเจนเหลว 30 นาที เมื่อครบระยะเวลานำเอมบริโอมาละลายอย่างรวดเร็ว และนำมาล้างด้วยอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร ND ร่วมกับซูโครส 1.2 โมล เป็นระยะเวลา 20 นาที แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ND พบว่าการพัฒนาของเอมบริโอไปเป็นต้นพืชเป็นไปอย่างปกติ ส่วนอัตราการรอดชีวิตมีประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์

เช่นเดียวกันกับ Kanchit (2000) ได้นำฝักกล้วยไม้ *Doritis pulcherrima* Lindl. อายุ 3 เดือนมาทำการทดลอง พบว่าการเติมสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 50 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดคือ 62 เปอร์เซ็นต์ ในปีเดียวกัน Philip (2000) ทำการศึกษาการพัฒนากระบวนการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมแบบ long term โดยใช้ Protocorm like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้ลูกผสม *Dendrobium* cv.Kasem Boonchoo White โดยศึกษาหาความแตกต่างของสารที่ใช้เตรียมเนื้อเยื่อด้วยการทำให้ของเหลวภายในเซลล์อยู่ในสภาพความเข้มข้นสูงด้วย cryoprotectant ที่มี loading solutions ที่แตกต่างกัน (LS1 LS2 LS3 LS4 LS5 และ LS6) หยดให้กับ PLBs ทิ้งไว้ 15 นาที ทุกทรีตเมนต์ ให้เปอร์เซ็นต์ความรอดชีวิตหลังจากที่เก็บแช่แข็ง ในช่วง 7.4 – 34.4 เปอร์เซ็นต์ แต่ยกเว้น LS1 และ LS2 และในการทดสอบ Vitrification Solutions (VS1 VS2 VS3 VS4 และ VS5) ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 10 นาที โดยทุก treatment มีเปอร์เซ็นต์ความรอดชีวิต 11.1-39.2 เปอร์เซ็นต์ และให้เปอร์เซ็นต์ความรอดชีวิต 7.4-26.3 เปอร์เซ็นต์แต่ยกเว้น VS1 และเมื่อใช้ VS3 ที่เวลา 0 5 10 15 20 25 และ 30 นาที เปอร์เซ็นต์ของความมีชีวิต 20.1-53.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการรอดชีวิตหลังจากการเก็บรักษามีเปอร์เซ็นต์ 3.7-45 เปอร์เซ็นต์ พบการรอดชีวิตสูงสุด (48.5%) ที่ระยะเวลา 30 นาที เช่นเดียวกัน Tsukazaki *et al.* (2000) ได้ใช้เซลล์แขวนลอยของกล้วยไม้ *Doritaenpsis* cv. New Toyohashi ทำการเตรียมเซลล์ในอาหารเหลวสูตร New Dogashima ที่มีซูโครส 0.1 โมล และ abscisic acid (ABA) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติมสารที่มีส่วนประกอบของ กลีเซอรอล 2 โมล และ ซูโครส 4 โมล เป็นระยะเวลานาน 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และดึงน้ำออกด้วยสารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 1-3 ชั่วโมงใน

น้ำแข็ง หลังจากนั้นนำลงเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความรอดชีวิต 64 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบด้วย 2, 3, 5 – Triphenyltelra zolium chloride

3.3 การเก็บแบบแช่แข็งโดยวิธี Encapsulation / Dehydration การเก็บรักษาโดยวิธีการนี้ทำโดยการนำเมล็ดเทียมที่ได้จากการเคลือบชิ้นส่วนของพืชด้วยสารอัลจิเนตหรือสารที่ทำให้เกิดเจล จากนั้นนำไปทำให้สูญเสียน้ำด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การใช้สารซิลลิกาเจล หรือการใช้น้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นสูง ก่อนการเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวต่อไป (Ashmore, 1997)

Fukai *et al.* (1994) ใช้ส่วนข้อของต้นผีเสื้อ (*Dianthus hybridus*) พันธุ์ Sakuranadcsiko มาเคลือบด้วยสารอัลจิเนตแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.4 – 1.0 โมล เป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปดึงน้ำให้เหลือประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ทำการละลาย (Thawing) และนำไปเลี้ยงบนอาหาร พบว่าสามารถการเจริญได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Martinez *et al.* (1999) ทำการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์โดยใช้กระบวนการของเมล็ดเทียมและการดึงน้ำออกสำหรับชิ้นส่วนปลายยอดของ hop ในสภาพปลอดเชื้อภายหลังจากตัดชิ้นส่วนปลายยอด และหุ้มด้วยสารอัลจิเนตที่มีน้ำตาลซูโครส 0.5 โมล ทำการเตรียมเนื้อเยื่อ 2 วัน โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วย ซูโครส 0.75 โมล ทำการดึงน้ำด้วยสารซิลลิก้าเจลในตู้ Flow cabinet เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ตามด้วยการทำให้แข็งตัวอย่างรวดเร็วในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 60 นาที และทำการละลายอย่างช้าๆ พบว่ายอดสามารถเจริญเติบโตได้ 80 เปอร์เซ็นต์

3.4 การเก็บแบบแช่แข็งโดยวิธี Encapsulation / Vitrification การเก็บรักษาด้วยวิธีการนี้มีความคล้ายคลึงกันกับการเก็บแช่แข็งด้วยวิธี vitrification แต่มีความแตกต่างคือทำการการเคลือบชิ้นส่วนของพืชด้วยสารอัลจิเนตก่อน จากนั้นจึงทำตามขั้นตอนของการเก็บแช่แข็งด้วยวิธี vitrification ต่อไป ซึ่งการเคลือบชิ้นส่วนพืชด้วยสารอัลจิเนตก่อนทำการเก็บแช่แข็งนั้นจะช่วยลดความเป็นพิษที่ชิ้นส่วนของพืชจะต้องสัมผัสกับสารเคมีโดยตรงได้ (Ashmore, 1997)

Tannoury (1994) ใช้เนื้อเยื่อปลายยอดของต้นคาร์เนชั่นที่ได้จากต้นที่ทำการเลี้ยงในห้องทดลองมาเคลือบด้วยสารอัลจิเนต หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารเหลวที่มีน้ำตาลซูโครส 0.75 โมล เป็นระยะเวลานาน 18 ชั่วโมง ก่อนการเติมสารละลายที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส น้ำ และโพลีเอทธิลีนไกลคอล ในอัตราส่วน 6 : 4 : 6 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที นำลงแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวหลังจากการเก็บรักษาพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Matsumoto *et al.* (1996) ได้นำเอาเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด

ของวาซาบิ (wasabi ; *Wasabia japonica*) มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร 1/2 MS และน้ำตาลซูโครส 0.3 โมล ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 1 วัน จึงนำไปเคลือบด้วยสารอัลจิเนตที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอล และน้ำตาลซูโครส 2 และ 0.4 โมล ตามลำดับ จากนั้นเติมด้วยสารละลายสูตร PVS2 หรือ PVS3 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 30 นาที หรือที่ 0 องศาเซลเซียส นาน 70 -100 นาที จากนั้นทำการเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว พบว่าหลังการเก็บรักษาเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดของวาซาบิสามารถกลับมาเจริญได้ใหม่ภายหลังจากการเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 3 วัน โดยมีอัตราการเจริญของยอดเฉลี่ยประมาณ 96 เปอร์เซ็นต์