แผนงานวิจัย แผนงานวิจัยมันสำปะหลัง

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลัง

กิจกรรม การวิจัยพื้นฐานและศึกษาข้อมูลจำเพาะของพันธุ์

กิจกรรมย่อย เทคโนโลยีการอนุรักษ์และเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลัง

ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) การศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังในสภาพเยือกแข็งเพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) Study on Cassava Germplasm Preservation Technology by Cryopreservation Technique for Gene bank

คณะผู้ดำเนินงาน

ปาริฉัตร สังข์สะอาด[1/] จิณณจาร์ หาญเศรษฐสุข[2/]

สุพินญา บุญมานพ[1/] พัฒน์นรี รักษ์คิด[1/]

บทคัดย่อ

การศึกษาการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดมันสำปะหลังในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) โดยทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ระยอง1 ระยอง2 ระยอง9 ระยอง11 เกษตรศาสตร์50 ห้านาที BRA931 และ MCOL2089 โดยเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดมันสำปะหลังเป็นเวลา 10 วัน ใช้ในการศึกษาสูตรอาหารในการ preculture ปลายยอดบนอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 1 วัน ด้วยวิธี vitrification ไม่พบความแตกต่างในอัตราการรอดชีวิต การศึกษา cryoprotectant และระยะเวลาในการแช่ที่เหมาะสม ด้วยวิธี vitrification พบว่าปลายยอดที่แช่ใน PVS2+0.4M sucrose เป็นเวลา 45 นาที หลังนำแช่ในไนโตรเจนเหลวยังคงสภาพความเขียวบนอาหาร MS ดัดแปลงเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน และในการศึกษาการเก็บรักษาปลายยอดมันสำปะหลังโดยวิธี vitrification พบอัตราการรอดชีวิต 35 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ส่วนวิธี Encapsulation – vitrification มีอัตราการรอดชีวิต 65 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป หลังแช่ในไนโตรเจนเหลวและเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลง โดยปลายยอดยังไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้

ABSTRACT

The shoot tips of cassava were used for cryopreservation technique, which was applied to 8 cultivars (Rayong1, Rayong2, Rayong9, Rayong11, KU50, Hanatee, BRA931 and MCOL2089) , the cassava shoot tips excised from 10 day-old plantlets were precultured on modified MS medium supplement with different concentration of non-sucrose, 0.3M sucrose and 0.5M sucrose for 1 day by vitrification method, the result was not difference in the survival rate. The optimum cryoprotectant and duration of dehydration were PVS2+0.4M sucrose for 45 min, the cassava shoot tips still survival on modified MS medium about 1 month after kept in liquid nitrogen. Preservation of vitrification method, the survival rate of cassava shoot tips was found more than 35 % and Encapsulation – vitrification method was found the survival rate about 65%. Further cryopreservation of dehydrated samples did not effect ability to produce a shoot.

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ โทร. 02-904-6885-95

[2/] ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง

คำนำ

การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช (Gene bank) นอกจากการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในรูปของเมล็ดพันธุ์ (Seed bank) การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อจัดว่ามีความสำคัญ โดยเฉพาะพืชที่ไม่สามารถเก็บเชื้อพันธุ์ในรูปแบบของเมล็ด ต้องใช้ส่วนขยายพันธุ์อื่นๆ ในการเก็บรักษา เช่น มันสำปะหลัง กล้วย อ้อย เงาะ ฯลฯ ซึ่งการเก็บรักษาในแปลงรวบรวมพันธุ์นั้นต้องอาศัยพื้นที่ แรงงาน และงบประมาณในการดูแล นอกจากนี้ยังเสี่ยงต่อการสูญหายที่เกิดจาก โรค แมลง และภัยธรรมชาติ

การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อในปัจจุบันในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชทั่วไปนิยมเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชในสภาพหลอดทดลอง (Tissue culture) โดยการลดการเจริญเติบโตให้ช้าลง (Slow growth) และการเก็บในสภาพเยือกแข็ง (Cryopreservation) ซึ่งเป็นการเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชในระยะยาว ดังนั้นธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตรจึงควรมีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเก็บในสภาพเยือกแข็งซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพและทันสมัยในพืชชนิดต่างๆ เพื่อเก็บรวบรวมเชื้อพันธุกรรมพืชไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์ ในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

มันสำปะหลังจัดเป็นพืชเศรษฐกิจและพืชพลังงานที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศไทย ปัจจุบันมีการเก็บรวบรวมพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร ในรูปแบบของท่อนพันธุ์และเนื้อเยื่อในสภาพหลอดทดลอง จำนวนกว่า 600 สายพันธุ์ เพื่อเป็นการลดความเสี่ยงต่อการสูญหายของท่อนพันธุ์ในแปลงปลูกจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมหรือภัยธรรมชาติและลดระยะเวลาในการเปลี่ยนอาหารในสภาพหลอดทดลอง การเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งจะเป็นอีกเทคนิคหนึ่งซึ่งจะช่วยเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังได้ในระยะยาวและยังเป็นการลดพื้นที่การเก็บรักษา ตลอดจนเป็นการพัฒนาการเก็บรวบรวมเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังในประเทศไทยเพื่อเป็นฐานพันธุกรรมให้แก่นักปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต รวมทั้งประโยชน์ในการแลกเปลี่ยน การนำเข้าเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังจากต่างประเทศให้ได้อย่างสะดวกและปลอดภัย

ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) โดยใช้ตัวอย่างจากกลุ่มพันธุ์มันสำปะหลังเศรษฐกิจ กลุ่มพันธุ์มันสำปะหลังสำหรับรับประทาน และกลุ่มพันธุ์ต่างประเทศ ได้แก่

พันธุ์ระยอง1

จัดเป็นมันสำปะหลังพันธุ์พื้นเมืองที่ต่อมามีการคัดเลือกพันธุ์และเปรียบเทียบผลผลิต พบว่าให้ผลผลิตสูงสุดในปี 2518 จึงให้ชื่อว่า พันธุ์ระยอง1 และได้รับการแนะนำพันธุ์เมื่อปี 2500 โดยกรมกสิกรรม มีลักษณะเด่น คือ ผลผลิตสูงปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ผลผลิตหัวสด 3.22 ตันต่อไร่ เปอร์เซ็นต์แป้ง 18.3 เปอร์เซ็นต์ สียอดอ่อนสีม่วง มีขน ก้านใบสีเขียวอมม่วง ใบหอกปลายมน แตกกิ่งเล็กน้อย ความสูงของการแตกกิ่งแรก 180 เซนติเมตร ลำต้นสีเขียวเงิน เนื้อหัวมีสีขาว เปลือกหัวสีน้ำตาลอ่อน หัวมีลักษณะยาวเรียว ต้านทานโรคใบไหม้ปานกลาง มีปริมาณแป้งต่ำ อายุเก็บเกี่ยว 12 เดือน

พันธุ์ระยอง9

คัดเลือกจากเมล็ด F1 ของ ศวร.ระยอง (CMR31-19-23 x OMR29-20-118) ได้รับรองพันธุ์ในปี 2548 มีลักษณะเด่น คือ ลำต้นสูงตรง ผลผลิตสูง มีปริมาณแป้งสูง ต้านโรค อัตราการขยายพันธุ์สูง เหมาะกับอุตสาหกรรมเอทานอล ผลผลิตหัวสด 4.9 ตันต่อไร่ เปอร์เซ็นต์แป้งในฤดูฝน 24 เปอร์เซ็นต์ ฤดูแล้ง 28-31 เปอร์เซ็นต์
สียอดอ่อนเขียวอ่อน ก้านใบสีเขียวอ่อนอมชมพู แฉกใบกลางเป็นรูปใบหอก แตกกิ่งน้อย ความสูงของการแตกกิ่งแรก 160-190 เซนติเมตร ลำต้นสีน้ำตาลอมเหลือง เนื้อหัวสีขาว เปลือกหัวสีน้ำตาลอ่อน หัวมีลักษณะเรียวยาว ไม่ต้านทานไรแดง ไม่เหมาะสำหรับดินร่วนเหนียวและดินร่วนปนลูกรัง ไม่เหมาะกับการเก็บเกี่ยวต่ำกว่า 12 เดือน

พันธุ์ระยอง11

คัดเลือกจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ระยอง5 และ CMR29-20-118 ที่ ศวร.ระยอง ได้รับการรับรองพันธุ์ในปี 2553 ลักษณะเด่น คือ มีปริมาณแป้งสูง ทนความแห้งแล้งได้ดี ผลผลิตหัวสด 4.77 ตันต่อไร่ เปอร์เซ็นต์แป้งในฤดูฝน 25.8 เปอร์เซ็นต์ ฤดูแล้ง 29-32 เปอร์เซ็นต์
สียอดอ่อนสีน้ำตาลอมเขียว ก้านใบสีเขียวอมแดง แฉกกลางใบเป็นรูปใบหอกแตกกิ่งน้อย ลำต้นสีเขียวเงิน เนื้อหัวสีขาว เปลือกหัวสีน้ำตาล
ควรเก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 12 เดือน เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์แป้งสูงแต่สะสมน้ำหนักช้า

พันธุ์เกษตรศาสตร์50

เป็นพันธุ์ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มีลักษณะเด่น คือ ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี มีความงอกดี เก็บรักษาได้นาน มีปริมาณแป้งสูง ผลผลิตหัวสด 4.4 ตันต่อไร่ เปอร์เซ็นต์แป้งในฤดูฝน 23 เปอร์เซ็นต์ ฤดูแล้ง 28 เปอร์เซ็นต์
สียอดอ่อนสีม่วงไม่มีขน ก้านใบสีเขียวอมม่วง ใบรูปร่างแบบใบหอก แตกกิ่งน้อย ความสูง 150 เซนติเมตร ลำต้นสีเขียวเงิน เนื้อหัวสีขาว เปลือกหัวสีน้ำตาลอ่อน หัวมีขนาดสม่ำเสมอ
การปลูกมีข้อจำกัดในบางท้องที่จะแตกกิ่งทำให้ไม่สะดวกในการปฏิบัติดูแลรักษา

พันธุ์ระยอง2

คัดเลือกจากเมล็ดพันธุ์ลูกผสมนำมาจาก CIAT นำต้นที่คัดเลือกจากเมล็ดมาปลูกแบบต้นต่อแถว ได้สายพันธุ์ CM305-21 ให้ผลผลิตหัวสดและมีค่าดัชนีการเก็บเกี่ยวสูงกว่าระยอง1 ลักษณะเด่น คือ เป็นมันประเภทรับประทาน เนื้อมันสดมีคุณค่าทางอาหารสูง เหมาะสำหรับทำอาหารรับประทาน ผลผลิตหัวสดสูง ผลผลิต 4.16 ตันต่อไร่
สียอดอ่อนสีเขียวอ่อน ก้านใบสีเขียวอ่อนปนแดง ใบสีเขียวอ่อน ลำต้นสีน้ำตาลอ่อน
อายุเก็บเกี่ยวถ้านำมารับประทาน ประมาณ 8 เดือน ส่งโรงงานอายุประมาณ 10-12 เดือน ต้านทานโรคไหม้ปานกลาง ควรเก็บเกี่ยวในระยะที่ไม่แห้งแล้ง

พันธุ์ห้านาที

เป็นพันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกมานานในประเทศไทย ลักษณะเด่น คือ เนื้อร่วน เหมาะสำหรับทำขนม เชื่อม ย่าง ผลผลิต 1.5-2 ตันต่อไร่

สียอดสีเขียว ก้านใบสีแดง ใบกว้าง แตกกิ่งสูง ลำต้นสีน้ำตาลเข้ม เนื้อหัวสีขาว เปลือกหัวนอกสีน้ำตาลเข้ม เปลือกในสีม่วง หัวมีลักษณะเรียวยาว

อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 8 เดือน ต้านทานโรคปานกลาง

พันธุ์ MBRA931 เป็นพันธุ์มันสำปะหลังของประเทศบราซิล ซึ่งทางศูนย์เกษตรเขตร้อนนานาชาติ (International Center for Tropical Agriculture, CIAT) ส่งพันธุ์มารวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง โดยอนุรักษ์ไว้ในแปลงปลูกและห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์

พันธุ์ MCOL2089 เป็นพันธุ์มันสำปะหลังของประเทศโคลัมเบีย ซึ่งทางศูนย์เกษตรเขตร้อนนานาชาติ (International Center for Tropical Agriculture, CIAT) ส่งพันธุ์มารวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง โดยอนุรักษ์ไว้ในแปลงปลูกและห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ http://at.doa.go.th/cassava/variety_cas.php

การเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งมีการศึกษาในหลายวิธี อาทิ

1. การเก็บแบบแช่แข็งโดยวิธี vitrification เป็นวิธีการที่ใช้สารเคมีป้องกันไม่ให้น้ำในเซลล์แข็งตัวเป็นน้ำแข็ง โดยสารเคมีที่ใช้นี้มีทั้งชนิดที่ซึมผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์หรืออาจห่อหุ้มภายนอกซึ่งจะช่วยไม่ให้เซลล์พืชได้รับอันตรายจากผลึกน้ำแข็งขณะแช่ในไนโตรเจนเหลว สารเคมีเหล่านี้ได้แก่ น้ำตาลซูโครส, กลีเซอรอล, เอธิลีนไกคอล และ DMSO

2. การเก็บแบบแช่แข็งโดยวิธี Encapsulation Dehydration โดยการทำเมล็ดเทียม ห่อหุ้มชิ้นส่วนพืชด้วยสาร alginate จากนั้นนำไปทำให้สูญเสียน้ำโดยวิธีต่างๆ เช่น การใช้สารซิลิกาเจลหรือน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง ก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว

3. การเก็บแบบแช่แข็งโดยวิธี Encapsulation - Vitrification เคลือบชิ้นส่วนพืชด้วยสาร alginate แล้วทำตามขั้นตอนของการแช่แข็งแบบวิธี vitrificaton ซึ่งการเคลือบสาร alginate จะช่วยลดความเป็นพิษที่ชิ้นส่วนของพืชจะต้องสัมผัสกับสารเคมีโดยตรงได้

การศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) จำเป็นต้องทดลองหาเทคนิคที่เหมาะสม เนื่องจากมันสำปะหลังแต่ละพันธุ์อาจตอบสนองต่อวิธีการต่างๆ กัน การศึกษาชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เหมาะสม, การ preculture, สาร cryoprotectant ที่เหมาะสมและระยะเวลาแช่สารละลาย เพื่อให้สามารถใช้ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช เพื่อการใช้ประโยชน์ต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) ที่เหมาะสมในมันสำปะหลัง เพื่ออนุรักษ์ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1. ท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 8 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์มันเศรษฐกิจ : ระยอง1 ระยอง9 ระยอง11 และเกษตรศาสตร์50 พันธุ์มันรับประทาน : ระยอง2 และ ห้านาที พันธุ์มันต่างประเทศ : MBRA931 และ MCOL2089
2. อาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง
3. เครื่องแก้วและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการทำ Cryopreservation
4. ถังไนโตรเจนเหลวและไนโตรเจนเหลว
5. วัสดุปลูกต่างๆ สำหรับปลูกมันสำปะหลัง ได้แก่ กระถาง, กระบะเพาะ, ดินปลูก เป็นต้น

วิธีดำเนินการ

การเตรียมเนื้อเยื่อในการทดลองเก็บรักษาปลายยอดมันสำปะหลังในสภาพเยือกแข็ง (Cryopreservation)

1. รวบรวมท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 8 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ระยอง1, ระยอง9, ระยอง11, เกษตรศาสตร์50 (กลุ่มพันธุ์มันเศรษฐกิจ) พันธุ์ระยอง2, ห้านาที (กลุ่มพันธุ์มันสำหรับรับประทาน) พันธุ์ MBRA931, MCOL2089 (กลุ่มพันธุ์มันต่างประเทศ)
2. ปลูกท่อนพันธุ์มันสำปะหลังในกระบะเพาะ
3. นำปลายยอดและตาข้างมันสำปะหลัง ฟอกฆ่าเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง โดยฟอกคลอร็อกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ตามด้วยการฟอกคลอร็อกซ์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที การฟอกแต่ละครั้งเติม tween20 จำนวน 1-2 หยด
4. เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดและตาข้างมันสำปะหลัง ในสูตร MS ดัดแปลง (ภาคผนวก) เลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,000 – 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน นานประมาณ 2 – 3 เดือน

การเก็บรักษาปลายยอดมันสำปะหลังในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation)

นำปลายยอดและตาข้างมันสำปะหลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่เพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 2-3 เดือน โดยตัดชิ้นส่วนดังกล่าว ขนาด 0.5 เซนติเมตร เลี้ยงในอาหาร MS ดัดแปลง เป็นเวลา 10-12 วัน จากนั้นตัดปลายยอดขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร ลงในอาหาร preculture แล้วจึงทำการทดลอง ดังนี้

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสม preculture ในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation)

ทดลองเก็บรักษาปลายยอดมันสำปะหลัง ทั้ง 8 พันธุ์ ในสภาพเยือกแข็งโดยวิธี Vitrification โดยนำเนื้อเยื่อปลายยอดขนาด 1 มิลลิเมตร เลี้ยงในอาหาร preculture คือ อาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 0 (ไม่เติมน้ำตาล), 0.3M และ 0.5M เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงนำเนื้อเยื่อปลายยอดแช่ใน loading solution (2M glycerol + 0.4M sucrose) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแช่ในสารละลาย PVS2 (30% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% DMSO ในอาหาร MS) เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 วัน นำปลายยอดที่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวละลายผลึกน้ำแข็ง (thawing) โดยแช่ในน้ำอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงแช่ในสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1.2 M ในอาหาร MS (unloading) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำปลายยอดวางบนอาหารแข็งที่มีกระดาษกรองวางด้านบน เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงย้ายลงอาหาร MS ดัดแปลง สูตรเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง โดยวางในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายออกเลี้ยงในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปกติ
บันทึกอัตราการรอดชีวิตของปลายยอดที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว (+LN) และปลายยอดที่ไม่ได้แช่ในไนโตรเจนเหลว (-LN)

การศึกษา cryoprotectant ที่เหมาะสม

ทดลองเก็บรักษาปลายยอดมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง11 ในสภาพเยือกแข็งโดยวิธี Vitrification โดยนำปลายยอดมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง11 ขนาด 1 มิลลิเมตร ลงในอาหาร preculture สูตร MS + 0.3M sucrose เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงนำเนื้อเยื่อปลายยอดแช่ใน loading solution (2M glycerol + 0.4M sucrose) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแช่ในสาร cryoprotectant ชนิดต่างๆ กัน 4 ชนิด ได้แก่ สารละลาย PVS2 (30% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% DMSO ในอาหาร MS) เป็นเวลา 45 นาที , สารละลาย PVS2 ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.4 โมลาร์ เป็นเวลา 45 นาที, สารละลาย PVS3 เป็นเวลา 45 นาที และ สารละลาย DMSO 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที (ประศาสตร์, 2536) หลังจากนั้นแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 วัน นำปลายยอดที่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวละลายผลึกน้ำแข็ง (thawing) โดยแช่ในน้ำอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงแช่ในสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1.2 M ในอาหาร MS (unloading) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำปลายยอดวางบนอาหารแข็งที่มีกระดาษกรองวางด้านบน เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงย้ายลงอาหาร MS ดัดแปลง สูตรเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง โดยวางในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายออกเลี้ยงในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปกติ
บันทึกอัตราการรอดชีวิตของปลายยอดที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว (+LN) และปลายยอดที่ไม่ได้แช่ในไนโตรเจนเหลว (-LN)

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่สารละลาย PVS2

ทดลองเก็บรักษาปลายยอดมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง11 ในสภาพเยือกแข็งโดยวิธี Vitrification โดยนำปลายยอดมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง11 ขนาด 1 มิลลิเมตร ลงในอาหาร preculture สูตร MS + 0.3M sucrose เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงนำเนื้อเยื่อปลายยอดแช่ใน loading solution (2M glycerol + 0.4M sucrose) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแช่ในสารละลาย PVS2 ระยะเวลาต่างๆ กัน คือ 0, 30, 45, 60 และ 90 นาที หลังจากนั้นแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 วัน นำปลายยอดที่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวละลายผลึกน้ำแข็ง (thawing) โดยแช่ในน้ำอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงแช่ในสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1.2 M ในอาหาร MS (unloading) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำปลายยอดวางบนอาหารแข็งที่มีกระดาษกรองวางด้านบน เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงย้ายลงอาหาร MS ดัดแปลง สูตรเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง โดยวางในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายออกเลี้ยงในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปกติ
บันทึกอัตราการรอดชีวิตของปลายยอดที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว (+LN) และปลายยอดที่ไม่ได้แช่ในไนโตรเจนเหลว (-LN)

การศึกษาการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดมันสำปะหลังในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) โดยวิธี Vitrification

ทดลองเก็บรักษาปลายยอดมันสำปะหลัง ทั้ง 8 พันธุ์ ในสภาพเยือกแข็งโดยวิธี Vitrification โดยนำเนื้อเยื่อปลายยอดขนาด 1 มิลลิเมตร เลี้ยงในอาหาร preculture สูตร MS + 0.3M sucrose เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงนำเนื้อเยื่อปลายยอดแช่ใน loading solution (2M glycerol + 0.4M sucrose) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแช่ในสารละลาย PVS2 (30% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% DMSO+ 0.4M sucrose ในอาหาร MS) เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 วัน นำปลายยอดที่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวละลายผลึกน้ำแข็ง (thawing) โดยแช่ในน้ำอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงแช่ในสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1.2 M ในอาหาร MS (unloading) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำปลายยอดวางบนอาหารแข็งที่มีกระดาษกรองวางด้านบน เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงย้ายลงอาหาร MS ดัดแปลง สูตรเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง โดยวางในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายออกเลี้ยงในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปกติ
บันทึกอัตราการรอดชีวิตของปลายยอดที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว (+LN) และปลายยอดที่ไม่ได้แช่ในไนโตรเจนเหลว (-LN)

การศึกษาการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดมันสำปะหลังในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) โดยวิธี Encapsulation – Vitrification

ทดลองเก็บรักษาปลายยอดมันสำปะหลัง ทั้ง 8 พันธุ์ ในสภาพเยือกแข็งโดยวิธี Vitrification โดยนำเนื้อเยื่อปลายยอดขนาด 1 มิลลิเมตร เลี้ยงในอาหาร preculture สูตร MS + 0.3M sucrose เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงนำเนื้อเยื่อปลายยอดแช่ใน loading solution (2M glycerol + 0.4M sucrose + 3% Na-alginate) เป็นเวลา 20 นาที นำปิเปตดูดเนื้อเยื่อปลายยอดหยดลงในอาหาร MS ที่มี $CaCl_2$ 0.1 โมลาร์ ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.4 โม

ลาร์ แช่เป็นเวลา 30 นาที จะได้ปลายยอดที่ห่อหุ้มด้วยวุ้น เป็นเม็ดกลม (alginate bead) นำเม็ด bead ที่ได้แช่ในสารละลาย PVS2 (30% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% DMSO+ 0.4M sucrose ในอาหาร MS) เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 วัน นำเม็ด bead ที่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลวละลายผลึกน้ำแข็ง (thawing) โดยแช่ในน้ำอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงแช่ในสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 1.2 M ในอาหาร MS (unloading) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเม็ด bead วางบนอาหารแข็งที่มีกระดาษกรองวางด้านบน เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงย้ายลงอาหาร MS ดัดแปลง สูตรเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง โดยวางในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายออกเลี้ยงในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปกติ บันทึกอัตราการรอดชีวิตของปลายยอดที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว (+LN) และปลายยอดที่ไม่ได้แช่ในไนโตรเจนเหลว (-LN)

ระยะเวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลา(เริ่มต้น-สิ้นสุด)

เริ่มต้น ตุลาคม 2554 –กันยายน 2556

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ

อาคารทรัพยากรพันธุกรรมพืชสิรินธร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเตรียมเนื้อเยื่อการทดลองเก็บรักษาปลายยอดมันสำปะหลังในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation)

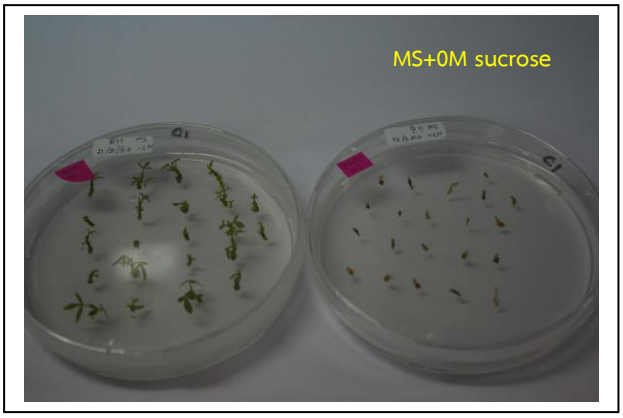
จากการรวบรวมท่อนพันธุ์มันสำปะหลังจำนวน 8 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ระยอง1, ระยอง9, ระยอง11 เกษตรศาสตร์50, ระยอง2, ห้านาที, MBRA931 และ MCOL2089 จากแหล่งรวบรวมพันธุ์มันสำปะหลังของกรมวิชาการเกษตร คือ ศวร.ระยอง, ศวพ.โนนสูง และ ศวพ.นครราชสีมา ปลูกในกระบะเพาะ เป็นเวลา 3 เดือน จะสามารถนำปลายยอดและตาข้างมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยพบว่าในการฟอกฆ่าเชื้อ สามารถฟอกชิ้นส่วนพืชด้วยคลอร็อกเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ตามด้วยคลอร็อกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที แล้วจึงนำเนื้อเยื่อปลายยอดและตาข้างเลี้ยงลงในอาหาร MS สูตรดัดแปลง เป็นเวลา 2-3 เดือน ก่อนตัดปลายยอดใช้ในการทดลอง

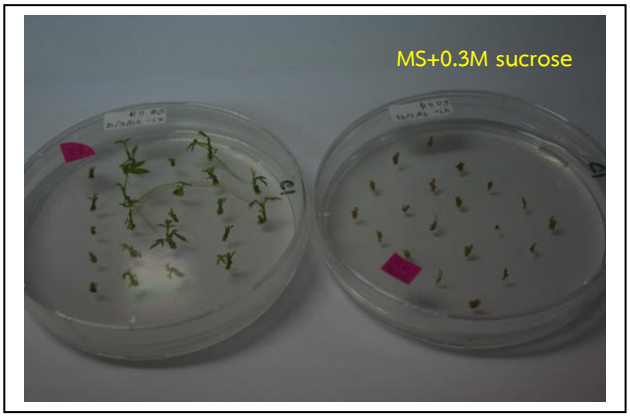
การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสม preculture ในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation)

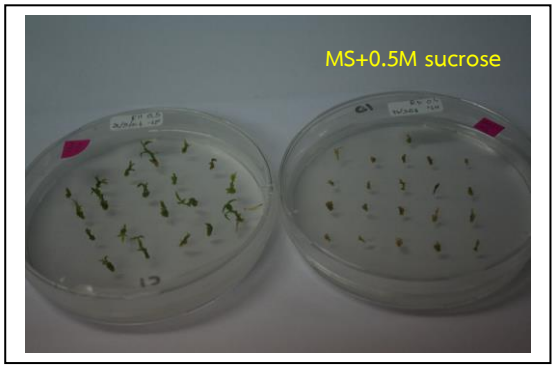
จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการ preculture โดยนำเนื้อเยื่อปลายยอดมันสำปะหลัง จำนวน 8 พันธุ์ ทำการ preculture ด้วยน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 1 วัน และทดลองเก็บรักษาปลายยอดด้วยวิธี vitrification พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่แตกต่างกัน ปลายยอดที่ preculture ในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครส และไม่ได้แช่ในไนโตรเจนเหลว สามารถรอดชีวิตได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในมันสำปะหลังทุกพันธุ์ แต่เมื่อผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว และเลี้ยงปลายยอดในอาหาร MS ดัดแปลงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าปลายยอดเปลี่ยนเป็นสีขาว ไม่สามารถรอดชีวิตได้ในทุกพันธุ์ ปลายยอดที่ preculture ในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.3 โมลาร์ ปลายยอดที่ไม่ได้แช่ในไนโตรเจนเหลว พันธุ์ระยอง9 และ ระยอง11 มีอัตรารอดชีวิต 92.5 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนพันธุ์อื่นๆ สามารถรอดชีวิตได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวและเลี้ยงปลายยอดในอาหาร MS ดัดแปลงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าปลายยอดมันสำปะหลังทุกพันธุ์เปลี่ยนเป็นสีขาวไม่สามารถรอดชีวิตได้ ส่วนปลายยอดที่ preculture ในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.5 โมลาร์ ปลายยอดที่ไม่ได้แช่ในไนโตรเจนเหลว พันธุ์ระยอง9 และ ระยอง11 มีอัตรารอดชีวิต 90.5 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนพันธุ์อื่นๆ สามารถรอดชีวิตได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวและเลี้ยงปลายยอดในอาหาร MS ดัดแปลงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าปลายยอดมันสำปะหลังทุกพันธุ์เปลี่ยนเป็นสีขาวไม่สามารถรอดชีวิตได้เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 1, ภาพที่ 1) แต่ Matsumoto และคณะ (1995) กล่าวว่า พืชแต่ละชนิดมีความต้องการซูโครสในระดับที่เหมาะสมต่างกัน หากได้รับซูโครสในระดับความเข้มข้นสูงเกินความต้องการ พืชจะไม่มีการเจริญและพัฒนาต่อ ซึ่งการ preculture จะทำให้พืชสะสมน้ำตาลได้อย่างเหมาะสม ช่วยให้ต้นพืชแข็งแรงขึ้นทำให้เนื้อเยื่อสามารถทนทานต่อการดึงน้ำออกจากเซลล์ หรือ อุณหภูมิต่ำๆ ได้

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเมื่อเลี้ยงในอาหาร preculture ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ

ชื่อพันธุ์	MS		MS+0.3 M sucrose		MS+0.5 M sucrose	
	- LN	+ LN	- LN	+ LN	- LN	+ LN
1. ระยอง 1	100	0	100	0	100	0
2. ระยอง 9	100	0	92.5	0	90.5	0
3. ระยอง 11	100	0	95	0	70	0
4. เกษตรศาสตร์ 50	100	0	100	0	100	0
5. ระยอง 2	100	0	100	0	100	0
6. ห้านาที	100	0	100	0	100	0
7. MBRA 931	100	0	100	0	100	0
8. MCOL 2089	100	0	100	0	100	0







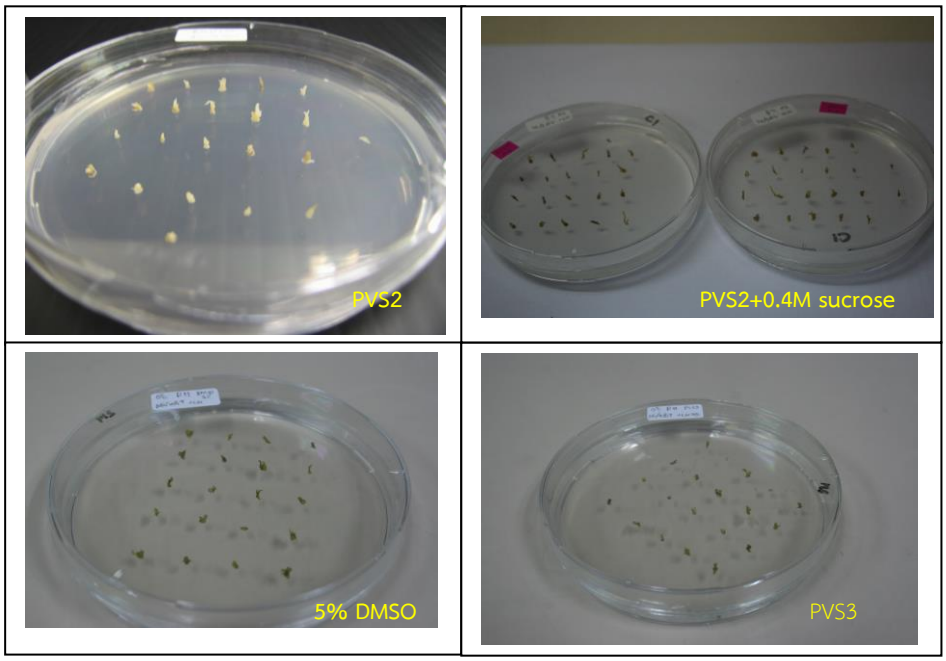
ภาพที่ 1 เนื้อเยื่อปลายยอดเมื่อเลี้ยงบนอาหาร preculture ที่ความเข้มข้น 0, 0.3 และ 0.5 โมลาร์ ทดลองเก็บรักษาด้วยวิธี vitrification และแช่ในไนโตรเจนเหลว (+LN)

<u>การศึกษา cryoprotectant ที่เหมาะสม</u>

จากการทดลองนำปลายยอดมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง11 แช่ใน cryoprotectant ชนิดต่างๆ พบว่าหลังจากเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวและนำเลี้ยงในอาหารปกติ เป็นเวลา 1 เดือน ปลายยอดที่แช่ในสารละลาย PVS2 + 0.4M sucrose ยังมีสภาพเขียวอยู่ เมื่อเทียบกับปลายยอดที่แช่ใน PVS2 จะมีลักษณะสีขาวซีด ส่วนปลายยอดที่แช่ใน 5%DMSO และ PVS3 จะมีลักษณะเป็นสีน้ำตาล แต่ทั้งนี้เนื้อเยื่อปลายยอดยังไม่สามารถรอดชีวิตหรือชักนำเป็นยอดได้ในเวลาต่อมา (ตารางที่ 2, ภาพที่ 2) และพบว่าสารละลาย PVS3 มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสสูงจึงทำให้สารละลายมีความหนืดมาก ไม่สะดวกในการปฏิบัติงานแต่เป็นสารที่สารที่เป็นองค์ประกอบมีส่วนที่ปกป้องเซลล์พืชได้ดี แต่ทั้งนี้การใช้ทั้ง 5%DMSO และ PVS3 ต้องทำการศึกษาในขั้นตอนอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น ระยะเวลาในการแช่ อาจจะได้ผลที่ดีขึ้นและสามารถนำไปปรับใช้ต่อไป

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของปลายยอดมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 11 เมื่อแช่ cryoprotectant ต่างๆ ในการเก็บรักษาโดยวิธี vitrification

cryoprotectant	- LN	+ LN
PVS2	100	0
PVS2 + 0.4 M sucrose	100	100
5% DMSO	100	0
PVS3	100	0



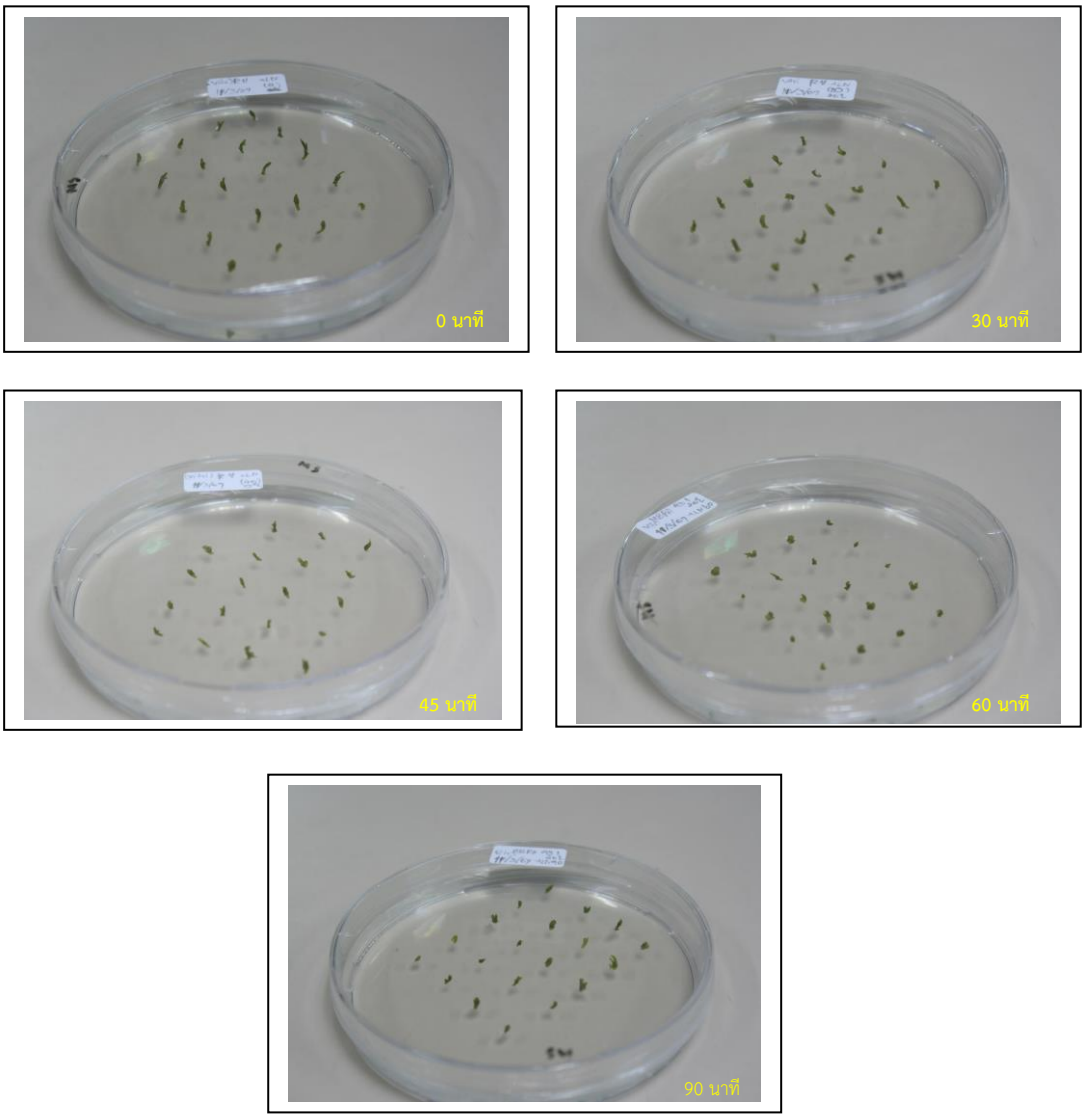
ภาพที่ 2 เนื้อเยื่อปลายยอดมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง11 ทดลองแช่ใน cryoprotectant ชนิดต่างๆ เก็บรักษาด้วยวิธี vitrification และแช่ในไนโตรเจนเหลว (+LN)

<u>การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่สารละลาย PVS2</u>

จากการนำปลายยอดมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง11 ทดลองแช่ PVS2+0.4M sucrose เป็นระยะเวลาต่างๆ กัน พบว่าปลายยอดที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 1 เดือนนั้น ปลายยอดที่แช่ใน PVS2+0.4M sucrose ที่ 0 นาที จะมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเกือบขาว ส่วนที่แช่ที่ 30 นาที ขึ้นไป (30, 45, 60 และ 90 นาที) จะยังคงความเขียว 62.5, 100, 85 และ 82.5 ตามลำดับ ซึ่งจะพบว่าปลายยอดที่แช่ใน PVS2+0.4M sucrose เป็นเวลา 45 นาที ยังคงความเขียวทั้งหมด แต่ยังไม่สามารถชักนำให้ปลายยอดเจริญได้ (ตารางที่ 3, ภาพที่ 3)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของปลายยอดมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 11 เมื่อแช่ PVS2 ระยะเวลาต่างๆ ในการเก็บรักษาโดยวิธี vitrification

ระยะเวลาในการแช่ PVS2 (นาที)	- LN	+ LN
0	100	0
30	100	62.5
45	100	100
60	100	85
90	100	82.5



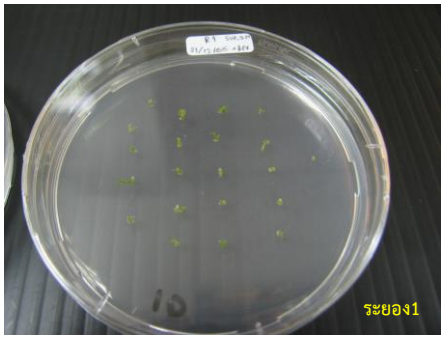
ภาพที่ 3 ปลายยอดมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง11 เมื่อแช่ PVS2 ระยะเวลาต่างๆ ในการเก็บรักษาด้วยวิธี vitrification

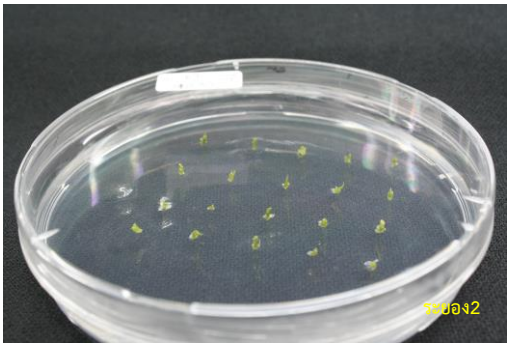
<u>การศึกษาการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดมันสำปะหลังในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) โดยวิธี Vitrification</u>

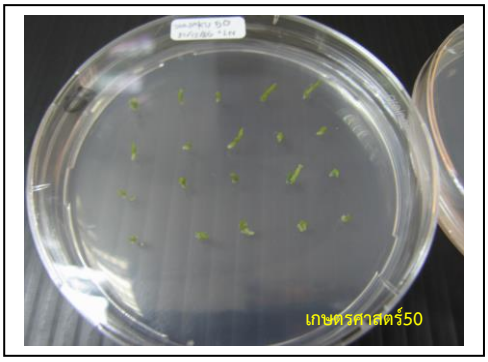
จากการทดลองนำปลายยอดมันสำปะหลังทั้ง 8 พันธุ์ เก็บรักษาโดยวิธี vitrification พบว่าปลายยอดที่ไม่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวสามารถรอดชีวิตได้ 100 เปอร์เซ็นต์ในทุกพันธุ์ ส่วนปลายยอดที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว และหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ดัดแปลง เป็นเวลา 1 เดือนพบว่าเนื้อเยื่อปลายยอดยังมีสีเขียวปนสีน้ำตาล โดยพบในพันธุ์ระยอง1 เป็น 77.5 เปอร์เซ็นต์, พันธุ์ระยอง9 เป็น 35 เปอร์เซ็นต์, พันธุ์ระยอง11 เป็น 75 เปอร์เซ็นต์, เกษตรศาสตร์50 เป็น 72.5 เปอร์เซ็นต์, ระยอง2 เป็น 67.5 เปอร์เซ็นต์, ห้านาที เป็น 60 เปอร์เซ็นต์ , MBRA931 และ MCOL2089 เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ทุกพันธุ์ยังไม่สามารถชักนำให้ปลายยอดเจริญได้ (ตารางที่ 4, ภาพที่ 4) โดยพบว่ากลุ่มมันสำปะหลังพันธุ์ต่างประเทศสามารถรอดชีวิตได้ดีกว่ากลุ่มพันธุ์อื่นๆ ในระยะเวลา 1 เดือน ซึ่งพบว่าในพันธุ์ระยอง1, เกษตรศาสตร์50 และ ห้านาที มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตใกล้เคียงกันกับผลการศึกษาของ Charoensub และคณะ (2003) แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของปลายยอดมันสำปะหลังเมื่อเก็บรักษาโดยวิธี vitrification

ชื่อพันธุ์	เก็บรักษาโดยวิธี vitrification	
	- LN	+ LN
1. ระยอง 1	100	77.5
2. ระยอง 9	100	35
3. ระยอง 11	100	75
4. เกษตรศาสตร์ 50	100	72.5
5. ระยอง 2	100	67.5
6. ห้านาที	100	60
7. MBRA 931	100	100
8. MCOL 2089	100	100







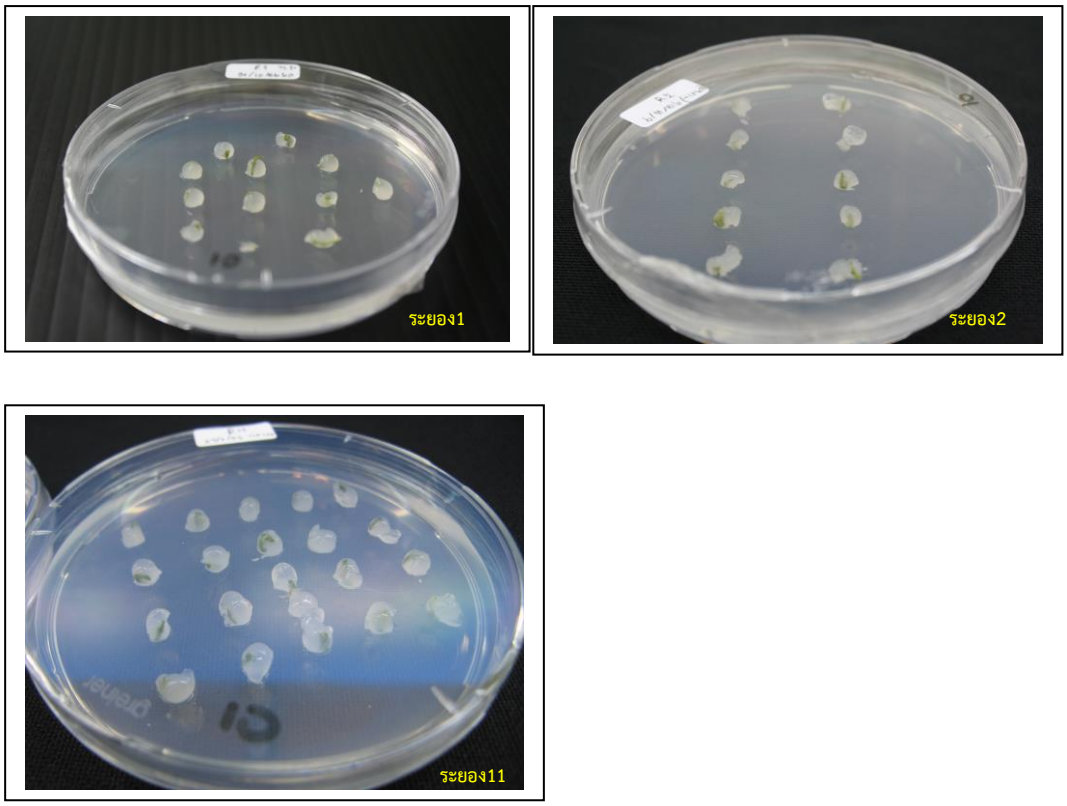
ภาพที่ 4 ปลายยอดมันสำปะหลังเมื่อเก็บรักษาด้วยวิธี vitrification

<u>การศึกษาการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดมันสำปะหลังในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) โดยวิธี Encapsulation – Vitrification</u>

จากการทดลองนำปลายยอดมันสำปะหลังทั้ง 8 พันธุ์ เก็บรักษาโดยวิธี Encapsulation-vitrification พบว่าปลายยอดที่หุ้มด้วย alginate ที่ไม่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวสามารถรอดชีวิตได้ 100 เปอร์เซ็นต์ในทุกพันธุ์ ส่วนปลายยอดที่หุ้มด้วย alginate ที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลว และหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ดัดแปลง เป็นเวลา 1 เดือนพบว่าเนื้อเยื่อปลายยอดยังมีสีเขียว โดยพบในพันธุ์ระยอง1 เป็น 95 เปอร์เซ็นต์, พันธุ์ระยอง9 เป็น 90 เปอร์เซ็นต์, พันธุ์ระยอง11 เป็น 92.5 เปอร์เซ็นต์, เกษตรศาสตร์50 เป็น 87.5 เปอร์เซ็นต์, ระยอง2 เป็น 65 เปอร์เซ็นต์, ห้านาที เป็น 87.5 เปอร์เซ็นต์ , MBRA931 เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และ MCOL2089 เป็น 90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่5, ภาพที่5) โดยทุกพันธุ์ยังไม่สามารถชักนำให้ปลายยอดเจริญได้เช่นเดียวกับวิธี vitrification ซึ่ง Charoensub และคณะ (2004) ใช้เวลา 28 วัน ในการเลี้ยงปลายยอดมันสำปะหลังและแช่ใน PVS2 ที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของปลายยอดมันสำปะหลัง 38 – 80 เปอร์เซ็นต์ ในมันสำปะหลังจำนวน 4 พันธุ์

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของปลายยอดมันสำปะหลังเมื่อเก็บรักษาโดยวิธี Encapsulation - vitrification

ชื่อพันธุ์	เก็บรักษาโดยวิธี Encapsulation - vitrification	
	- LN	+ LN
1. ระยอง 1	100	95
2. ระยอง 9	100	90
3. ระยอง 11	100	92.5
4. เกษตรศาสตร์ 50	100	87.5
5. ระยอง 2	100	65
6. ห้านาที	100	87.5
7. MBRA 931	100	100
8. MCOL 2089	100	90



ภาพที่ 5 ปลายยอดมันสำปะหลังเมื่อเก็บรักษาด้วยวิธี Encapsulation - vitrification

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การเก็บรักษาปลายยอดมันสำปะหลัง 8 พันธุ์ พันธุ์ระยอง1, ระยอง9, ระยอง11, เกษตรศาสตร์50 (กลุ่มพันธุ์มันเศรษฐกิจ) พันธุ์ระยอง2, ห้านาที (กลุ่มพันธุ์มันสำหรับรับประทาน) พันธุ์ MBRA931, MCOL2089 (กลุ่มพันธุ์มันต่างประเทศ) ในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) ด้วยวิธี vitrification พบว่าในการ preculture ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในระดับใดเหมาะสมที่สุด เนื่องจากปลายยอดยังไม่สามารถรอดชีวิตได้ แต่ที่ระดับน้ำตาลความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ มีแนวโน้มที่น่าจะมีความเหมาะสม เพราะเป็นความเข้มข้นที่ไม่มากหรือน้อยเกินไป แต่ทั้งนี้ควรทำการทดลองศึกษาเพิ่มเติมในด้านการเตรียมความพร้อมของเนื้อเยื่อก่อนทำการ preculture เช่น การปรับสภาพต้นพืชก่อนทำการทดลองโดยนำไปเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิต่ำ เป็นต้น และ PVS2+0.4M sucrose เป็น cryoprotectant ที่เหมาะสม ส่วนระยะเวลาในการแช่ใน PVS2+0.4M sucrose ที่เหมาะสม คือ 45 นาที พบว่าปลายยอดยังคงความเขียว 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลังเป็นเวลา 1 เดือน และการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดมันสำปะหลังโดยวิธี vitrification พบว่าปลายยอดของกลุ่มพันธุ์มันสำปะหลังต่างประเทศยังเป็นสีเขียว 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลังเป็นเวลา 1 เดือน ส่วนวิธี

Encapsulation-vitrification พบว่าทุกพันธุ์ยังคงมีความเขียว เมื่อเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง เป็นเวลา 1 เดือน ไม่แตกต่างกัน

ในการศึกษาครั้งนี้ ยังมีอีกหลายปัจจัยที่ต้องมีการศึกษาพัฒนาต่อ โดยเฉพาะการเตรียมพร้อมเนื้อเยื่อก่อนทำการทดลอง รวมทั้งการศึกษาหาสูตรอาหารในการชักนำให้ปลายยอดหลังจากการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำเทคนิคที่ได้พัฒนาในการทดลองเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังในสภาพเยือกแข็ง (Cryopreservation) ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช ได้อย่างเหมาะสม
2. เป็นข้อมูลในการศึกษาพัฒนาวิธีการเก็บรักษาเนื้อเยื่อในสภาพเยือกแข็ง เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในมันสำปะหลังพันธุ์อื่นๆ ต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และผู้ที่มีส่วนในการดำเนินงานทุกท่านที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี ศวร.ระยอง ศวพ.โนนสูง และ ศวพ.นครราชสีมา ดร.ประพิศ วองเทียม, ดร.สุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ที่ให้การช่วยเหลือระหว่างการดำเนินงาน

เอกสารอ้างอิง

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 196 หน้า

Charoensub, R., Phansiri, S., Yongmanitchai, W. and Sakai, A., 2003. Routine cryopreservation of in vitro-grown axillary apices of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by vitrification : importance of a simple monodal culture. Scientia Horticulturae 98: 485-492.

Charoensub, R., Hirai D. and Sakai, A. 2004. Cryopreservation of *In vitro* – Grown Shoot tips of Cassava by Encapsulation – vitrification Method. Cryo Letters, 25:51-58.

Matsumoto, T. and A. Sakai. 1995. An approach to enhances dehydration tolerance of alginate- coated dried meristem cooled to -196 °C. Cryo-Letter 16:299-306.

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

Sakai, A., S. Kobayashi and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of novel orange (Citrus Sinensis Osb. Var. brasilrensis Tanaka) by Vitrification. Plant Cell Rep. 9: 30-33.

http://at.doa.go.th/cassava/variety_cas.php 12/2556

ภาคผนวก

<u>ขั้นตอนการเก็บรักษาปลายยอดมันสำปะหลังในไนโตรเจนเหลว</u> โดยวิธี

1. Vitrification

Preculture (MS+ Sucrose)

↓ 1 วัน

Loading Solution (2M gly+0.4M Sucrose)

↓ 20 นาที

PVS2 dehydration (30% glycerol , 15% ethylene glycol, 15%DMSO, MS, 0.4M sucrose) (Sakai และคณะ, 1990)

↓ 0-90 นาที

Liquid Nitrogen (-196 องศาเซลเซียส)

↓ 1 วัน

Post thraw น้ำอุ่น 45 องศาเซลเซียส

↓ 2-3 นาที

PVS2 out

↓

1.2M Sucrose + MS

↓ 20 นาที

เลี้ยงในอาหาร MS (ดัดแปลง)

2. Encapsulation-Vitrification

Preculture (MS + Sucrose)

↓ 1 วัน

Loading Solution (2M gly+0.4M Sucrose + 3%alginate)

↓ 20 นาที

Encapsulation (MS + 0.1M $CaCl_2$)

↓ 30 นาที

Dehydration PVS2

↓ 45 นาที

Liquid Nitrogen (-196 องศาเซลเซียส)

↓ 1 ชั่วโมง

Post thraw น้ำอุ่น 45 องศาเซลเซียส

↓ 2-3 นาที

PVS2 out

↓

1.2M Sucrose + MS

↓ 20 นาที

เลี้ยงในอาหาร MS (ดัดแปลง)

สูตรอาหาร MS

องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์พื้นฐานสูตร MS

Macronutrient	mg/L
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2 . 2H_2O$	440
$MgSO_4 .7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
Micronutrient	
H_3Bo_3	6.2
$MnSO_4 . 4H_2O$	22.3
KI	0.83
$ZnSO_4 . 7H_2O$	8.6
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0. 25
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.025
$CoCl_2\ 6H_2O$	0.025
Fe-EDTA	
$FeSO_4 . 7H_2O$	27.85
Na_2EDTA	37.25

ที่มา Murashige and Skoog (1962)

สูตรอาหาร MS ดัดแปลง สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง (Charoensub *et. al*, 2003)

อาหารสูตร MS

Inositol	100 mg/l
Thiamine HCl	1 mg/l
BA	0.02 mg/l
GA	0.1 mg/l
NAA	0.01 mg/l
3% sucrose	
Agar	7.5 g/l

ปรับ pH 5.6

เพาะเลี้ยงในห้องอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1,000 – 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน