ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิจัยและพัฒนาการเกษตร)

ปริญญา

วิจัยและพัฒนาการเกษตร — **สาขา**

คณะเกษตร กำแพงแสน — **ภาควิชา**

เรื่อง การศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาคัพภะหวายในสภาพเย็นยิ่งยวด

Optimization of Cryopreservation Technique of Rattan's Embryo

นามผู้วิจัย นางสาวกำไล เรียนหัตถกรรม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทร์เปรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ภาณี ทองพำนัก, D.Agr.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ปิยรัษฎ์ เจริญทรัพย์, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์ธงชัย มาลา, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ______ **เดือน** ______ **พ.ศ.** ______

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาคัพภะหวายในสภาพเย็นยิ่งยวด

Optimization of Cryopreservation Technique of Rattan's Embryo

โดย

นางสาวกำไล เรียนหัตถกรรม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิจัยและพัฒนาการเกษตร)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กำไล เรียนหัตถกรรม 2554: การศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาคัพภะหวายในสภาพเย็นยิ่งยวด ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิจัยและพัฒนาการเกษตร) สาขาวิจัยและพัฒนาเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทร์เปรม, Ph.D. 89 หน้า

ศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการการเก็บรักษาคัพภะหวายในสภาพเย็นยิ่งยวด และเพื่อเป็นแนวทางในการอนุรักษ์พันธุกรรมหวายไม่ให้สูญพันธุ์ไป โดยใช้ผลหวาย 3 ชนิด คือ หวายน้ำผึ้ง หวายกำพวน และหวายขี้ไก่ จากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) มาเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวด 3 วิธีการ คือ vitrification, encapsulation-dehydration และ encapsulation- vitrification พบว่า คัพภะของหวายทั้ง 3 ชนิดที่ไม่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว มีการรอดชีวิตร้อยละ 100 ทั้ง 3 วิธีการ ส่วนคัพภะของหวายทั้ง 3 ชนิด ที่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวโดยวิธี vitrification และวิธี encapsulation-vitrification ไม่พบการรอดชีวิต ส่วนวิธี encapsulation-dehydration พบการรอดชีวิตของคัพภะของหวายน้ำผึ้ง หวายกำพวน และหวายขี้ไก่ เป็นร้อยละ 20 80 และ 100 ตามลำดับ ทำได้โดยเพาะเลี้ยงคัพภะบนอาหาร MS ที่เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำคัพภะมาทำ encapsulation ด้วย 3% Na-alginate แล้วแช่คัพภะใน loading solution ที่มี 0.8 M sucrose + 1 M glycerol เป็นเวลา 0 20 หรือ 30 นาที แล้ววาง คัพภะบน silica gel น้ำหนัก 50 กรัมต่อคัพภะ 20 ชิ้น เป็นเวลา 14 หรือ 21 ชั่วโมง เพื่อลดปริมาณน้ำในเซลล์ก่อนนำไปแช่ไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำมาแช่ใน unloading solution ที่มี 1.2 M sucrose เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นแคะเอาเฉพาะส่วน ของคัพภะย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน นอกจากนี้ยังใช้เทคนิคดังกล่าวเก็บรักษาคัพภะหวายเพิ่มอีก 4 ชนิด คือ หวายแข้งไก่ หวายเดาใหญ่ หวายชุมพร และหวายหอม พบว่า มีการรอดชีวิตเป็นร้อยละ 80 80 80 และ 70 ตามลำดับ และได้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายหลังการเก็บรักษาคัพภะหวายในสภาพเย็นยิ่งยวดโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีในหวาย 2 ชนิด คือ หวายชุมพร และหวายน้ำผึ้ง พบว่าหวายชุมพรมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมประมาณร้อยละ 3 ส่วนหวายน้ำผึ้งไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม

_______________ _______________ ___ / ___ / __

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kamlai Reanhatthakam 2011: Optimization of Cryopreservation Technique of Rattan's Embryo Master of Science (Agricultural Research and Development), Major Field: Agricultural Research and Development , Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen Thesis Advisor: Associate Professor Sontichai Chanprame, Ph.D. 89 pages.

Cryopreservation technique for rattan embryo was studied as it would be used as a quideline for rattan genetic conservation. Three rattan species, *Calamus* sp., *C. longisetus* Griff. and *C. myrianthus* Becc., were *in vitro* cultured at plant tissue culture laboratory, RSPG. Three methods of cryopreservation vitrification, encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification, were studied. The survival percentage of embryo before liquid nitrogen immersion was 100% and after liquid nitrogen immersion were 20 80 and 100% in *Calamus* sp., *C. longisetus* Griff., *C. myrianthus* Becc, respectively for encapsulation-dehydration method. The most suitable protocol was preculturing the embryos on preculture medium for seven days. The embryos were then encapsulated and left in loading solution containing 0.8M sucrose and 1M glycerol for 0 20 or 30 minutes. The encapsulated embryos were then dehydrated using silica gel (20 embryos per 50 g silica gel) for 14 or 21 hours. After immersing in liquid nitrogen, the encapsulated embryos were thawed at 37-40 ^{o}C for 2 minute and left in unloading solution containing 1.2 M sucrose for 20 minute. After reculturing on MS + 0.3 M sucrose for 1 day, the embryos were taken out from supported medium and transferred onto MS medium . They were then incubated for 1 month. The same technique was also appliced to preserve another 4 rattan species in liquid nitrogen; *Daemonorops brachystachys Korthalsia grandis* Rild. *C. tenuis* Roxb. and *C. pandanosmus* Furt.. The survival percentage of embryos after liquid nitrogen immersion were 80 80 80 and 70% respectively. Genetic stability of 2 species of rattan embryo (*Calamus* sp. and *C. tenuis* Roxb.) preserved in liquid nitrogen was also studied using AFLP technique. A few polymorphic DNA band (3%) were found in *C. tenuis* Roxb. While non polymorphic DNA band was found in *Calamus* sp.

______________________________ ______________________________ ___ / ___ / __

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทร์เปรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำงานวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ กราบขอบพระคุณ ดร.ภาณี ทองพำนัก อาจารย์ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำงานวิจัย และให้ความช่วยเหลือตลอดมา กราบขอบพระคุณ ดร.ปิยรัษฎ์ เจริญทรัพย์ รองหัวหน้าสำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอัน เนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ฝ่ายวิชาการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยดูแลเอาใจใส่และให้คำแนะนำในการงานทำวิจัย และการปฏิบัติตัวในการทำงานได้เป็นอย่างดี กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ชเนษฎ์ ม้าลำพอง ประธานการสอบ และผู้ช่วยศาสตราจารย์กัญจนา แซ่เตียว ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณ คุณพรชัย จุฑามาศ หัวหน้าสำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ที่ให้โอกาสในการทำงานวิจัยในครั้งนี้รวมทั้งให้โอกาสได้ศึกษาต่อ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ทุกๆ ท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยและเป็นกำลังใจได้อย่างดีให้เสมอมา

ขอขอบคุณทุนโนวาร์ติส เฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษา ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยสำหรับการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ ญาติพี่น้อง ที่ให้การสนับสนุนและคอยเป็นกำลังใจตอลดมา และขอบคุณเพื่อน ๆ ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ

กำไล เรียนหัตถกรรม

ตุลาคม 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	27
ผลและวิจารณ์	39
สรุปและข้อเสนอแนะ	55
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	57
ภาคผนวก	69
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหาร Murashige and Skoog	70
ภาคผนวก ข วิธีเตรียมสารละลาย cryopreservation	72
ภาคผนวก ค วิธีการเตรียมสารละลายสำหรับการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	75
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ	79
ภาคผนวก จ ภาพหวายที่ใช้ศึกษาการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวด	83
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	89

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สารเคมีที่ใช้เป็น cryoprotectants และปริมาณที่ใช้โดยทั่วไป	13
2	ส่วนประกอบของสารละลาย vitrification	13
3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter และ ไพรเมอร์ ในขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเอเอฟแอลพี	38
4	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของคัพภะหวายทั้ง 3 ชนิด ที่ไม่แช่ (-LN) และแช่ (+LN) ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี vitrification เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน	40
5	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของคัพภะหวายทั้ง 3 ชนิด ที่ไม่แช่ (-LN) และแช่ (+LN) ในไนโตรเจนเหลว 24 ชั่วโมง โดยวิธี encapsulation-dehydration เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน	43
6	การรอดชีวิตของคัพภะหวายทั้ง 4 ชนิด ที่ผ่านการแช่ ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี encapsulation-dehydration ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน	43
7	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของคัพภะหวายทั้ง 3 ชนิด ที่ไม่แช่ (-LN) และแช่ (+LN) ในไนโตรเจนเหลว 24 ชั่วโมง โดยวิธี encapsulation-vitrification เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน	46
8	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของคัพภะหวายทั้ง 4 ชนิด ภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว 24 ชั่วโมง โดยวิธี encapsulation-dehydration เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน	48
9	การรอดชีวิตของคัพภะหวายทั้ง 4 ชนิด ที่ผ่านการแช่ ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี encapsulation-dehydration ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน	49
10	แสดงคู่ไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ ที่คัดเลือกได้จากจำนวนคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 16 คู่	50

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า

11 แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพีกับดีเอ็นเอของหวายชุมพรที่ผ่านการแช่และไม่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวโดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ 51

12 แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพีกับดีเอ็นเอของหวายน้ำผึ้งที่ผ่านการแช่และไม่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวโดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ 52

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ก1 การเตรียมอาหาร Murashige and Skoog 71

ง1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของคัพภะหวายน้ำผึ้ง ที่ไม่ผ่านการแช่และผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration 80

ง2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของคัพภะหวายกำพวน ที่ไม่ผ่านการแช่และผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration 80

ง3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของคัพภะหวายขี้ไก่ ที่ไม่ผ่านการแช่และผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration 80

ง4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของคัพภะหวายแข้งไก่ ที่ไม่ผ่านการแช่และผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration 81

ง5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของคัพภะหวายเคาใหญ่ ที่ไม่ผ่านการแช่และผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration 81

ง6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของคัพภะหวายชุมพร ที่ไม่ผ่านการแช่และผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration 81

ง7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของคัพภะหวายหอม ที่ไม่ผ่านการแช่และผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration 82

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขั้นตอนการเตรียมคัพภะหวายก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	27
2	ขั้นตอนการเก็บรักษาคัพภะหวายในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี vitrification	29
3	ขั้นตอนการเก็บรักษาคัพภะหวายในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration	30
4	ขั้นตอนการเก็บรักษาคัพภะหวายในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-vitrification	31
5	การพัฒนาของคัพภะหวายที่ไม่ผ่านการแช่และผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว โดยวิธี vitrification	41
6	การพัฒนาของคัพภะหวายที่ไม่ผ่านการแช่และผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration	44
7	การพัฒนาของคัพภะหวายที่ไม่ผ่านการแช่และผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-vitrification	47
8	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหวายชุมพร จำนวน 6 ตัวอย่างที่เกิดจากปฏิกิริยาเอเอฟแอลพีโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์	53
9	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหวายน้ำผึ้ง จำนวน 6 ตัวอย่าง ที่เกิดจากปฏิกิริยาเอเอฟแอลพีโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 ไพรเมอร์	54

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพผนวกที่		หน้า
จ1	ภาพผลหวายขี้ไก่ *Calamus myrianthus* Becc.	84
จ2	ภาพผลหวายกำพวน *Calamus longisetus* Griff. .	84
จ3	ภาพผลหวายน้ำผึ้ง *Calamus* sp.	85
จ4	ภาพผลหวายแข้งไก่ *Daemonorops brachystachys*	85
จ5	ภาพผลหวายชุมพร *Calamus tenuis* Roxb.	86
จ6	ภาพผลหวายเดาใหญ่ *Korthansia grandis* Rild.	86
จ7	ภาพผลหวายหอม *Calamus pandanosmus* Furt.	87
จ8	ส่วนประกอบของผลหวายหอม *C. pandanosmus* Furt.	87
จ9	คัพภะหวายน้ำผึ้งที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร	88

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาคัพภะหวายในสภาพเย็นยิ่งยวด

Optimization of Cryopreservation Technique of Rattan's Embryo

คำนำ

หวายเป็นผลผลิตที่สำคัญมากอย่างหนึ่งที่ได้จากป่าที่มีการนำมาใช้ประโยชน์รองมาจากไม้ใช้สอย โดยส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์คือส่วนของลำหวาย (ลำต้น) ซึ่งส่วนของลำหวายเมื่อลอกกาบออกหมดแล้วจะมีลักษณะเฉพาะตัวคือมีน้ำหนักเบา เหนียวและยืดหยุ่นสูง สามารถนำมาดัดเป็นรูปต่าง ๆ ได้ จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้ประโยชน์ในการทำเฟอร์นิเจอร์ เครื่องใช้สอยและเครื่องเรือนต่าง ๆ ที่มีคุณภาพ โดยทั่วไปหวายถูกคัดด้วยมาตรฐาน 7 ประการคือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ความยาว สี ความแข็งแรง จุดตำหนิ ความยาวในแต่ละปล้อง และความสม่ำเสมอทางด้านความโต โดยที่หวายที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่กว่า 18 มม. จัดเป็นหวายขนาดใหญ่ ซึ่งใช้ทำโครงสร้างเฟอร์นิเจอร์ เช่น หวายข้อดำ (*Calamus manna*) หวายกำพวน (*C. longisetus*) หวายน้ำผึ้ง (*Calamus* sp.) หวายขี้เสี้ยน (*C. rudentum*) หวายงวย (*C. peregrinus*) และหวายที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า 18 มม. จัดเป็นหวายขนาดเล็ก เช่น หวายตะค้าทอง (*C. caesius*) หวายขี้ผึ้ง (*C. blumei*) หวายเล็ก (*C. javensis*) หวายหอม (*C. pandanosmus*) หวายขี้เหร่ (*C. densiflorus*) ผลิตภัณฑ์จากหวายเป็นที่นิยมใช้กันทั่วไปทั้งในประเทศและต่างประเทศ และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้ประเทศไทยมีการนำเข้าหวายเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทำผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ปัจจุบันหวายเป็นพืชป่าที่หายากและมีราคาแพง จึงมีความต้องการหวายเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทำเฟอร์นิเจอร์และเครื่องใช้สอยในปริมาณมาก ทำให้มีการลักลอบนำหวายจากป่ามาใช้ประโยชน์โดยขาดการอนุรักษ์ และพื้นที่ป่าถูกเปลี่ยนไปเป็นพื้นที่เกษตรกรรม อีกทั้งประเทศ อินโดนีเซีย มาเลเซีย ใช้มาตรการออกกฎหมายห้ามส่งออกวัตถุดิบหวายยกเว้นการส่งออกในรูปผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปแล้วแทน และหวายส่วนใหญ่เป็น dioecious plant คือเป็นต้นที่ช่อดอกเพศผู้และเพศเมียแยกกันอยู่คนละต้น ทำให้พบต้นหวายที่ให้ผลผลิตน้อยลงเนื่องจากส่วนหนึ่งเป็นต้นตัวผู้ เวลาในการเจริญของผลตั้งแต่เริ่มออกดอกจนถึงผลแก่ประมาณ 1 ปี หวายบางชนิดเมื่อออกดอกออกผลแล้วจะตาย บางชนิดขึ้นเป็นต้นเดียวไม่แตกกอ เช่นหวายน้ำผึ้งและหวายข้อดำเมื่อถูกตัดแล้วไม่สามารถสืบทอดพันธุ์ต่อได้ และการขยายพันธุ์ของหวายโดยใช้เมล็ดและหน่อมีข้อจำกัด ซึ่งการขยายพันธุ์โดยใช้หน่อมีอัตราการเพิ่มปริมาณที่น้อยและมีข้อจำกัดกับหวายที่ไม่สามารถแตกกอได้ ส่วนเมล็ดหวายมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำและความงอกจะลดลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อย่างรวดเร็ว ทำให้ไม่สามารถเก็บรักษาเมล็ดหวายไว้ได้ เมื่อเก็บเมล็ดหวายแล้วต้องเพาะทันทีไม่ควรเก็บไว้ จากข้อจำกัดของหวายเกี่ยวกับการเจริญเติบโตและการสืบทอดพันธุ์ดังกล่าว และการใช้หวายจากป่าเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีการปลูกทดแทน และขาดการอนุรักษ์ ทำให้หวายในสภาพธรรมชาติลดลงและบางชนิดเกือบสูญพันธุ์ไป ทำให้ต้องมีการอนุรักษ์พันธุกรรมหวายไม่ให้สูญพันธุ์ไปจากป่าและเพื่อไว้ใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต ดังนั้นวิธีการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชในสภาพเย็นยิ่งยวดที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการอนุรักษ์พันธุกรรมหวาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

หาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาคัพภะหวายบางชนิดในไนโตรเจนเหลว เพื่อเป็นแนวทางในการอนุรักษ์พันธุกรรมหวายไม่ให้สูญพันธุ์ไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

หวายเป็นพืชวงศ์ Palmae จัดอยู่ใน major group Lepidcaryid หรือ พวกที่มีผลเป็นเกล็ด หวายเป็นปาล์มเลื้อยมีลำต้นปีนป่ายตามต้นไม้ ส่วนต่าง ๆ ปกคลุมไปด้วยหนาม มีมือเกาะลักษณะเป็นเส้นยาวออกจากปลายใบหรือจากกาบหุ้มลำ ซึ่งลักษณะดังกล่าวไม่พบในปาล์มชนิดอื่น หวายเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีอายุหลายปี ไม่ผลัดใบ เจริญเติบโตได้ดีในบริเวณที่มีฝนตกชุก และมีความชื้นสูงในเขตมรสุม หวายทั้งหมดในโลกนี้มี 13 สกุล ประมาณ 600 ชนิด (Zehui, 2007) มีการกระจายอยู่ทั่วไปแถบทวีปเอเชีย คาบสมุทรมลายา อาฟริกา ทางตอนใต้ของประเทศอินเดีย พม่า จีน ทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลียและหมู่เกาะปาปัวร์นิวกินี โดยมีศูนย์กลางการกระจายพันธุ์ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งได้แก่ประเทศมาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และไทย พื้นที่บริเวณนี้จึงเป็นแหล่งผลิตหวายที่สำคัญที่สุดของโลก (Dransfield, 1979) ประเทศไทยมีการสำรวจพบหวาย 6 สกุล ประมาณ 62 ชนิด คือ สกุล *Calamus*, *Daemonorops*, *Korthalsia*, *Plectocomia*, *Plectocomiopsis* และ *Myrialepsis* (Sutthisrisilapa, 2004) ซึ่งมีการกระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ ตามบริเวณป่าดิบชื้น ป่าดิบแล้ง ป่าพรุ และป่าชายเลน โดยพบมากที่สุดทางภาคใต้ของประเทศ ได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี สงขลา ระนอง กระบี่ นราธิวาส ปัตตานี ซึ่งชนิดของหวายที่พบมาก ได้แก่ หวายกำพวน หวายงวย หวายขี้เสี้ยน หวายน้ำ หวายชุมพร หวายน้ำผึ้ง และหวายบางชนิดพบเฉพาะถิ่นเท่านั้น เช่น หวายตะค้าทองพบที่จังหวัดนราธิวาส หวายข้อดำ พบที่ตามแนวชายแดนติดต่อประเทศมาเลเซีย แถบจังหวัดยะลาและนราธิวาส หวายที่พบส่วนใหญ่ในประเทศไทยเป็นหวายสกุล *Calamus*

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของหวาย

ลำต้น (stems) ลำต้นของหวายเป็นส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์ ประกอบด้วยปล้อง (internodes) หลาย ๆ ปล้องต่อกันเป็นลำ ลำต้นแบบเลื้อย (climbing stem) ปีนป่ายไปตามต้นไม้ใหญ่ที่อยู่ใกล้เคียง ลำต้นห่อหุ้มด้วยกาบใบหรือกาบหุ้มลำ (leaf sheath) ซึ่งปกคลุมไปด้วยหนาม ลำหวายมีความยาวมากน้อยแตกต่างกันไปตามชนิดของหวายตั้งแต่ขนาดเล็ก 10 เซนติเมตร จนมีความยาวสูงสุดถึง 175 เมตร (Burkill, 1935) ขนาดของลำหวายจะไม่เพิ่มขึ้นตามอายุ ในระยะต้นกล้าหวายจะเจริญเติบโตโดยการเพิ่มขนาดของลำต้นหลังจากนั้นจะเจริญทางด้านความยาว ลักษณะการแตกกอของหวายโดยทั่วไปเกิดบริเวณผิวดินและมีการแตกหน่อได้หลายหน่อ จึงทำให้ลำมีลักษณะเป็นกอ ซึ่งผิวของลำหวายมีความสำคัญอย่างยิ่งในเชิงการค้า เนื่องจากการแบ่งเกรดของหวายจะใช้ผิวที่สมบูรณ์เป็นตัวแบ่งเกรด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใบ (leaf) ใบหวายเป็นใบประกอบ (compound leaf) ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ กาบหุ้มใบ (leaf sheath) เป็นส่วนที่หุ้มลำหวาย หุ้มสลับเหลื่อมกันตลอดลำต้นมี 2-4 ชั้น กาบใบส่วนใหญ่มักมีหนามกระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งลักษณะของกาบหุ้มใบและการเรียงตัวของหนามบนกาบหุ้มใบสามารถใช้จำแนกชนิดของหวายได้ ก้านใบ (petiole) ในขณะที่เป็นต้นอ่อนยังมีก้านใบปรากฏอยู่ให้เห็น เมื่อลำหวายแก่ขึ้นก้านใบจะหายไป ใบย่อย (leaflet) มีลักษณะแบบขนนก (pinnate) ลักษณะของขอบใบมี 2 ลักษณะ คือ ขอบใบเรียบ (entire margined) และขอบใบหยัก (erose margined) ใบย่อยเรียงตัวกันอยู่บนก้านใบ (rachis) มีทั้งที่เรียงตัวเป็นระเบียบ และไม่เป็นระเบียบ ใบย่อยอาจมีขนหรือหนามแตกต่างกันไปตามชนิด ใบอ่อนมีลักษณะแตกต่างกับใบแก่อย่างชัดเจน (ชนาธิป และคณะ, 2536)

อวัยวะปีนป่าย (climbing organs) มีอยู่ 2 ลักษณะ คือ มือเกาะ (cirrus) เป็นลักษณะที่ยื่นยาวออกจากใบย่อยคู่สุดท้าย ส่วนที่ยื่นออกไปนี้จะมีหนามปรากฏอยู่ ในการเจริญของหวายจากระยะที่เป็นกล้าหวายจนกระทั่งแก่ตัว ใบอ่อนมักจะไม่มีมือเกาะ แต่ในใบแก่ที่พัฒนาเต็มที่แล้วจะมีมือเกาะปรากฏอยู่ พบในหวายสกุล *Daemonorops*, *Korthalsia*, *Plectocomia*, *Plectocomiopsis*, *Myrialepsis* และ *Calamus* บางชนิด (ชนาธิป และคณะ, 2536) ส่วนมือเกี่ยว (flagellum) เป็นช่อดอกที่เป็นหมัน (sterile inflorescence) เกิดบนกาบใบใกล้ส่วนที่เรียกว่า เข่า (knee) มีหน้าที่เช่นเดียวกับมือเกาะ หนามที่ปรากฏอยู่บนมือเกี่ยวจะมีการเรียงตัวแบบกลุ่มหรือกระจายอยู่ทั่ว ๆ ไป และมีลักษณะโค้งกลับ โดยปกติแล้วมือเกาะและมือเกี่ยวจะไม่ปรากฏอยู่บนหวายชนิดเดียวกัน

ดอก (flower) ดอกเป็นดอกช่อ (inflorescence) แบบ spike มักเกิดเป็นคู่และมี bracts เล็ก ๆ อยู่ด้วย การออกดอกของหวายมี 2 ลักษณะ คือ เป็นแบบ hapaxanthic ข้อที่อยู่ตอนยอดของลำหวายจะสร้างช่อดอกขึ้นมาในเวลาใกล้เคียงกัน ซึ่งในลักษณะนี้ทำให้ยอดหวายหมดความแข็งแรงทำให้ลำต้นตายลงหลังจากการออกดอกและติดผลแล้ว ส่วนการออกดอกแบบ pleonanthic นั้นลำต้นจะสร้างช่อดอก ซึ่งช่อดอกจะไม่เกิดขึ้นพร้อมกัน ดังนั้นจึงทำให้ลำต้นเติบโตต่อไปได้หลังจากออกดอกแล้ว หวายเป็นพืช dioeious มีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่แยกกัน เป็นพืชผสมข้าม ยกเว้นหวายในสกุล *Korthalsia*, *Laccosperma* และ*Eremospatha* ช่อดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่ต้นเดียวกัน (monoecious) (Uhi and Dransfield, 1987)

ผล (fruit) ผลของหวายเป็นผลเดี่ยว (simple fruit) มีเกล็ดซ้อนทับกันย้อนกลับในแนวดิ่ง เกล็ดของผลหวายเกิดจากปลายยอดมาทางฐานของผลหวาย โดยเกล็ดจะเรียงลดหลั่นกันตามลำดับเป็นแถวตรงตามแนวดิ่ง ลักษณะเกล็ดจะแข็งเป็นมัน ผลหวายมีเปลือกนอก (pericarp) มีสีที่แตกต่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กันออกไปบางชนิดสีน้ำตาลเหลือง น้ำตาลอ่อน น้ำตาลแก่ หรือน้ำตาลปนแดง เป็นต้น ส่วนของผนังชั้นกลาง (mesocarp) ของหวายในสกุล *Korthalsia*, *Laccosperma*, *Eremospatha* และ *Oncocalamus* เป็นเนื้อหนาฉ่ำน้ำ เปลือกหุ้มเมล็ดแห้งเมื่อเมล็ดแก่ หวายในสกุลอื่น ๆ นอกเหนือจากที่กล่าวมา ผนังผลบางและเมล็ดแห้งเมื่อแก่ เมล็ดปกคลุมไปด้วยเนื้อเยื่อที่หนาเรียกว่า sarcotesta หุ้มอยู่ ซึ่งเนื้อที่หุ้มเมล็ดนี้สามารถนำมารับประทานได้ (อิศรา, 2529) การแก่ของเมล็ดสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของเกล็ดบนเปลือกนอกของผล ใน 1 ผล จะมี 1 เมล็ด ในบางชนิดอาจมี 3 เมล็ด ใน 1 ผล ในช่อหนึ่ง ๆ อาจมีผลได้ตั้งแต่ 100-5,000 ผล แล้วแต่ชนิดของหวาย เช่น หวายตะค้าทองมีผลมากกว่า 2,000 ผล ในแต่ละลำในทุกช่วงเวลา (Manokaran, 1979) ส่วนของคัพภะอยู่ในร่องเมล็ดส่วนกลางหรือด้านข้าง

ราก (roots) ระบบรากของหวายมีการกระจายออกรอบ ๆ ในแนวราบกว้างขวางและมีระบบรากสั้น เจริญในแนวดิ่ง รากอาจเจริญไปข้างล่างแต่มีบางส่วนเจริญย้อนกลับขึ้นมาด้านบน (Dransfield, 1979) ในบริเวณที่มีใบไม้ทับถมเป็นชั้นหนา ๆ รากบริเวณนี้มักมีเซลล์ที่มีผนังหนาเซลล์อยู่ติดกันหลวม ๆ คาดว่ารากส่วนนี้ทำหน้าที่ในการหายใจ

การเจริญเติบโตและการพัฒนาของหวาย

หวายที่ขึ้นอยู่ในธรรมชาติมีต้นกล้าเป็นจำนวนมาก แต่มีจำนวนไม่มากนักที่เจริญเติบโตและพัฒนาเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ กล้าหวายส่วนใหญ่ตายไปเนื่องจากการแข่งขันทางด้านแสง อาหารและน้ำตลอดจนโรคและแมลงต่าง ๆ สำหรับหวายชนิดที่ปีนป่ายไปสูง ๆ การพัฒนาของลำต้นเร็วหรือช้าและการแตกกอได้รับการกระตุ้นเมื่อได้รับแสงที่เพียงพอ นอกจากนี้แสงยังเป็นตัวกระตุ้นการยืดตัวของลำต้นหวายอีกด้วย (Manokaran, 1985) การยืดตัวของลำต้นหวายจะเกิดขึ้นตลอดเวลา แต่ก็ผันแปรไปในแต่ละช่วง

การออกดอกและการติดผลของหวายหลายชนิดเกิดขึ้นตามฤดูกาลและสภาพแวดล้อม เช่น ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการออกดอกของหวายตะค้าทอง (*C. caesius*) ได้แก่ ระยะช่วงแล้งซึ่งมีอุณหภูมิสูง ตามด้วยระยะฝนตกชุก (Manokaran, 1989) การออกดอกของหวายบางชนิดไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยสภาพแวดล้อม เช่น หวายน้ำ (*Daemonorops angustifolia*) ซึ่งหวายจะมีการออกดอกต่อเนื่องกันไปตามลำต้น และอายุการออกดอกของหวายจะแตกต่างกันออกไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การขยายพันธุ์ของหวายในสภาพธรรมชาติ

ในสภาพธรรมชาติหวายสามารถขยายพันธุ์ได้จากเมล็ดและการแตกหน่อ ซึ่งการขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ดเป็นวิธีที่กระจายพันธุ์ได้อย่างกว้างขวางซึ่งต้องอาศัยคนและสัตว์ หลังจากที่คนหรือสัตว์กินผลหวายแล้วนำเมล็ดไปทิ้งไว้ในที่ที่เหมาะสมเมล็ดจะงอกขึ้นเอง แต่มีข้อเสียเนื่องจากเมล็ดหวายมีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำ และจะลดลงอย่างรวดเร็ว (ถนอม, 2522) ใช้เวลาในการงอกนาน และการมีชีวิตของเมล็ดจะลดลงอย่างรวดเร็ว จึงทำให้การขยายพันธุ์โดยเมล็ดในสภาพธรรมชาติได้ผลน้อยและไม่แน่นอน นอกจากนี้การเจริญเติบโตในระยะแรกจะโตช้า ส่วนการขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อเป็นวิธีการที่ให้ผลที่แน่นอนและอัตราในการเจริญเติบโตรวดเร็วกว่า แต่มีอัตราการเพิ่มในปริมาณน้อย (Aziah, 1987) หวายบางชนิดที่มีลำต้นเดี่ยวจะไม่สามารถแตกหน่อได้ อีกทั้งการขยายพันธุ์ยังจำกัดอยู่ในบริเวณโคนต้น และอัตราการแตกหน่อยังขึ้นกับความสมบูรณ์แข็งแรงของต้นแม่อีกด้วย ถ้าต้นแม่แคระแกรนต้นที่เกิดจากหน่อก็จะแคระแกรนเช่นเดียวกับต้นแม่ การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีที่สามารถขยายพันธุ์ได้ต้นที่มีลักษณะเหมือนกันในปริมาณมากภายในเวลาอันรวดเร็ว

พระราชดำริของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว กับการอนุรักษ์และขยายพันธุกรรมหวายโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในปี พ.ศ. 2529 ทรงมีพระราชดำริให้อนุรักษ์และขยายพันธุ์หวายชนิดต่าง ๆ ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อไว้ใช้ประโยชน์ในอนาคต ซึ่งหวายเป้าหมายคือ หวายข้อดำ หวายน้ำผึ้ง หวายตะค้าทอง หวายหอม หวายโป่ง หวายกำพวน หวายงวย และหวายขี้เสี้ยน และได้พระราชทานพระบรมราชานุญาตให้ทดลองปลูกต้นหวายเหล่านั้นในป่ายางนาใกล้พระตำหนักเรือนต้น สวนจิตรลดา และมีพระดำริให้ทดลองปลูกที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ และที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพานอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดสกลนคร ต่อมาเมื่อปี 2532 ได้จัดทำแปลงรวบรวมพันธุ์หวายชนิดต่างๆ ในพื้นที่ 1,000 ไร่ ที่ตำบลปะเหลียน จังหวัดตรัง และได้น้อมเกล้าฯ ถวายเป็นสวนหวายเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เพื่อเป็นที่ศึกษาและวิจัย (โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, 2549)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหวาย

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวางในการขยายพันธุ์พืช ซึ่ง Murashige (1974) ได้เสนอขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์ไว้ 3 ขั้นตอนคือ 1) การเตรียมเนื้อเยื่อพืชให้ปราศจากเชื้อและนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ 2) การเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เจริญเติบโตและขยายต้นให้มีปริมาณมากในอาหารสังเคราะห์ 3) การนำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงออกปลูกในสภาพธรรมชาติ ปัจจุบันการนำวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการขยายพันธุ์หวายเป็นวิธีที่แก้ไขข้อจำกัดของการขยายพันธุ์หวายในสภาพธรรมชาติซึ่งมีอัตราการเพิ่มปริมาณที่ต่ำ ขยายปริมาณได้ช้า โดยทั่วไปชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงจะใช้เนื้อเยื่อเจริญ เช่น คัพภะ ยอดอ่อน ปลายราก ช่อดอก เป็นต้น (Aziah, 1987) อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีส่วนประกอบเหมือนกับอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงพืชทั่วไป อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง และแสง มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหวายอย่างมาก สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ได้สืบทอดงานอนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว จึงพระราชทานให้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) เก็บรักษาพันธุกรรมหวายโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พรชัย และคณะ (2533) ได้เพาะเลี้ยงเนื่องเยื่อหวายในสกุล *Calamus* จำนวน 6 ชนิด ที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สวนจิตรลดา โดยใช้ชิ้นส่วนของคัพภะ ได้แก่ หวายตะค้าทอง หวายข้อดำ และหวายงวย ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร Murashige และ Skoog (MS) ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอด หวายน้ำผึ้ง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสู MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัส หวายหอม ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม NAA 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัส และหวายกำพวน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดแคลลัส ต่อจากนั้นได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของหวายตะค้าทอง เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อปริมาตร ปริมาตรกลุ่มเซลล์ และความมีชีวิต โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม picloram 20 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 50 กรัมต่อลิตร และ casein hygrolysate 300 มิลลิกรัมต่อลิตร(ปิยรัษฎ์, 2536; ปิยรัษฎ์ และคณะ, 2539) นอกจากนี้ Aziah and Manokaran (1985) ประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงคัพภะหวายข้อดำ (*C. manna*) ให้เกิดเป็นยอด ราก และแคลลัสได้ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS และ คัพภะจะเกิดแคลลัสบนอาหารที่เติมผงถ่าน และมีออกซินความเข้มข้นสูง เมื่อนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีออกซินต่ำ แคลลัสมีลักษณะเป็นสีขาวหรือขาวครีม จากนั้นจะเกิด embryogenesis เป็นยอดเล็ก ๆ นำยอดไปชักนำให้เกิดรากบนอาหารที่เติมออกซิน Dekkers and Rao (1987) รายงานการเพาะเลี้ยงคัพภะหวาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

C. trachycoles บนอาหารสูตร MS ที่ดัดแปลงโดยเติม 6-benzylaminopurine (BAP), NAA หรือ 2,4-D พบว่าคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BAP 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร คัพภะมีการเจริญอย่างรวดเร็ว สามารถเกิดยอดได้ภายใน 2 สัปดาห์ และเกิดทั้งยอดและรากบนอาหารที่เติม BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ารากจะเจริญได้ดีขึ้นถ้าเติมออกซินในอาหารด้วย อาหารที่เติม NAA และ 2,4-D คัพภะมีการเจริญเติบโตไม่แน่นอน บนอาหารที่เติม NAA จะเกิดรากใน 4 สัปดาห์ ในขณะที่เติม 2,4-D ใช้เวลาถึง 6 สัปดาห์ และเกิดแคลลัสใน 8 สัปดาห์ และสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้บนอาหารที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การเก็บรักษาพันธุกรรมในสภาพเย็นยิ่งยวด (cryopreservation)

การเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวด (cryopreservation) เป็นการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชในไนโตรเจนเหลว (LN) ที่อุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส (Withers and Engelmann, 1997) ซึ่งในการเก็บรักษาพันธุกรรมในสภาพที่อุณหภูมิต่ำทำให้การแบ่งเซลล์และขบวนการ metabolism ต่าง ๆ ภายในเซลล์หยุดการทำงาน ทำให้สามารถเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชไว้ได้นาน (Engelmann, 2004) ปราศจากเชื้อโรคและความเสี่ยงทางพันธุกรรม การเก็บรักษาพันธุกรรมวิธีนี้เป็นเทคโนโลยีที่ดีที่สุดและคุ้มค่าในการอนุรักษ์พันธุกรรมในระยะยาวอย่างยั่งยืน ซึ่งใช้พื้นที่น้อยในการเก็บรักษาและยังช่วยในการป้องกันการเข้าทำลายของโรคและแมลง การเก็บรักษาวิธีการนี้สามารถเก็บรักษาพันธุกรรมได้เกือบทุกชิ้นส่วน ซึ่งสามารถใช้อนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชที่ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและไม่สามารถเก็บรักษาในรูปของเมล็ดได้ เช่น แคลลัส เกสร ตากิ่ง เมล็ด shoot apices somatic embryos zygotic embryos และprotocorm เป็นต้น พืชที่ประสบความสำเร็จโดยใช้ชิ้นส่วนต่าง ๆ ในการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวด เช่น การเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้ *Bletilla striata* โดยวิธี vitrification (Hirano *et al*., 2005) การเก็บรักษา shoot tips ของคาร์เนชั่นโดยวิธี encapsulation-vitrification (Halmagyi and Deliu, 2007) การเก็บรักษา protocorm-like bodies ของ *Oncidium* (Miao *et al*., 2005) protocorm ของ *Oncidium bifolium* (Flachsland *et al*., 2006) การเก็บรักษา anther ของข้าว โดยวิธี encapsulation-dehydration (Marassi *et al*., 2006) เป็นต้น

หลักการสำคัญที่ทำให้สามารถเก็บรักษาพันธุกรรมในสภาพเย็นยิ่งยวดประสบความสำเร็จได้คือ ต้องป้องกันไม่ให้ภายในเซลล์กลายเป็นผลึกน้ำแข็ง (ice crystal) ซึ่งการเกิดผลึกน้ำแข็งจะเป็นอันตรายแก่เซลล์ ทำได้โดยการลดปริมาณน้ำภายในเซลล์หรือทำให้เซลล์สูญเสียน้ำ (dehydration) โดยการให้อุณหภูมิต่ำอย่างช้า ๆ (conventional slow freezing) การให้อุณหภูมิต่ำอย่างง่าย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(simple freezing) การทำให้แห้ง (air drying) การทำให้เกิดสภาพแก้วอย่างสมบูรณ์ (complete vitrification) ซึ่งกระบวนการเกิดสภาพแก้ว (vitrification) เป็นกระบวนการทางกายภาพเพื่อหลีกเลี่ยงการสร้างผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ โดยการเปลี่ยนแปลงของสารละลายในสภาพของเหลวไปเป็นของแข็งมีสภาพคล้ายแก้วที่มีรูปร่างไม่แน่นอน ในช่วงอุณหภูมิประมาณ -110 องศาเซลเซียส (glass transition temperature : Tg) (Sakai *et al.*, 2000) ซึ่งน้ำในสภาพที่กลายเป็นแก้วจะช่วยป้องกันการยุบตัวของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงความเข้มของสาร ค่า pH ในระหว่างการสูญเสียน้ำ แรงดันน้ำต่ำกว่าผลึกน้ำแข็งในระหว่างที่น้ำกลายสภาพเป็นแก้ว ซึ่งจะไม่ทำให้เซลล์มีการสูญเสียน้ำเพิ่มอีก

Freezing injury

พืชที่มีน้ำภายในเซลล์มากจะไม่สามารถมีชีวิตได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (freezing) โดยความเสียหายที่เกิดจากอุณหภูมิเยือกแข็ง จะเกิดจาก water potential ในช่องว่างระหว่างเซลล์ มีค่าสูงกว่าในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) หรือแวคิวโอ (vacuoles) ดังนั้นน้ำภายนอกเซลล์หรือในช่องว่างระหว่างเซลล์จะกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง (ice crytal) ทันที ซึ่งการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์จะทำให้พืชตายเป็นส่วนใหญ่ (Steponkus *et al.*, 1992) และเมื่ออุณหภูมิต่ำลงไปอีก น้ำจะเคลื่อนที่ออกจากโปรโตพลาสซึม (protoplasm) ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งในช่องว่างระหว่างเซลล์เพิ่มขึ้น โปรโตพลาส (protoplas) จึงสูญเสียน้ำ ดังนั้นการที่อุณหภูมิค่อย ๆ ลดลงจนต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (slow cooling) จะทำให้พืชได้รับอันตรายหรือตายเนื่องจากการสูญเสียน้ำ (dehydration) ของโปรโตพลาสซึม ซึ่งมีผลทำให้สารละลายในเซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้น เกิดการตกตะกอนเป็นผลทำให้เซลล์เหี่ยวเนื่องจากเกิด plasmolysis ค่าความเป็นกรดและด่าง (pH) ภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงไปเพิ่มความเข้มข้นของ electrolyte ความเครียดของเซลล์ที่เกิดจากการแช่แข็ง และการละลาย (thawing) ส่งผลให้เกิดการก่อตัวของอนุมูลอิสระ (free radicals) ที่ก่อให้เกิดความเสียหาย เช่น lipid peroxidation การเสียสภาพของโปรตีน และการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอ (ลิลลี่, 2546; Cadenas,1989; Benson *et al.*,1992; Smirnoff,1995)

Hardening

hardening เป็นขบวนการที่พืชได้รับสภาวะเครียดที่ไม่รุนแรงถึงกับตายได้ (sub lethal) แต่จะได้รับสภาวะเครียดที่ละน้อย จนทำให้พืชเกิดความต้านทานต่อสภาวะเครียดนั้น ๆ ได้ดีขึ้น โดยการลดลงของอุณหภูมิและความยาวสั้นของวัน ซึ่ง hardening สามารถส่งผลในการเพิ่มโปรตีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้ำตาล โพรลีน และไกลซีน ซึ่งจะมีส่วนร่วมในการเพิ่มค่าของออสโมติก (osmotic) ของสารละลายในเซลล์ Ramirez *et al*. (2005) รายงานว่าการทำ cold-hardening ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีความจำเป็นในการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดภายหลังการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวดโดยวิธี encapsulation-dehydration ส่วนปลายยอดของสตรอเบอร์รี่ Ryynänen and Aronen (2005) รายงานว่าการทำ cold-hardening ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสภายใต้สภาพวันสั้น (8/16 สว่าง/มืด) เป็นเวลา 28 วัน สามารถเก็บรักษาส่วนยอดของ *Betula pendula* ในสภาพเย็นยิ่งยวด Niino *et al*. (2007) รายงานว่าการทำ cold-hardening ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสภายใต้สภาพวันสั้น (8/16 สว่าง/มืด) มากกว่า 30 วัน สามารถเก็บรักษาตาของ mat rush (*Juncus* spp.) ในสภาพเย็นยิ่งยวดโดยวิธี vitrification Zhao *et al*. (1999) พบว่าการทำ cold-hardening ปลายยอดของแอปเปิ้ลที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน มีอัตราการรอดชีวิตสูงภายหลังการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวด Halmagyi *et al*. (2005) รายงานว่า การทำ cold-hardening ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ไม่สามารถทำให้ปลายยอดของมันฝรั่งเจริญเติบโตได้ภายหลังการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวด

Dehydration

เซลล์พืชประกอบด้วยน้ำประมาณ 95% เมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส น้ำจะกลายเป็นน้ำแข็ง การก่อตัวของน้ำแข็งภายในเซลล์จะทำให้พืชตายเป็นส่วนใหญ่ (Mikula *et al*., 2005) และการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวดโดยการทำให้น้ำภายในเซลล์ลดลง จะเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์น้อยที่สุด ซึ่งในการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชส่วนใหญ่ เช่น แคลลัส เซลล์แขวนลอย คัพภะ และปลายยอด มีปริมาณน้ำที่สูงมากจึงมีความไวต่อความเสียหายจากความเย็น ณ จุดเยือกแข็ง (freezing injury) ในขณะแช่แข็งในกระบวนการ vitrification-based ก่อนการแช่แข็งเซลล์จะต้องทำให้เกิดการสูญเสียน้ำ เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดผลึกน้ำแข็ง (ice-crystal) ภายในเซลล์ เพราะเมื่อเซลล์ได้รับความเสียหายแล้วจะไม่สามารถกลับสู่สภาพเดิมได้อีก วิธีการป้องกันไม่ให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ มีดังนี้

1. air drying การดึงน้ำออกโดยการทำให้แห้งด้วยการเป่าลมภายใน laminar air-flow หรือการดึงน้ำออกโดยการใช้ silica gel ซึ่งไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิและความชื้นของอากาศได้ ซึ่งจะมีอิทธิพลต่ออัตราการระเหยของน้ำ

2. freeze dehydration เป็นวิธีการดึงน้ำโดยใช้ความเย็นอย่างช้า ๆ เพื่อชะลอการเกิดน้ำแข็งภายในเซลล์ และป้องกันชิ้นส่วนพืชจากการเกิด cryoinjury (Menges and Murray, 2004) โดยทั่วไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใช้อัตราการลดความเย็นที่ใช้ คือ 0.5 หรือ 2 องศาเซลเซียสต่อนาที และจะค่อย ๆ ลดลงจนถึงอุณหภูมิ -35 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดและสถานะของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ (Taylor and Fletcher, 1999) ชี้ให้เห็นว่าการลดอัตราความเย็นจะช่วยให้การเกิดออสโมติก (osmotic) มีความเสถียร Zhang *et al*. (2007) อธิบายว่าอัตราความเย็น อุณหภูมิและช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวดจะมีผลต่อการรอดชีวิตของ *Laminaria japonica* ดังนั้นการสูญเสียน้ำที่เหมาะสมต่ออัตราความเย็น ทำได้โดยการลดอุณหภูมิและหาช่วงเวลาที่เหมาะสม ภายหลังการแช่แข็งอย่างช้า ๆ โดยการทำให้เซลล์สูญเสียน้ำ และจุ่มในไนโตรเจนเหลว ซึ่งในการที่จุ่มในไนโตรเจนเหลวทำให้เซลล์เกิดสภาพแก้วอย่างสมบูรณ์โดยไม่เกิดผลึก และเซลล์จะไม่ได้รับผลกระทบจากความเย็น

3. สารป้องกันความเย็น (cryoprotectants) การเติมสารป้องกันความเย็นเพื่อปรับการผ่านเข้าออกของสาร (premeability) ผ่านผนังและเยื่อหุ้มเซลล์ และจุดเยือกแข็ง (freeze point) ของเซลล์ ซึ่งจะทำให้เซลล์มีความทนทานต่อการแช่แข็ง (freezing) และการละลาย (thawing) ภายหลังการเก็บรักษาโดยไม่มีผลกระทบต่อความมีชีวิตและการพัฒนาของเซลล์และเนื้อเยื่อ (Bajaj, 1995) ซึ่งสารป้องกันความเย็นแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ สารเคมีประเภทออกฤทธิ์ภายในเซลล์ สารกลุ่มนี้สามารถซึมผ่านเข้าภายในเซลล์ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายในระหว่างการแช่แข็งและการละลาย สารเคมีในกลุ่มนี้ได้แก่ glycerol dimethyl sulfoxide (DMSO) และแอลกอฮอล์หลายชนิดเช่น methanol ethanol propanediol เป็นต้น ซึ่งสารประเภทนี้จะป้องกันอันตรายได้ดีเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นค่อนข้างสูง (1-4 M) โดยที่แอลกอฮอล์มีอัตราการแพร่เข้าสู่เซลล์สูงที่สุด รองมาคือ DMSO และ glycerol ซึ่งสารประเภทนี้จะเป็นพิษต่อเซลล์ และสารเคมีประเภทออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ จะให้ผลได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าสารเคมีประเภทออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (0.01-0.2 M) และเป็นพิษน้อยกว่า สารเคมีในกลุ่มนี้ได้แก่ polyvinylpyrrolidon (PVP) และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น sucrose glucose mannitol เป็นต้น (ตารางที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 สารเคมีที่ใช้เป็น cryoprotectants และปริมาณที่ใช้โดยทั่วไป

สารเคมี	ปริมาณการใช้ (%)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	2.5-12
Glycerol	1-10
Glucose	4-8
Ethylene glycol	2.5
Polyethylene glycol (PEG) MW 6000	10
Sucrose	3-5
Proline	1 M

ที่มา: ประศาสตร์ (2536)

สารป้องกันความเย็นมีประสิทธิภาพสูงมากในการหลีกเลี่ยงการเกิดน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งสาร vitrification เป็นสารป้องกันความเย็นที่มีประสิทธิภาพในการรักษาชิ้นส่วนพืชในระหว่างการแช่แข็ง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารละลาย vitrification

สารละลาย	ส่วนประกอบ	อ้างอิง
PVS1	22% glycerol + 15% EG + 15% PEG + 7% DMSO + 0.5 M sorbitol	Uragami *et al*,.1990
PVS2	30% glycerol + 15% DMSO + 15% EG in medium with 0.4 M sucrose	Sakai *et al*., 1990
PVS3	50% glycerol + 50% sucrose in medium	Nishizawa *et al*., 1993
PVS4	35% glycerol + 20% EG + 20.5% sucrose	Sakai *et al*., 2000

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยทั่วไปสาร PVS2 (plant vitrification solution) ถูกนำมาใช้ในการเก็บรักษาพันธุกรรมพืช มีค่าโมลาลิตี (molarity) ที่ความเข้มข้น 7.8 M และมีความเป็นพิษสูง มีผลทำให้ชิ้นส่วนพืชได้รับความเสียหายระหว่างขั้นตอนการดึงน้ำออก สามารถลดระดับความเป็นพิษโดยการลดเวลาในการแช่ในสารละลาย PVS2 (Mandal and Sharma. 2007) การดึงน้ำออกที่ 0 องศาเซลเซียส แทนอุณหภูมิห้องจะช่วยลดระดับความเป็นพิษของสารละลายต่อชิ้นส่วนพืชในระหว่างการเกิดสภาพแก้ว (vitrification) และการเพิ่มช่วงเวลาในการแช่สารป้องกันความเย็นจะทำให้สารละลายเข้าไปภายในเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น (Sakai *et al*., 2000) Matsumoto *et al*. (1995) รายงานว่าการแช่ apical meristems ของ wasabi (*Wasabia japonica*) ในสารละลาย PVS2 ที่เวลา 30 และ 100 นาที สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตจาก 30 เป็น 95 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการแช่ปลายยอดส้ม (*Poncirus trifoliate* (L.) X *Citrus sinensis* (L.) Osbeck) ในสารละลาย PVS2 ที่เวลา 60-180 นาที สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตจาก 30 เป็น100 เปอร์เซ็นต์ (Wang *et al*., 2002)

การแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลาย PVS2 โดยตรงจะส่งผลให้ความดัน osmotic เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว และชิ้นส่วนพืชเกิดการสูญเสียน้ำมากเกินไป ทำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดภาวะแห้ง แก้ไขได้โดยการแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลาย loading solution (LS) (2 M glycerol และ 0.4 M sucrose) ก่อนการแช่ในสารละลาย PVS2 ซึ่งจะทำให้ชิ้นส่วนพืชมีความทนทานต่อการแห้งได้ ซึ่ง glycerol มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นความทนทานต่อการแห้งของปลายยอดก่อนการแช่ในสาร PVS2 (Schoenweiss *et al*., 2005) ในระหว่างการแช่ชิ้นส่วนพืชใน LS เซลล์จะสูญเสียน้ำ เกิด plasmolyse และเกิดการแพร่กระจายของ glycerol ใน cytosol ซึ่งจะไปเพิ่มความทนทานต่อการสูญเสียน้ำ โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ และความเสถียรของเยื่อหุ้มเซลล์ (Matsumoto *et al*., 1998)

การใช้สาร vitrification ร่วมกับ DMSO EG PEG glycerol และsucrose อาจลดผลกระทบที่เกิดจากการสัมผัสกับ DMSO โดยตรง (Turner *et al*., 2001a,b) Häggman *et al*. (1998) รายงานว่าสารละลาย PGD (10% PEG 6000, 10% glucose และ 10% DMSO) ช่วยให้ embryogenic ของ Scots pine รอดชีวิตมากกว่าการใช้ DMSO และ PGD II (2.5% PEG 6000, 2% glucose และ 2.5% DMSO บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที แล้วตามด้วย 5% PEG 6000, 4% glucose และ 5% DMSO) โดยมาประยุกต์ใช้กับ *Abies cephalonica* (Aronen *et al*., 1999) และ apical ของ *Populus tremula* L. X *Populus tremuloides* Michx (Jokipii *et al*., 2004)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Preculture

เนื้อเยื่อพืชที่นำมาเก็บรักษาต้องผ่านกระบวนการก่อนการเก็บรักษาโดยการเพาะเลี้ยงในที่ที่อุณหภูมิต่ำกว่าปกติในที่มืด ร่วมกับการเพาะเลี้ยงในอาหารมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงหรือมีสารป้องกันความเย็น เพื่อกระตุ้นการปรับตัวให้ทนต่อสภาพการแช่แข็ง อาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงหรือมีสารป้องกันความเย็นจะช่วยเพิ่มความทนทานให้กับชิ้นส่วนพืช เนื่องจากน้ำตาลจะมีส่วนช่วยในการลดปริมาณน้ำภายในเซลล์ ทำให้มีการสะสมน้ำตาลภายในเซลล์ เพื่อป้องกันความเสียหายของโปรตีนและเยื่อหุ้มเซลล์ที่ได้รับความเสียหายในระหว่างการสูญเสียน้ำและการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (Panis *et al*., 1996; Miao *et al*., 2005) ในการทำ preculture อย่างเดียวไม่เพียงพอสำหรับการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวด ดังนั้นในการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชให้ประสบความสำเร็จจะต้องปรับสภาพชิ้นส่วนพืชโดยการนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาล โดยปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมอยู่ประมาณ 0.1-1 M เป็นเวลา 1-5 วัน ขึ้นอยู่กับระบบการเพาะเลี้ยงและชนิดของพืชเพื่อให้พืชปรับสภาพและทนทานต่อการขาดน้ำ แต่น้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษต่อพืช (Wu *et al*., 2003) Halmagyi *et al*. (2005) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้แก่ sucrose glucose mannitol และsorbitol ในการเก็บรักษาปลายยอดของมันฝรั่ง พบว่า การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อลดลงเมื่อใช้ glucose และ mannitol Chen and Wang (2002) รายงานว่าอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุดของแครอท ภายหลังการเก็บรักษา ต้องทำ preculture 2 ครั้ง โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาล sucrose 0.175 M เป็นเวลา 1-3 วัน และในอาหารที่เติมน้ำตาล sorbitol 0.4 M เป็นเวลา 4 วัน

การละลายน้ำแข็ง (thawing)

เมื่อต้องการนำเนื้อเยื่อที่เก็บรักษามาใช้ ต้องทำการละลายน้ำแข็งที่เกาะตัวออกอย่างรวดเร็วเพื่อไม่ให้น้ำภายในเซลล์เปลี่ยนจากของแข็งที่มีสภาพคล้ายแก้วไปเป็นผลึกน้ำแข็ง สภาพดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า -110 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันเซลล์ไม่ให้ได้รับอันตรายในขณะละลายน้ำแข็งจะต้องละลายอย่างรวดเร็วเพื่อผ่านจุดวิกฤตินี้ โดยแช่ในน้ำอุ่นหรืออาหารเพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิประมาณ 37-40 องศาเซลเซียส ในกรณีที่เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ จะทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่แข็งตัวนี้ทำได้ช้าและเกิดความเสียหายต่อเซลล์ได้ (ศิริกุล, 2548)

ภายหลังการละลายน้ำแข็งแล้วต้องดึงสารป้องกันความเย็นออกจากเซลล์ โดยการนำชิ้นส่วนพืชไปแช่ในสารละลาย osmotic เช่น แช่ในสารละลายที่มีน้ำตาล sucrose หรือ น้ำตาล sorbitol

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความเข้มข้น 1.2 M เพื่อหลีกเลี่ยงการดูดน้ำเข้าภายในเซลล์อย่างรวดเร็วและป้องกันการเคลื่อนย้ายของสารป้องการความเย็นเข้าสู่เซลล์ (Towill and Bajaj, 2002) Kim *et al*. (2006) รายงานว่าการเก็บรักษาปลายยอดของมันฝรั่ง ที่แช่ใน 0.8 M sucrose ให้ผลการรอดชีวิตสูงกว่าที่แช่ใน 0.3 และ 1.2 M sucrose ซึ่งขั้นตอนการละลายน้ำแข็งเป็นส่วนที่สำคัญในการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชเพื่อให้สามารถเจริญเติบโตได้ภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ดังนั้นจึงต้องควรระวังไม่ให้เซลล์ได้รับความเสียหายจากการเกิดผลึกน้ำแข็ง

วิธีการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวด

เทคนิคการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชในสภาพเย็นยิ่งยวดขึ้นอยู่กับปรากฏการณ์ของการเกิดสภาพแก้ว (vitrification) ซึ่งขั้นตอนของ vitrification นั้นเซลล์จะสูญเสียน้ำจากการเติมสารป้องกันความเย็นหรือการผึ่งให้แห้งก่อนการแช่แข็ง เพื่อให้สามารถหลีกเลี่ยงการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ vitrification, encapsulation-dehydration, encapsulation-vitrification, desiccation, pregrowth, pregrowth desiccation และ droplet freezing (Engelmann and Takagi, 2000; Sakai and Englemann, 2007)

Vitrification

ทำได้โดยนำชิ้นส่วนพืชที่ต้องการเก็บรักษามาเพาะเลี้ยงในที่อุณหภูมิต่ำกว่าปกติ ในที่มืดร่วมกับสารป้องกันความเย็นหรือในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง ประมาณ 7 วันขึ้นกับชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง เพื่อกระตุ้นการปรับตัวให้ทนทานต่อการแช่แข็งในขณะเก็บรักษา แล้วนำมาแช่ในสารป้องกันความเย็น (cryoprotectants solutions) เพื่อปรับการผ่านเข้าออกของสารผ่านผนังและเยื่อหุ้มเซลล์ และจุดเยือกแข็งของเซลล์ ซึ่งเซลล์จะมีความทนทานต่อการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ระหว่างการแช่แข็งและการละลายน้ำแข็งภายหลังการเก็บรักษา (Sakai *et al*., 2000) หลักการที่สำคัญในการเก็บรักษาโดยวิธี vitrification จำเป็นต้องควบคุมขั้นตอนการสูญเสียน้ำ และการแช่สารป้องกันความเย็น เพื่อป้องกันความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากความเป็นพิษของสารเคมีหรือความเครียด osmotic ในระหว่างการสูญเสียน้ำ

หลักการสำคัญในการเก็บรักษาโดยการทำให้เกิดสภาพแก้วอย่างสมบูรณ์ (vitrification) ต้องควบคุมขั้นตอนการสูญเสียน้ำจากการซึมผ่านของสารป้องกันความเย็น และป้องกันความเสียหายที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เกิดจากความเป็นพิษของสารเคมีหรือความเครียดจากการเกิด osmotic ระหว่างการสูญเสียน้ำ ดังนั้น ช่วงเวลาที่เหมาะสมในระหว่างการแช่ในสารละลาย PVS2 (plant vitrification solution) เป็นสิ่งที่สำคัญในการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวดด้วยเทคนิค vitrification (Niino *et al*., 2007) เพราะภาวะขาดน้ำอาจทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายจากความเป็นพิษของสารสะลาย PVS2 ความเครียดจากการเกิด osmotic ในระหว่างการแช่ในสารป้องกันความเย็น และการเกิดน้ำแข็งภายในเซลล์ระหว่างการแช่แข็ง ช่วงเวลาในการดึงน้ำที่เหมาะสมมีความสัมพันธ์กับปัจจัยหลายประการรวมถึงขนาดและชิ้นส่วนที่ใช้ และวิธีการแช่สารป้องกันความเย็น (Chen and Wang, 2002) Matsumoto and Sakai (2003) พบว่า ขั้นตอนการดึงน้ำออกสองครั้งสำหรับการเก็บรักษาปลายยอดขององุ่นโดยวิธี vitrification โดยการแช่สารละลาย 50% PVS2 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ตามด้วยการแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 50 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ให้การรอดชีวิตสูงกว่าการดึงน้ำออกครั้งเดียว

Encapsulation-dehydration

เป็นวิธีการที่พัฒนามาจากการทำเมล็ดเทียม (artificial seed) โดยการนำชิ้นส่วนพืชมาหุ้มด้วย alginate bead ปรับสภาพชิ้นส่วนพืชบนอาหาร preculture ที่มีน้ำตาลสูง จากนั้นดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยการเป่าลมด้วย lamina flow หรือใช้ silica gel ให้น้ำในเซลล์ลดลงเหลือประมาณ 20% ของน้ำหนักสด (Engelmann, 2000) แล้วจึงนำไปจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว ซึ่งการหุ้มชิ้นส่วนด้วย alginate bead จะช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ และง่ายต่อการหยิบจับขณะเคลื่อนย้าย

Wang *et al*. (2000) รายงานการเปรียบเทียบผลระหว่างการใช้ silica gel และ air drying ในการเก็บรักษาปลายยอดของ *Vitis vinfera* พบว่าอัตราการรอดชีวิตขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำภายในเซลล์ ไม่ได้ขึ้นกับวิธีการที่ทำให้เนื้อเยื่อสูญเสียน้ำ มีการศึกษาเกี่ยวกับการรอดชีวิตโดยใช้เทคนิค encapsulation-dehydration ปริมาณน้ำที่ทำให้ชิ้นส่วนพืชรอดชีวิตในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวได้ ตั้งแต่ 15%-25% (Uragami *et al*., 1989; Uragami *et al*., 1990; Sherlock *et al*., 2005) Ryynänen and Aronen (2005) ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาปลายยอดของสตอเบอร์รี่โดยใช้เทคนิค encapsulation–dehydration ร่วมกับเทคนิค vitrification โดยการทำ preculture ใน 0.8 M sucrose เป็นเวลา 19 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่น ๆ การทำ encapsulated เป็นเรื่องที่ง่าย (Hirai *et al*., 1998) และไม่เป็นพิษต่อชิ้นส่วนพืช (Niino and Sakai, 1992)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการทำ encapsulated เป็นวิธีที่ง่ายเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น และไม่มีความเป็นพิษอันเนื่องมาจากสารป้องกันความเย็น ในระหว่างการสูญเสียน้ำ (Niino and Sakai, 1992) อย่างไรก็ตาม ปัญหาของวิธี encapsulation-dehydration คือลดอัตราการเจริญเติบโต ภายหลังการเก็บรักษาการเจริญเติบโตและขบวนการดึงน้ำจะนานกว่าวิธี vitrification Sakai *et al*. (2000) ได้พัฒนาเทคนิค encapsulation-dehydration มี 2 ขั้นตอนโดย แช่ในสารละลาย loading solution (LS) ในขั้นตอนแรก และ การทำ osmoprotection ในระหว่างการทำ encapsulation ซึ่งจะช่วยลดเวลาในการทำให้แห้งและมีอัตราการเจริญที่สูงขึ้นในวาซาบิ (Matsumoto *et al*., 1995) ดอกเก็กฮวยและมิ้น (Sakai *et al*., 2000)

Encapsulation-vitrification

เป็นการรวมเอาหลักการของวิธี vitrification และ encapsulation-dehydration เข้าด้วยกัน โดยการหุ้มชิ้นส่วนพืชด้วย alginate bead ก่อนเพื่อป้องกันหรือลดความเสียหายที่จะเกิดกับชิ้นส่วนพืช แล้วนำไปดึงน้ำออกโดยการผ่านการแช่ในสารป้องกันความเย็นก่อนที่จะนำไปเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวด (Engelmann, 2000) Yamuna *et al*. (2007) รายงานการเก็บรักษาปลายยอดของขิงมีการรอดชีวิต 66% จากการทำ preculture ใน 0.1 M sucrose เป็นเวลา 24 ชั่วโมงตามด้วย 0.3 M sucrose เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วแช่ใน 2 M glycerol และ 1.6 M sucrose เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วแช่ในสารละลาย PVS2

encapsulation-vitrification เป็นวิธีการที่ง่ายต่อการหยิบจับ ประหยัดเวลาในการดึงน้ำออก และการฟื้นตัวในระยะแรกดีกว่า encapsulation-dehydration Hirai *et al*. (1998) สังเกตว่าการทำ encapsulation-vitrification ในเนื้อเยื่อเจริญของ *Fragaria ananassa* ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดยอดมากกว่า เนื้อเยื่อเจริญจากการทำ encapsulation

Desiccation

เทคนิคการทำให้แห้งมีขั้นตอนที่ง่ายมาก โดยการทำให้ชิ้นส่วนที่ต้องการเก็บรักษาแห้งอย่างเดียว แล้วนำไปจุ่มในไนโตรเจนเหลวโดยตรง เทคนิคนี้ใช้สำหรับเก็บรักษาเมล็ดพืช และชิ้นส่วนพืชที่สามารถทนต่อการแห้งได้ โดยการเป่าลมด้วย laminar air-flow หรือใช้ silica gel ซึ่งเทคนิคนี้จะขึ้นอยู่กับระดับความชื้นของชิ้นส่วนที่เก็บรักษา (Wen and Song, 2007) ความชื้นเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการรอดชีวิตโดยทั่วไปความชื้นจะอยู่ประมาณ 10-20% ของน้ำหนักเปียก มีรายงานว่ามีการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พัฒนาการเก็บรักษาคัพภะของข้าวโพดโดยการลดความชื้นได้ต่ำกว่า 13% ก่อนการแช่ในไนโตรเจนเหลว Lambardi *et al*. (2004) รายงานว่าคัพภะของส้มสามารถรอดชีวิตได้ที่ระดับความชื้นน้อยกว่า 20% ก่อนการแช่ในไนโตรเจนเหลว Seo *et al*. (2007) รายงานการเก็บปลายยอดของ *Paeonia lactiflora* ว่าสามารถเจริญเติบโตดี โดยการผึ่งลมใน laminar air-flow เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

Pregrowth และ Pregrowth desiccation

เทคนิค pregrowth พัฒนาสำหรับ somatic embryos ของพืชตระกูลกล้วย และ มันเทศ (*Ipomoea butatas*) (Blackesley *et al*., 1996) เทคนิค pregrowth ทำได้โดยการแช่เนื้อเยื่อใน sucrose ABA หรือ proline ที่มีความเข้มข้นสูง แล้วจึงนำไปจุ่มในไนโตรเจนเหลว และละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง แล้วเพาะเลี้ยงในอาหาร regrowth เพื่อชักนำการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ ส่วนเทคนิค pregrowth desiccation นั้น การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในอาหาร preculture เพื่อชักนำให้เกิดความทนทานต่อการแห้ง เพื่อสามารถแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง โดยเลี้ยงใน preculture บนน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง (Dumet *et al*., 1993; Blackesley *et al*., 1996) หรือ ABA หรือ proline เพื่อชักนำให้เกิดความทนทานต่อการแห้ง แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวโดยตรง Nitzsche (1980) ได้เก็บรักษาแคลลัส ของแครอท โดยทำ preculture เพื่อให้ทนต่อการแห้ง บนอาหาร Gamborg (10 มิลลิกรัมต่อลิตร ABA และ 50 กรัมต่อลิตร sucrose) และละลายน้ำแข็งภายหลังการแช่ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน Shimonishi *et al*. (1991) รายงานการเก็บรักษา somatic embryos ของแตงโมให้การรอดชีวิต 65% ภายหลังการทำ preculture ใน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ABA และ ความคุมความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 56-65%

Droplet-vitrification

เทคนิค droplet-vitrification เป็นการรวมเอาเทคนิค droplet-freezing และ vitrification เข้าด้วยกัน โดยการหยดสารป้องกันความเย็นลงในหลุม aluminium foil แล้วนำไปจุ่มในไนโตรเจนเหลว (Sakai and Englemann, 2007) และละลายน้ำแข็งโดยการจุ่ม aluminium foil ในน้ำอุ่น แล้วแช่ใน unloading ที่มี 0.8 M sucrose (Kim *et al*., 2006) ซึ่งในระหว่างการแช่แข็งและการละลายน้ำแข็งเซลล์จะได้รับการบาดเจ็บ (Agrawal *et al*., 2004; Kim *et al*., 2006; Yoon *et al*., 2006) ซึ่ง aluminium foil มีประสิทธิภาพในการระบายความร้อนได้อย่างรวดเร็วและสม่ำเสมอให้กับชิ้นส่วนที่เก็บรักษา (Halmagyi *et al*., 2005; Kim *et al*., 2006; Yoon *et al*., 2006) เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดผลึกน้ำแข็งภายใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เซลล์ และภายนอกเซลล์ (Kim *et al*., 2006) เทคนิคนี้ช่วยให้การรอดชีวิตสูงกว่า droplet-freezing หรือ vitrification อย่างเดียว Panis *et al*. (2005) ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาปลายยอดจากชิ้นส่วนตั้งต้นที่เป็นรากของพืชวงศ์กล้วย คือ *Musa* และ *Enset* ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้เทคนิค droplet-vitrification โดยการทำ preculture ที่มีน้ำตาล sucrose แล้วแช่ใน LS เป็นเวลา 7 ชั่วโมง และดึงน้ำออกโดยแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 30-50 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส Wagner *et al*. (2002) รายงานการเก็บรักษา apices ของมันฝรั่ง ด้วยเทคนิค droplet freezing โดยการแช่ใน 10% DMSO เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในอาหาร MS ที่เติม zeatin แล้วย้ายลงบน aluminium foil และจุ่มในไนโตรเจนเหลว Halmagyi *et al*. (2005) ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาปลายยอดมันฝรั่ง และกุหลาบ ด้วยเทคนิค vitrification-droplet การเก็บรักษาปลายยอดของกุหลาบ โดยทำ preculture ในอาหาร MS ที่เติม 0.1 ถึง 1 M sucrose เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 10-30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ภายหลังการละลายน้ำแข็ง ปลายยอดสามารถเจริญได้ภายใน 10 วัน

การจำแนกลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค เอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)

เทคนิคเอเอฟแอลพี เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่ง ที่มีความเหมาะสมในการจำแนกและตรวจสอบสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต พัฒนาขึ้นโดย Zebeau และ Vos นักวิจัยของบริษัท Keygene N.V. ประเทศเนเธอร์แลนด์ และได้จดสิทธิบัตรในปี ค.ศ. 1993 (Vos *et al*., 1995; Vos and Kuiper, 1997) เทคนิคเอเอฟแอลพี เป็นเครื่องหมายที่ตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ดังนั้นจึงรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP) และประสิทธิภาพของพีซีอาร์ เข้าด้วยกัน (สุรินทร์, 2545; Vos *et al*., 1995) สารพันธุกรรมจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก่อนแล้วเชื่อมต่อดีเอ็นเอด้วย adapter ที่เป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นไม่เกิน 20 เบส แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งเรียกขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบเฉพาะนี้ว่า “selective amplification” (Vos *et al*., 1995) โดยไพร์เมอร์จะจับเฉพาะเจาะจงกับ adapter นั้น ๆ ถือเป็นการเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณ ต่อจากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่มีการเพิ่มปริมาณนั้นมาแยกชิ้นส่วนโดยใช้พอลิอะคิลาไมด์เจล (polyacraylamide gel) ด้วยเทคนิคอิเลกโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacraylamide gel จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ (DAN profile) ที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เอเอฟแอลพีไพร์เมอร์คู่หนึ่ง ๆ นี้เรียกว่า “ลายพิมพ์เอเอฟแอลพี” จึงเป็นวิธีตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเออีกวิธีหนึ่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ของแต่ละตัวอย่างบอกถึงความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แต่โพลิมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ไม่ได้เกิดจากความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอแต่เกิดจากการมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้น (สุรินทร์, 2545)

การเก็บรักษาพันธุกรรมในสภาพเย็นยิ่งยวดให้ประสบความสำเร็จไม่เพียงแต่การทำให้ชิ้นส่วนพืชสามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว แต่อีกประการหนึ่ง คือ ชิ้นส่วนพืชภายหลังการเก็บรักษาจะต้องมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกับก่อนเก็บรักษา ซึ่งมีงานวิจัยจำนวนมากรายงานว่า การแสดงออกของเซลล์และอวัยวะต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อพืชจะต้องมีลักษณะเหมือนกับก่อนการเก็บรักษา เช่น คุณสมบัติทางเซลล์พันธุศาสตร์ คุณสมบัติทางชีวเคมี และการแสดงออกของยีน ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุล สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรม แต่สามารถใช้ร่วมกับวิธีอื่นได้ เช่น สัณฐานวิทยา (morphological) เซลล์วิทยา (cytological) ไอโซไซม์ (isozyme) (Scocchi *et al.*, 2004) โดยการใช้ rDNA (ribosomal DNA) probes เป็นเครื่องมือประเมินความมีเสถียรภาพ ผลกระทบต่อการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรมของเซลล์ร่างกาย ผลของสารป้องกันความเย็น และความเสียหายจากการแช่แข็ง (Harding, 1991) จากการตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมของชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวดโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่า somatic embryo ของ Cork oak (*Quercus suber* L.) ที่ผ่านการเก็บรักษาโดยวิธี encapsulation-dehydration ไม่มีความแตกต่างกัน (Fernandes *et al.*, 2008) เช่นเดียวกับการเก็บรักษาปลายยอดของมันฝรั่ง (*Solonum tuberosum* L.) (Zarghami *et al.*, 2008) และการเก็บรักษาขนุนในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี vitrification พบว่า ไม่มีความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของขนุน (วิทยาพร, 2550)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการศึกษาการเก็บรักษาเฉพาะส่วนของคัพภะในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation)

1. เมล็ดหวาย จำนวน 7 ชนิด

 1.1 หวายขี้ไก่ (*Calamus myrianthus* Becc.)
 1.2 หวายกำพวน (*Calamus longisetus* Griff.)
 1.3 หวายน้ำผึ้ง (*Calamus* sp.)
 1.4 หวายแข้งไก่ (*Daemonorops brachystachys)*
 1.5 หวายชุมพร (*Calamus tenuis* Roxb.)
 1.6 หวายเคาใหญ่ (*Korthalsia grandis* Rild.)
 1.7 หวายหอม (*Calamus pandanosmus* Furt.)

2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

 2.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและหยาบสำหรับชั่งสารเคมี
 2.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
 2.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ
 2.4 เตาไฟฟ้าหรือเตาแก๊ส
 2.5 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ สำหรับเตรียมอาหารและบรรจุอาหาร เช่น กระบอกตวง บีกเกอร์ ปิเปต และแท่งแก้วคนสารเคมี เป็นต้น

3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ฮอร์โมนพืช

4.1 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

4.2 6-benzylaminopurine (BAP)

5. สารฟอกฆ่าเชื้อ

5.1 clorox 20%

5.2 Tween 20

6. สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotectants)

6.1 glycerol

6.2 dimethyl sulfoxide (DMSO)

6.3 ethylene glycol

7. สารหุ้มเนื้อเยื่อ

7.1 3% Na-alginate

7.2 0.1 M $CaCl_2$

8. สารสำหรับดูดความชื้น silica gel

9. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการย้ายเนื้อเยื่อ

9.1 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (laminar air-flow cabinet)

9.2 เครื่องมือผ่าตัด เช่น มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว เป็นต้น

9.3 เครื่องมืออื่น ๆ เช่น ตะเกียงแอลกอฮอล์ กระบอกฉีดแอลกอฮอล์ ผ้าที่นึ่งฆ่าเชื้อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

10.1 ถังไนโตรเจนเหลว

10.2 หลอดเก็บเนื้อเยื่อ (cryotube)

10.3 กล่องเก็บความเย็น (ice box)

10.4 water bath

10.5 เครื่องมืออื่น ๆ เช่น ขวดแก้ว ไมโครปิเปต ขนาด 1,000 ไมโครลิตร tip ปลายตัด

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP)

1. เนื้อเยื่อหวาย จำนวน 2 ชนิด

1.1 หวายน้ำผึ้ง (*Calamus sp.*)

1.2 หวายชุมพร (*Calamus tenuis* Roxb.)

2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัด วัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

2.1 หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.2 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

2.3 โกร่งและก้านบด

2.4 ถุงมือแพทย์

2.5 pipette tips

2.6 pipettes (p1000, p200, p20 และ p2)

2.7 storage box

2.8 เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) (TOYOBO รุ่น Gelmate 2000)

2.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich รุ่น MIKRO 20, Germany)

2.10 ฉายแสงยูวีและถ่ายภาพดีเอ็นเอ (Gel Documentation) (รุ่น DOC – print II,VILBER LOURMAT, Germany)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.11 water bath (รุ่น GFL 1083, Labsouce Limited)

2.12 Lambda DNA (Promega)

2.13 Vortex-genie 2

2.14 absolute ethanol (Merck, Germany)

2.15 70% ethanol

2.16 chloroform (Merck,Germany)

2.17 isoamyl (Merck,Germany)

2.18 CTAB buffer (100mM Tris HCL pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2%PVP, 2% CTAB และ 2% 2 mercaptoethanol)

2.19 1XTBE buffer

2.20 SYBR Safe DNA gel stain (invitrogen)

2. 21 6X loading dry (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol,30% glycerol)

2.22 1XTE buffer (10mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0

2.23 agarose (Promega)

3. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี

3.1 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

3.2 orbital incubator (รุ่น JEN CONS SI 50, UK)

3.3 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย (Gene Amp^R PCR System 9700, PE Applied iosystems)

3.4 PCR tube (0.2 ml)

3.5 polyvinyl pyrrolidone (PVP)

3.5 isopopanol (sigma,USA)

3.6 *Eco*RI (Roche, USA)

3.7 *Tru*9I (Roche, USA)

3.8 T4 DNA ligase (Fermentas)

3.9 incubation buffer A (BOEHRINGER MANNHEIM)

3.10 *Eco*RI adapter

3.11 *Mse*I adapter

3.12 Ø X 174 DNA / *Hin* f I Marker (Fermentas)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.13 Go Tag Green Master Mix (Promega)

3.14 *Eco*RI primer +1

3.15 *Eco*RI primer +3

3.16 *Mse*I primer +1

3.17 *Mse*I primer +3

3.18 sequencing dye

4. อุปกรณ์และสารเคมีในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซีส

4.1 5X TBE buffer (Tris base 54 กรัม Boric acid 27.5 กรัม และ 0.5 M EDTA pH 8.0 20 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 ลิตร)

4.2 5% denaturing polyacrylamide gel

4.3 sodium thiosulfate (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

4.4 Ammonium persufate (APS) (BDH, England)

4.5 silver nitrate

4.6 acetic acid

4.7 37% formaldehyde

4.8 sodium carbonate (Na_2CO_3)

4.9 Sequi-Gen GT Sequencing cell (Bio-Rad, USA)

4.10 Bind silane

4.11 N,N,N',N' –tetramethylenediamine (TEMED)

5. โปรแกรมในการวิเคราะห์ข้อมูล

5.1 โปรแกรม NTSYSpc.ver 2.11T (Rohlf, 2000)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การศึกษาวิธีการเก็บรักษาเฉพาะส่วนของคัพภะในไนโตรเจนเหลว

1.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืช

ผลหวายที่เก็บจากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตน์ราชสุดา สยามบรมราชกุมารี จำนวน 3 ชนิด คือ หวายน้ำผึ้ง หวายกำพวน และหวายขี้ไก่ นำผลหวายมาฟอกฆ่าเชื้อโดยการผ่านน้ำไหลประมาณ 20 นาที หลังจากนั้นนำมาฆ่าเชื้อด้วย 20% Clorox ผสมด้วย tween-20 2-3 หยด ประมาณ 20 นาที แล้วจุ่มผลหวายในแอลกอฮอล์ 95% แล้วผ่านเปลวไฟ ใช้กรรไกรตัดกิ่งผ่าผลหวายแล้วแคะเอาเฉพาะส่วนของคัพภะมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 0.3 M sucrose เพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ภาพที่ 1) ในแต่ละการทดลองวางแผนการทดลองแบบ CRD 2 ซ้ำ ๆ ละ 10 ชิ้น โดยนำคัพภะมาผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

ภาพที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมคัพภะหวายก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

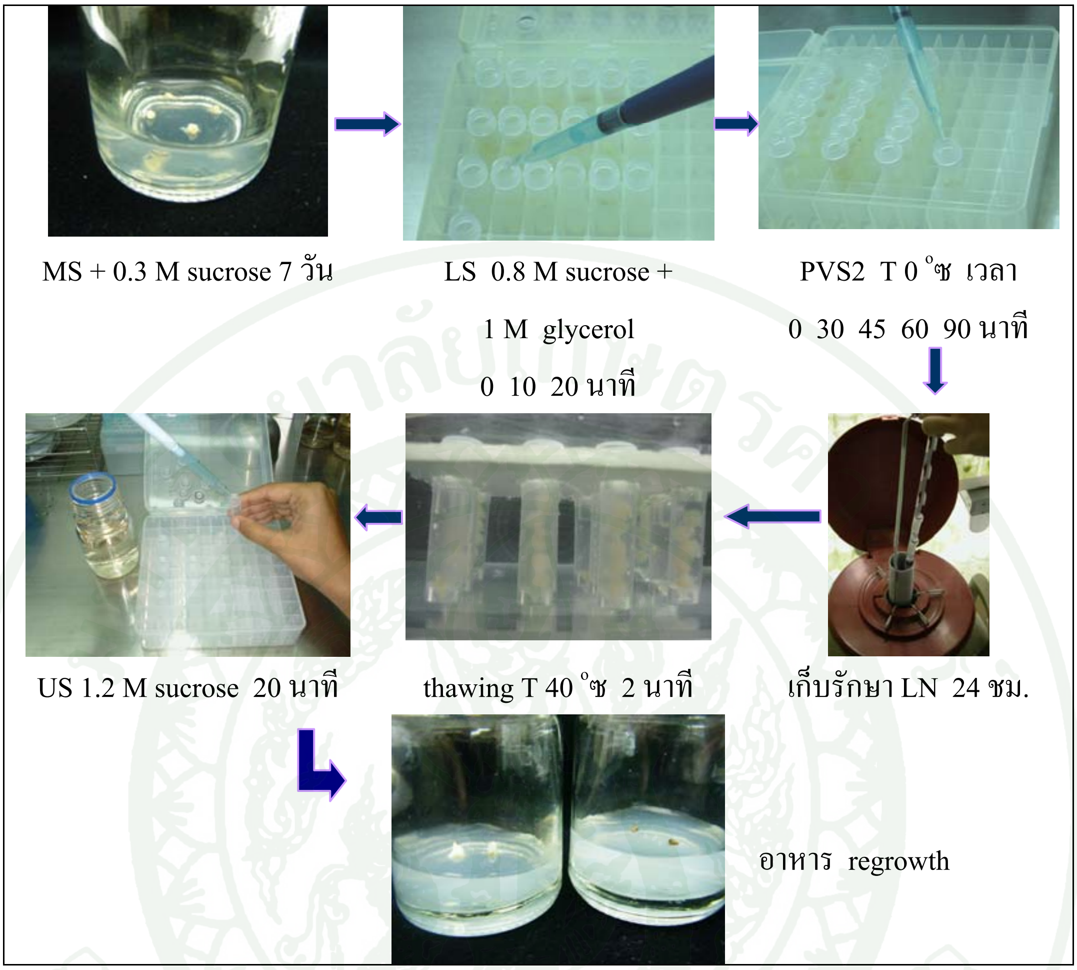
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 วิธีการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

1.2.1 vitrification

บรรจุเฉพาะส่วนของคัพภะหวายใส่ใน cryotube แช่ใน loading solution (LS) 0.8 M sucrose + 1 M glycerol เปรียบเทียบระยะเวลาในการแช่เป็นเวลา 0 10 และ 20 นาที แล้วนำไปแช่ในสาร cryoprotectant PVS2 30% (w/v) glycerol 15%(w/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) 15% (w/v) ethylene glycol ที่เติม 0.4 M sucrose นำไป prefreezing ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบระยะเวลาในการแช่เป็นเวลา 0 30 45 60 และ 90 นาที หลังจากนั้นเทสาร PVS2 ออก แล้วเติมสารละลาย PVS2 ใหม่ลงไป นำไปแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาละลายผลึกน้ำแข็งด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วนำมาล้างสาร PVS2 ใน unloading solution (US) 1.2 M sucrose เป็นเวลา 20 นาที นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 1 วัน แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน (ภาพที่ 2) เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



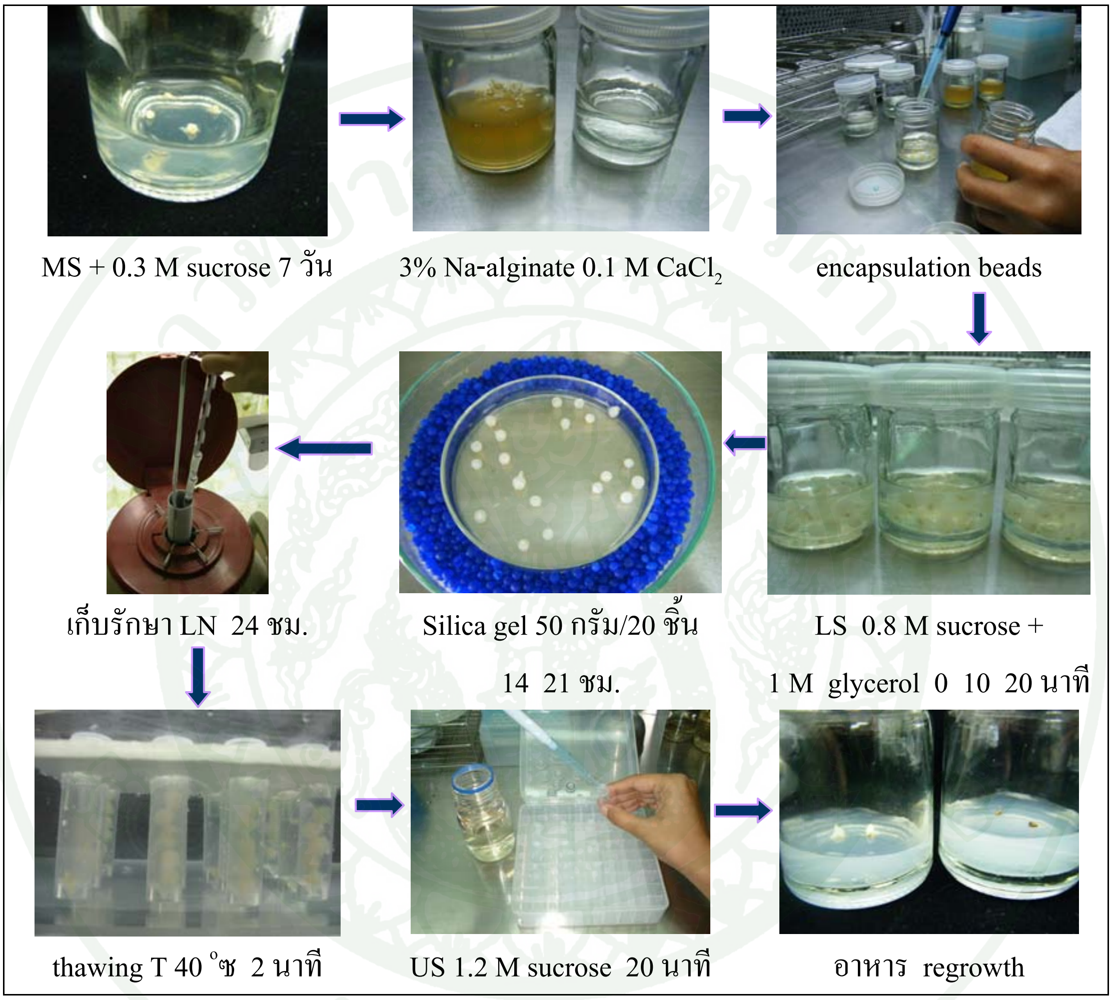
ภาพที่ 2 ขั้นตอนการเก็บรักษาคัพภะหวายในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี vitrification

1.2.2 encapsulation-dehydration

บรรจุส่วนของคัพภะหวายลงในขวดที่มี 3% Na-alginate ใช้ pipette tip ปลายตัดดูดสารละลาย 3% Na-alginate ให้มีชิ้นส่วนของคัพภะติดมาด้วย หยดลงในขวดที่มี 0.1 M $CaCl_2$ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นย้าย beads ที่มีคัพภะมาแช่ใน loading solution (0.8 M sucrose + 1 M glycerol) เปรียบเทียบระยะเวลาในการแช่เป็นเวลา 0 10 และ 20 นาที นำ beads วางบนจานแก้วเพื่อดึงน้ำออกด้วย silica gel หนัก 50 กรัมต่อ beads 20 ชิ้น เปรียบเทียบระยะเวลาในการดึงน้ำออกเป็นเวลา 14 และ 21 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำ beads บรรจุลงใน cryotube แล้วนำไปแช่ไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาละลายผลึกน้ำแข็งด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วนำมาแช่ใน unloading solution

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(US) 1.2 M sucrose เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน (ภาพที่ 3) เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต



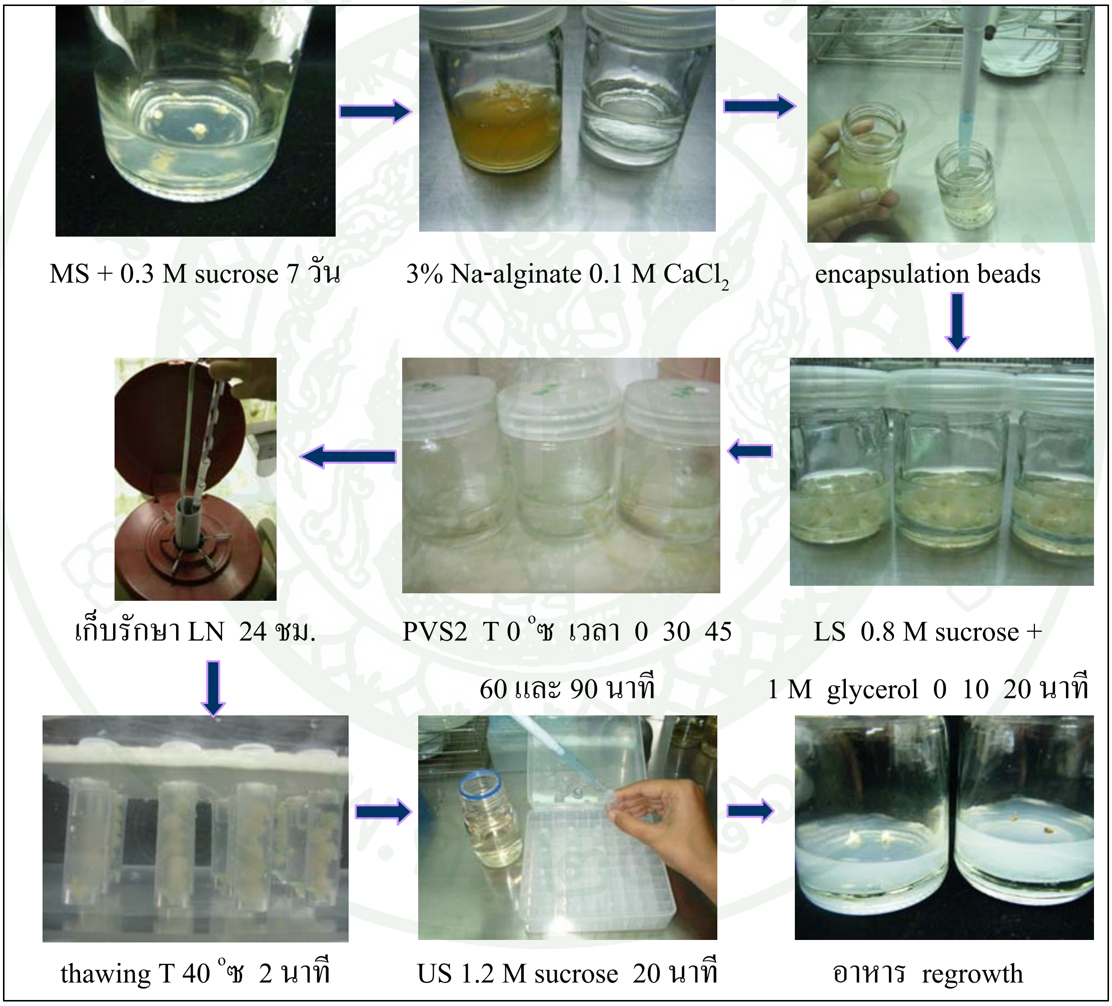
ภาพที่ 3 ขั้นตอนการเก็บรักษาคัพภะหวายในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration

1.2.3 encapsulation-vitrification

บรรจุส่วนของคัพภะหวายลงในขวดที่มี 3% Na-alginate ใช้ pipette tip ปลายตัดดูดสารละลาย 3% Na-alginate ให้มีชิ้นส่วนของคัพภะติดมาด้วย หยดลงในขวดที่มี 0.1 M $CaCl_2$ ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นย้าย beads ที่มีคัพภะมาแช่ใน loading solution (0.8 M sucrose + 1 M glycerol) เปรียบเทียบระยะเวลาในการแช่เป็นเวลา 0 10

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และ 20 นาที เติมสาร PVS2 นำไป prefreezing ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบระยะเวลาในการ pre freezing เป็นเวลา 0 30 45 60 และ 90 นาที หลังจากนั้นเทสาร PVS2 ออก แล้วเติมสารละลาย PVS2 แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาละลายผลึกน้ำแข็งด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วนำมาล้างสาร PVS2 ใน unloading solution (US) 1.2 M sucrose เป็นเวลา 20 นาที นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน (ภาพที่ 4) เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการเก็บรักษาคัพภะหวายในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-vitrification

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำการศึกษาการรอดชีวิตของคัพภะก่อนการแช่ในโตรเจนเหลวทุกการทดลอง โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเปรียบเทียบกับคัพภะที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว

1.3 คัดเลือกวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งมาประยุกต์ใช้ในหวาย 4 ชนิด

1.3.1 หวายแข้งไก่ (*Daemonorops brachystachys)*

1.3.2 หวายชุมพร (*Calamus tenuis* Roxb.)

1.3.3 หวายเดาใหญ่ (*Korthalsia grandis* Rild.)

1.3.4 หวายหอม (*Calamus pandanosmus* Furt.

1.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

โปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ SPSS Ver. 11.5

2. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP)

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เพาะเลี้ยงคัพภะหวายน้ำผึ้ง และหวายชุมพร ในสภาพปลอดเชื้อโดยนำผลหวายน้ำผึ้งและหวายชุมพร ที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อแล้วตัดเอาเฉพาะส่วนของคัพภะมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้คัพภะมีการเจริญเติบโตเพียงพอต่อการศึกษา (ภาพผนวกที่ 9) นำมาผ่านขบวนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวโดยวิธี encapsulation-dehydration แล้วนำชิ้นส่วนหวายที่ผ่านการแช่และไม่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวมาสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงวิธีการสกัดดีเอ็นเอของ Christiansen *et al*. (2002) โดยมีขั้นตอนดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1.1 บดคัพภะหวายในโกร่งบดยาโดยใช้ในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดเป็นผงแป้ง

2.1.2 ตักใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณครึ่งหลอด แล้วเติม CTAB buffer (2% CTAB, 2% PVP, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2% 2-mercaptoethanol) (65 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร

2.1.3 ผสมให้เข้ากัน vortex บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (พลิกหลอดไปมาทุกๆ 10 นาที)

2.1.4 เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24 : 1 (chloroform : isoamyl alcohol 24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เขย่าขึ้นลงเบา ๆ นาน 20 นาที

2.1.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกชั้นสารละลาย และคลอโรฟอร์มออกจากกัน หลังจากนั้นดูดสารละลายใส (ส่วนบน) ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.1.6 ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม absolute ethanol ที่เย็นปริมาณ 2.5 เท่าของปริมาตรของสารละลายที่ได้ เอียงหลอดไปมาจะพบดีเอ็นเอที่ตกตะกอน

2.1.7 นำไปแช่เย็นประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอนได้ดีขึ้น แล้วนำไปปั่นเหวียงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง ระวังอย่าให้ตะกอนที่ก้นหลอดหลุดออกมา แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที (จำนวน 2 ครั้ง) เทของเหลวทิ้ง คว่ำหลอดเพื่อผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง

2.1.8 เติม TE buffer (10mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์อาร์เอ็นเอส เอ (RNase A) ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เมื่อตะกอนดีเอ็นเอละลายดีแล้ว นำไปไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 การวัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

วัดคุณภาพและปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีส (agarose gel electrophoresis) โดยการย้อมด้วย SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) โมเลกุลของ SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) จะเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวคู่ของสายดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตก็จะเกิดการเรืองแสงขึ้นซึ่งวิธีนี้สามารถบอกถึงปริมาณดีเอ็นเอ โดยประมาณได้ และยังสามารถใช้ตรวจคุณภาพของดีเอ็นเอได้อีกด้วย ซึ่งในการตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอสามารถทำได้โดยการเตรียมเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% (agarose 0.8 กรัม ใน 0.5X TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) นำไปหลอมละลายด้วยไมโครเวฟ ทิ้งให้อะกาโรสเย็นลงจนกระทั่งอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เติม SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร แล้วเทลงในถาดเตรียมเจลที่มีหวีเสียบไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หรือจนกว่าเจลจะแข็งตัว แล้วดึงหวีออกอย่างระมัดระวัง ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีย้อม (loading dye) อัตราส่วน 1:9 แล้วหยอดลงในช่องว่างด้วยปิเปตต์ จากนั้นหยดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard DNA) ย้ายเจลลงในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีส (Gel Mate 2000, TOYOBO; Japan) โดยให้ด้านที่มีช่องหวีอยู่ด้านขั้วลบ แล้วเท 0.5X TBE buffer ลงจนท่วมแผ่นเจล ปิดฝาเครื่องแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าให้วิ่งผ่านจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 30 นาที สีย้อม (loading dye) จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางที่เหมาะสม (เคลื่อนที่ได้ 1 ใน 4 ของแผ่นเจล) จากนั้นจึงปิดกระแสไฟฟ้า นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) และบันทึกภาพโดยใช้เครื่อง DNA photo documentation เพื่อใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ เปรียบเทียบขนาดและความหนาของแถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นประมาณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น (deionized water) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) แล้ว ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)

2.3.1 การตัดดีเอ็นเอ (digestion) ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด

นำดีเอ็นเอต้นแบบมาตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด เพื่อให้ได้ชิ้น ดีเอ็นเอขนาดเล็ก ๆ ที่สามารถเพิ่มปริมาณในการทำพีซีอาร์ได้ดีและมีขนาดเหมาะสมในการแยกบน non-denaturing polyacrylamide gel สำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดในขั้นตอนนี้คือ *Eco*RI และ *Tru*9I การตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ มีขั้นตอนคือ ใส่ดีเอ็นเอและสารละลายแต่ละชนิดในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 เท่า (10X buffer : 10mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM magnesium acetate, 50 mM potassium acetate) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด คือ *Eco*RI ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ *Tru*9I ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงในไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.3.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter (ligation)

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์(polymerase chain reaction, PCR) โดย adapter ที่ต่อเข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอจะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งจับเกาะของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ ซึ่ง adapter ที่ใช้ คือ *Eco*RI adapter และ *Mse*I adapter โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร มาเติมสารละลาย *Eco*RI adapter ที่มีความเข้มข้น 50 พิกโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ *Mse*I adapter ที่มีความเข้มข้น 5 พิกโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 5 เท่า (5X ligase buffer : 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM magnesium acetate, 50 mM potassium acetate, 5 mM DTT 50 ng/ μl) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วเติมเอนไซม์ T4 DNA ligase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และเติม 10 mM ATP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงในไมโครเซนตริฟิวจ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ (PCR, Polymerase Chain Reaction)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems) ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ของเทคนิคเอเอฟแอลพีนั้นจะทำ 2 ครั้ง ขั้นที่ 1 เรียกว่า pre-amplification เป็นการเพิ่มปริมาณโดยการใช้ไพรเมอร์เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 1 เบสที่ปลาย 3’ และขั้นที่ 2 เรียกว่า selective amplification เป็นการนำผลผลิตที่ได้จากขั้นแรกมาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งจะใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3’ เพื่อเพิ่มโอกาสในการคัดเลือก จำนวน 3 เบส และให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการศึกษา

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอน pre-selective amplification นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter ที่เจือจาง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร เก็บส่วนที่เหลือไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเติมสารละลายไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่มีการเพิ่มเบสคัดเลือกเข้าที่ปลาย 3’ ไพรเมอร์ละ 1 เบส คือ ไพรเมอร์ E+1 และไพรเมอร์ M+1 ความเข้มข้น 70 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายบัพเฟอร์สำหรับทำพีซีอาร์ความเข้มข้น 10 เท่า (10X PCR buffer : 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM $MgCl_2$ 500 mM KCl) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร dNTP mix (dATP dCTP dGTP dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 100 มิลลิโมลาร์) ความเข้มข้นรวม 1 mM ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และสารละลายแมกนีเซียม ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 50 mM ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร ใส่เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงในเครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ 30 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems) ตั้งอุณหภูมิและเวลาของเครื่องจำนวน 20 รอบ ดังนี้คือ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที แล้วนำผลผลิตของ pre-selective amplification มาเจือจาง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ สำหรับเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณขั้นที่ 2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอน selective amplification นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอน pre-selective amplification เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ใส่หลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลายไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ E+3 และไพรเมอร์ M+3 ที่มีการเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3' ไพรเมอร์ละ 3 เบส ความเข้มข้น 30 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับทำพีซีอาร์ความเข้มข้น 10 เท่า (10X PCR buffer : 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 100 มิลลิโมลาร์) ความเข้มข้นรวม 1 mM ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และสารละลายแมกนีเซียม ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 50 mM ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร ใส่เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงในเครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ 30 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems) ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณโดยใช้โปรแกรม touch down PCR ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 1 รอบ ลดอุณหภูมิในขั้นตอน annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ และต่อด้วยอุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 23 รอบ เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว ให้เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.5 การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

การแยกขนาดดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มจำนวนจากวิธีพีซีอาร์โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้วิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสทำการแยกดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องแยกขนาดแบบ non denaturing polyacraylamide gel (Gel-scan 3000) ที่ความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ (polyacraylamide) 4.5 เปอร์เซ็นต์ และ 1X TBE buffer ผ่านกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining

2.6 การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มจำนวนจากขั้นตอน pre-amplification มาคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในขั้นตอน selective amplification โดยคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือกประกอบด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุดไพรเมอร์ 2 ชุด แต่ละชุดมีจำนวน 4 ไพรเมอร์ ซึ่งได้จำนวนคู่ไพรเมอร์ในการคัดเลือกทั้งสิ้น 16 คู่ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter และ ไพรเมอร์ ในขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเอเอฟแอลพี

สัญลักษณ์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Adapter	
*Eco*RI adapter	5’-CTCGTAGACTGCGTACC-3’
	3’-CATCTGACGCATGGTTAA-5’
*Mse*I adapter	5’-GACGATGAGTCCTGAG-3’
	3’-TACTCAGGACTCAT-5’
Primer+1	
E-A	5’-GACTGCGTACCAATTCA-3’
M-C	5’-GATGAGTCCTGAGTAAC-3’
Primer+3	
E-AAG	5’-GACTGCGTACCAATTCAAG-3’
E-ACT	5’-GACTGCGTACCAATTCACT-3’
E-ACC	5’-GACTGCGTACCAATTCACC-3’
E-ACG	5’-GACTGCGTACCAATTCACG-3’
M-CAC	5’-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3’
M-CAG	5’-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3’
M-CTA	5’-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3’
M-CTC	5’-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3’

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาวิธีการเก็บรักษาเฉพาะส่วนของคัพภะในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation)

1.1 vitrification

จากการนำคัพภะหวายทั้ง 3 ชนิด คือ หวายขี้ไก่ หวายกำพวน และหวายน้ำผึ้ง ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร preculture เพื่อเตรียมความพร้อมนาน 7 วัน มาหาช่วงเวลาในการแช่สาร loading solution และระยะเวลาการแช่สาร PVS2 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แล้วหาอัตราการรอดชีวิตของคัพภะหวายภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 1 วัน แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เป็นเวลา 1 เดือน เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของ คัพภะหวายที่ไม่ผ่านการแช่และผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว (LN) พบว่า คัพภะที่ไม่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวของหวายทั้ง 3 ชนิด มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดร้อยละ 100 ทุกช่วงเวลาในการแช่สาร loading solution และระยะเวลาการแช่สาร PVS2 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4) สังเกตได้จากคัพภะของหวายมีการขยายตัวใหญ่ขึ้น สีของคัพภะมีสีขาวอมเหลือง พร้อมที่จะพัฒนาและเจริญเติบโต (ภาพที่ 5ก.) และจากการทำ preculture เพื่อกระตุ้นการปรับตัวให้ทนทานต่อสภาพแช่แข็งเพียงอย่างเดียวเป็นเวลา 7 วัน ให้ผลการรอดชีวิตเหมือนกับการเติมสารป้องกันความเย็นทุกช่วงระยะเวลา แสดงว่าสาร cryoprotectants ไม่เป็นพิษต่อคัพภะ (Wang *et. al.*, 2005)

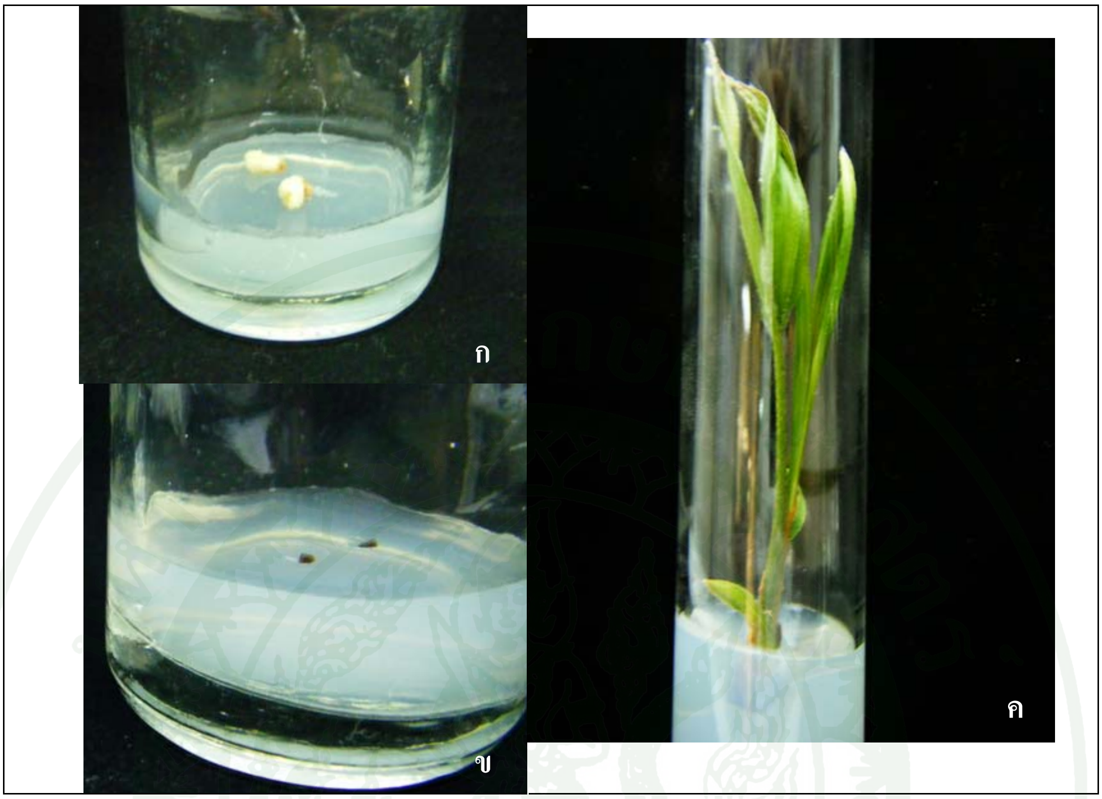
คัพภะที่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวไม่มีการตอบสนองต่ออาหาร MS ซึ่งให้อัตราการรอดชีวิตของคัพภะที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นร้อยละ 0 ทุกช่วงเวลาในการแช่สาร loading solution และระยะเวลาการแช่สาร PVS2 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4) สังเกตได้จากลักษณะของคัพภะกลายเป็นสีดำ (ภาพที่ 5ข.) อาจเป็นเพราะช่วงเวลาในการแช่สาร loading solution และ PVS2 น้อยเกินไป ทำให้สาร cryoprotectants ประเภทออกฤทธิ์ภายในเซลล์ได้แก่ DMSO และ glycerol ไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปภายในเซลล์ ทำให้การป้องกันการยืดตัวของเซลล์และปกป้องการเปลี่ยนแปลงของระบบ membrane บกพร่อง ส่วนสารประเภทออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ เช่น sucrose ที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์มีประสิทธิภาพลดลงทำให้น้ำภายในเซลล์เปลี่ยนเป็นผลึกน้ำแข็งทิ่มแทงเซลล์จนเสียหาย (Engelmann, 2000; Penycooke and Towill, 2000)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของคัพภะหวายทั้ง 3 ชนิด ที่ไม่แช่ (-LN) และแช่ (+LN) ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี vitrification ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน

PVS2 (นาที)	แช่ LS (นาที)	การรอดชีวิต (%±S.E.)					
		หวายน้ำผึ้ง		หวายกำพวน		หวายขี้ไก่	
		+LN	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN
0	0	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	10	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	20	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
30	0	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	10	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	20	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
45	0	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	10	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	20	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
60	0	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	10	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	20	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
90	0	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	10	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	20	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 การพัฒนาของคัพภะหวายกำพวนที่ไม่ผ่านการแช่และผ่านการแช่ในโตรเจนเหลวโดย วิธี vitrification (ก) การพัฒนาของคัพภะหวายกำพวนที่ไม่ผ่านการแช่ในโตรเจนเหลว ที่เพาะเลี้ยง บนอาหาร MS นาน 1 เดือน (ข) คัพภะหวายกำพวนที่ตายได้ภายหลังการแช่ในโตรเจนเหลวที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน (ค) การเจริญเติบโตของหวายกำพวนที่ไม่ผ่านการแช่ในโตรเจนเหลว ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 17 เดือน

1.2 encapsulation-dehydration

จากการนำคัพภะหวายทั้ง 3 ชนิด ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร preculture เพื่อเตรียมความพร้อมนาน 7 วัน แล้วห่อหุ้มคัพภะด้วย Na-alginate bead เพื่อหาช่วงเวลาในการแช่ beads ที่มีคัพภะในสาร loading solution และระยะเวลาในการดึงน้ำออกจากเม็ด beads โดยใช้ silica gel 50 กรัม/คัพภะ 20 ชิ้น แล้วหาอัตราการรอดชีวิตของคัพภะหวายภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 1 วัน แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เป็นเวลา 1 เดือน เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของคัพภะหวายที่ไม่ผ่านการแช่และผ่านการแช่ในในโตรเจนเหลว พบว่าคัพภะที่ไม่ผ่านการแช่ในโตรเจนเหลวมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดร้อยละ 100

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทุกช่วงเวลาในการแช่สาร loading solution และระยะเวลาในการดึงน้ำโดยใช้ silica gel (ตารางที่ 5) สังเกตจากคัพภะมีสีขาวอมเหลือง และมีขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 6ก.) แสดงว่า ระยะเวลาในการแช่สาร loading solution ที่เวลา 0 20 และ 30 นาที และระยะเวลาในการใช้ silica gel เป็นเวลา 14 และ 21 ชั่วโมง ไม่ทำให้คัพภะได้รับความเสียหาย

คัพภะที่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวมีการตอบสนองต่ออาหาร MS สังเกตจากคัพภะมีสีขาวอมเหลือง พร้อมที่จะพัฒนาและเจริญเติบโต (ภาพที่ 6ข.) โดยมีอัตราการรอดชีวิตของหวายทั้ง 3 ชนิด คือ หวายขี้ไก่ มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดร้อยละ 100 จากการแช่สาร loading solution 30 นาที ร่วมกับการใช้ silica gel ที่ 14 ชั่วโมง หวายกำพวนมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดร้อยละ 80±13.3 จากการแช่สาร loading solution 0 นาที ร่วมกับการใช้ silica gel ที่ 14 ชั่วโมง และหวายน้ำผึ้งมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดร้อยละ 20±13.3 จากการแช่สาร loading solution 20 นาที ร่วมกับการใช้ silica gel ที่ 14 ชั่วโมง และจากการแช่ loading solution 0 นาที ร่วมกับการใช้ silica gel 21 ชั่วโมง (ตารางที่ 5) ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ตารางที่ 6) เป็นผลจากการเตรียมความพร้อมของคัพภะบนอาหาร preculture ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูงถึง 0.3 M นาน 7 วัน ก่อนการทำเม็ด beads ช่วยทำให้เซลล์เกิดการสะสมน้ำตาลและเพิ่มความเสถียรของผนังเซลล์มากขึ้น โดยเฉพาะน้ำตาลซูโครสสามารถปกป้องเซลล์จากความเย็นในขณะที่เซลล์สูญเสียน้ำ การใช้ silica gel ที่ 14 ชั่วโมง ดึงน้ำออก สามารถป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่บริเวณ intracellular ของเซลล์ (Uragami *et. al.*, 1990) และการดึงน้ำออกจากเม็ด beads ด้วยสาร loading solution ที่มี glycerol ทำให้เนื้อเยื่อทนต่อความเย็นได้ดีขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของคัพภะหวายทั้ง 3 ชนิด ที่ไม่แช่ (-LN) และแช่ (+LN) ใน ไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี encapsulation-dehydration ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน

Silica gel (ชั่วโมง)	แช่ LS (นาที)	การรอดชีวิต (%±S.E.)					
		หวายน้ำผึ้ง		หวายกำพวน		หวายขี้ไก่	
		+LN	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN
14	0	0	100±0.0	80±13.3	100±0.0	20±13.3	100±0.0
	20	20±13.3	100±0.0	60±16.3	100±0.0	40±16.3	100±0.0
	30	0	100±0.0	40±16.3	100±0.0	100±0.0	100±0.0
21	0	20±13.3	100±0.0	20±13.3	100±0.0	40±16.3	100±0.0
	20	0	100±0.0	40±16.3	100±0.0	80±13.0	100±0.0
	30	0	100±0.0	0	100±0.0	80±13.0	100±0.0

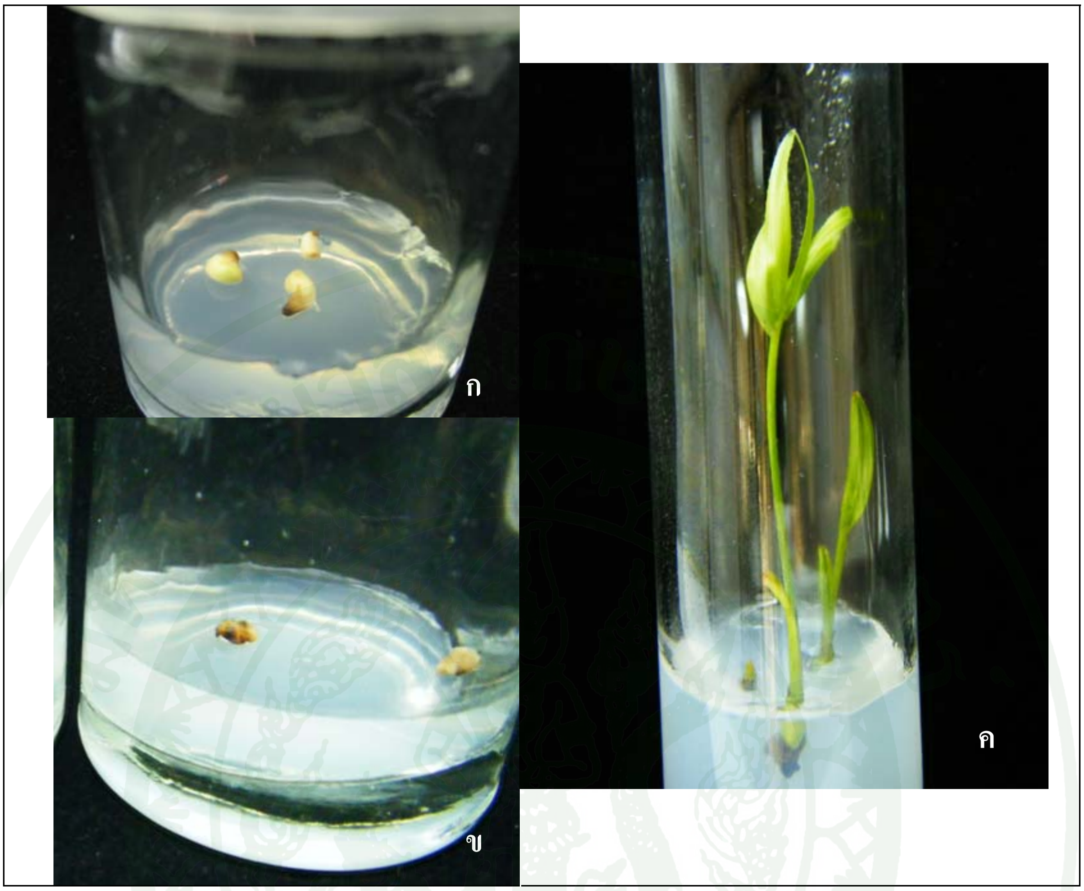
ตารางที่ 6 การรอดชีวิตของคัพภะหวายทั้ง 3 ชนิด ที่ผ่านการแช่ ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี encapsulation-dehydration ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน

Silica gel (ชั่วโมง)	แช่ LS (นาที)	การรอดชีวิต (%±S.E.)		
		หวายน้ำผึ้ง*	หวายกำพวน*	หวายขี้ไก่*
14	0	0^{b}	$8±1.33^{a}$	$2±1.33^{b}$
	20	$2±1.33^{a}$	$6±1.63^{ab}$	$4±1.63^{b}$
	30	0^{b}	$4±1.63^{bc}$	$10±1.00^{a}$
21	0	$2±1.33^{a}$	$2±1.33^{bcd}$	$4±1.63^{b}$
	20	0^{b}	$4±1.63^{bc}$	$8±1.33^{a}$
	30	0^{b}	0^{d}	$8±1.33^{a}$

หมายเหตุ * มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตัวอักษรต่างกันที่กำกับการรอดชีวิตของคัพภะหวายทั้ง 3 ชนิดแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan’s multiple range test ที่ 0.05

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 การพัฒนาของคัพภะหวายขี้ไก่ที่ไม่ผ่านการแช่และผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวโดยวิธี encapsulation-dehydration (ก) การพัฒนาของคัพภะหวายขี้ไก่ที่ไม่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน (ข) การพัฒนาของคัพภะหวายขี้ไก่ที่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน (ค) การเจริญเติบโตของหวายขี้ไก่ที่ไม่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 17 เดือน

1.3 encapsulation-vitrification

จากการนำคัพภะหวายที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร preculture เพื่อเตรียมความพร้อมเป็นเวลา 7 วัน มาหาช่วงเวลาในการแช่ beads ที่มีคัพภะในสาร loading solution และระยะเวลาในการแช่ beads ใน PVS2 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แล้วหาอัตราการรอดชีวิตของคัพภะหวายภายหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 1 วัน แล้วย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เป็นเวลา 1 เดือน เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของคัพภะหวายที่ไม่ผ่านการแช่และผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว (LN) พบว่า คัพภะที่ไม่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวมีอัตรา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การรอดชีวิตสูงสุดร้อยละ 100 ทุกช่วงเวลาในการแช่สาร loading solution และระยะเวลาในการแช่สาร PVS2 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 7) สังเกตได้จากลักษณะของคัพภะมีสีขาวอมเหลือง พร้อมที่จะพัฒนาและเจริญเติบโต (ภาพที่ 7ก.)

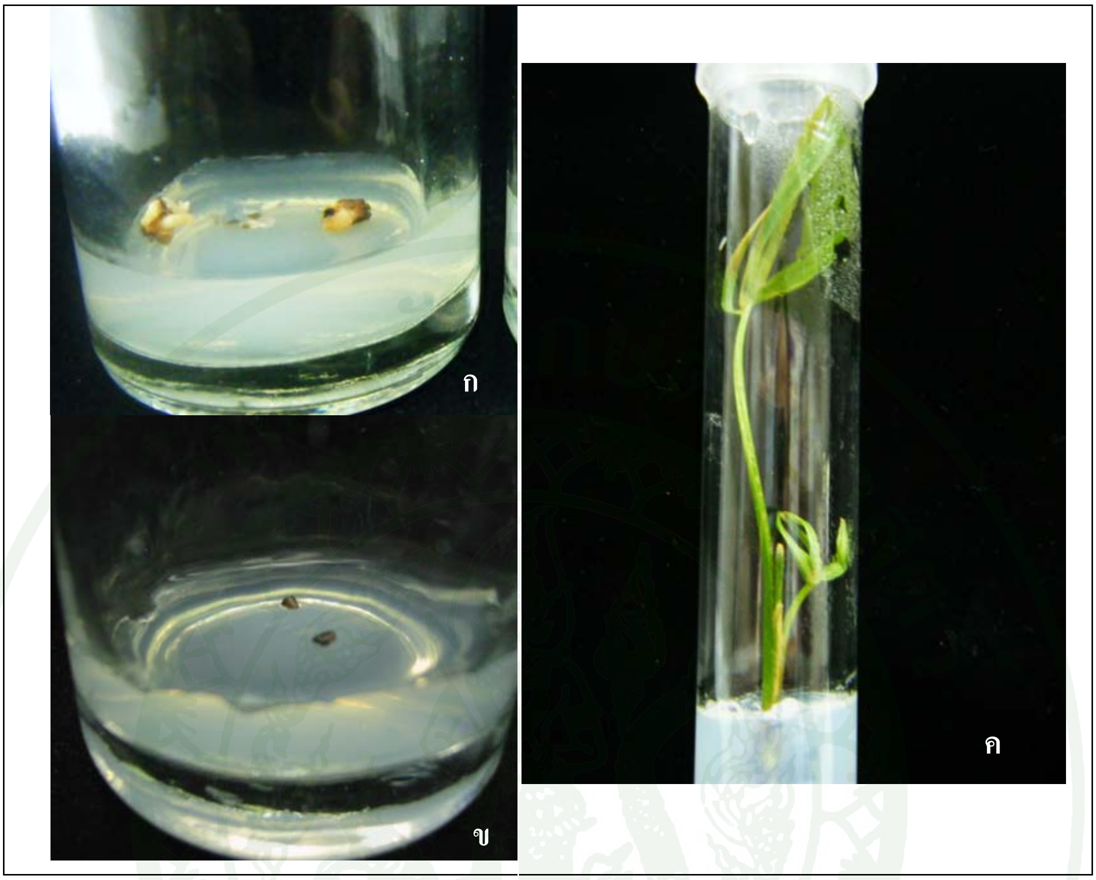
คัพภะที่ผ่านการแช่ในโตรเจนเหลวไม่มีการตอบสนองต่ออาหาร MS ซึ่งให้อัตราการรอดชีวิตของคัพภะที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว เป็น 0 เปอร์เซ็นต์ ทุกช่วงเวลาในการแช่สาร loading solution และระยะเวลาการแช่สาร PVS2 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 7) และสีของคัพภะกลายเป็นสีดำไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ (ภาพที่ 7ข.) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน อาจเป็นเพราะระยะเวลาการแช่สาร loading solution และ PVS2 น้อยเกินไป ทำให้ไม่สามารถดึงน้ำออกจากเซลล์ได้ จึงเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์ถูกทำลายและได้รับความเสียหาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของคัพภะหวายทั้ง 3 ชนิด ที่ไม่แช่ (-LN) และแช่ (+LN) ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี encapsulation-vitrification ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน

PVS2 (นาที)	แช่ LS (นาที)	การรอดชีวิต (%±S.E.)					
		หวายน้ำผึ้ง		หวายกำพวน		หวายขี้ไก่	
		+LN	-LN	+LN	-LN	+LN	-LN
0	0	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	10	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	20	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
30	0	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	10	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	20	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
45	0	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	10	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	20	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
60	0	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	10	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	20	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
90	0	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	10	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0
	20	0	100±0.0	0	100±0.0	0	100±0.0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 7 การพัฒนาของคัพภะหวายน้ำผึ้งที่ไม่ผ่านการแช่และผ่านการแช่ในโตรเจนเหลวโดยวิธี encapsulation-vitrification (ก) การพัฒนาของคัพภะหวายน้ำผึ้งที่ไม่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน (ข) คัพภะหวายน้ำผึ้งที่ตายภายหลังแช่ในโตรเจนเหลว ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน (ค) การเจริญเติบโตของหวายน้ำผึ้งที่ไม่ผ่านการแช่ใน โตรเจนเหลว ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 17 เดือน

จากการศึกษาการเก็บรักษาคัพภะหวาย 3 ชนิด คือ หวายขี้ไก่ หวายกำพวน และหวายน้ำผึ้งในไนโตรเจนเหลว ทั้ง 3 วิธีการ พบว่า วิธีที่สามารถเก็บรักษาคัพภะหวายในไนโตรเจนเหลวได้ดีที่สุด คือ วิธี encapsulation-dehydration ซึ่งให้อัตราการรอดชีวิตของหวายทั้ง 3 ชนิด ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ วิธี vitrification และ วิธี encapsulation-vitrification ดังนั้นจึงได้นำมาประยุกต์ใช้กับการเก็บรักษาคัพภะหวายอีก 4 ชนิด คือ หวายแข้งไก่ หวายหอม หวายชุมพร และหวายเดาใหญ่ โดยที่หวายแข้งไก่มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดร้อยละ 80±13.33 โดยผ่านการแช่สาร loading solution เป็นเวลา 10 นาที ร่วมกับการดึงน้ำออกด้วย silica gel เป็นเวลา 21 ชั่วโมง หวายหอมมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดร้อยละ 70±15.28 โดยผ่านการแช่สาร loading solution เป็นเวลา 20 นาที ร่วมกับการดึงน้ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ออกด้วย silica gel เป็นเวลา 14 ชั่วโมง หวายชุมพรมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดร้อยละ 80±13.33 โดยผ่านการแช่สาร loading solution เป็นเวลา 10 นาที ร่วมกับการดึงน้ำออกด้วย silica gel เป็นเวลา 21 ชั่วโมง และหวายเดาใหญ่มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดร้อยละ 80±13.33 โดยผ่านการแช่สาร loading solution เป็นเวลา 20 นาที ร่วมกับการดึงน้ำออกด้วย silica gel เป็นเวลา 21 ชั่วโมง (ตารางที่ 8)) ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 (ตารางที่ 9) จะสังเกตว่าหวายแต่ละชนิดจะใช้เวลาในการแช่สาร loading solution และการดึงน้ำออกด้วย silica gel ที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ในการเก็บรักษาพันธุกรรมหวายโดยใช้ชิ้นส่วนของคัพภะอาจขึ้นอยู่กับชนิดของหวายที่นำมาเก็บรักษา

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของคัพภะหวายทั้ง 4 ชนิด ที่ผ่านการแช่ที่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี encapsulation-dehydration ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน

Silica gel	LS	การรอดชีวิต (%±S.E.)			
(ชม.)	(นาที)	หวายแข้งไก่	หวายเดาใหญ่	หวายชุมพร	หวายหอม
14	0	50±16.67	20±13.33	40±16.33	0
	10	60±16.67	50±16.67	60±16.33	60±16.33
	20	50±16.67	0	70±15.28	70±15.28
	30	50±16.67	10±10	40±16.33	40±16.33
21	0	20±13.33	80±13.33	10±10	30±15.28
	10	80±13.33	40±16.33	80±13.33	0
	20	70±15.28	60± 16.33	60±16.33	50±16.67
	30	70±15.28	2013.33	50±16.33	40±16.33

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 การรอดชีวิตของคัพภะหวายทั้ง 4 ชนิด ที่ผ่านการแช่ ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี encapsulation-dehydration ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS นาน 1 เดือน

Silica gel (ชม.)	LS (นาที)	การรอดชีวิต (%±S.E.) หวายแข้งไก่*	หวายเดาใหญ่*	หวายชุมพร*	หวายหอม*
14	0	5±1.67[ab]	2±1.33[bcd]	4±1.63[ab]	0[b]
	10	6±1.63[ab]	5±1.67[abc]	6±1.63[a]	6±1.63[a]
	20	5±1.67[ab]	0[d]	7±1.53[a]	7±1.53[a]
	30	5±.1.67[ab]	1±1.0[cd]	4±1.63[ab]	4±1.63[ab]
21	0	2±1.33[b]	8±1.33[a]	1±1.00[b]	3±1.53[ab]
	10	8±1.33[a]	4±1.63[bcd]	8±1.33[a]	0[b]
	20	7±1.53[ab]	6±1.63[ab]	6±1.63[a]	5±1.67[a]
	30	7±1.53[ab]	2±1.33[bcd]	5±1.67[ab]	4±1.63[ab]

หมายเหตุ * มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05
ตัวอักษรต่างกันที่กำกับการรอดชีวิตของคัพภะหวายทั้ง 4 ชนิดแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ 0.05

2. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค เอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism ;AFLP)

การตรวจสอบความแปรปรวนทรงพันธุกรรมอันเกิดจากการแช่คัพภะหวายในไนโตรเจนเหลว ทำได้โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี โดยการสกัดดีเอ็นเอจากคัพภะหวาย 2 ชนิด คือ หวายน้ำผึ้ง และหวายชุมพร ที่ผ่านการแช่และไม่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสม 8 คู่ ได้แก่ E+ACC/M+CAC E+ACC/M+CAG E+ACC/M+CTA E+ACC/M+CTC E+ACT/M+CAG E+ACT/M+CTA E+ACT/M+CTC E+AAG/M+CAC จากการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ทั้งสิ้น 16 คู่ (ตารางที่ 10) หวายชุมพรให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 189 แถบ เฉลี่ย 23 แถบต่อหนึ่งคู่ไพร มีไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic band) 5 แถบ (ตารางที่ 11) ซึ่งความถี่ในการเกิด polymorphic ไม่มาก มีความเป็นไปได้ว่าลักษณะที่แตกต่างกันที่เกิดขึ้นนั้นอาจเป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลมาจากการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวด ซึ่งในระหว่างการแช่แข็งอาจทำให้ชิ้นส่วนที่เก็บรักษาบางส่วนตาย เนื่องจากความเสียหายที่เกิดขึ้นของเซลล์พืชเกิดจากการสูญเสียน้ำและการเกิดผลึกน้ำแข็งในระหว่างการแช่แข็ง (Engelmann, 2000) หรือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอาจเกิดตั้งแต่ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณของคัพภะที่ชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส ซึ่งการที่แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดภายหลังการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวดยังถือได้ว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นน้อยมาก (ภาพที่ 8) จากการศึกษาของ Fernandes *et al.* (2008) พบการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา 2.5% ใน Cork oak เช่นเดียวกับการศึกษาของ Hornero *et al.* (2001) รายงานความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างการเก็บรักษาชิ้นส่วนของต้น และ embryogenic ของต้น Cork oak เป็น 5.6-7.3% และSchaefer-Menuhr *et al.* (1996) ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเพียงเล็กน้อยในมันฝรั่งที่ผ่านการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวดเมื่อเปรียบเทียบกับที่เก็บรักษาในสภาพปกติ เช่นเดียวกับ Zarghami *et al.* (2008) ได้ตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของมันฝรั่ง 2 สายพันธุ์ Agria และ Marphona พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมภายหลังการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวดมีความคล้ายคลึงกัน 97% และ 100% ตามลำดับ ซึ่งอาจจะทำให้โอกาสที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมภายในยีนมีน้อยมากตามไปด้วย เพราะว่าดีเอ็นเอส่วนใหญ่ในจีโนมมากกว่า 90% เป็นส่วนที่ไม่ใช่ยีน ดังนั้น polymorphic ที่เกิดขึ้นน้อยเหล่านี้อาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของชิ้นส่วนที่นำมาเก็บรักษา ส่วนหวายน้ำผึ้งให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 216 แถบ เฉลี่ย 27 แถบต่อหนึ่งคู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 12) ซึ่งลักษณะทางพันธุกรรมภายหลังการเก็บรักษามีลักษณะที่เหมือนกัน แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวดไม่สามารถทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมของหวายน้ำผึ้งเกิดการเปลี่ยนแปลงภายหลังการเก็บรักษา (ภาพที่ 9)

ตารางที่ 10 คู่ไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ ที่คัดเลือกได้จากจำนวนคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 16 คู่

Primer	M+CAC	M+CAG	M+CTA	M+CTC
E+ACC	√	√	√	√
E+ACT		√	√	√
E+AAG	√			
E+ACG				

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพีกับดีเอ็นเอของหวายชุมพรที่ผ่านการแช่และ ไม่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 8 คู่ไพรเมอร์

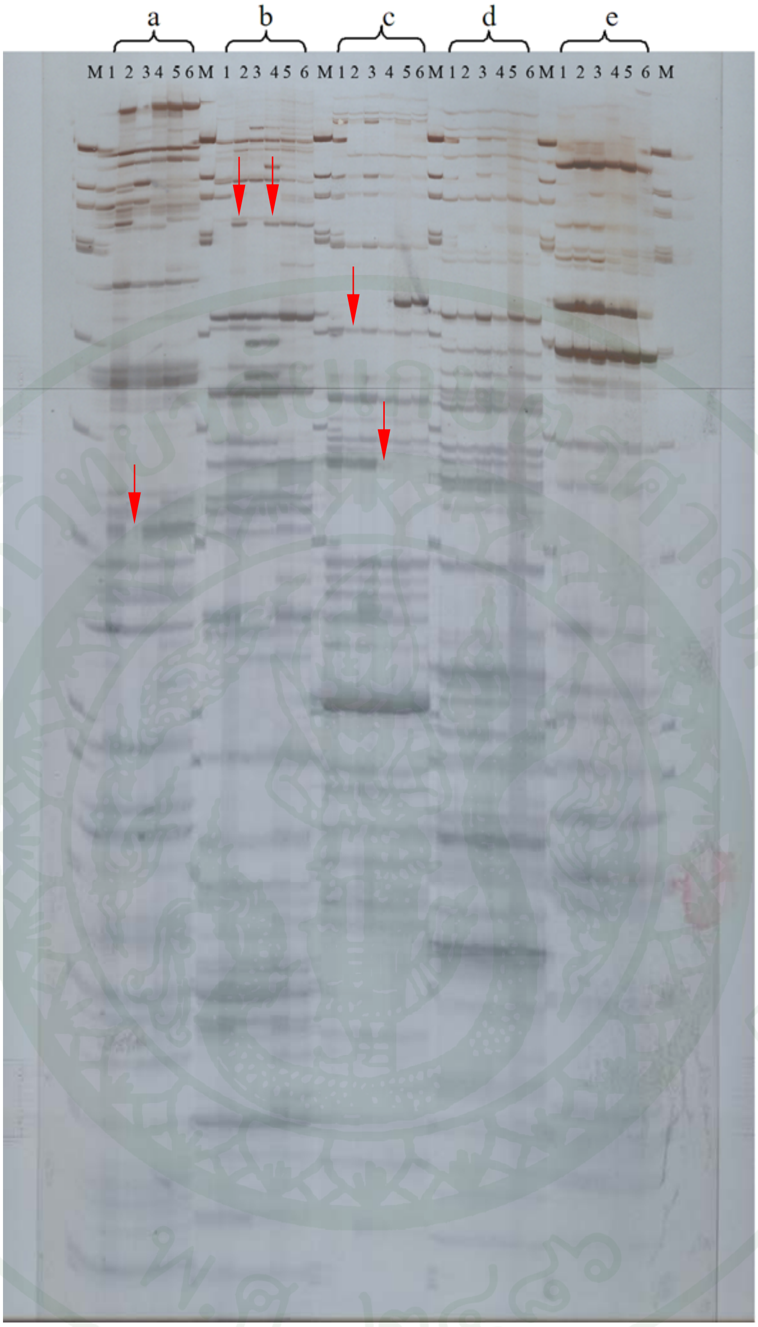
ลำดับที่	ไพรเมอร์		จำนวนแถบ	จำนวนแถบ	จำนวนแถบ
	E+	M+	ดีเอ็นเอทั้งหมด	monomorphic	polymorphic
1	ACT	CTA	37	36	1
2	ACT	CAG	49	47	2
3	ACT	CTC	34	32	2
4	AAG	CAC	45	45	-
5	ACC	CTA	25	25	-
6	ACC	CAG	28	28	-
7	ACC	CTC	20	20	-
8	ACC	CAC	23	23	-
	รวม		189	184	5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 แสดงจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพีกับดีเอ็นเอของหวายน้ำผึ้งที่ผ่านการแช่และไม่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ไพรเมอร์

ลำดับที่	ไพรเมอร์		จำนวนแถบ	จำนวนแถบ	จำนวนแถบ
	E+	M+	ดีเอ็นเอทั้งหมด	monomorphic	polymorphic
1	ACT	CTA	47	47	-
2	ACT	CAG	33	33	-
3	ACT	CTC	16	16	-
4	AAG	CAC	52	52	-
5	ACC	CTA	24	24	-
6	ACC	CAG	32	32	-
7	ACC	CTC	29	29	-
8	ACC	CAC	12	12	-
	รวม		216	216	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหวายชุมพร จำนวน 6 ตัวอย่าง ที่เกิดจากปฏิกิริยาเอเอฟแอลพีโดยใช้ไพรเมอร์ a = E+ACT/M+CTA, b = E+ACT/M+CAG, c = E+ACT/M+CTC, d = E+AAG/M+CAC, e = E+ACC/M+CTA และ M = molecular marker 100 bp หมายเลข 1, 3, 5 = คัพภะที่ไม่แช่ในไนโตรเจนเหลว หมายเลข 2, 4, 6 = คัพภะที่แช่ในไนโตรเจนเหลว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหวายน้ำผึ้ง จำนวน 8 ตัวอย่าง ที่เกิดจากปฏิกิริยาเอเอฟแอลพีโดยใช้ไพรเมอร์ a = E+ACT/M+CTA, b = E+ACT/M+CAG, c = E+AAG/M+CAC, d = E+ACC/M+CAG และ M = molecular marker 100 bp หมายเลข 1, 3, 5, 7 = คัพภะที่ไม่แช่ในไนโตรเจนเหลว หมายเลข 2, 4, 6, 8 = คัพภะที่แช่ในไนโตรเจนเหลว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาวิธีการเก็บรักษาเฉพาะส่วนของคัพภะในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation)

การเก็บรักษาคัพภะหวายน้ำผึ้ง หวายกำพวน และหวายขี้ไก่ ในไนโตรเจนเหลว ทั้ง 3 วิธีการ คือ vitrification encapsulation-dehydration และ encapsulation-vitrification พบว่า วิธีที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาคัพภะหวายในไนโตรเจนเหลว คือ encapsulation-dehydration ทำได้โดยการปรับสภาพคัพภะหวายด้วยการทำ preculture บนอาหาร MS ที่เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำคัพภะมาทำ encapsulation และแช่ใน loading solution ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ตามด้วยการทำให้แห้งด้วย silica gel หนัก 50 กรัม/คัพภะ 20 ชิ้น ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน เพื่อลดปริมาณน้ำในเซลล์ แล้วจึงนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งระยะเวลาในการแช่ loading solution การดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วย silica gel จะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของคัพภะหวายที่นำมาเก็บรักษา โดยที่วิธีการที่ดีที่สุดในการเก็บรักษาคัพภะหวายทั้ง 7 ชนิดในสภาพเย็นยิ่งยวดที่ให้การรอดชีวิตสูงที่สุด เป็นดังนี้

1. หวายขี้ไก่ โดยทำ preculture บนอาหาร MS ที่เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำคัพภะมาทำ encapsulation แล้วแช่ใน loading solution เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้แห้งด้วย silica gel เป็นเวลา 14 ชั่วโมง

2. หวายกำพวน โดยทำ preculture บนอาหาร MS ที่เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำคัพภะมาทำ encapsulation แล้วแช่ใน loading solution เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำให้แห้งด้วย silica gel เป็นเวลา 14 ชั่วโมง

3. หวายน้ำผึ้ง โดยทำ preculture บนอาหาร MS ที่เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำคัพภะมาทำ encapsulation แล้วแช่ใน loading solution เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำให้แห้งด้วย silica gel เป็นเวลา 14 ชั่วโมง

4 หวายแข้งไก่ โดยทำ preculture บนอาหาร MS ที่เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำคัพภะมาทำ encapsulation แล้วแช่ใน loading solution เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้แห้งด้วย silica gel เป็นเวลา 21 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5 หวายชุมพร โดยทำ preculture บนอาหาร MS ที่เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำคัพภะมาทำ encapsulation แล้วแช่ใน loading solution เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้แห้งด้วย silica gel เป็นเวลา 21 ชั่วโมง

6 หวายเดาใหญ่ โดยทำ preculture บนอาหาร MS ที่เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำคัพภะมาทำ encapsulation แล้วแช่ใน loading solution เป็นเวลา 0 นาที แล้วทำให้แห้งด้วย silica gel เป็นเวลา 14 ชั่วโมง

7 หวายหอม โดยทำ preculture บนอาหาร MS ที่เติม 0.3 M sucrose เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นนำคัพภะมาทำ encapsulation แล้วแช่ใน loading solution เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำให้แห้งด้วย silica gel เป็นเวลา 14 ชั่วโมง

2. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค เอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism ;AFLP)

การจำแนกลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี นำมาใช้เพื่อประเมินความเชื่อมั่นทางพันธุกรรมของหวาย 2 ชนิดภายหลังการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวด ซึ่งหวายทั้ง 2 ชนิดนี้ อาจมีความทนทานต่อการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวดในแง่ความคงที่ของพันธุกรรมที่ไม่เหมือนกัน โดยลักษณะทางพันธุกรรมของหวายน้ำผึ้งไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมภายหลังการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวด ส่วนหวายชุมพรมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมร้อยละ 3 ภายหลังการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวด แต่จะยิ่งชัดเจนยิ่งขึ้นถ้ามีข้อมูลทางสัณฐานวิทยามาพิจารณาประกอบกัน ดังนั้นวิธีการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวดจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าจะนำมาใช้ในการเก็บรักษาพันธุกรรมหวาย เพื่อไว้ใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต เนื่องจากลักษณะทางพันธุกรรมภายหลังการเก็บรักษามีค่าที่ยอมรับได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. 2552. **แนวทางการดำเนินงาน อพ.สธ. ระยะ 5 ปีที่สี่.** บริษัทเวิร์ค สแควร์ จำกัด, กรุงเทพฯ.

ชนาธิป กุลดิลก, ณัฏฐากร เสมสันทัด, วิโรจน์ อธิรัตนปัญญา และ วรรณา นิติวัฒนชัย. 2536. **การปลูกไม้ป่า.** โครงการพัฒนาชุมชน สวนป่าชุมชน สำนักส่งเสริมการปลูกป่า กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรฯ. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ส. มงคลการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ถนอม เปรมรัศมี. 2522. **วันต้นไม้ประจำปีของชาติ.** กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ.

ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์. 2536. **การเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของหวายตะค้าทอง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์, พรชัย จุฑามาศ และ กมลพรรณ นามวงศ์พรหม. 2539. การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของหวายตะค้าทอง, น. 27. *ใน* **การประชุมวิชาการเทคนิคของวิธีการทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ครั้งที่ 13**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรชัย จุฑามาศ, ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์, มนุวดี สมบูรณ์ทรัพย์, ปรานอม พฤฒพงษ์, อิศรา วงศ์ข้าหลวง และ สุรียา ตันติวิวัฒน์. 2533. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหวาย, น. 66. *ใน* **การประชุมวิชาการเทคนิคของวิธีการทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ครั้งที่ 8**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

ลิลลี่ กาวีต๊ะ. 2546. **การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานและพัฒนาการของพืช.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศิริกุล เกษา. 2548. **การอนุรักษ์พันธุ์จำปีสิรินธร *Magnolia sirindhorniae* Noot. & Chalermglin ในหลอดทดลองโดยการเก็บรักษาในสภาวะชะลอการเจริญและการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิทยาพร พรชุติ. 2550. **การเก็บรักษาขนุนในไนโตรเจนเหลว.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล.

อิศรา วงศ์ข้าหลวง. 2529. **การศึกษาการเจริญเติบโตของหวายหกชนิด.** รายงานการสัมมนาเรื่องหวาย.

Agrawal, A., R. Swennen and B. Panis. 2004. A comparision of four methods for cryopreservation of meristems in banana (*Musa* spp.). **CryoLett.** 25: 101-110.

Aronen, T.S., J. Krajnakova, H.M. Häggman and L.A. Ryyannen. 1999. Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica*. **Plant Sci.** 142: 163-172.

Aziah, M.Y. 1987. Mass-propagation techniques for rattan. Paper presented at the **Collogium on Rattan Propagation Problems and Challenges in Keto Kinalalu,** Sabah, 19-22th Jan.,1987. Malaysia. 11 pp.

Aziah, M.Y. and N. Manokaran. 1985. Seed and vegetative propagation of rattan, pp. 13-21. *In* K.M. Wong and N. Manokaran, eds. **Proceeding of the Rattan Seminar, 2nd-4th Oct.** 1984. Kuala Lumper, Malaysia.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bajaj, Y.P.S. 1995. Cryopreservation of cell, tissues, organs, and recalcitrant seeds. pp. 1-52. *In* Y.P.S. Bajaj, ed. **Biotechnology in Agriculture and Forestry 32: Cryopreservation of Plant Germplasm I.** New Delhi:Thomsom Press.

Benson, E.E., P.T. Lynch and J. Jones. 1992. Detection of lipid peroxidation products in cryoprotected and frozen rice cells: consequences for post-thaw survival. **Plant Sci.** 85: 107-114.

Blackesley, D., A. Mazrooei and S. Henshaw. 1996. Cryopreservation of non-encapsulated embryogenic tissue of sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Plant Cell Rep.** 15: 873-876.

Burkill, I.H. 1935. **A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula.** Crown Agents for the Colonies, London. 2 vols. 2402 pp.

Cadenas, E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. **Ann. Rev. Biochem.** 58: 79-110.

Chen, Y. and J.H. Wang. 2002. Cryopreservation of carrot (*Daucus carota* L.) cell suspensions and protoplasts by vitrification. **CryoLett.** 24: 57-64.

Christiansen, M.J., S.B. Andersen and R. Ortiz. 2002. Diversity changes in an intensively bred wheat germplasm during the 20th century. **Mol. Breed.** 9: 1-11.

Dekkers, A.J. and A.N. Rao. 1987. Some observations on *in vitro* culture of *Calamus rachycoleus*, pp. 63-67. *In* A.N. Rao and M.Y. Aziah, eds. **Proceeding of the Seminar on Tissue Culture of forest Species**, 15-18th Jun., 1987. Kula Lumper, Malaysia.

Dransfield, J. 1979. A manua of the rattan of the Malay Peninsula. **Malayan Forest Records No 29.** Forest Department, Kuala Lumpur. 270 pp.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dumet, D., F. Engelmann, N. Chabrillange and Y. Duval. 1993. Cryopreservation of oil palm somatic embryos involving a desiccation step. **Plant Cell Rep.** 12: 352-355.

Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. pp. 1-7. *In* F. Engelmann and H.Takagi, eds. **Cryopreservation of Tropic Plant Germplasm Current Research Progress and Application.** Rome: IPGRI.

Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In vitro Cell Biol Plant.** 40: 427-433.

Engelmann F. and H. Takagi. 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Japan International Research Centre for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. **International Plant Genetic Resources Institute**, Rome. Italy. 52: 261-268.

Flachsland, E., G. Terada, A. Scocchi, H. Rey, L. Mroginski and F. Engelmann. 2006. Cryopreservation of seeds and *in vitro* cultured protocorms of *Oncidium bifolium* (orchidaceae) by encapsulation-dehydration. **CryoLett.** 27: 235-242.

Fernandes, P., E. Rodriguez, G. Pinto, I. Roldan-Ruiz, M.D. Loose and C. Santos. 2008. Cryopreservation of *Quercus suber* somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability. **Tree Physiol.** 28: 1841-1850.

Häggman, H.M., L.A. Ryynanen, T.S. Aronen and J. Krajnakova. 1998. Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.** 54: 45-53.

Halmagyi, A., C. Deliu and A. Coste. 2005. Plant regrowth from potato shoot tips cryopreserved by a combinated vitrification-droplet method. **CryoLett.** 26: 313-322.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Halmagyi, A. and C. Deliu. 2007. Cryopreservation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot-tips by encapsulation-vitrification. **Sci Hort.** 113: 300–306.

Harding, K. 1991. Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow growth and cryopreservation. **Euphytica** 55: 141-146.

Hirai, D., K. Shirai, S. Shirai and A. Sakai. 1998. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of strawberry *(Fragaria* X *ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. **Euphytica** 101: 109-115.

Hirano, T., T. Godo, M. Mii and K. Ishikawa. 2005. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. **Plant Cell Rep.** 23: 534-539.

Hornero, J., I. Martinez, C. Celestino, F.J. Gallego, V. Torres and M. Toribio. 2001. Early checking of genetic stability of cork oak somatic embryos by AFLP analysis. **Intl. J. Plant Sci.** 162: 827-833.

Jokipii, S., L. Ryynanen, P.T. Kallio, T. Aronen and H. Haggman. 2004. A cryopreservation method maintaining the genetic fidelity of a model forest tree, *Populus tremula* L. X *Populus tremuloides* Michx. **Plant Sci.** 166: 799-806.

Kim, H.H., J.W. Yoon, Y.E. Park, E.G. Cho, J.K. Sohn, T.S. Kim and F. Engelmann. 2006. Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet vitrification. **CryoLett.** 27: 223-234.

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Mandal, B.B. and S.D. Sharma. 2007. Cryopreservation of *in vitro* shoot tips of *Dioscorea deltoidea* Wall., an endangered medicinal plant: effect of cryogenic procedure and storage duration. **CryoLett.** 28: 461-470.

Manokaran, N. 1979. A note on the number of fruits produced by four species of rattans. **Malaysian Forester** 42: 46-49.

Manokaran, N. 1985. Biological and edologial considerations pertinent to the silviculture of Rattans, pp. 95-105. *In*: K.M. Wong and N. Manokaran, eds. **Proceedings of the Rattan Seminar,** Kuala Lumpur, 2-4 October 1984. The Rattan Information Centre, Forest Research Institute, Kepomg.

Manokaran, N. 1989. Florering and fruiting patterns In: *Calamus caesius*, pp. 122-129. *In* A.N. Rao and I. Vongkaluang, eds. **Recent Research on Rattan. Proceeding of the International Rattan Seminar,** Chiagmai, 12-14 November 1987. Faculty of Forestry, Kasetsart University, Thailand & International Development Research Centre, Canada.

Marassi, M.A., A. Scocchi and M.A. Gonzalez. 2006. Plant regeneration from rice anthers cryopreserved by an encapsulation-dehydration technique. **In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.** 42: 31-36.

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

Matsumoto, T., A. Sakai and Y. Nako. 1998. A novel preculturing for enhancing the survival of *in vitro*-grown meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) cooled to-196°C by vitrification. **CryoLett.** 19: 27–36.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Matsumoto, T. and A. Sakai. 2003. Cryopreservation of axillary shoot tips of *in vitro*-grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocol. **Euphytica** 131: 299-304.

Menges, M. and J.A.H. Murray. 2004. Cryopreservation of transformed and wild-type *Arabiodopsis* and tobacco cell suspension cultures. **Plant J.** 37: 635-644.

Miao, N. Hwey., Y. Kaneko and Y. Sugawara. 2005. Ultrastructural implications of pretreatment for successful cryopreservation of *Oncidium* protocorm-like body. **CryoLett.** 26: 333-340.

Mikula, A., T. Tykaraska and M. Kuras. 2005. Ultrastructure of *Gentiana tibtica* proembryogenic cells before and after cooling treatments. **CryoLett.** 26: 367-378.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for repid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol Plant.** 15: 473-497.

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 25: 135-166.

Niino, T. and A. Sakai. 1992. Cryopreservation of alginate - coated *in vitro* grown shoot tips of apple, pear and mulberry. **Plant Sci.** 87: 199-206.

Niino, T., D. Tanaka, R.R. Tantely, K. Fukui and K. Shirata. 2007. Cryopreservation of basal stem buds of *in vitro* growth mat rush (*Juncus* spp.) by vitrification. **CryoLett.** 28: 197-206.

Nishizawa, S., A. Sakai, Y. Amano and T. Matuzawa. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. **Plant Sci.** 88: 67-73.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Nitzsche, W, 1980. One year storage of dried carrot callus. **Z Pflanzenphysiol.** 100: 269-271.

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

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

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

Ramirez, C., G. Farfan, J.M.L. Arada and M.E.G. Benito. 2005. Apex cryopreservation of several strawberry genotypes by two encapsulation- dehydration methods. **CryoLett.** 26: 17-24.

Rohlf, F.J. 2000. **Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, NTSY-pc Program Manual Version 2.0**. Applied Biostatistics Inc., 3 Heritage Lane, Setauket, NY 11733.

Ryynänen, L. and T. Aronen. 2005. Genome fidelity during short- and long-term tissue culture and differentially cryostored meristems of silver birch (*Betula pendula*). **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.** 83: 21-32.

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Sakai, A. and F. Englemann. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: A review. **CryoLett.** 28: 151-172.

Schaefer-Menuhr, A., E. Mueller, and E.M. Wagner. 1996. Cryopreservation: an alternative for long-term storage of old patato varieties. **Potato Res.** 39: 507-513.

Schoenweiss, K., A.M. Dinkel and R. Grotha. 2005. Comparison of cryopreservation techniques for long-term storage of Ash (*Fraxinus excelsior* L.). **CryoLett.** 26: 201-212.

Scocchi, A., M. Faloci, R. Medina, S. Olmos and L. Mroginski. 2004. Plant recovery of cryopreserved apical meristem-tips of *Melia azedarach* L. using encapsulation/ dehydration and assessment of their genetic stability. **Euphytica** 35: 29-38.

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

Sherlock, G., W. Block and E.E. Benson. 2005. Thermal analysis of the plant encapsulation dehydration cryopreservation protocol using silica gel as the desiccant. **CryoLett.** 26: 45-54.

Shimonishi, K., M. Ishikawa, S. Suzuki and S. Oosawa. 1991. Cryopreservation of melon somatic embryos by dessication method. **Jpn J Breed.** 41: 347-351.

Smirnoff, N. 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment, pp. 217-243. *In* N. Smirnoff, ed. **Environment and Plant Metabolism, Flexibility and Acclimation.** Bios Scientific Publishers, Oxford, U.K.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Steponkus, P.L., R. Langis and S. Fujikawa. 1992. Cryopreservation of plant tissues by vitrification, pp. 1–61. *In*: P.L. Steponkus, ed. **Advances in Low Temperature Biology V.1.** JAI Press, Hampton Hill, UK.

Sutthisrisilapa, C. 2004. Country report on the status of rattan resources and uses in Thailand, pp. 224-250. *In*: **Regoinal Conference on Sustainable Development of Rattan in Asia.** January 22-23, 2004, Manila, Philippines.

Taylor, R. and R. Fletcher. 1999. Cryopreservation of eukaryotic algae: a review of methodologies. **J. Appli. Phycol.** 10: 481–501.

Towill, L.E. and Y.P.S. Bajaj. 2002. **Cryopreservation of Plant Germplasm II. Biotechnology in Agriculture and Forestry Series**. Springer, London.

Turner, S., S.L. Krauss, E. Bunn, T. Senaratna, K. Dixon, B. Tan and D. Touchell. 2001a. Genetic fidelity and viability of *Anigozanthos viridis* following tissue culture, cold storage and cryopreservation. **Plant Sci.** 16: 1099-1106.

Turner, S.R., D.H. Touchell, T. Senaratna, E. Bunn, B. Tan and K.W. Dixon. 2001b. Effects of plant growth regulatory on survival and recovery growth following cryopreservation. **CryoLett.** 22: 163-174.

Uhi, N.W. and J. Dransfield. 1987. **Genera Palmarum: A Classification of Palms Based on the Work of H.E. Moore, Jr.L.H. Bailey Hortorium & the international Palm Society.** Lawrence, Kansas, United States. 610 pp.

Uragami, A., A. Sakai, M. Nagai and T. Takahashi. 1989. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. **Plant Cell Rep.** 8: 418-421.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Vos, P. and M. Kuiper. 1997. AFLP analysis. *In* Caetano Anolles and Gresshoff eds. **DNA Markers. Protocols, Application, and Overviews.** Wiley-Liss, Inc. New York. 364 pp.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acids Res.** 23: 4407-4414.

Wagner, G.M., H.M. Schumacher and R.J. Cross. 2002. Recovery of potato apices after several years of storage in liquid nitrogen. **CryoLett.** 24: 33-41.

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

Wang, Q., O. Batuman, P. Li, M.B. Joseph and R. Gafny. 2002. A simple and efficient cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of 'Troyer' citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. X *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] by encapsulation-vitrification. **Euphytica** 128: 135-142.

Wang, Y.L., M.J. Fan and S.I. Liaw. 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 46: 29-34.

Wen, B. and S. Song. 2007. Acquisition of cryotolerance in maize embryos during seed development. **CryoLett.** 28: 291-302.

Withers, L. and F. Engelmann. 1997. *In vitro* conservation of plant genetic resources, pp. 57-88. *In*: A. Altman ed. **Agricultural Biotechnology.** Marcel Dekker, Inc., New York.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Yamuna, G., V. Sumathi, S.P. Geetha, K. Praveen, N. Swapna and K.N. Babu. 2007. Cryopreservation of *in vitro* grown shoots of ginger (*Zingiber officinale* Rose.). **CryoLett.** 28: 241-252.

Yoon, J.W., H.H. Kim, H.C. Ko, H.S. Hwang, E.S. Hong, E.G. Cho and F. Engelmann. 2006. Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification: effect of subculture of mother-plants and of preculture of shoot tips. **CryoLett.** 27: 211-222.

Zarghami, R., M. Pirseyedi, S. Hasrak and B.P. Sardrood. 2008. Evaluation of genetic stability in cryopreserved *Solanum tuberosum*. **African J. Biotech.** 7: 2798-2802.

Zehui, J. 2007. Rattan resources and its industry. pp. 261-276. **In Bomboo and Rattan in the World**. China Forestry Publishing House. 261-276.

Zhang, Q.H., Y.Z. Cong, S.C. Qu, S.J. Luo and X.X. Tang. 2007. Cryopreservation of gametophytes of *Laminaria japonica* (Phaeophyta) with two-step cooling: interactions between variables related to post-thaw survival. **CryoLett.** 28: 215-222.

Zhao, Y., Y. Wu, F. Engelmann, M. Zhou and S. Chen. 1999. Cryopreservation of apple *in vitro* shoot tips the droplet freezing method. **CryoLett.** 20: 109-112.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหาร Murashige and Skoog

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก1 การเตรียมอาหาร Murashige and Skoog

สารเคมี	**มิลลิกรัมต่อลิตร**
Macro elements	
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Micro elements	
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.7H_2O$	22.3
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Na_2EDTA	37
$FeSO_4.7H_20$	27.85
Organic compounds	
Myo-Inositol	100
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine hydrochloride	0.1
Thiamine hydrochloride	0.1
Sucrose	30,000
Agar	8,000
pH 5.8	

ที่มา: Murashige and Skoog (1962)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารละลาย cryopreservation

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. อาหาร Preculture และ Regrow ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

อาหารสูตร MS (Stock I, II, III, IV)

Sucrose	0.3 M	51.34	กรัม
gelrite		2.5	กรัม

pH 5.7

2. Plant Vitrification Solution Formula 2 (PVS2)

glycerol	30%	(W/V)
Ethylene glycol (Eg)	15%	(W/V)
Dimethyl sulphoxide (DMSO)	15%	(W/V)
Sucrose	0.4	M

pH 5.7

ปรับปริมาตรด้วย MS basal medium (Stock I, II, III)

3. Loading Solution (LS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

glycerol	1	M
Sucrose	0.8	M

ปรับปริมาตรด้วย MS basal medium (Stock I, II, III)

pH 5.7

4. 3% Na-alginate ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Na-alginate	3%	(V/W)
Sucrose	0.4	M

Ca-free MS basal medium (Stock I –No $CaCl_2$, II, III)

pH 5.7

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. 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
5.7			

6. Unloading solution (US)

Sucrose	1.2	M

pH 5.7

ปรับปริมาตรด้วย MS basal medium (Stock I, II, III)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

วิธีการเตรียมสารละลายสำหรับการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. CTAB buffer 2X

2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)	100 mM	5	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20 mM	4	มิลลิลิตร
NaCl	1.4 M	8.182	กรัม
CTAB (Hexadecyltrimethyl-			
ammonium bromide,$C_{19}H_{42}NBr$)	2%	2	กรัม
Polyvinylpyrrolidone (PVP-40)	1%	1	กรัม
เติมน้ำให้ครบ		100	มิลลิลิตร

2. mM dNTPs

100 mM dATP	1 mM	10 ไมโครลิตร
100 mM dCTP	1 mM	10 ไมโครลิตร
100 mM dGTP	1 mM	10 ไมโครลิตร
100 mM dTTP	1 mM	10 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น		960 ไมโครลิตร

3. 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

EDTA (disodium ethylenediaminetetraacetate.$2H_2O$)	18.61	กรัม
น้ำ (dH_2O)	70	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วย NaOH ให้ได้ pH 8.0 เติมน้ำให้ครบ	100	มิลลิลิตร

4. 0.5 X TBE buffer ปริมาตร 1 ลิตร

5 X TBE	100	มิลลิลิตร
dH_2O	900	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. 1 M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 1 ลิตร

Tris base	121.1	กรัม

เติมน้ำ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ pH 8.0 เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร

6. Chloroform : isoamyl (24:1) ปริมาตร 1 ลิตร

Chloroform	960	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	40	มิลลิลิตร

7. TE buffer pH 8.0 ปริมาตร 1 ลิตร

1 M Tris-HCl pH 8.0	10	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA pH 8.0	2	มิลลิลิตร
dH_2O	988	มิลลิลิตร

8. 4.5% acrylamide ปริมาตร 1 ลิตร

ACRYL/BIS ™ 19:1 (amresco)	113.6	มิลลิลิตร
5 X TBE	100	มิลลิลิตร
Urea	450	มิลลิลิตร
เติมน้ำ (dH_2O) ให้ครบ	1	ลิตร

9. 10% Ammonium persulfate (APS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Ammonium persulfate	1	กรัม
dH_2O	10	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10. 0.5% ETOH-Acetic acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Acetic acid	50	ไมโครลิตร
95% ETOH	9.8	มิลลิลิตร

11. 5 X TBE (Tris-borate) ปริมาตร 1 ลิตร

Tris base	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
dH_2O	980	มิลลิลิตร

12. Fix & Stop Solution ปริมาตร 1 ลิตร

dH_2O	900	มิลลิลิตร
Acetic acid	100	มิลลิลิตร

13. Silver Stain

dH_2O	1000	มิลลิลิตร
Silver Nitrate	1	กรัม
Formaldehyde 37%	1.5	มิลลิลิตร

14. Developer

dH_2O	1000	มิลลิลิตร
NaCO3	30	กรัม
Formaldehyde 37%	1.5	มิลลิลิตร
Sodiumthiosulfate (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	200	ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ง1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการรอดชีวิตของคัพภะหวายน้ำผึ้งที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration ที่ความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	5	0.533	0.107	1.8
Error	54	3.200	0.059	
Total	59	3.733		

ตารางผนวกที่ ง2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการรอดชีวิตของคัพภะหวายกำพวนที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration ที่ความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	5	4.000	0.800	4.154
Error	54	10.400	0.193	
Total	59	14.400		

ตารางผนวกที่ ง3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการรอดชีวิตของคัพภะหวายขี้ไก่ที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration ที่ความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	5	4.800	0.960	5.4
Error	54	9.600	0.178	
Total	59	14.400		

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ง4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการรอดชีวิตของคัพภะหวายแข้งไก่ที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration ที่ความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	7	2.388	0.341	1.419
Error	72	17.300	0.240	
Total	79	19.688		

ตารางผนวกที่ ง5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการรอดชีวิตของคัพภะหวายเดาใหญ่ที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration ที่ความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	7	5.200	0.743	4.114
Error	72	13.000	0.181	
Total	79	18.200		

ตารางผนวกที่ ง6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการรอดชีวิตของคัพภะหวายชุมพรที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration ที่ความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	7	3.288	0.470	2.025
Error	72	16.700	0.232	
Total	79	19.988		

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ง7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการรอดชีวิตของคัพภะหวายหอมที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration ที่ความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	7	4.587	0.655	3.395
Error	72	13.900	0.193	
Total	79	18.488		

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก จ

ภาพหวายที่ใช้ศึกษาการเก็บรักษาในสภาพเย็นยิ่งยวด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพผนวกที่ จ1 ผลหวายขี้ไก่ *Calamus myrianthus* Becc.

ภาพผนวกที่ จ2 ผลหวายกำพวน *Calamus longisetus* Griff.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพผนวกที่ จ3 ผลหวายน้ำผึ้ง *Calamus sp.*

ภาพผนวกที่ จ4 ผลหวายแข้งไก่ *Daemonorops brachystachys*

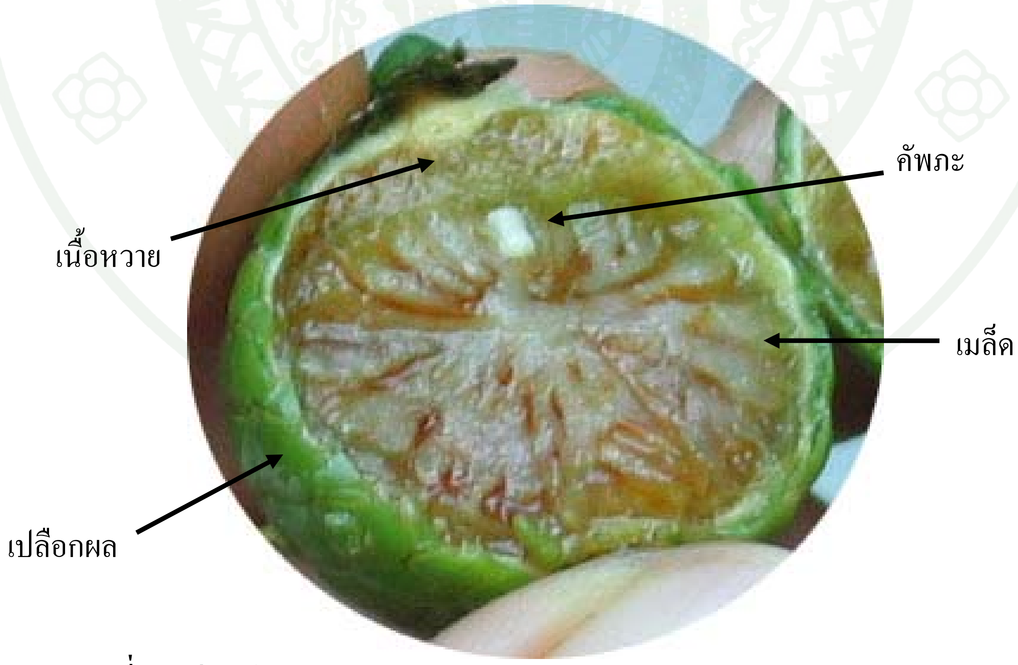
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพผนวกที่ จ5 ภาพผลหวายชุมพร *Calamus tenuis* Roxb.

ภาพผนวกที่ จ6 ผลหวายเดาใหญ่ *Korthalsia grandis* Rild.

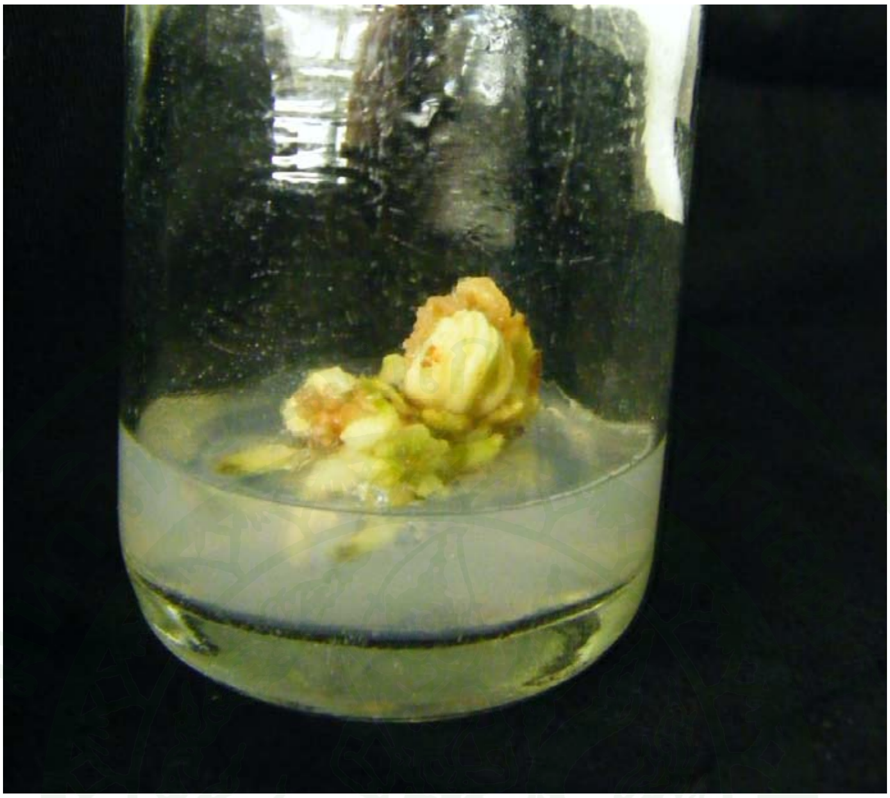
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพผนวกที่ จ7 ผลหวายหอม *Calamus pandanosmus* Furt.



ภาพผนวกที่ จ8 ส่วนประกอบของผลหวายหอม *C. pandanosmus* Furt.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ จ9 คัพภะหวายน้ำผึ้งที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวกำไล เรียนหัตถกรรม
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 31 สิงหาคม 2526
สถานที่เกิด	สระบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(วิทยาศาสตรบัณฑิต)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิจัย
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	หน่วยปฏิบัติการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์พืช ฝ่ายวิชาการ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สวนจิตรลดา สำนักพระราชวัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนโนวาร์ติส เฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์