1. ชุดโครงการวิจัย : **วิจัยและพัฒนากล้วยไม้**

2. **โครงการวิจัย** : การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้เพื่อใช้ประโยชน์

3. **กิจกรรม** : การขยายพันธุ์และเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในสภาพควบคุม

4. **ชื่อการทดลอง** : การขยายพันธุ์และเก็บรักษากล้วยไม้ป่าสกุลแวนดาในสภาพปลอดเชื้อ

5. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : ชยานิจ ดิษฐบรรจง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : กษิดิศ ดิษฐบรรจง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

: ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

6. **บทคัดย่อ**

เก็บรักษาพันธุกรรมในสภาพปลอดเชื้อนับเป็นวิธีการเก็บรักษาที่มีประสิทธิภาพ สามารถเก็บได้ในระยะยาว เพื่อประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์ด้านการปรับปรุงพันธุ์ จึงได้ทำการศึกษาการขยายพันธุ์และเก็บรักษากล้วยไม้ป่าสกุลแวนดา 2 ชนิดได้แก่สามปอยขุนตานและฟ้ามุ่ย เมล็ดสามปอยขุนตาน สามารงอกได้ดีบนอาหารสูตร ND เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 % casein hydrolysage 100 มิลลิกรัม /ลิตรหลังจากทำการเพาะ นาน 3 เดือน ส่วนเมล็ดฟ้ามุ่ยไม่สามารถงอกในทุกสูตรอาหาร ซึ่งอาจเป็นผลจากอุณหภูมิในระหว่างการเจริญของฝักและการเคลื่อนย้าย จึงได้ทำการเพาะเลี้ยงตายอด/ตาข้างของฟ้ามุ่ย ซึ่งมีการพัฒนาเป็นโปรโตคอม มากสุด 65 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลว ND ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มล/ล. ร่วมกับ BA 5 μM และน้ำตาลซูโครส 3 % โปรโตคอมของกล้วยไม้ทั้ง 2ชนิดสามารถ เพิ่มปริมาณโปรโตคอม อาหารเหลว ND ที่ประกอบด้วยน้ำมะพร้าว 150 มล/ล. ร่วมกับ BA 1 หรือ 5 μM และน้ำตาลมอลโตส 3 % สามปอยขุนตาน มีอัตราการเพิ่มปริมาณ สูงสุด 6.3 เท่า ส่วนฟ้ามุ่ยเพิ่มปริมาณได้สูงสุด 5.6 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น และสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ND ที่เติม BA 1 μM ร่วมกับ NAA 1 μM และน้ำตาลมอลโตส 3 % และจากการศึกษาการเก็บรักษาพันธุกรรมไนโตรเจนเหลว ด้วยวิธี Encapsulation – Dehydration โดยใช้โปรโตคอมของสามปอยขุนตานเป็นตัวอย่างในการศึกษา และการเก็บด้วยวิธี Vitrification ของสามปอยขุนตาน และฟ้ามุ่ย พบว่าการเก็บรักษาด้วย Vitrification โดยใช้ PVS 3 เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (Cryoprotectant) นาน 20 -40 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว จะทำให้มีอัตราการรอดชีวิตและพัฒนาเป็นต้นหลังนำออกจากไนโตรเจนเหลว มากกว่าวิธี Encapsulation – Dehydration ที่ผ่านการ Dehydrate ด้วย mannitol 6-8 เปอร์เซ็นต์นาน 3 ชั่วโมง สามปอยขุนตานมีอัตราการรอดชีวิต 21.4

เปอร์เซ็นต์ หลังการเก็บด้วยวิธี Vitrification เมื่อแช่ PVS 3 นาน 20 นาที ส่วนฟ้ามุ่ย รอดชีวิต 16.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่ PVS 3 นาน 40 นาที ในขณะที่ วิธี Encapsulation – Dehydration จะมีอัตรารอดชีวิตเพียง 6.2 เปอร์เซ็นต์

คำนำ

ประเทศไทยมีสภาพภูมิประเทศที่เอื้ออำนวยให้มีป่าไม้อันเป็นถิ่นอาศัยของกล้วยไม้ป่าต่างๆอยู่ในทุกภูมิภาค โดยพบกล้วยไม้ในป่าธรรมชาติมากกว่า 1,000 ชนิด กล้วยไม้ป่าของไทยล้วนแล้วแต่เป็นพืชพรรณที่น่าสนใจและมีคุณค่าทางด้านการศึกษาวิจัยทั้งในแง่วิชาการ ตลอดจนมีประโยชน์ต่อประเทศไทยในอนาคตโดยสามารถนำกล้วยไม้ป่าเหล่านี้มาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อผลิตลูกผสมที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ แต่ในปัจจุบันกล้วยไม้ป่าเป็นพืชที่น่าห่วงว่าจะสูญหายไปเรื่อยๆ เนื่องจากการทำลายสภาพแวดล้อมทางนิเวศน์วิทยา การตัดไม้ทำลายป่า การเผาป่า การทำไร่เลื่อนลอย ปริมาณกล้วยไม้ป่าที่ขยายพันธุ์ตามธรรมชาติลดลง นอกจากนี้การนำกล้วยไม้ป่าออกมาจำหน่ายทั้งในระดับท้องถิ่น หรือรวบรวมลักลอบส่งออกไปยังต่างประเทศ ทำให้กล้วยไม้ป่าบางชนิดที่พบในธรรมชาติกลายเป็นของหายาก จะเห็นได้จากมีการลักลอบนำกล้วยไม้ป่าชนิดต่างๆ มาขายที่สวนจตุจักรเป็นปริมาณมากในราคาถูก หากเป็นเช่นนี้ต่อไปกล้วยไม้ป่าอาจสูญพันธุ์ไปจากป่าเมืองไทยได้

กล้วยไม้สกุลแวนดา (*Vanda spp.*) เป็นกล้วยไม้อิงอาศัยที่วงการกล้วยไม้รู้จักคุ้นเคยมานานในธรรมชาติพบตามป่าดิบแล้งและป่าเบญจพรรณ ทางภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ และตะวันตกของไทย มีอยู่หลายชนิด เช่น ฟ้ามุ่ย (*Vanda coerulea* Griff.) ฟ้ามุ่ยน้อย (*Vanda coerulescens* Griff.) จัดเป็นพืชอนุรักษ์บัญชีที่ 1 ซึ่งเป็นชนิดพันธุ์ที่หายากและใกล้จะสูญพันธุ์ (กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2537) สามปอยหลวง (*Vanda benbonii)* สามปอยขุนตาล (*Vanda denisoniana* Benson & Rchb.f.) (อบฉันท์ , 2543) เป็นสายพันธุ์ที่มีประโยชน์ และมีคุณค่าทางด้านการศึกษาวิจัยทั้งในแง่วิชาการ การปรับปรุงพันธุ์พืช ตลอดจนอำนวยประโยชน์ต่อประเทศไทยในอนาคตโดยสามารถนำกล้วยไม้ป่าเหล่านี้มาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อผลิตลูกผสมที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจมากมายนับร้อยชนิด สร้างมูลค่าให้กับธุรกิจกล้วยไม้ของไทยอย่างมหาศาล แต่ปัจจุบันกล้วยไม้ไทยโดยเฉพาะกล้วยไม้ป่า ซึ่งมีลักษณะที่ดีเด่นในพันธุกรรม น่าห่วงว่าจะสูญหายไปเรื่อยๆ จากสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงไป การตัดไม้ทำลายป่า การเผาป่า การทำไร่เลื่อนลอย แม้กระทั่งการนำกล้วยไม้จากป่าออกมาจำหน่ายทั้งในระดับท้องถิ่น หรือรวบรวมเพื่อการส่งออกไปยังต่างประเทศ ซึ่งถือว่าเป็นการลดปริมาณของกล้วยไม้ในธรรมชาติโดยตรง ทำให้กล้วยไม้ป่าบางชนิดที่พบในธรรมชาติกลายเป็นของหายากสำหรับประเทศไทย(ระพี, 2535) กล้วยไม้ป่าสกุลป่าแวนด้าที่เก็บรวบรวมได้โดยสถาบันวิจัยพืชสวนขณะนี้ยังมีปริมาณน้อย จึงมี

ความจำเป็นเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องดำเนินการ ขยายพันธุ์กล้วยไม้ป่าให้ได้ปริมาณมาก เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ และนำส่วนหนึ่งมาเก็บรักษาพันธุกรรมกล้วยไม้ไว้เพื่อใช้ประโยชน์ต่อการวิจัย การศึกษา และการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

ในการเก็บรักษาพันธุกรรมของกล้วยไม้ป่าไม่สามารถเก็บรักษาหรืออนุรักษ์ไว้ในสภาพธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากปัจจุบันสภาพนิเวศวิทยาของป่าไม้และภูมิอากาศของโลกเปลี่ยนแปลงไป จึงได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาประยุกต์ใช้เพื่อเก็บรักษาพันธุกรรมไว้ในสภาพปลอดเชื้อ นับเป็นวิธีการเก็บรักษาที่มีประสิทธิภาพ สามารถเก็บได้ในระยะปานกลางและระยะยาว เพื่อประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์หรือใช้ประโยชน์ด้านการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. ศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์กล้วยไม้ป่าสกุลแวนดาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. ศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษากล้วยไม้ป่าสกุลแวนดาในระยะยาว

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

ทำการศึกษากาขยายพันธุ์และการเก็บรักษากล้วยไม้ป่าสกุลแวนด้า ได้แก่ฟ้ามุ่ย สามปอยขุนตาล ดังนี้

1. การขยายพันธุ์กล้วยไม้ป่าสกุลแวนด้า

1.1สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเมล็ดสามปอยขุนตาล และสามปอยนก

1.1.1 เก็บรวบรวมฝักกล้วยไม้ป่าสกุลแวนดา 2 ชนิด ได้แก่ สามปอยขุนตาล และสามปอยนก จาก จ.เชียงใหม่ และ จ.ตาก ทำการชักนำให้เกิดตาดอก โดยนำต้นที่ได้มาไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 18 - 20 องศา เซลเซียส ให้แสงนาน 10 ชั่วโมง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ต่อจากนั้นนำออกมาเลี้ยงในโรงเรือนนาน 2-3 เดือน จึงเริ่มแทงช่อดอก เมื่อดอกบานทำการผสมเกสร สามปอยขุนตาน และสามปอยนก ดูแลรักษาจนติดฝัก สำหรับสามปอยนก ฟักแห้งร่วงหลังจากผสมได้ 4 เดือน ส่วนฟ้ามุ่ย ได้รับความอนุเคราะห์ฝักจากศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ

1.1.2 นำฝักสามปอยขุนตาน และฟ้ามุ่ย ที่มีอายุประมาณ 5-6 เดือน มาฟอกฆ่าเชื้อภายนอกด้วย Sodium hypoclorite (Haiter®Bleach) 20 % นาน 15 นาที จุ่มแอลกอฮอล์ 95 % เผาไฟเพื่อเป็นการฆ่าเชื้ออีกครั้ง หลังจากนั้นนำฝัก มาผ่าเอาเมล็ดภายในซึ่งมีลักษณะเป็นผงละเอียด ใส่ลงในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 45 มิลลิลิตร แล้วใช้ไมโครไปเปต ดูดส่วนผสมของเมล็ดและน้ำกลั่นปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดขนาด 4 ออนซ์ที่มีอาหารเพาะเมล็ดสูตรต่างๆ เกลี่ยให้เต็มพื้นที่ผิวของอาหาร เลี้ยงในอาหาร ชนิดละ 20 ขวด ชนิดอาหารที่ใช้ได้แก่

1. อาหาร VW + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร / ลิตร + น้ำตาลซูโคลส 2 %

2. อาหาร VW + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร / ลิตร + น้ำตาลมอลโตส 2 % +casein hydrolysage 100 มิลลิกรัม /ลิตร

3. อาหาร ND + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร / ลิตร + น้ำตาลซูโคลส 2 %

4. อาหาร ND + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร / ลิตร + น้ำตาลมอลโตส 2 % +casein hydrolysage 100 มิลลิกรัม /ลิตร

ทำการ เลี้ยงในห้องมืด ที่อุณหภูมิห้องเลี้ยง 25 ± 2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการงอกของเมล็ดหลังการเพาะเมล็ดนาน 3 เดือนโดยพิจารณาจากปริมาณการงอกของเมล็ด โดยให้คะแนนจาก 0-3 ดังนี้

คะแนน 0 = เมล็ดไม่งอก

คะแนน 1 = เมล็ดงอกมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆสีเหลือง มีปริมาณ 0 – 10 %ของพื้นที่

คะแนน 2 = เมล็ดงอกมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆสีเหลือง มีปริมาณ 10 - 50 % ของพื้นที่

คะแนน 3 = เมล็ดงอกมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆสีเหลือง ถึงเขียวอ่อน มีปริมาณการงอกมากกว่า50 % ของพื้นที่

1.2 การเพาะเลี้ยงตายอด/ตาข้าง ฟ้ามุ่ย

เนื่องจากการเพาะเมล็ดฟ้ามุ่ยไม่สำเร็จ และไม่สามารถหาตัวอย่างในช่วงที่ออกดอกได้ จึงนำตาข้างและตายอดของต้นอ่อนฟ้ามุ่ยที่ได้รับการอนุเคราะห์จากองค์การสวนพฤกษศาสตร์ จ.เชียงใหม่ ในสภาพปลอดเชื้อ ที่มีขนาดความสูงของต้นประมาณ 7-10 ซม. นำตายอดและตาข้างมาชักนำให้เกิดโปรโตคอม โดยทำการเลี้ยงในอาหารเหลว 4 ชนิด ได้แก่

1.อาหารเหลว VW + น้ำมะพร้าว 150 มล/ล. + BA 1 μM + น้ำตาลซูโครส 3 %

2. อาหารเหลว VW + น้ำมะพร้าว 150 มล/ล. + BA 3 μM + น้ำตาลซูโครส 3 %

3. อาหารเหลว ND + น้ำมะพร้าว 150 มล/ล. + BA 1 μM + น้ำตาลซูโครส 3 %

4. อาหารเหลว ND + น้ำมะพร้าว 150 มล/ล. + BA 3μM + น้ำตาลซูโครส 3%

บันทึกอัตราการพัฒนาเป็นโปโตคอม ภายหลังการเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากจำนวนชิ้นส่วนที่นำไปเพาะเลี้ยง ใช้อาหารสูตรละ 20 ชิ้น เนื่องจากต้นฟ้ามุ่ยที่ได้มามีจำนวนไม่มาก จึงไม่สามารถวางแผนการดำเนินงานทางสถิติได้

1.3 การพัฒนาของโปรโตคอมเป็นต้น

1.3.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณโปรโตคอม

หลังจากเมล็ดงอกแล้วเลี้ยงต่อไปอีก 3 เดือนในอาหารสูตรเดิม พบว่ามีการเจริญเป็น 2 ลักษณะ คือเจริญเป็นต้นอ่อน และโปรโตคอม ศึกษาการเพิ่มปริมาณดังนี้

นำโปรโตคอมที่เกิดขึ้นจากการเพาะเมล็ดของสามปอยขุนตาน และโปรโตคอมที่เกิดจากตายอด ตาข้างของฟ้ามุ่ย ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clump 0.5 -0.8 เซนติเมตร แต่ละ clump มี

น้ำหนักสด ประมาณ 30-50 มิลลิกรัม แล้วเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตรต่างๆ 4 ชนิด เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ แต่ละกรรมวิธีประกอบด้วยโปรโตคอม 30 ชิ้น กรรมวิธีประกอบด้วย อาหาร 4 ชนิดดังนี้

1. VW + น้ำมะพร้าว150 มิลลิลิตร/ ลิตร + BA 1 μM
2. VW + น้ำมะพร้าว150 มิลลิลิตร/ ลิตร + BA 5 μM
3. ND + น้ำมะพร้าว150 มิลลิลิตร/ ลิตร + BA 1 μM
4. ND + น้ำมะพร้าว150 มิลลิลิตร/ ลิตร + BA 5 μM

อาหารเหลว ทั้ง 4 ชนิด เติม maltose 3% (w/v) เลี้ยงบน shaker ที่ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที (rpm) ในห้องที่มีแสงสว่างจากหลอด fluorescent อุณหภูมิห้องเลี้ยง 25 ± 2 องศาเซลเซียส pH 5.0

บันทึกผล โดยประเมินการเจริญเติบโตจากน้ำหนักสดที่เพิ่มทุก สัปดาห์ที่ 2 และ 4 เปลี่ยนอาหารทุกครั้งที่มีการบันทึกน้ำหนักสด การเจริญเติบโตของโปรโตคอม คำนวณจากน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นคิดเป็นเท่าของน้ำหนักสดเริ่มต้น โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการเพิ่มน้ำหนักสด (เท่าจากน้ำหนักเริ่มต้น)} = \frac{\text{น้ำหนักสดสัปดาห์ที่ 4 - น้ำหนักสดเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}$$

1.3.2 ศึกษาสูตรอาหารในการพัฒนาเป็นต้นอ่อน

นำโปรโตคอมของสามปอยขุนตาน และฟ้ามุ่ยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 ซม.ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโปรโตคอมในอาหารเหลว ND + น้ำมะพร้าว150 มิลลิลิตร/ ลิตร + BA 1 μM มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่างๆ เพื่อให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นอ่อน โดยเปลี่ยนอาหารทุกเดือน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ แต่ละกรรมวิธีประกอบด้วยโปรโตคอม 20 ชิ้น กรรมวิธีประกอบด้วย อาหาร 4 ชนิดดังนี้

1. อาหารสูตร ND + BA 5 μM + NAA 1 μM + maltose 30 gm/l
2. อาหารสูตร ND + BA 1 μM + NAA 1 μM + maltose 30 gm/l
3. อาหารสูตร Phytamax (P6793)
4. อาหารสูตร VW + sucrose 30 gm/l + activated charcoal 500 mg/l

บันทึกผลการทดลอง หลังจากเลี้ยงนาน 3 เดือน โดยประเมินจากจำนวนยอดต่อกลุ่มแคลลัส

2. การเก็บรักษาพันธุกรรมกล้วยไม้ป่าในสภาพปลอดเชื้อ

2.1 การเก็บรักษาโปรโตคอมกล้วยไม้สามปอยขุนตานภายใต้ความเย็นจัดโดยวิธี Encapsulation - Dehydration

การเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชวิธีนี้เป็นการเก็บในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation) ที่มีอุณหภูมิต่ำ - 196 องศาเซลเซียส เซลล์พืชจะหยุดการเจริญเติบโตโดยสิ้นเชิง เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

2.1.1 ศึกษาผลของ mannitol และระยะเวลาในการ dehydrate ต่อความมีชีวิตของโปรโตคอม

ก่อนกระบวนการเก็บรักษาในสภาพเย็นจัดที่ -196 องศาเซลเซียส ในไนโตรเจนเหลว ชิ้นส่วนพืชจะต้องผ่านขบวนการ preculture เพื่อกระตุ้นให้เซลล์มีการปรับตัวและทนทานต่อสภาพความเย็นจัดขณะการเก็บรักษาและยังต้องเติมสาร cryoprotectants ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อปรับสภาพของเซลล์ เพื่อทำให้ทนทานต่อความเย็นจัด ในการทดลองนี้ใช้สาร mannitol ซึ่งช่วยป้องกันอันตรายให้เซลล์และยังช่วยลดความชื้นของเซลล์ด้วย อย่างไรก็ตามสารชนิดนี้ถ้าใช้ในความเข้มข้นที่สูงเกินไปอาจมีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ได้ จึงต้องทำการศึกษาโดย มีวิธีการทดลองดังนี้

ระยะ preculture

นำโปรโตคอมของกล้วยไม้สามปอยขุนตาน มาเลี้ยงบนอาหารเพื่อปรับสภาพ ประกอบด้วยอาหารเหลว ND + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อ ลิตร + sucrose 3 % (w/v) ที่เติม mannitol อัตรา 0 , 2 , 4 , 6 , และ 8 % (w/v) preculture เป็นเวลา 2 วัน ที่ อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ในสภาพห้องเลี้ยงมีแสงสว่างจากหลอด fluoresence โดยมีช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

ระยะ Encapsulation / dehydration

ดำเนินการตามขั้นตอนของ Sakai (1995) นำโปรโตคอมของกล้วยไม้สามปอยขุนตานจาก preculture ใน mannitol อัตราต่างๆ ใส่ในอาหารเหลว ND (1949) ที่ไม่มีส่วนประกอบของ calcium เติม 3% (w/v) sodium alginate, glycerol 2 M และ 0.4 M sucrose เขี่ยโปรโตคอมให้กระจายเป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนนำไปใส่ลงอาหาร จากนั้นดูดโปรโตคอมของช้างกระ พร้อมอาหารเหลวหยดในอาหารเหลว modified VW(1949) ที่ประกอบด้วย 0.1 M $CaCl_2$ จะทำให้เกิด alginate bead ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4-5 มิลลิเมตร ภายใน bead มีโปรโตคอมประมาณ 2-3 ชิ้นต่อ bead จากนั้นแช่ alginate bead ในอาหารเหลวนี้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ bead แข็งตัวดีขึ้น หลังจากนั้นทำการ dehydrate โดยนำ bead มาลดความชื้น โดยใส่ในขวดที่บรรจุ silica gel เป็นเวลาต่างๆ ได้แก่ 0 , 1 , 2 , 3 , 4 และ 5 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงในอาหาร ND เติม BA 5 uM และ น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร /ลิตร เพื่อประเมินความมีชีวิต

ทำการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ 5 x 6 factorial in Completely Randomized Design (CRD) แต่ละสิ่งทดลองใช้ bead 60 bead (15 bead ต่อซ้ำ) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ปัจจัยประกอบด้วย

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของ mannitol 5 ระดับ คือ 0 , 2 , 4 , 6 และ 8 % (w/v)

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการ dehydration 6 ช่วงคือ 0 , 1 , 2, 3 , 4 และ 5 ชั่วโมง

บันทึกผลอัตราความมีชีวิตของโปรโตคอมใน alginate bead โดยประเมินจากการเติบโตและเพิ่มปริมาณของโปรโตคอมในแต่ละ bead เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารชักนำให้โปรโตคอมเติบโตและเพิ่มปริมาณ นาน 3 เดือน โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราความมีชีวิต (\%)} = \frac{\text{จำนวน bead ที่โปรโตคอมมีการเติบโต}}{\text{จำนวน bead ทั้งหมด}} \times 100$$

2.1.2 ผลของการเก็บรักษาใน liquid nitrogen ต่อความมีชีวิตของโปรโตคอม มีวิธีการดังนี้

preculture โปรโตคอมช้างกระ โดยใช้ mannitol ความเข้มข้น 0, 2 , 4 , 6 และ 8 % (w/v) เป็นเวลา 2 วัน ที่ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ในสภาพห้องเลี้ยงมีแสงสว่างจากหลอด fluoresent โดยมีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ตามด้วยการ encapsulation และระยะเวลาในการ dehydrate ชิ้น alginate bead ที่ 0, 1, 2 , 3 , 4 และ 5 ชั่วโมง แล้วนำ bead เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 6-8 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำมาบรรจุใน cryovial แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลวนาน 1 ชั่วโมง

หลังจากแช่ cryovial ในไนโตรเจนเหลว 1 ชั่วโมง นำ alginate bead มาทำให้อุ่น โดยแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำ bead มาเลี้ยงบนอาหาร ND ที่ประกอบด้วยน้ำมะพร้าว 150 มล/ล. ร่วมกับ BA 1 หรือ 5 µM และน้ำตาลมอลโตส 3 % เพื่อทดสอบความมีชีวิตโดยพิจารณาจากความสามารถเติบโตเพิ่มปริมาณของโปรโตคอม

ทำการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ 5 x 6 factorial in Completely Randomized design (CRD) แต่ละสิ่งทดลองใช้ 60 bead (15 bead ต่อซ้ำ) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ปัจจัยประกอบด้วย

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของ mannitol 5 ระดับ 0 , 2 , 4 , 6 และ 8% (w/v)

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการ dehydration 6 ช่วง คือ 0 ,1 , 2 , 3 , 4 และ 5 ชั่วโมง

บันทึกผลอัตราความมีชีวิตของโปรโตคอมใน alginate bead โดยประเมินจากการเติบโตและเพิ่มปริมาณของโปรโตคอมในแต่ละ bead เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหาร ND ที่ประกอบด้วยน้ำมะพร้าว 150 มล/ล. ร่วมกับ BA 1 หรือ 5 µM และน้ำตาลมอลโตส 3 % นาน 3 เดือน โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราความมีชีวิต (\%)} = \frac{\text{จำนวน bead ที่โปรโตคอมมีการเติบโต}}{\text{จำนวน bead ทั้งหมด}} \times 100$$

2.2 การเก็บในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธี Vitrification

ศึกษาผลของสาร cryoprotectant และระยะเวลาในการแช่สารก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว

นำโปรโตคอมของกล้วยไม้สามปอยขุนตาน และฟ้ามุ่ย ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว มาทำการเลี้ยงปรับสภาพของเซลล์ (Pre-culture)และเพิ่มปริมาณ บนอาหารแข็งสูตร ND เป็นเวลา 1 เดือน ทำการปรับสภาพและดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยนำโปรโตคอมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม.ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม ที่เพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเป็น 0.5 โมลาร์ 48 ชั่วโมง ตามด้วยการเลี้ยงบนอาหาร ND ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเป็น 0.8 โมลาร์อีก 24 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำไปแกว่งในสารละลาย Loading solution ที่ประกอบด้วย อาหารเหลว ND น้ำตาลซูโครส 0.8 โมลาร์ และกลีเซอรอล (Glycerol) 2 โมลาร์ นาน 30 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 80 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปแช่ในสาร Cryoprotectant 4 ชนิด ที่ระยะเวลาต่างกัน ระหว่าง 0 – 80 นาทีที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หลังจากเก็บโซมาติกเอมบริโอไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 1 สัปดาห์ นำมาทำให้ละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วล้างด้วยสารละลาย Unloading solution ประกอบด้วยอาหารเหลว MS ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ นาน 30 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 80 รอบต่อนาที ต่อจากนั้นนำโปรโตคอมมาเลี้ยงบนอาหารเพิ่มปริมาณ เก็บข้อมูล ผลของชนิดและระยะเวลาในการแช่ของสาร Cryoprotectant ต่อความมีชีวิตของโปรโตคอมก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลวและหลังแช่ในไนโตรเจนเหลว วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม IRRISTAT ข้อมูลที่เป็นเปอร์เซ็นต์แปลง (Transform) โดย Arcsin transformation และแสดงผลเป็นข้อมูล Back transformed scale

วางแผนการทดลองแบบ 4 x 5 Factorial in the Completely Randomize Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ 20 กรรมวิธี ใช้กลุ่มโปรโตคอมกรรมวิธีละ 48 กลุ่ม มีปัจจัยที่ทำการศึกษา 2 ปัจจัย

ปัจจัยที่1 ชนิดของสาร Cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่

1. PVS2 ประกอบด้วย Glycerol 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโดยปริมาตร Dimethylsulfoxide, DMSO 15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโดยปริมาตร Ethylene glycol, EG 15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโดยปริมาตร และน้ำตาลซูโครส 13.7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโดยปริมาตร (Sakai และคณะ, 1990)
2. PVS3 ประกอบด้วย Glycerol 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโดยปริมาตร และน้ำตาลซูโครส 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโดยปริมาตร (Nishizawa และคณะ,1993)
3. PVS3-1 (PVS3ดัดแปลง 1) ประกอบด้วย Glycerol 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโดยปริมาตร และน้ำตาลซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโดยปริมาตร
4. PVS3-2 (PVS3ดัดแปลง 2) ประกอบด้วย Glycerol 45 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโดยปริมาตร และน้ำตาลซูโครส 45 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักโดยปริมาตร

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการแช่สาร Cryoprotectant 5 ระดับ ได้แก่ 0, 20, 40, 60 และ 80 นาที

บันทึกอัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอมและการเจริญเพิ่มปริมาณหลังการเลี้ยงบนอาหารชักนำ นาน 4-8 สัปดาห์

ผลการทดลอง

1.การขยายพันธุ์กล้วยไม้ป่าสกุลแวนดา

1.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้

การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ป่าสกุลแวนดาทั้ง 2 ชนิดได้แก่ สามปอยขุนตาน จากจังหวัดเชียงใหม่ และฟ้ามุ่ย ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์ฟักอายุ 5 เดือน จากศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ ในอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ อาหารสูตร VW(1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 % , อาหารสูตร VW(1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 2 % casein hydrolysage 100 มิลลิกรัม /ลิตร , อาหารสูตร ND เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 % และอาหาร ND เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 2 % casein hydrolysage 100 มิลลิกรัม /ลิตร หลังจากทำการเพาะเมล็ด นาน 3 เดือน เมล็ดฟ้ามุ่ย ไม่สามารถงอกในทุกสูตรอาหาร ส่วนสามปอยขุนตาล สามารถงอกได้ในอาหารทั้ง 4 สูตร เมล็ดกล้วยไม้ที่งอกมีลักษณะเป็นตุ่มขนาดเล็กสีเหลืองจนถึงสีเขียวอ่อนกระจายบนอาหารโดยมีปริมาณความงอกคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ในระดับต่างๆกัน

สามปอยขุนตานมีคะแนนเฉลี่ยความงอกดีที่สุดที่ระดับ 1.4 คะแนน เมื่อเพาะเมล็ดบนอาหารสูตร ND เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 2 % casein hydrolysage 100 มิลลิกรัม /ลิตร รองลงมาได้แก่การเพาะบนอาหารสูตร ND เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลมอลโตส 2 % โดยไม่มี casein hydrolysage ในขณะที่การเพาะในอาหาร VW ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร / ลิตร และ ซูโคลส 2 % มีคะแนนการงอกต่ำสุดเพียง 0.6 (ตารางที่ 1) เห็นได้ว่า อาหาร ND มีคะแนนการงอกมากกว่าอาหาร vw นอกจากนี้น้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนก็ให้ผลต่อการงอกของเมล็ดที่ต่างกัน การใช้น้ำตาลมอลโตส ร่วมกับ casein hydrolysage และน้ำมะพร้าว จะเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดเมื่อเทียบกับสูตรอาหารชนิดเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมะพร้าวมีส่วนประกอบของสารกลุ่ม cytokinin เช่น zeatin riboside ทำหน้าที่กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ (สุรวิช , 2533) ซึ่งช่วยให้เมล็ดมีอัตราความงอกดีขึ้น ส่วนฟ้ามุ่ยไม่งอกเลยในทุกสูตรอาหาร ทั้งนี้อาจเป็นเพราะอายุของฟักที่ยังไม่เหมาะสม อีกประการหนึ่งอุณหภูมิในระหว่างการเติบโตของฟักที่ค่อนข้างสูง ก็มีส่วนสำคัญที่ทำให้เมล็ดกล้วยไม้ที่อยู่ภายในฟักฟ่อหรือไม่เจริญเติบโต

ตารางที่ 1 คะแนนความงอกของเมล็ดกล้วยไม้สกุลแวนดา

สูตรอาหาร	**คะแนนเฉลี่ย**	
	สามปอยขุนตาน	ฟ้ามุ่ย
1. VW + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร/ลิตร +ซูโคลส 2 %	0.6	0
2. VW + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร / ลิตร + มอลโตส 2 % +casein hydrolysage 100 มิลลิกรัม /ลิตร	0.8	0
3. ND + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร / ลิตร + ซูโคลส 2 %	1.2	0
4. ND + น้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตร / ลิตร + มอลโตส 2 % +casein hydrolysage 100 มิลลิกรัม /ลิตร	1.4	0

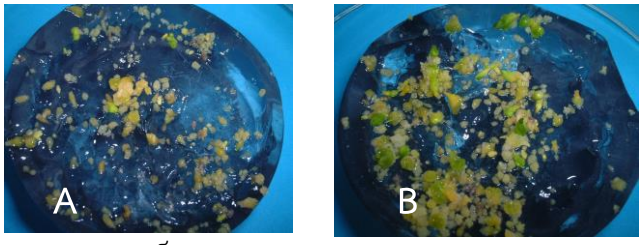
คะแนน 0 = เมล็ดไม่งอก

คะแนน 1 = เมล็ดงอกมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆสีเหลือง มีปริมาณ 0 – 10 %ของพื้นที่

คะแนน 2 = เมล็ดงอกมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆสีเหลืองถึงเขียวอ่อน มีปริมาณ 10 - 50 % ของพื้นที่

คะแนน 3 = เมล็ดงอกมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆสีเหลือง ถึงเขียวอ่อน มีปริมาณการงอกมากกว่า50 % ของพื้นที่

ภาพที่ 1 . ลักษณะดอกและฝักของสามปอยขุนตาน และสามปอยนก



ภาพที่ 2 การงอกของเมล็ดสามปอยขุนตาน A = คะแนน 1 B = คะแนน 2

1.2 การเพาะเลี้ยงตายอด/ตาข้าง ฟ้ามุ่ย

เมื่อนำตายอดและตาข้างของฟ้ามุ่ยในสภาพปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆ 4 สูตร เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ ภายหลังจากการเลี้ยงนาน 3เดือน พบว่าตายอดและตาข้าง มีการพัฒนาเป็นโปรโตคอม มากสุด 65 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลว ND ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มล/ล. และ BA 5 μM รองลงมา 45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงใน อาหาร ND ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มล/ล. และ BA 1 μM (ตารางที่ 2) ส่วนการใช้อาหารสูตร VW ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 150 มล/ล. BA 5 μM น้ำตาลซูโครส 3 % มีอัตราการพัฒนาเป็นโปรโตคอมเพียง 20 % ส่วนอาหารเหลว VW น้ำมะพร้าว 150 มล/ล. BA 1 μM และซูโครส 3 %ไม่สามารถชักนำให้ตายอดและตาข้างของฟ้ามุ่ยพัฒนาเป็นโปรโตคอมได้ ทั้งนี้เนื่องจากองค์ประกอบที่แตกต่างกันของธาตุอาหารทั้ง 2 สูตร และการตอบสนองที่ต่างกันของกล้วยไม้แต่ละชนิด

ตารางที่ 2 อัตราการเกิดโปรดตคอมจากตายอดและตาข้างของฟ้ามุ่ย

สูตรอาหาร	อัตราการพัฒนาเป็นโปรโตคอม (%)
1.อาหารเหลว VW + น้ำมะพร้าว 150 มล/ล. + BA 1 μM + ซูโครส 3 %	-
2.อาหารเหลว VW + น้ำมะพร้าว 150 มล/ล. + BA 5 μM + ซูโครส 3 %	20
3. อาหารเหลว ND + น้ำมะพร้าว 150 มล/ล. + BA 1 μM + ซูโครส 3 %	45
41.อาหารเหลว ND + น้ำมะพร้าว 150 มล/ล. + BA 5 μM + ซูโครส 3 %	65

1.3 การพัฒนาของโปรโตคอมเป็นต้น

1.3.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณโปรโตคอม

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ โปรโตคอมของฟ้ามุ่ยและสามปอยขุนตานกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิดมีการตอบสนองต่อสูตรอาหารไปในทางเดียวกัน ในสัปดาห์ที่ 4 สามารถเพิ่มปริมาณสามปอยขุนตานได้ 5.9 – 6.3 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้นโดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่3.1)เมื่อเลี้ยงใน อาหารเหลว ND ที่มี น้ำมะพร้าว 150 มล/ล. + BA 1 หรือ 5 μM และน้ำตาลมอลโตส 3 % ส่วนอาหาร VW เติมน้ำมะพร้าว 150 มล/ล. + BA 1 หรือ 5 μM มีอัตราเพิ่มปริมาณโปรโตคอมเพียง 2.4 - 3.3 เท่า สำหรับฟ้ามุ่ยสามารถเพิ่มปริมาณมากสุด 5.6 เท่า ในอาหารเหลว ND น้ำมะพร้าว 150 มล/ล. + BA 1μM และน้ำตาลมอลโตส 3 % และไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับอาหาร ND ที่เติม BA 1μM (ตารางที่ 3.2)

เมื่อพิจารณาจากลักษณะของโปรโตคอมทั้งสามปอยขุนตานและฟ้ามุ่ย การเลี้ยงในอาหาร ND โปรโตคอมจะมีสีเขียวอ่อน เมื่อเติม BA 1μM และจะเข้มขึ้น เมื่อ BA สูงขึ้นถึงระดับ 5 μM ในขณะที่การเลี้ยงโปรโตคอมของกล้วยไม่ทั้งสองชนิดในอาหารเหลวสูตร VW โปรโตคอมจะมีสีออกเหลือง ดังภาพที่ 3 ทั้งนี้เนื่องจากโปรโตคอมได้รับสารอาหารที่แตกต่างกัน ในองค์ประกอบของสูตรอาหาร ND และ ซึ่งจากผลการทดลองจะพบว่าสูตรอาหาร ND มีความเหมาะสมในการเพิ่มปริมารโปรโตคอมมากกว่าอาหาร VW

ตารางที่ 3 การเจริญเติบโตของโปรโตคอมของกล้วยไม้ป่าสกุลแวนด้า (การเจริญเติบโตคิดเป็นเท่าของน้ำหนักสดเริ่มต้น) ในสัปดาห์ที่ 2 และ 4

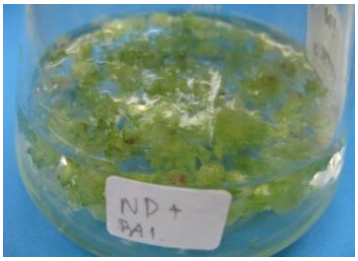
ตารางที่ 3.1 การเพิ่มปริมาณของโปรโตคอมสามปอยขุนตาน

สูตรอาหาร	**การเจริญเติบโต (เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น)**	
	สัปดาห์ที่ 2	**สัปดาห์ที่4**
1. VW + น้ำมะพร้าว150 มิลลิลิตร/ ลิตร + BA 1 μM	1.4 c	2.4 c
2. VW + น้ำมะพร้าว150 มิลลิลิตร/ ลิตร + BA 5 μM	1.8 b	3.3 bc
3. ND + น้ำมะพร้าว150 มิลลิลิตร/ ลิตร + BA 1 μM	2.2 a	5.9 a
4. ND + น้ำมะพร้าว150 มิลลิลิตร/ ลิตร + BA 5 μM	2.4 a	6.3 a
CV (%)	22	25

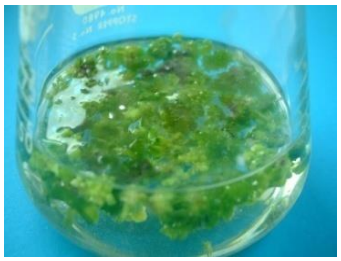
ตารางที่ 3.2 การเพิ่มปริมาณของโปรโตคอมฟ้ามุ่ย

สูตรอาหาร	**การเจริญเติบโต (เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น)**	
	สัปดาห์ที่ 2	**สัปดาห์ที่4**
1. VW + น้ำมะพร้าว150 มิลลิลิตร/ ลิตร + BA 1 μM	1.1 ab	2.6 c
2. VW + น้ำมะพร้าว150 มิลลิลิตร/ ลิตร + BA 5 μM	1.4 b	2.8 c
3. ND + น้ำมะพร้าว150 มิลลิลิตร/ ลิตร + BA 1 μM	2.0 a	5.6 a
4. ND + น้ำมะพร้าว150 มิลลิลิตร/ ลิตร + BA 5 μM	2.1 a	5.1 ab
CV (%)	21	26

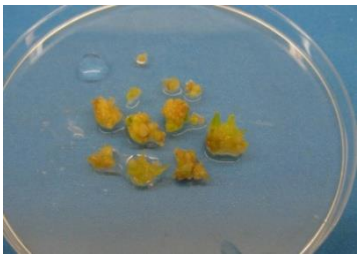
ค่าเฉลี่ย ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ
วิเคราะห์โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



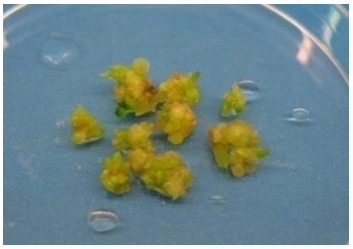
ND + CW 150 มล/ล. + BA 1 μM



ND + CW 150 มล/ล. + BA 5 μM



VW + CW 150 มล/ล. + BA 1 μM



VW + CW 150 มล/ล. + BA 5 μM

ภาพที่ 3 แสดงการเพิ่มปริมาณโปโตคอมของสามปอยขุนตาน หลังการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆ นาน 3 เดือน

1.3.2 การพัฒนาเป็นต้น

เมื่อนำโปรโตคอมของสามปอยขุนตาน และฟ้ามุ่ย ที่ได้จากการเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว ND + น้ำมะพร้าว150 มิลลิลิตร/ ลิตร + BA 1 μM ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 ซม. มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรต่างๆ เพื่อให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นอ่อน โดยทำการเปรียบเทียบสูตรอาหาร 3 ชนิด พบว่าในระยะ 1 เดือนแรก การเลี้ยงโปรโตคอมของกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด บนอาหารแข็งสูตร ND ร่วมกับ NAA 1 μM น้ำตาล maltose 30 gm/l และ BA 1 และ 5 μM โปรโตคอมจะมีการขยายขนาดเพิ่มขึ้นมากแต่ยังไม่มีการพัฒนาเป็นยอด เช่นเดียวกับการใช้อาหารสำเร็จสำหรับกล้วยไม้สูตร Phytamax โปรโตคอมก็ยังมีการเพิ่มปริมาณขึ้นบ้าง ต่างกับการเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ร่วมกับน้ำตาล sucrose 30 gm/l และ activated charcoal 500 mg/l ซึ่งในสามปอยขุนตาน ไม่มีการเติบโตเลย และตายในระยะเวลาต่อมา (ภาพที่ 4D) ส่วนในฟ้ามุ่ยจะมีทั้งกลุ่มแคลลัสที่ตาย และยังคงมีชีวิตอยู่ (ภาพที่ 5D) และเมื่อเลี้ยงต่อไปในเดือนที่2 แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหาร ND และ Phytamax เริ่มหยุดการขยายขนาดเพิ่มปริมาณ และ

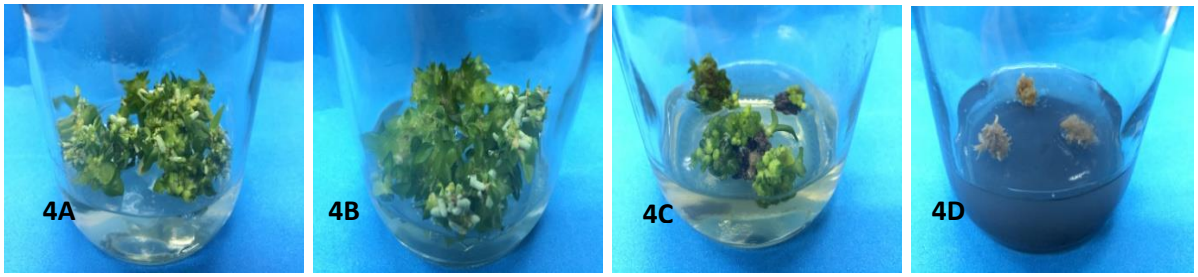
เริ่มพัฒนาเปลี่ยนรูปร่างเป็นใบเลี้ยงขนาดเล็กๆ จนในเดือนที่ 3 มีการเจริญเป็นยอดอ่อนที่ชัดเจนขึ้น และเริ่มมีการพัฒนาเป็นรากเกิดขึ้น (ภาพที่ 4 A-B และ 5 A-B) เมื่อทำการนับจำนวนยอดเฉลี่ย ต่อ 1 กลุ่มแคลลัส พบว่า สามปอยขุนตาน มีจำนวนยอดเฉลี่ยต่อ 1 กลุ่มแคลลัสสูงสุด 7.4 ยอด เมื่อเลี้ยงบนอาหาร ND ที่มี BA 1 μM ร่วมกับ NAA 1 μM และน้ำตาล maltose 30 gm/l รองลงมาได้แก่อาหารสูตร ND ที่มีBA 5 μM NAA 1 μM และน้ำตาล maltose 30 gm/l มีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 6.1 ยอด / 1 กลุ่มแคลลัส ในขณะที่อาหารสำเร็จสำหรับกล้วยไม้ Phytamax มีจำนวนยอดเฉลี่ยเท่ากับ 3.8 ยอด / 1 กลุ่มแคลลัส ส่วนอาหาร VW แคลลัสแห้งตายทั้งหมด

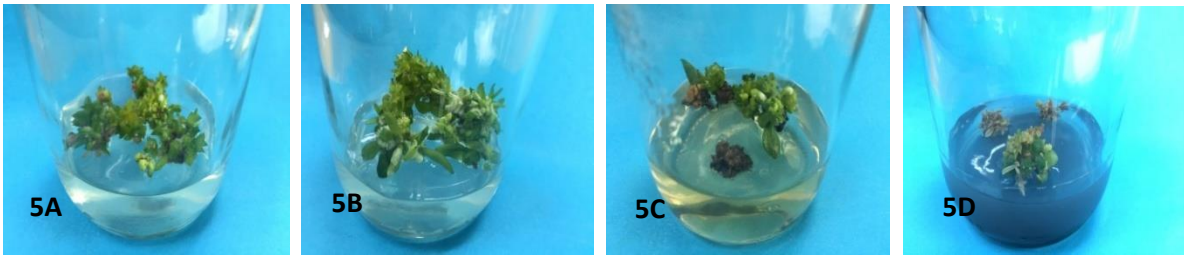
สำหรับฟ้ามุ่ย มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูง 4.9 และ 4.4 ยอด / 1กลุ่มแคลลัส เมื่อเลี้ยงบนอาหาร NDที่มี BA 1 หรือ 5μM ร่วมกับ NAA 1 μM และน้ำตาล maltose 30 gm/l รองลงมาได้แก่ Phytamax และ VW เติม sucrose 30 gm/l และ activated charcoal 500 mg/l มียอดเฉลี่ยเท่ากับ 2.9 และ 1.8 ยอด / 1แคลลัส ตามลำดับ (ตารางที่ 4) และเมื่อเลี้ยงกล้วยไม้ทั้งสองชนิดต่อไปอีก ในเดือนที่ 4-5 ยอดอ่อนมีการพัฒนาในด้านความสูง และมีการเติบโตของรากอย่างเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่6)

ตารางที่ 4 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อกลุ่มแคลลัส ของสามปอยขุนตาน และฟ้ามุ่ยหลังเลี้ยง บนอาหารสูตรต่างๆ นาน 3 เดือน

สูตรอาหาร	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อ 1 กลุ่มแคลลัส	
	สามปอยขุนตาน	ฟ้ามุ่ย
1. ND + BA 5 μM + NAA 1 μM + maltose 30 gm/l	6.1ab	4.4 a
2. ND + BA 1 μM + NAA 1 μM + maltose 30 gm/l	7.4 a	4.9 a
3. Phytamax (P6793)	3.8 b	2.9 b
4. VW + sucrose 30 gm/l + activated charcoal 500 mg/l	0	1.8c
CV	30.2	24.6

ค่าเฉลี่ย ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ
วิเคราะห์โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%





ภาพที่. 4A-D การพัฒนาเป็นต้นอ่อนสามปอยขุนตาน หลังการเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดยอดนาน 3 เดือน

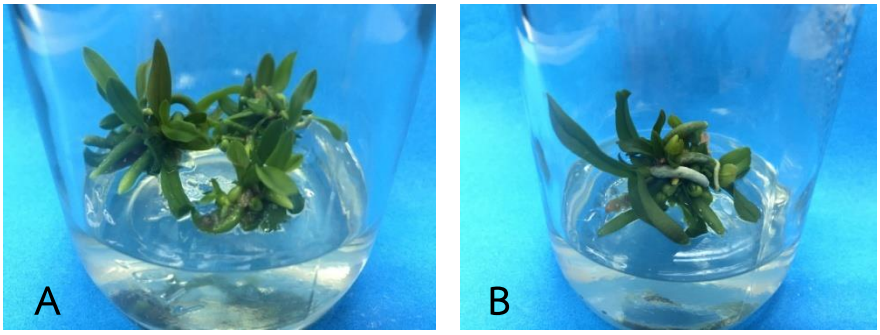
ภาพที่. 5A-D การพัฒนาเป็นต้นอ่อนของฟ้ามุ่ย หลังการเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดยอดนาน 3 เดือน

A อาหารสูตร ND + BA 5 µM + NAA 1 µM + maltose 30 gm/l

B อาหารสูตร ND + BA 1 µM + NAA 1 µM + maltose 30 gm/l

C อาหารสูตร Phytamax (P6793)

D อาหารสูตร VW + sucrose 30 gm/l + activated charcoal 500 mg/l



ภาพที่ 6 A. การเจริญของสามปอยขุนตาน บนอาหาร ND ที่มี BA 1 µM NAA 1 µM และน้ำตาล maltose 30 gm/l หลังเลี้ยงนาน 5 เดือน

B การเจริญของฟ้ามุ่ย บนอาหาร ND ที่มี BA 1 µM NAA 1 µM และน้ำตาล maltose 30 gm/l หลังเลี้ยงนาน 5 เดือน

2. การเก็บรักษาพันธุกรรมกล้วยไม้ป่าสกุลแวนดาในระยะยาว

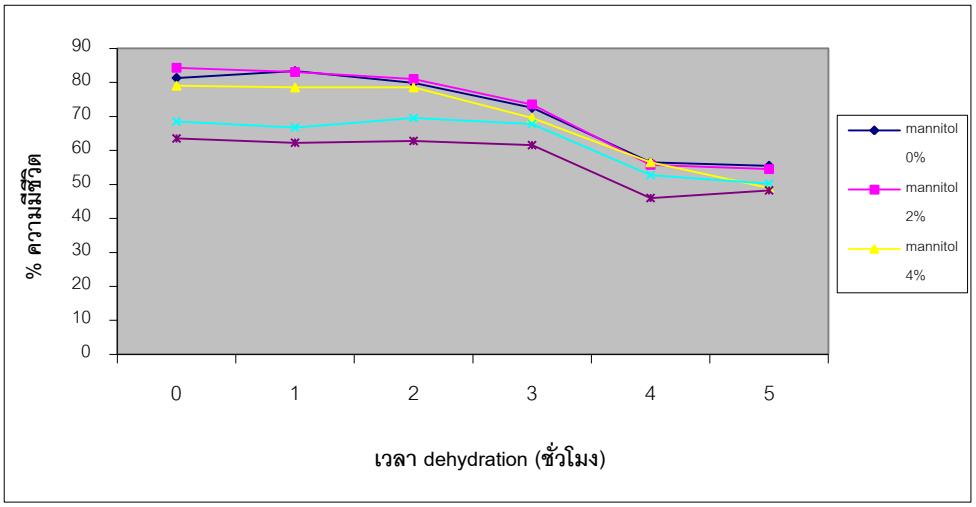
2.1 การเก็บรักษาโปรโตคอมสามปอยขุนตาน โดยวิธี Encapsulation -Dehydration

การเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชในระยะยาวโดยการแช่เย็นจัดในไนโตรเจนเหลวที่ –196 องศาเซลเซียส เป็นวิธีการที่ใช้กันมากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สิ่งสำคัญของวิธีการนี้ คือ หลีกเลี่ยงการเกิดการเสียหายของเซลล์ในช่วงที่แช่ในไนโตรเจนเหลว วิธี cryopreservation นี้ เซลล์หรือเนื้อเยื่อต้องผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ ก่อนที่จะแช่ในไนโตรเจนเหลว ดังนั้นขั้นตอนระยะการ dehydration ของalginate bead จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่นำมาพิจารณาในการทดลอง

2.1.1 ผลของ mannitol และระยะเวลาในการ dehydrate ต่อความมีชีวิตของโปรโตคอม

วิธีการ encapsulation/dehydration ของ การทดลองนี้มีกระบวนการของ cryoprotective 2 ขั้นตอน คือ preculture ชิ้นส่วนพืชใน mannitol และการ dehydration ของ alginate bead ในขวดที่บรรจุ silica gel เป็นระยะเวลาต่างๆ วิธีการในขั้นตอนนี้มีความสำคัญต่อการมีชีวิตรอดของโปรโตคอม ถ้าใช้ cryoprotectant คือ mannitol ความเข้มข้นที่สูงเกินไป หรือการ dehydrated ในระยะเวลาที่ไม่เหมาะสม มีผลต่อความมีชีวิตของโปรโตคอม จึงได้ทำการทดลองแบบ factorial in CRD เพื่อศึกษาถึงปัจจัยทั้ง 2 ชนิด โดยใช้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเติบโตเพิ่มปริมาณของโปรโตคอมที่อยู่ภายใน bead จากการวิเคราะห์พบว่าทั้งความเข้มข้นของ mannitol และระยะเวลาในการ dehydrate ล้วนมีผลต่อความมีชีวิตของโปรโตคอมและมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน เมื่อความเข้มข้นของ mannitol สูงขึ้นในแต่ละช่วงเวลาของการ dehydrated เปอร์เซ็นต์ความมีชิวิตของ alginate bead จะค่อยๆลดลง ในทำนองเดียวกัน ระยะเวลาของการ dehydrated ยิ่งนานขึ้นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต ของ alginate bead ก็จะค่อยๆลดลง ในแต่ละความเข้มข้นของ mannitol เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 7)

เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ mannitol ที่ใช้ preculture ภายหลังเลี้ยง algenate bead ในอาหารที่ใช้เพิ่มปริมาณโปรโตคอม การใช้ mannitol ระดับ 0 , 2 , 4 , 6 และ 8 % (w/v) ในแต่ละความเข้มข้น algenate bead จะมีอัตราความมีชีวิตลดลง เมื่อนำมา dehydrated เป็นเวลา 4 และ 5 ชั่วโมง และแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับระยะเวลาในการ dehydrate 0, 1 , 2 และ 3 ชั่วโมง (ตาราง ที่ 5.1) ส่วนการ dehydrate ในแต่ละช่วงเวลา เมื่อความเข้มข้นของ mannitol เพิ่มขึ้น อัตราความมีชีวิตจะลดลง โดยที่ความเข้มข้น 8 % (w/v) จะมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตน้อยที่สุด คือ 48.24 % เมื่อใช้เวลาในการ dehydrated นาน 5 ชั่วโมง (ตาราง 5.2) ทั้งนี้เป็นเพราะระยะเวลาในการ dehydrated และความเข้มข้นของ mannitol ที่สูงเกินไป ทำให้ pH ภายในเซลล์เปลี่ยน เพิ่มความเข้มข้นของ electrolyte และเกิด interaction ระหว่าง macro molecule เป็นผลให้เกิดการเสียน้ำในเซลล์ (Dumet and Benson , 2000) จึงเกิดการตายมากกว่าครึ่ง



ภาพที่ 7 อิทธิพลของ mannitol ระดับต่างๆต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตคอมกล้วยไม้สามปอยขุนตานภายใน alginate bead ที่ระยะเวลาในการ dehydrate ต่างกัน

ตารางที่ 5. ผลของการ preculture ต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของ alginate bead ซึ่งภายในมีโปรโตคอมสามปอยขุนตาน (ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว) แสดงข้อมูลของ Back Transformed Scale

ตาราง 5.1 ผลของ mannitol ต่อ % ความมีชีวิตของ alginate bead ที่ระยะเวลาในการ dehydrate ต่างกัน

เวลา dehydration (ชั่วโมง)	% ความมีชีวิต				
	ความเข้มข้นของ mannitol (% w/v)				
	0	2	4	6	8
0	84.22 ab	88.20 a	83.01 a	71.51 a	66.42 a
1	87.30 a	88.05 a	81.51 a	69.77 a	65.46 a
2	82.76 ab	85.11 ab	82.86 a	72.51 a	65.79 a
3	75.48 ab	78.73 b	73.74 ab	70.78 a	64.56 a
4	60.53 c	59.56 c	59.32 bc	55.75 b	50.00 b
5	59.40 c	58.81 c	52.20 c	53.24 b	42.24c

CV = 28%

ตาราง 5.2 ผลของระยะเวลาในการ dehydrate ต่อ % ความมีชีวิตของ alginate bead ที่ mannitol ความเข้มข้นระดับต่างๆ

ความเข้มข้นของ mannitol (% w/v)	**% ความมีชีวิต**					
	เวลา dehydration (ชั่วโมง)					
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
0	84.22ab	87.30 a	82.76 a	75.48 a	60.53 a	59.40 a
2	88.20a	88.05 a	85.11 a	78.73 a	59.56 a	58.81 a
4	83.01ab	81.51ab	82.86 a	73.74 ab	59.32 a	52.20 b
6	71.51b	69.77 c	72.51 b	70.78 ab	55.75 ab	53.24 ab
8	66.42c	65.46 c	65.79 c	64.56 b	50.00 b	42.24 c

CV = 28%

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT

2.1.2 ผลของการเก็บรักษาใน liquid nitrogen ต่อความมีชีวิตของโปรโตคอม

จากการทดลองภายหลังจากแช่ liquid nitrogen นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเพิ่มปริมาณโปรโตคอม algenate beads มีเปอร์เซนต์ความมีชีวิตน้อยมาก การ preculture โดยใช้ mannitol ความเข้มข้น 6 % (w/v) ที่ระยะเวลา dehydrated 3 และ 4 ชั่วโมง และที่ระดับความเข้มข้น 8 % (w/v) ระยะเวลา dehydrated 4 ชั่วโมง จะมีเปอร์เซนต์ความมีชีวิต 6.2 , 4.0 และ 3.4 % ตามลำดับ ส่วนใน treatment อื่นๆ โปรโตคอมจะตายหมด จึงไม่สามารถวิเคราะห์ผลทางสถิติได้ (ตาราง 6)

ในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชโดยวิธี cryopreservation มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง เช่น ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเก็บรักษา การใช้โปรโตคอมของกล้วยไม้ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแบ่งตัวและพัฒนาได้อย่างรวดเร็ว เป็นเซลล์อยู่ในช่วงของการเจริญเติบโต (expotential phase) จะมีความทนทานต่อสภาพเครียดหรือความเย็นจัดได้ดีกว่าเซลล์ในระยะ lag phase หรือ stationary phase เนื่องจากเป็นเซลล์ขนาดเล็ก มีขนาด vacuole ซึ่งเป็นแหล่งเก็บน้ำเล็ก มีปริมาณน้ำน้อย เมื่อผ่านขบวนการ preculture ทำให้มีความทนทานต่อสภาพเย็นจัดได้ นอกจากนี้เซลล์ระยะนี้มีการทนทานต่อการเสียน้ำมากกว่า จึงมีชีวิตรอดหลังจากการเก็บใน liquid nitrogen (Yoshida et al.,1993 และ Dereuddre and Basaglia , 1998) และนอกจากนี้การนำ algenate beads ไปแช่ในที่เย็นจัดแต่ไม่แข็ง ก่อนแช่ liquid nitrogen สามารถชักนำให้ความมีชีวิตหลังเก็บรักษาสูงขึ้น (Chen and Katha , 1985) ในการทดลองนี้ได้นำ algenate beads ที่ผ่านการ preculture ไปแช่ในตู้เย็น (5-8 องศาเซลเซียส) นาน 24 ชั่วโมงก่อนการนำไปแช่ liquid nitrogen อาจเป็นการช่วยเพิ่มความอยู่รอดได้บ้าง แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีอัตราการรอด

ชีวิตภายหลังจากเก็บรักษาค่อนข้างน้อย อาจเนื่องมาจากการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์และระหว่างเซลล์พืช ทำให้เซลล์แตก (Crowe et al ., 1988) หรือเกิดจากการสูญเสียสภาพสมดุลย์ ของ lipid bilayer ของ cell membrane ทำให้เซลล์ตาย (Steponkus , 1984)

ตารางที่ 6 ความมีชีวิตของโปรโตคอมสามปอยขุนตาน หลังแช่ในไนโตรเจนเหลว เมื่อผ่านการ preculture บน mannitol และ dehydrate ที่ระยะต่างๆ

ความเข้มข้นของ mannitol (% w/v)	**% ความมีชีวิต**					
	เวลา dehydration (ชั่วโมง)					
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	6.2	4.0	0
8	0	0	0	3.4	0	0

ภาพที่ 8 การเติบโตของโปรโตคอมสามปอยขุนตานภายหลังการเก็บในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธี Encapsulation –Dehydration เมื่อผ่านการ preculture บน mannitol 6% และ dehydrate นาน 3 ชั่วโมง

2.2.ศึกษาการเก็บรักษาโปรโตคอมสามปอยขุนตาน และฟ้ามุ่ย โดยวิธี Vitrification

ศึกษาถึงอิทธิพลสาร Cryoprotectant 4 ชนิดร่วมกับเวลาในการแช่สาร Cryoprotectant

ในการศึกษาการเก็บรักษาโปรโตคอมของกล้วยไม้ ต้องทำการปรับสภาพและดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยนำโปรโตคอมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม.ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตร ND เติมน้ำมะพร้าว และ abscisic acid (ABA) 2 μM น้ำตาลซูโครส 0.5 M 48 ชั่วโมง ตามด้วยการเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม ที่มีความ

เข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเพิ่มเป็น 0.8 M อีก 24 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำไปแกว่งในสารละลาย Loading solution ที่ประกอบด้วย อาหารเหลว ND น้ำตาลซูโครส 0.8 Mและกลีเซอรอล (Glycerol) 2 M นาน 30 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 80 รอบต่อนาที

นอกจากการเตรียมเนื้อเยื่อโดยดึงน้ำออกจากเซลล์แล้ว จำเป็นต้องปรับสภาพของไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) เพื่อให้ทนทานต่อการแข็งตัว วิธีการในขั้นตอนนี้มีความสำคัญต่อการรอดชีวิตและพัฒนาของโปรโตคอม จึงได้ทำการทดลองศึกษาถึงอิทธิพลสาร Cryoprotectant 4 ชนิดร่วมกับเวลาในการแช่สาร Cryoprotectant นาน 0 - 80 นาที โดยใช้อัตราการรอดชีวิตเป็นตัวชี้วัด ทั้งก่อนและหลังการแช่ในไนโตรเจนเหลว และจากการวิเคราะห์พบว่าสาร Cryoprotectant ทั้ง 4 ชนิด และเวลาในการปรับสภาพเซลล์ในสาร Cryoprotectant 0 - 80 นาทีที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส มีผลต่ออัตราการรอดชีวิต

เมื่อเปรียบเทียบผลของสาร Cryoprotectant และระยะเวลาในการแช่สาร ก่อนและหลังที่ทำการเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว นาน 1 สัปดาห์ นำมาทำให้ละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วล้างด้วยอาหารเหลว ND ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารเพิ่มปริมาณ ซึ่งได้แก่อาหาร ND เติมน้ำมะพร้าว150 มิลลิลิตร/ ลิตร BA 1 μM และน้ำตาล maltose 3 % นาน 6 - 8 สัปดาห์ บันทึกอัตราการรอดชีวิต

จากตารางที่ 7 พบว่าโปรโตคอมของสามปอยขุนตาน เมื่อแช่ใน PVS2 โดยไม่มีการนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลว อัตราการรอดชีวิตจะค่อยๆลดลง เมื่อแช่นาน 80 นาที ความมีชีวิตรอดจะเหลือเพียง 38.8 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ การใช้ PVS3 และ PVS3 ดัดแปลง อัตรารอดชีวิตค่อนข้างสูงกว่า แต่เมื่อวัดอัตรารอดชีวิตภายหลังเก็บในไนโตรเจนเหลว การใช้ PVS2 โดยแช่นาน 40 และ 60นาที โปรโตคอมรอดชีวิตเพียง 4.8 และ 3.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่การใช้ PVS3 ระยะเวลาในการแช่สารนาน 20-60 นาที ไม่มีผลแตกต่างทางสถิติ โดยมีอัตรารอดชีวิตสูงสุด 21.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่สาร PVS3 นาน 20 นาที สูงกว่าการใช้ PVS3 ดัดแปลง การแช่ชิ้นส่วนใน PVS3 -1 นาน 20 ,40 และ 60 นาที ให้ผลไม่ต่างกันในเรื่องของความมีชีวิตรอด ซึ่งอยู่ระหว่าง 18.8 – 20.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการแช่ใน PVS3-2 นาน 40 นาที โปรโตคอมจะรอดชีวิตมากที่สุด 16.8 เปอร์เซ็นต์

สำหรับโปรโตคอมของฟ้ามุ่ย ภายหลังการเก็บในไนโตรเจนเหลว การใช้ PVS2 จะตายหมดในทุกช่วงเวลาของการแช่สาร การใช้ PVS3 จะได้ผลดีกว่าการใช้ PVS3 ดัดแปลง จากตารางที่ 8 จะเห็นว่าเมื่อใช้สาร PVS3 แช่ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที ก่อนนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลว จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 16.4 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่การแช่นาน 60 และ 40 นาที ตามลำดับ ส่วนการใช้ PVS3 ดัดแปลง ทั้ง 2 ชนิด อัตราการรอดชีวิต อยู่ระหว่าง 3.2 – 8.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าการใช้ PVS3 ในทุกช่วงเวลาของการแช่สาร

การใช้เทคนิค Vitrification ในการเก็บรักษาพันธุกรรมพืช ชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ ชนิดของสาร Cryoprotectant ตลอดจนการปรับสภาพเซลล์รวมทั้งการดึงน้ำจากเซลล์ ล้วนเป็นปัจจัยสำคัญต่อความสำเร็จซึ่งต้องคำนึงถึงกระบวนการลดหรือปรับปริมาณน้ำในเซลล์ให้เหมาะสม ในขณะเดียวกันต้องป้องกันผลกระทบจากของสาร Cryoprotectant และการเปลี่ยนแปลงออสโมติก (Takagi *et al*, 1997) จากการทดลองครั้งนี้ได้ใช้โซมาติกเอมบริโอในระยะเริ่มต้นเป็นชิ้นส่วนในการเก็บรักษา เนื่องจากเป็นเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตพร้อมที่จะพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ และมีแวคคิวโอล (Vacuole) ขนาดเล็ก ซึ่งทนต่ออุณหภูมิต่ำได้มากกว่าเซลล์ที่มีจำนวนและแวคคิวโอลขนาดใหญ่ (Uragami, 1991) ก่อนที่จะนำโปรโตคอมมาแช่ในสาร Cryoprotectant ได้ทำการปรับสภาพของเซลล์ (Pre-culture) ด้วยน้ำตาลซูโครส 0.5-0.8 โมลาร์ และแช่ในสารละลาย Loading solution เพื่อเป็นการสะสมแป้งบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นและยังเป็นการเพิ่มออสโมติคัม (Osmoticum) ซึ่งช่วยป้องกันความเสียหายในระหว่างการสูญเสียน้ำและการแข็งตัวในไนโตรเจนเหลว (Engelmann *et al*, 1995) นอกจากนี้ในการใช้สาร Cryoprotectant ชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบ ระยะเวลาในการแช่และอุณหภูมิ มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตและพัฒนาเป็นต้นพืชภายหลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว ถึงแม้ว่ามีรายงานการใช้ PVS2 ประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด แต่ก็มีพืชบางชนิด เช่นปลายยอดมะละกอ *(Carica papaya)* ไม่สามารถทนต่อความเป็นพิษของ EG และ DMSO ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ PVS2 (Wang และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Martinez – Montero และคณะ (2008) ใช้ PVS2 ในโซมาติกเอมบริโอของอ้อย ซึ่งผลความมีชีวิตและพัฒนาเป็นต้นพืชได้เพียง 11% และรายงานว่า PVS2 เป็นพิษต่อเซลล์ โดย Fahy และคณะ (2004) กล่าวว่าความเป็นพิษของ EG และ DMSO เป็นอุปสรรคต่อความสำเร็จในการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งด้วยวิธี Vitrification สารดังกล่าวมีผลทำให้เซลล์ตายและลดความสามารถในการพัฒนาเป็นต้น แนวทางที่จะประสบความสำเร็จควรหลีกเลี่ยงการใช้สารที่เป็นพิษหรือลดความเข้มข้นของสารดักกล่าว จึงทำให้มีการพัฒนาส่วนประกอบของ PVSs ได้แก่ PVS3 ซึ่งมีเพียงกลีเซอรอลและซูโครส ซึ่งในระยะ 5-10 ปีที่ผ่านมา มีรายงานการใช้ PVS3 ประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด เช่นในการเก็บรักษาตายอดของแพร์โดยวิธี Droplet vitrification การใช้ PVS3 จะให้ผลต่อความมีชีวิตสูงกว่าการใช้ PVS2 และ PVS4 (Zhomagulova *et* al, 2014) นอกจากนี้ Kim และคณะ, (2009) ศึกษาการเก็บปลายยอดของกระเทียมและเบญจมาศด้วยเทคนิค Droplet vitrification โดยเปรียบเทียบสาร PVS2 และ PVS3 พบว่าการใช้ PVS3 ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตและพัฒนาเป็นต้นได้สูงกว่าการใช้ PVS2 ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ PVS3 สามารถใช้กับพืชได้หลายชนิดโดยไม่จำกัดขนาดและชนิดของชิ้นส่วนพืช โดยเฉพาะพืชที่ไม่ทนทานต่อความเป็นพิษในเซลล์ของสาร EG และ DMSO

ตารางที่ 7 ผลของสาร Cryoprotectant และระยะเวลาในการแช่สารต่ออัตราความมีชีวิตของโปรโตคอมสามปอยขุนตาน**ก่อนและหลัง**การเก็บในไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลา (นาที)	ชนิดของสาร Cryoprotectant							
	PVS2		PVS3		PVS3 -1		PVS3 -2	
	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) LN-	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) LN +	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) LN-	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) LN +	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) LN-	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) LN +	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) LN-	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) LN +
0	98.2 a	0	100 a	0	100 a	0	98.8 a	0
20	83.4 b	0	100 a	21.4a	98.0 a	19.6a	96.2 a	14.6ab
40	69.8 c	4.8	98 .2a	20.8a	98.2 a	20.4a	94.8 a	16.8a
60	59.2 d	3.6	94.4 b	19.2ab	92.2 b	18.8a	85.6 b	12.4b
80	38.8e	0	94.6 b	14.6b	89.8 c	14.6b	78.8c	9.6 c
CV %	31	27	31	28	27	28	31	30

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT (แสดงข้อมูลของ Back Transformed Scale)

ตารางที่ 1.6 ผลของสาร Cryoprotectant และระยะเวลาในการแช่สารต่ออัตราความมีชีวิตของโปรโตคอม ฟ้ามุ่ย **ก่อนและหลัง**การเก็บในไนโตรเจนเหลว

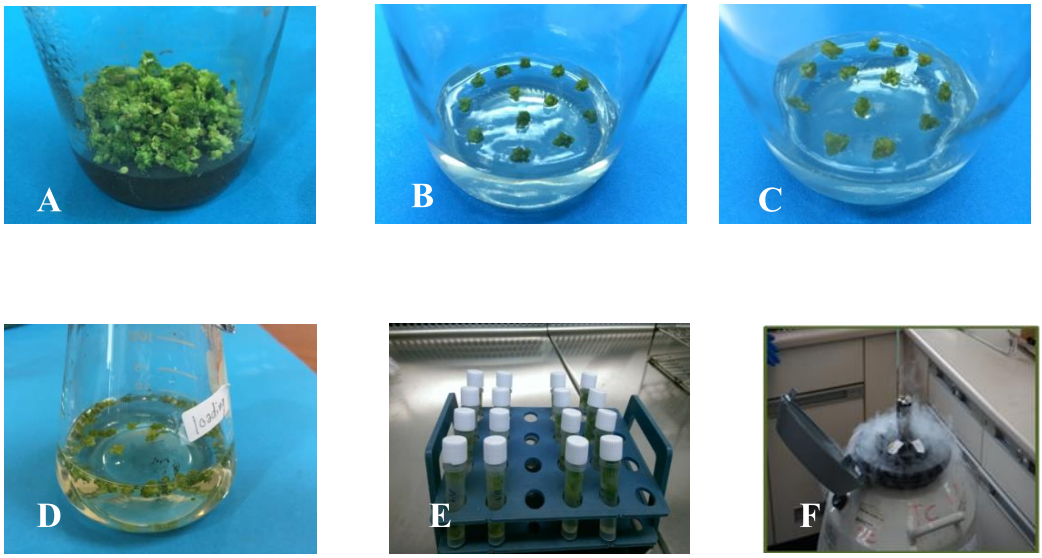
ระยะเวลา (นาที)	ชนิดของสาร Cryoprotectant							
	PVS2		PVS3		PVS3 -1		PVS3 -2	
	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) LN-	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) LN +	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) LN-	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) LN +	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) LN-	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) LN +	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) LN-	ความมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์) LN +
0	100 a	0	98.4a	0	100 a	0	94.8ab	0
20	96.8 a	0	98.8a	12.8bc	96.0 a	8.8a	98.6a	6.2a
40	87.2 b	0	96.8a	16.4a	94.8 a	5.6b	92.4a	6.4a
60	78.6c	0	94.8 a	14.8ab	95.4 ab	4.8b	94.8ab	4.6b
80	68.4d	0	98.4a	11.8c	92.4 b	4.4b	91.8b	3.2b
CV %	33	-	25	29	32	28	27	31

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT (แสดงข้อมูลของ Back Transformed Scale)

PVS2 = 30% glycerol + 15% DMSO + 15% EG + 13.7% sucrose

PVS3 = 50% glycerol + 50% sucrose

PVS3- 1 = 50% glycerol + 40% sucrose PVS3 - 2 = 45% glycerol + 45% sucrose



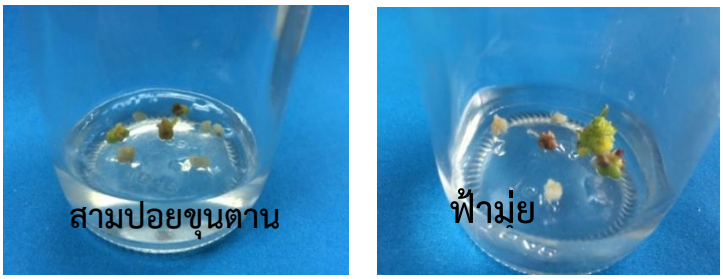
ภาพที่ 9 การเตรียมโปรโตคอมกล้วยไม้ก่อนการเก็บรักษา

A โปรโตคอมกล้วยไม้ที่นำมาเก็บรักษา

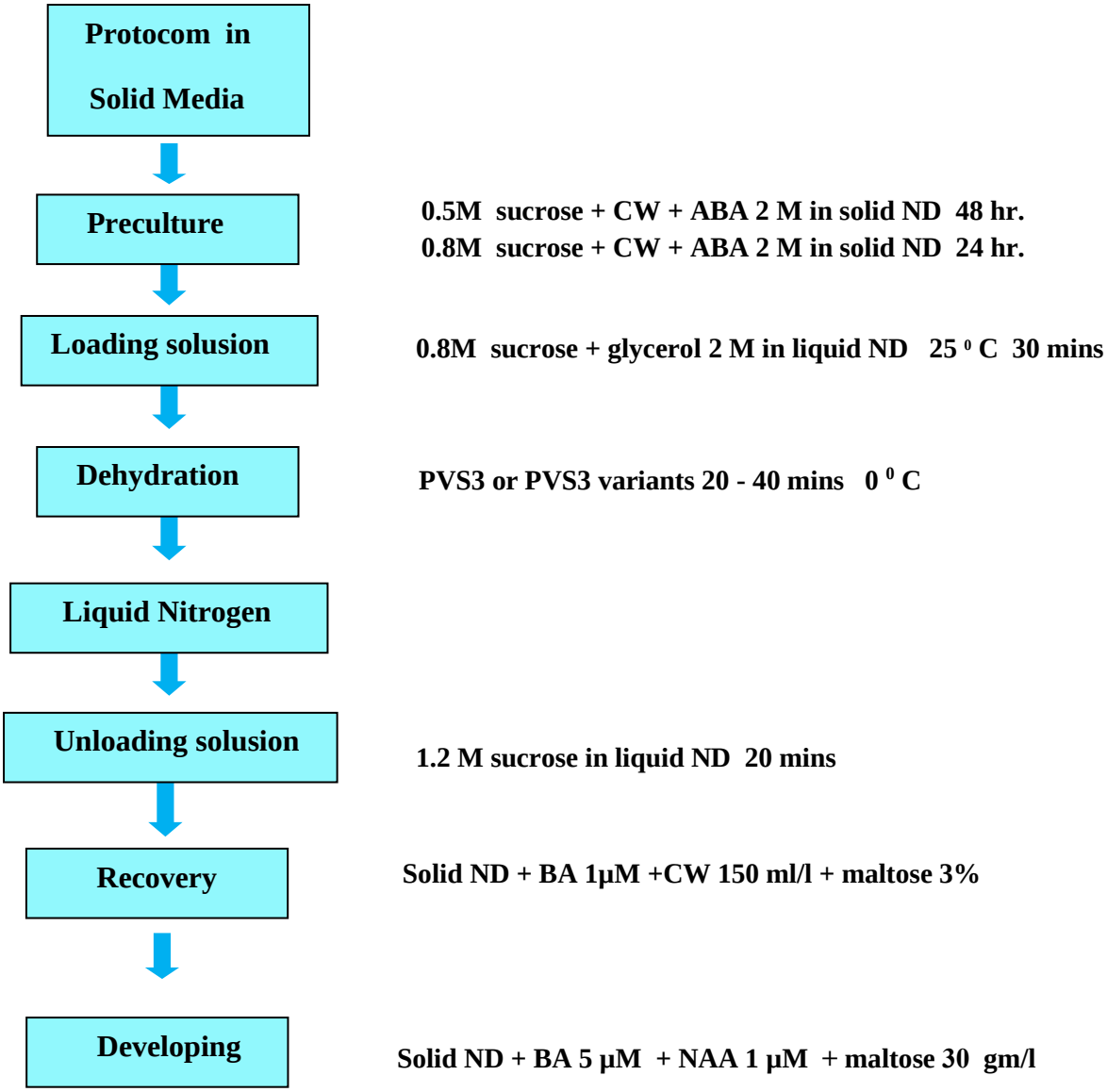
B- C แยกออกเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำมา Preculture บนอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 0.5และ 0.8 โมลาร์

D แช่ในสารละลาย loading solution นาน 30 นาที

E, F ดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยสารละลาย PVS ก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว



ภาพที่ 10 ความมีชีวิตของโปรโตคอมสามปอยขุนตาน และฟ้ามุ่ย หลังจากแช่ไนโตรเจนเหลวเมื่อใช้ PVS 3



ภาพที่11 แสดงขั้นตอนการเก็บรักษาโปรโตคอมกล้วยไม้สามปอยขุนตาน และฟ้ามุ่ย ด้วยวิธี Vitrification

สรุปผลการทดลอง

การขยายพันธุ์และเก็บรักษากล้วยไม้ป่าสกุลแวนดา สรุปผลการดำเนินการได้ดังนี้

1. การเพาะเมล็ดฝักกล้วยไม้สามปอยขุนตาน หลังจากทำการเพาะเมล็ด นาน 3 เดือน สามปอยขุนตานมีคะแนนเฉลี่ยความงอกดีที่สุดที่ระดับ 1.4 คะแนน เมื่อเพาะเมล็ดบนอาหารสูตร ND เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 % casein hydrolysage 100 มิลลิกรัม /ลิตร ส่วนเมล็ดฟ้ามุ่ย ไม่สามารถงอกในทุกสูตรอาหาร ซึ่งอาจเป็นผลจากอุณหภูมิในระหว่างการเจริญของฝักและการเคลื่อนย้าย

2. การเพาะเลี้ยงตายอด/ตาข้าง ฟ้ามุ่ย พบว่าตายอดและตาข้าง มีการพัฒนาเป็นโปรโตคอม มากสุด 65 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลว ND ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มล/ล. BA 5 μM และ น้ำตาลซูโครส 3 % ส่วนการใช้อาหารสูตร VW ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 150 มล/ล. BA 5 μM น้ำตาลซูโครส 3 % มีอัตราการพัฒนาเป็นโปรโตคอมเพียง 20 เปอร์เซ็นต์

3. ทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณโปรโตคอม อาหารเหลว ND ที่ประกอบด้วยน้ำมะพร้าว 150 มล/ล. ร่วมกับ BA 1 หรือ 5 μM และน้ำตาลมอลโตส 3 % ให้อัตราการเพิ่มปริมาณโปรโตคอมไม่แตกต่างทางสถิติ โดยสามปอยขุนตาน มีอัตราการเพิ่มปริมาณ สูงสุด 6.3 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ND ที่ประกอบด้วยน้ำมะพร้าว 150 มล/ล. ร่วมกับ BA 5 μM ส่วนฟ้ามุ่ยเพิ่มปริมาณได้สูงสุด 5.6 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ND ที่ประกอบด้วยน้ำมะพร้าว 150 มล/ล. ร่วมกับ BA 1 μM นาน 4 สัปดาห์ และโปรโตคอมของกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิดสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ดี เมื่อย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร ND ที่เติม BA 1 μM ร่วมกับ NAA 1 μM และน้ำตาลมอลโตส 3 % โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยที่เกิดขึ้นสูงสุดเท่ากับ 7.4 และ 4.9 ยอด ในสามปอยขุนตานและฟ้ามุ่ยตามลำดับ

4. ศึกษาการเก็บรักษาพันธุกรรมในระยะยาวในไนโตรเจนเหลว ด้วยวิธี Encapsulation – Dehydration โดยใช้โปรโตคอมของสามปอยขุนตานเป็นตัวอย่างในการศึกษา และการเก็บโปรโตคอมของสามปอยขุนตาน และฟ้ามุ่ย ด้วยวิธี Vitrification พบว่าการเก็บรักษาด้วย Vitrification โดยใช้ PVS 3 เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (Cryoprotectant) นาน 20 -40 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จะทำให้มีอัตราการรอดชีวิตและพัฒนาเป็นต้นหลังนำออกจากไนโตรเจนเหลว มากกว่าวิธี Encapsulation – Dehydration ที่ผ่านการ Dehydrate ด้วย mannitol 6-8 เปอร์เซ็นต์นาน 3 ชั่วโมง สามปอยขุนตานมีอัตราการรอดชีวิต 21.4 เปอร์เซ็นต์ หลังการเก็บด้วยวิธี Vitrification เมื่อแช่ PVS 3 นาน 20 นาที ส่วนฟ้ามุ่ย รอดชีวิต 16.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่ PVS 3 นาน 40 นาที ในขณะที่ วิธี Encapsulation – Dehydration จะมีอัตรารอดชีวิตเพียง 6.2 เปอร์เซ็นต์

เอกสารอ้างอิง

กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2537. คู่มือจำแนกพืชอนุรักษ์ตามพรบ.พันธุ์พืช พ.ศ. 2518. กรมวิชาการเกษตร.กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 322 หน้า

ระพี สาคริก. 2535. กล้วยไม้รองเท้านารี วิธีปลูกเลี้ยงและปัญหาอนุรักษ์ธรรมชาติ. สำนักพิมพ์ โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 134 หน้า.

สุรวิช วรรณไกรโรจน์ . 2533 . องค์ประกอบและการเตรียมอาหารสังเคราะห์. เอกสารประกอบการสอน วิชาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 25 หน้า

อบฉันท์ ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้เมืองไทย. สำนักพิมพ์บ้านและสวน. กรุงเทพฯ. 461 หน้า.

Chen, T.H.H., P.H. Li, and K.K. Katha. 1985. Cryopreservation of wheat suspension cultures and regenarable callus. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 4 : 101-109.

Crowe, J.H., J.F. Carpenter, L.M. Crowe, T.J. Anchordoguy. 1988. Interaction of sugars with membranes. Biochemical Biophysical Acta. 947 : 367-384.

Dereuddre, J. and C. Basaglia. 1998. Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllas* L. var. Kole) apical and axillary shoot tips excised from different aged *in vitro* plantlets. Plant Cell Rep. 7 : 170-173.

Dumet, D. and E.E. Benson. 2000. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In : Engelmann F, Takagi, H. (eds). Cryopreservation of tropical plant germplasm. Italy, IPGRI. Pp. 43-56.

Engelmann, F., B. Assy-Bah, S. Bagniol, D. Dumet and N. Michaux-Ferriere. 1995. Cryopreservation of date palm, oil palm and coconut. In : Biotechnology in Agriculture and Forestry. Y.P.S. Bajaj (ed.). Vol. 32, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 236-244.

Fahy, G.M., B. Wowk, J. Wu and S. Paynter. 2004. Improved vitrification solution based on the predictability of vitrification solution toxicity. Cryobiology. 48 : 22-35.

Kim, H., Y. Lee, D. Shin, H. Ko, J. Gwag, E. Cho and F. Engelmann. 2009. Development of alternative plant vitrification solution in droplet-vitrification procedures. CryoLetters. 30(5) : 320-334.

Martinez – Montero, M.E. J. Martinez and F. Engelmann. 2008. Cryopreservation of sugarcane somatic embryos. CryoLetters. 29 : 229-242.

Steponkus, P.L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. Annu. Rev. Plant Physio. 35 : 534-584.

Takagi, H., N.T. Thinh, O.M. Senboku and A. Sakai. 1997. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. I. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. Plant Cell Rep. 16 : 594-599

Uragami, A. 1991. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) cultured *in vitro*. Research Bulletin of the Hokkaido National Agricultural Experiment Station.156 : 1-37.

Yoshida, S., Y. Hattanda, T. Suyama. 1993. Variation in chilling sensitivity of suspension cultured cells of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) during the growth cycle. Plant Cell Rep. 34 : 673-679

Zhomagulova, Z.B., I.Y. Kovalchuk, R.M. Barbars, G.A. Kampitova and T.T. Turdiev. 2014. Effect of pretreatmemt method dormant peer buds on viable after cryopreservation. World Applied Sci. J. 30(3) : 330-334.

ภาคผนวก

1. Modified Vacin and Went (VW, 1949) medium

Components	mg/l
$Ca_3(PO_4)2$	200
KNO3	525
KH_2PO4	250
$MgSO_4.7H_2O$	250
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
Na_2EDTA	37.25
$MnSO_4.7H_2O$	5.7
Sucrose	3% (w/v)
Gelrite	0.3% (w/v)

pH 5.7

2. Na-alginate solution

Na-alginate	3% (w/v)
Sucrose	0.4 M
Glycerol	2 M

2. New Dogashima Media (ND)

Macro elements

NH4NO3	480 mg/l
KNO3	200 mg/l
Ca(NO3)2 . 4H20	470 mg/l
KCI	150 mg/l
MgSo4.7H2O	250 mg/l
KH2PO4	550 mg/l

Macro elements(modified Nitsch 1956)

MnSO4.4H20	3 mg/l
ZnSO4.7H20	0.5 mg/l
H3BO4	0.5 mg/l
CuSO4.5H20	0.025 mg/l
Na2MoO4.2H20	0.025 mg/l
CoCl2.6H20	0.025 mg/l
Concentrated H2SO4	0.5 mg/l (I eliminated this for our cultures)

Organics (modified Morel & Welmore, 1951)

Myo-inositol	100 mg/l
Niacin	1.0 mg/l
Pyridoxine HCI	1.0 mg/l
Thiamine HCI	1.0mg/l
Calcium pantothenate	1.0 mg/l
Adenine	1.0 mg/l
I-Cystein	1.0 mg/l
d-Biotin	0.1 mg/l
Fe-EDTA	21 mg/l

3. Phytamax Medium composition

Ammonium nitrate	825 mg/l
Ammonium sulfate	-
Boric acid	3.1 mg/l
Calcium chloride anhydrous	166 mg/l
Calcium nitrate	-
Cobalt chloride•6H2O	0.0125 mg/l
Cupric sulfate •5H2O	0.0125 mg/l
Na2-EDTA	37.24 mg/l
Ferrous sulfate•7H2O	27.85 mg/l
Magnesium sulfate	90.35 mg/l
Magnesium sulfate•H2O	8.45 mg/l
Molybdic acid (sodium salt) •2H2O	0.125 mg/l
Potassium iodide	0.415 mg/l
Potassium nitrate	950 mg/l
Potassium phosphate monobasic	85 mg/l
Zinc sulfate•7H2O	5.3 mg/l