แผนงานวิจัย การอนุรักษ์ความหลากหลายของทรัพยากรพันธุกรรมพืช

โครงการวิจัย เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชกรมวิชาการเกษตร

กิจกรรม เทคโนโลยีการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ

ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) การอนุรักษ์พันธุกรรมอ้อยในสภาพเยือกแข็งโดยใช้ปลายยอด

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) Conservation of Sugarcane (*Saccharum spp.)* Shoot Tip Using Cryopreservation Technique

คณะผู้ดำเนินงาน

ปาริฉัตร สังข์สะอาด สุกัลยา ศิริฟองนุกูล รัชนก ทองเวียง

วรกิจ ห้องแซง กษิดิศ ดิษฐบรรจง

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

การศึกษาการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) โดยทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อย 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์อู่ทอง12 ขอนแก่น3 อู่ทอง5 K84-200 และ อ้อยเคี้ยวเมอริชาด โดยเพาะเลี้ยงเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอ่อนอ้อย ใช้ในการศึกษาสูตรอาหารในการ preculture ปลายยอดบนอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมน้ำตาลซูโครส 2 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.08 และ 0.4 โมลาร์ เป็นเวลา 3-6 วัน ด้วยวิธี vitrification พบว่าสูตรอาหาร preculture ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.4 โมลาร์ มีแนวโน้มอัตราการรอดชีวิตดีกว่า ในส่วนของการศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยในสภาพเยือกแข็งจำนวน 3 เทคนิค ได้แก่ Vitrification, Encapsulation – vitrification และ Encapsulation – dehydration พบว่าการทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยในสภาพเยือกแข็งโดยเทคนิค Vitrification ปลายยอดอ้อยทุกพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่าเทคนิค Encapsulation – vitrification และ Encapsulation – dehydration เมื่อไม่ได้แช่ในไนโตรเจนเหลว (-LN) แต่เมื่อแช่ในไนโตรเจนเหลวยังไม่พบอัตราการรอดชีวิตในทุกเทคนิค

ABSTRACT

The shoot tips of sugarcane were used for cryopreservation technique, which was applied to 5 varieties (K84-200, U-thong12, Khonkan3, U-thong5 and Merichard) , the sugarcane shoot tips were precultured on modified MS medium supplement with different concentration of 0.08M sucrose and 0.4M sucrose for 3 - 6 days by vitrification method, the result was not difference in the survival rate but preculture with 0.4M sucrose the survival rate was better. The part of study on cryopreservation techniques for preserved the sugarcane shoot tips 3 techniques were Vitrification, Encapsulation – vitrification and Encapsulation – dehydration techniques. The vitrification technique showed the higher percentage of the survival rate than Encapsulation – vitrification and Encapsulation – dehydration techniques all of sugarcane varieties after non-liquid nitrogen (-LN). In contrast, the survival rate was not found after cryopreservation.

คำนำ

การปลูกอ้อยเพื่อการค้าโดยทั่วไปทางโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลจะรับซื้อผลผลิตอ้อยจากเกษตรกรตามน้ำหนัก (ตัน) และคุณภาพความหวาน (CCS) และจากสถานการณ์ปัจจุบันได้มีการกำหนดมาตรฐานของน้ำตาลทรายดิบที่ส่งออกไปต่างประเทศ มีการกำหนดปริมาณแป้งปนเปื้อนได้ไม่เกิน 800 ppm. ซึ่งส่งผลกระทบต่อพันธุ์อ้อยที่ปลูกเพราะพื้นที่ปลูกประมาณ 80 % ใช้อ้อยพันธุ์ K 84-200 ที่มีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมทั่วประเทศได้ดี แต่มีปริมาณแป้งในน้ำอ้อยมากกว่า 1,000 ppm. (กนกทิพย์ และ ประชา, 2550) จึงมีการรณรงค์ให้เกษตรกรลด/เลิกปลูก แต่ยังคงมีการใช้พ่อแม่พันธุ์ในการพัฒนาสายพันธุ์อ้อย เกษตรกรจึงได้ปรับเปลี่ยนมาใช้พันธุ์อ้อยที่ให้ผลผลิตต่อไร่และมีค่า CCS สูงกันมากขึ้นตามคำแนะนำ ด้วยเหตุผลนี้เองทำให้สายพันธุ์อ้อยดั้งเดิมที่ทนต่อสภาพแวดล้อมและโรคแมลงได้ดีเริ่มลดพื้นที่ปลูกลง และจากงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ผลผลิตชีวมวลในการนำผลผลิตทางการเกษตรมาใช้ในการผลิตเอทานอล สายพันธุ์อ้อยที่มีค่าเส้นใย (fiber) สูงได้กลับเข้ามามีบทบาทอีกครั้งหนึ่ง งานวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับการรวมรวมพันธุ์อ้อยสายพันธุ์ต่างๆ จึงมีความสำคัญมากขึ้นทั้งในแง่การปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุกรรม เนื่องจากอ้อยเป็นพืชอายุยาว การดูแลรักษาในสภาพแปลงต้องใช้แรงงาน และพื้นที่มาก ทางหน่วยงานของรัฐและเอกชนได้มีการเก็บรวบรวมสายพันธุ์ต่างๆไว้มากมายในสภาพปลอดเชื้อ (*In vitro*) จากการเก็บรวบรวมสายพันธุ์ต่างๆไว้เป็นจำนวนมากนี้เองทำให้งานเก็บรักษาพันธุ์อ้อยโดยวิธีนี้ต้องใช้เวลา และแรงงานมาก เนื่องจากการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารอย่างน้อย 3-4 เดือนครั้ง การเก็บรักษาพันธุกรรมพืชในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) จึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่นำมาใช้เก็บรักษาพันธุกรรมพืชที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส สามารถใช้อนุรักษ์เชื้อพันธ์พืชที่ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและไม่สามารถเก็บเมล็ดได้

หลักการสำคัญของวิธีการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชในสภาพเยือกแข็งที่จะใช้ได้อย่างประสบความสำเร็จ คือ ต้องป้องกันไม่ให้เซลล์กลายเป็นผลึกน้ำแข็ง (ice crystal) ซึ่งจะเป็นอันตรายแก่เซลล์ วิธีป้องกันการกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง เพื่อให้สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธ์พืชในรูปของเซลล์เนื้อเยื่อและอวัยวะพืชในไนโตรเจนเหลว คือ การลดปริมาณน้ำภายในเซลล์หรือทำให้เซลล์สูญเสียน้ำน้อยที่สุด (dehydration) ซึ่งสามารถทำได้โดย การให้อุณหภูมิต่ำ

อย่างช้า (conventional slow freezing) การให้อุณหภูมิต่ำอย่างง่าย (simple freezing) การทำให้เกิดสภาพแก้วอย่างสมบูรณ์ (complete vitrification) การทำให้แห้ง (air drying) วิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในสภาพเยือกแข็งมีหลายวิธี ได้แก่ วิธี vitrification, encapsulation-dehydration และ encapsulation-vitrification ซึ่งใช้พื้นที่น้อย ค่าใช้จ่ายต่ำ ไม่มีปัญหาผลกระทบจากสภาพแวดล้อมในการปลูกและการดูแลรักษาน้อยกว่าการเก็บในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและในสภาพแปลง เป็นการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในระยะยาว (long term) สะดวกในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์พืชระหว่างประเทศ เพราะมีขนาดเล็กและปลอดโรค สำหรับในประเทศไทยงานวิจัยที่ผ่านมามีการใช้เทคนิคการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชในสภาพเยือกแข็งในการเก็บเมล็ดและโปรโตคอมของกล้วยไม้ เอื้องคำ เอื้องเงิน ม้าบิน เขาแกะ และช้างกระ (ศุภกิจ, 2540; วราภรณ์, 2543; Thammasiri, 2000; Thammasiri, 2002) ชิ้นส่วนของปลายยอด (shoot tip) ของพืชที่ใกล้สูญพันธุ์และหายาก เช่น ขนุนไพศาลทักษิณ (Thammasiri, 1999) เป็นต้น

เนื่องจากธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร มีภารกิจในด้านการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชให้เหมาะสมกับชนิดของพืชแต่ละชนิดเพื่อเป็นประโยชน์ในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์ระหว่างหน่วยงาน และนำไปปรับใช้กับพืชชนิดอื่นในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชตามภารกิจของหน่วยงาน

เพื่อศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาปลายยอดอ้อยในสภาพเยือกแข็งเพื่อการอนุรักษ์

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ท่อนพันธุ์อ้อย จำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์อู่ทอง12 ขอนแก่น3 อู่ทอง5 K84-200 และ อ้อยเคี้ยวเมอริชาด
2. ไนโตรเจนเหลว
3. เครื่องแก้วและสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง (Cryopreservation)
4. วัสดุปลูกต่างๆ สำหรับปลูกท่อนพันธุ์มันเทศ ได้แก่ กระถาง, กระบะเพาะ, ดินปลูก ทราย เป็นต้น

วิธีการ

- แบบและวิธีการทดลอง

ทำการทดลองการเก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยในสภาพเยือกแข็ง ได้แก่ พันธุ์ K 84-200, อู่ทอง 12, ขอนแก่น 3, อู่ทอง5 และอ้อยเคี้ยวพันธุ์เมอริชาด รวม 5 พันธุ์ จัดเป็น 5 การทดลอง ในแต่ละการทดลองวางแผนการทดลองแบบ RCB 6 ซ้ำ 3 กรรมวิธี ได้แก่ เทคนิค vitrification, เทคนิค encapsulation-vitrification และ เทคนิค encapsulation-dehydration

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

การเตรียมตัวอย่างและชิ้นส่วนพืช คือ นำต้นพันธุ์อ้อยมาปลูกในท่อซีเมนต์เพื่อขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนหน่อ (ปลายยอด) หลังจากนั้นนำปลายยอดอ้อยที่ปลูกในท่อซีเมนต์มาฟอกฆ่าเชื้อและนำมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA (6-benzyladenine) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาล (sucrose) 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น (agar) 6.25 กรัม และน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร

ศึกษาวิธีการเก็บชิ้นส่วนพืชในสภาพเยือกแข็ง 3 วิธี ได้แก่

1. เทคนิค vitrification

นำปลายยอดและตาข้างของอ้อยทั้ง 5 พันธุ์ มาปรับสภาพ (preculture) หลังจากนั้นนำ shoot tips มาทำ LS (Glycerol 2 M และ sucrose 0.4 M) ประมาณ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ย้าย shoot tips ไปไว้ใน PVS3 (1 ml.) 50 % sucrose และ 50 % glycerol; Nishizawa et al., 1993) ที่บรรจุอยู่ใน cryotube เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบกำหนดใช้หลอดดูด PVS3 ใน cryotube ออก แล้วใส่ PVS3 เข้าไปใหม่ นำ cryotube ที่บรรจุ shoot tips ไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว (LN) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำตัวอย่างออกมาละลายในน้ำอุ่น 38 °C (Thawing) 1-2 นาที ดูดสารละลาย PVS3 ใน cryotube ออก นำชิ้นส่วนของ shoot tips ที่ได้ไปใส่ใน sucrose 1.2 M (US) เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำ shoot tips ที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม sucrose 0.3 M (Regrowth) เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่บรรจุใน 24 Well Cell culture บันทึกเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของปลายยอดและการเจริญเติบโตของต้นอ้อยในแต่ละการทดลองที่อายุ 1 เดือน

2. เทคนิคเทคนิค Encapsulation - vitrification

นำปลายยอดและตาข้างของอ้อยทั้ง 5 พันธุ์ มาปรับสภาพ (preculture) หลังจากนั้นทำ Encapsulation โดยนำปลายยอดใส่ใน alginate 3 % ใช้ปิเปตดูดส่วนของปลายยอดหยดลงในอาหารเหลว MS ที่เติม $CaCl_2$ 100 mM ร่วมกับ sucrose 0.4 M (pH 5.7*)* ประมาณ 20 นาที จะได้ alginate bead นำ alginate bead ที่ได้มาทำ osmotic dehydration ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม sucrose 0.4 M ร่วมกับ 2 M glyceral (LS) และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 60 นาที นำปลายยอดที่ได้แช่ในสารละลาย PVS3 (1 ml.) (50 % sucrose และ 50 % glycerol; Nishizawa et al., 1993) ที่บรรจุอยู่ใน cryotube 60 นาที เมื่อครบกำหนดใช้หลอดดูด PVS3 ใน cryotube ออก แล้วใส่ PVS3 เข้าไปใหม่ นำ cryotube ที่มี shoot tips ในถังไนโตรเจนเหลว (LN) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกมาละลายในน้ำอุ่น 38°C (Thawing) 1-2 นาที ดูดสารละลาย PVS3 ใน cryotube ออก นำชิ้นส่วนของ shoot tips ไปใส่ใน sucrose 1.2 M (US) เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำ shoot tips ที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม sucrose 0.3 M (Regrowth) เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่บรรจุใน 24 Well Cell culture บันทึกเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของปลายยอดและการเจริญเติบโตของต้นอ้อยในแต่ละการทดลองที่อายุ 1 เดือน

3. เทคนิค Encapsulation - Dehydration

ดัดแปลงตามวิธีการของ Gupta and Husnara (2009) นำปลายยอดอ้อยทั้ง 5 พันธุ์ มาปรับสภาพ (preculture) ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม sucrose 0.3 M (pH 5. 8) ที่ 25°C (ที่มีแสง 16 ชั่วโมง ที่มืด 8

ชั่วโมง) เป็นเวลา 3 - 6 วัน หลังจากนั้นนำปลายยอดใส่ใน alginate 3 % ใช้ปิเปตดูดส่วนของปลายยอดหยดลงในอาหารเหลว MS ที่เติม $CaCl_2$ 100 mM ร่วมกับ sucrose 0.4 M (pH 5.7) ประมาณ 20 นาที จะได้ alginate bead นำ alginate bead ที่ได้มาทำ osmotic dehydration ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม sucrose 0.4 M ร่วมกับ 2 M glyceral (Loading solution, LS) ที่ pH 5.7 และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำ alginate bead มาวางบนกระดาษกรองเพื่อลดความชื้น (air desiccation) ในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำ alginate bead บรรจุในหลอดพลาสติค (cryotube) แช่ในถังไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen; LN) เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำ bead ออกมาละลายในน้ำอุ่น 38°C (Thawing) และทำ Rehydration โดยนำ bead แช่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม sucrose 1.2 M (Unloading solution, US) เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำ bead ที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม sucrose 0.3 M (Regrowth) เป็นเวลา 1 วัน แล้วจึงย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่บรรจุใน 24 Well Cell culture บันทึกเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของปลายยอดและการเจริญเติบโตของต้นอ้อยในแต่ละการทดลองที่อายุ 1 เดือน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา(เริ่มต้น-สิ้นสุด)

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 –กันยายน 2561

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ

อาคารทรัพยากรพันธุกรรมพืชสิรินธร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลการทดลองและวิจารณ์

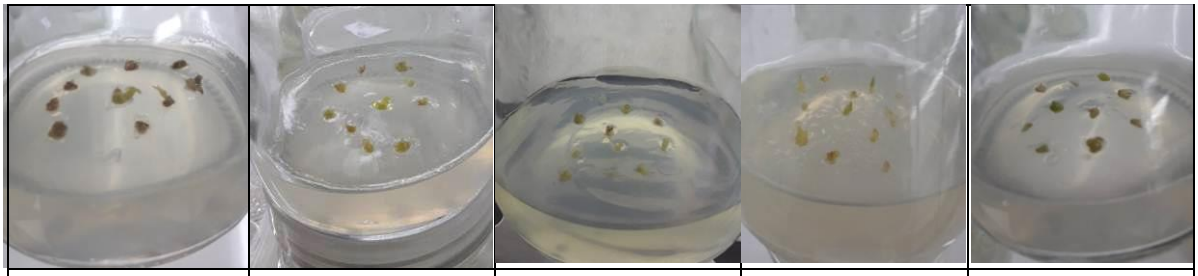
<u>การศึกษาการปรับสภาพปลาย (preculture) ยอดอ้อย</u>

จากการทดลองการปรับสภาพ (preculture) ของอ้อย 5 พันธุ์ (ภาพที่ 1) ได้แก่ อู่ทอง 12, ขอนแก่น 3, อู่ทอง 5, K84-200 และเมอริชาด ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม sucrose 2 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.08 M และ 0.4 M โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD 4 ซ้ำ รวมเป็น 10 กรรมวิธี พบว่า หลังจากตัดปลายยอดอ้อยทั้ง 5 พันธุ์

แล้วมาทำ preculture ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม sucrose ทั้งสองความเข้มข้น พบว่า ปลายยอดอ้อยมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1) ในขั้นตอนต่อไปของเทคนิค encapsulation-dehydration จะทำ alginate bead ในสารละลาย $CaCl_2$ 100 mM ร่วมกับ sucrose 0.4 M และในเทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification จะทำ LS (loading solution) ในสารละลาย Glycerol 2 M และ sucrose 0.4 M ซึ่งทั้ง 3 เทคนิคนี้จะทำการแช่ในสารละลายที่มี sucrose 0.4 M เป็นส่วนประกอบเช่นเดียวกัน ดังนั้น จากผลการทดลองการปรับสภาพ (preculture) นี้ ในขั้นตอนการศึกษาการเก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค encapsulation-dehydration, vitrification, และ encapsulation-vitrification จะใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม sucrose ที่มีความเข้มข้น 0.4 M ในการปรับสภาพ ซึ่งจะเป็นการเตรียมความพร้อมให้ปลายยอดอ้อยปรับตัวได้ดีกว่าการทำ preculture ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม sucrose ที่มีความเข้มข้น 0.08 M

ตารางที่ 1 การปรับสภาพ (preculture) ของอ้อยพันธุ์อู่ทอง12, ขอนแก่น 3, อู่ทอง 5, K 84-200 และเมอริชาด

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต
1. อู่ทอง 12 + 0.08 M sucrose	95
2. อู่ทอง 12 + 0.4 M sucrose	100
3. ขอนแก่น 3 + 0.08 M sucrose	100
4. ขอนแก่น 3 + 0.4 M sucrose	100
5. อู่ทอง 5 + 0.08 M sucrose	97.5
6. อู่ทอง 5 + 0.4 M sucrose	100
7. K 84-200 + 0.08 M sucrose	100
8. K 84-200 + 0.08 M sucrose	100
9. เมอริชาด+ 0.08 M sucrose	95
10. เมอริชาด+ 0.4 M sucrose	100
F-test	ns
C.V. (%)	4.96



อู่ทอง 12	ขอนแก่น 3	อู่ทอง 5	K 83-200	เมอริชาด

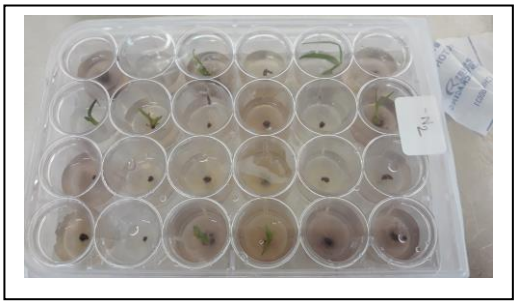
ภาพที่ 1 การปรับสภาพปลายยอดอ้อยพันธุ์อู่ทอง 12, ขอนแก่น, 3 อู่ทอง 5, K84-200 และเมอริชาด

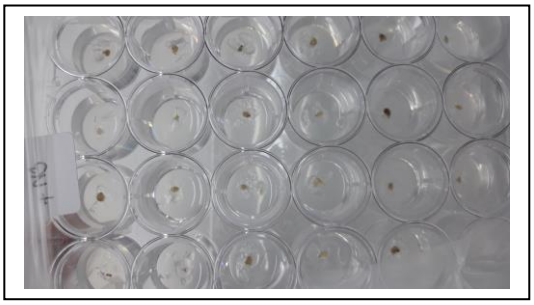
<u>การเก็บรักษาปลายยอดอ้อย พันธุ์อู่ทอง12 ในสภาพเยือกแข็ง</u>

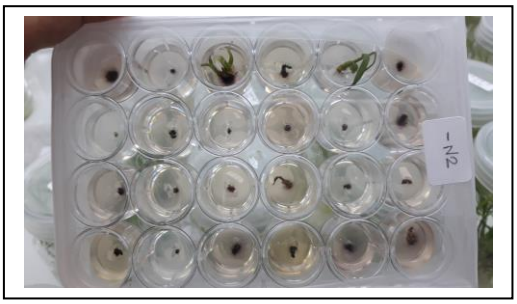
ทำการทดลองเก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยพันธุ์อู่ทอง12 ในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration พบว่าการรอดชีวิตของปลายยอดอ้อยเมื่อไม่ได้แช่เนื้อเยื่อปลายยอดในไนโตรเจนเหลว (-LN) ด้วยเทคนิค vitrification และ encapsulation-vitrification มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 10 และ 6.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเนื้อเยื่อแช่ในไนโตรเจนเหลว (+LN) ยังไม่พบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต ดังตารางที่ 2 (ภาพที่ 2)

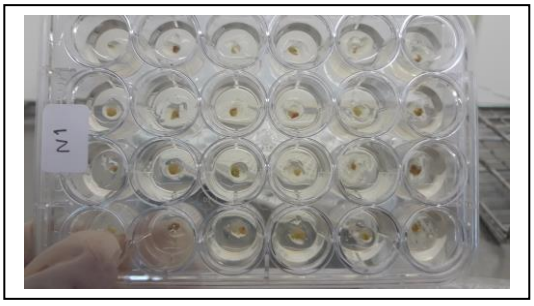
<u>ตารางที่ 2</u> อัตราการรอดชีวิตของปลายยอดอ้อยพันธุ์อู่ทอง12 ที่เก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration

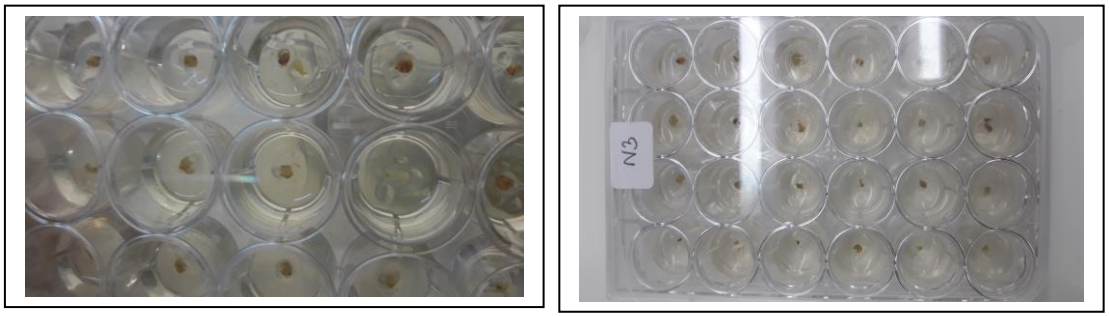
วิธีการเก็บรักษา	**เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต**		**ลักษณะที่พบ**
	-LN	**+LN**	
Vitification	10	0	-
Encapsulation-Vitrification	6.66	0	-
Encapsulation-Dehydration	0	0	-











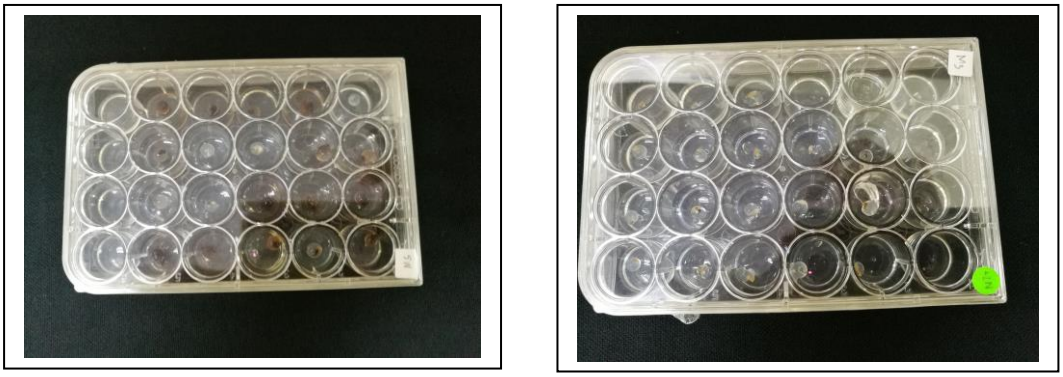
ภาพที่ 2 เก็บรักษาพันธุกรรมพันธุ์อ้อยอู่ทอง12 ในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) 3 เทคนิค

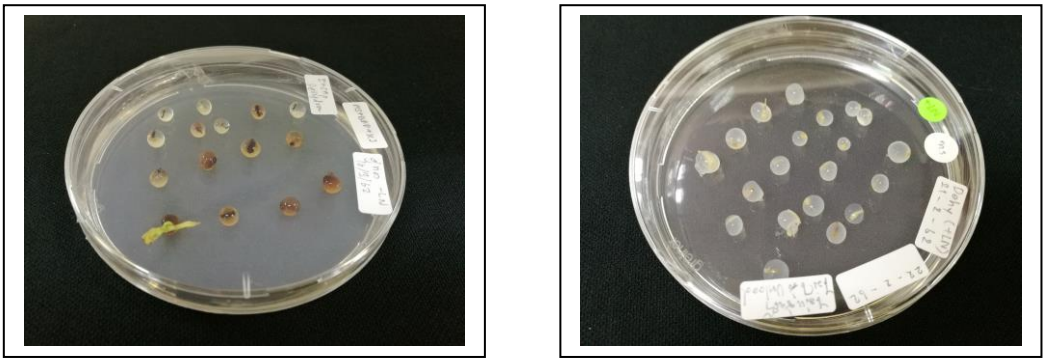
<u>การเก็บรักษาปลายยอดอ้อย พันธุ์ขอนแก่น3 ในสภาพเยือกแข็ง</u>

ทำการทดลองเก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยพันธุ์ขอนแก่น3 ในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration พบว่าทุกวิธีมีอัตราการรอดชีวิตเมื่อไม่ได้แช่เนื้อเยื่อปลายยอดในไนโตรเจนเหลว (-LN) 26.66 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ส่วนเนื้อเยื่อแช่ในไนโตรเจนเหลว (+LN) ยังไม่พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ดังตารางที่ 3 (ภาพที่ 3)

<u>ตารางที่ 3</u> อัตราการรอดชีวิตของปลายยอดอ้อยพันธุ์ขอนแก่น3 ที่เก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration

วิธีการเก็บรักษา	**เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต**		**ลักษณะที่พบ**
	-LN	**+LN**	
Vitification	41.66	0	-
Encapsulation-Vitrification	30	0	-
Encapsulation-Dehydration	26.66	0	-





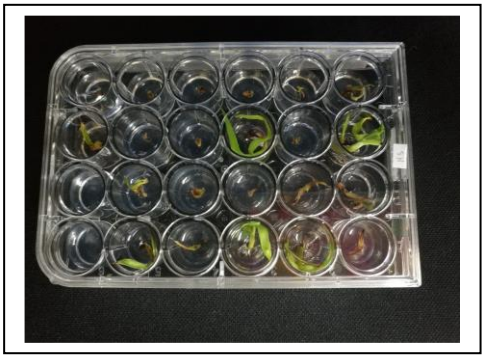
ภาพที่ 3 เก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยพันธุ์ขอนแก่น3 ในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) 3 เทคนิค

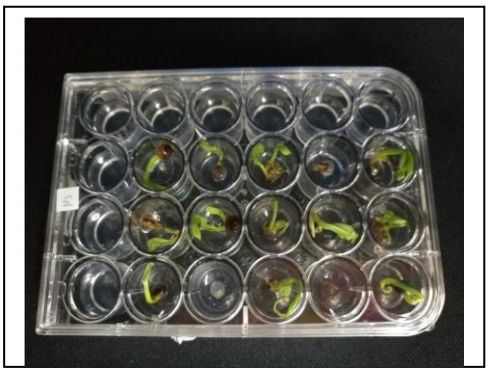
<u>การเก็บรักษาปลายยอดอ้อย พันธุ์อู่ทอง5 ในสภาพเยือกแข็ง</u>

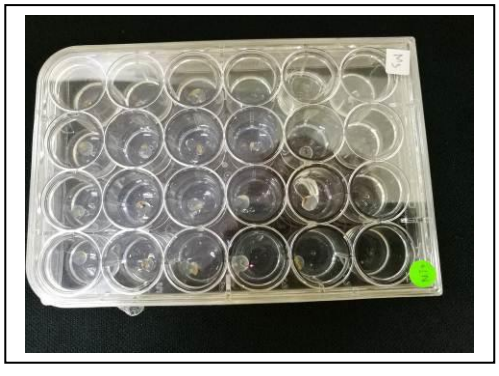
ทำการทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยพันธุ์อู่ทอง 5 ในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration พบว่าทุกวิธีมีอัตราการรอดชีวิตเมื่อไม่ได้แช่เนื้อเยื่อปลายยอดในไนโตรเจนเหลว (-LN) 60 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป โดยเทคนิค vitrification มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด 81 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเนื้อเยื่อแช่ในไนโตรเจนเหลว (+LN) ยังไม่พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต แต่พบว่าเนื้อเยื่อมีลักษณะยืดตัวของปลายยอดในช่วงสัปดาห์แรกหลังจากนำออกจากการแช่ในไนโตรเจนเหลว และพบว่าเนื้อเยื่อกลายเป็นสีน้ำตาลหรือขาวซีดในเวลาต่อมา ดัง ตารางที่ 4 (ภาพที่ 4)

ตารางที่ 4 อัตราการรอดชีวิตของปลายยอดอ้อยพันธุ์อู่ทอง 5 ที่เก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration

วิธีการเก็บรักษา	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต		ลักษณะที่พบ
	-LN	+LN	
Vitification	81	0	+LN เนื้อเยื่อยังเขียวในช่วงเดือนแรก
Encapsulation-Vitrification	70	0	
Encapsulation-Dehydration	63	0	







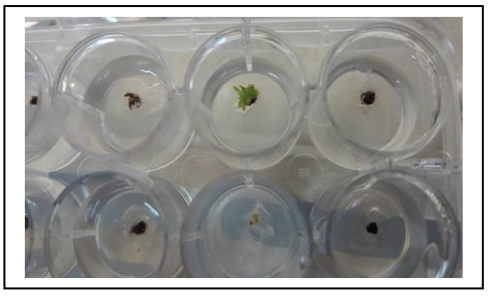
ภาพที่ 4 เก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยพันธุ์อู่ทอง5 ในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) 3 เทคนิค

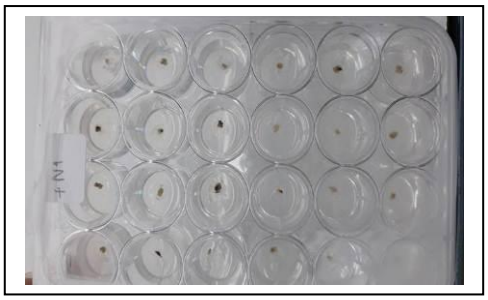
การเก็บรักษาปลายยอดอ้อย พันธุ์ K84-200 ในสภาพเยือกแข็ง

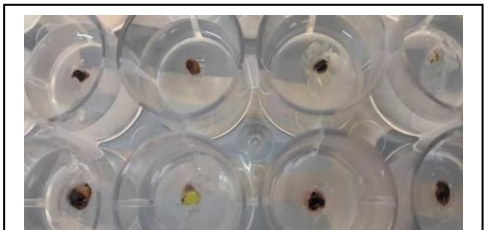
ทำการทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยพันธุ์ K84-200 ในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration พบว่าทุกวิธีมีอัตราการรอดชีวิตเมื่อไม่ได้แช่เนื้อเยื่อปลายยอดในไนโตรเจนเหลว (-LN) 10 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป โดยเทคนิค vitrification มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด 23.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเนื้อเยื่อแช่ในไนโตรเจนเหลว (+LN) ยังไม่พบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ดังตารางที่ 5 (ภาพที่)

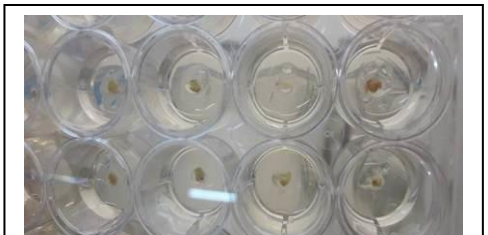
ตารางที่ 5 อัตราการรอดชีวิตของปลายยอดอ้อยพันธุ์ K84-200 ที่เก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งโดยใช้เทคนิค vitrification, encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration

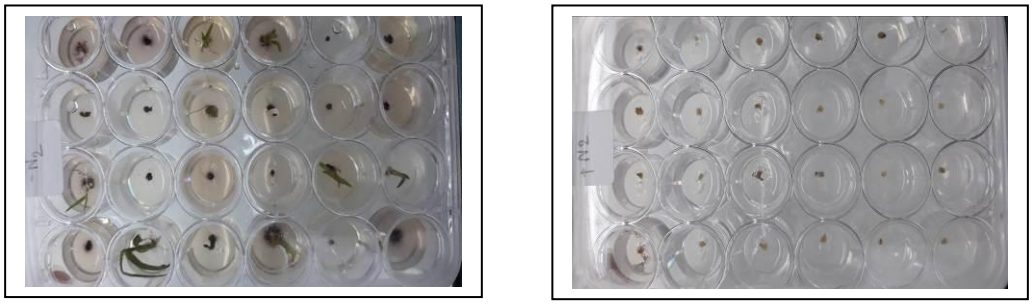
วิธีการเก็บรักษา	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต		ลักษณะที่พบ
	-LN	+LN	
Vitification	23.3	0	-
Encapsulation-Vitrification	16.6	0	-
Encapsulation-Dehydration	10	0	-







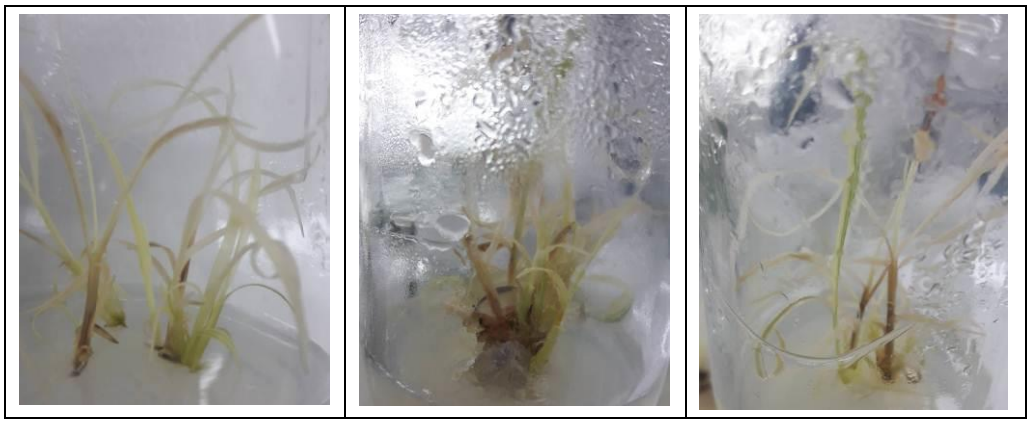




ภาพที่ 5 เก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยพันธุ์ K84-200 ในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) 3 เทคนิค

<u>การเก็บรักษาปลายยอด พันธุ์อ้อยเคี้ยวเมอริชาด ในสภาพเยือกแข็ง</u>

การทดลองเก็บรักษาอ้อยเคี้ยวพันธุ์เมอริชาด พบว่า ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีลักษณะซีดขาว (ภาพที่ 6) หลังจากได้มีการปรับสูตรอาหารให้ความเหมาะสมโดยใส่ปุ๋ยกล้วยไม้ (21-21-21) พบว่าหน่ออ่อนที่แตกขึ้นมาใหม่ยังเป็นสีขาวจึงได้ทดลองเพิ่มปริมาณปุ๋ยกล้วยไม้ (21-21-21) 1 กรัม เป็น 2 กรัมต่อลิตร แต่ยังพบว่าต้อนอ่อนยังคงเป็นสีขาว และไม่สามารถหาท่อนพันธุ์ใหม่มาปลูกเพื่อนำหน่อมาใช้ในการทดลองได้ทันเวลา จึงไม่สามารถทดลองการเก็บรักษาอ้อยพันธุ์เมอริชาดได้



ภาพที่ 6 ลักษณะสีต้นของอ้อยเคี้ยวพันธุ์เมอริชาดหลังจากนำมาขยายพันธุ์ในอาหารแข็งสูตร MS

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การ preculture ปลายยอดอ้อย 5 พันธุ์ ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม sucrose ที่มีความเข้มข้น 0.4 M ในการปรับสภาพ เป็นการเตรียมความพร้อมให้ปลายยอดอ้อยปรับตัวได้ดีกว่าการทำ preculture ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม sucrose ที่มีความเข้มข้น 0.08 M

2. การทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยโดยวิธี Vitification มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์ความรอดชีวิตสูงกว่าวิธี Encapsulation-Vitrification และ Encapsulation-Dehydration เมื่อยังไม่ได้แช่ลงในไนโตรเจนเหลว ควรทำการทดลองหาวิธีการที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนในแต่ละเทคนิค เช่น เวลาที่เหมาะสมในการ dehydration, ชนิดของ cryoprotectant เป็นต้น นอกจากนี้อาจหาวิธีใหม่ๆ เช่นการทำ droplet หรือการใช้ cryoplate ในการทดลองเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยในสภาพเยือกแข็งให้สำเร็จต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถนำข้อมูลใช้ในการศึกษาพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาปลายยอดพันธุ์อ้อยในสภาพเยือกแข็งวิธีอื่นๆ หรือพืชชนิดต่างๆ ต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพและผู้ที่มีส่วนในการดำเนินงานทุกท่านที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี และหน่วยงานแหล่งรวบรวมพันธุ์อ้อยทุกแห่งที่ให้ท่อนพันธุ์ อาทิ ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี

เอกสารอ้างอิง

กนกทิพย์ เลิศประเสริฐรัตน์ และ ประชา ถ้ำทอง. 2550. ศึกษาปริมาณแป้งในอ้อยพันธุ์รับรอง พันธุ์แนะนำ และโคลนดีเด่น. รายงาน ผลงานวิจัยและพัฒนาด้านพืชและเทคโนโลยีการเกษตร การทดลองสิ้นสุดปีงบประมาณ 2550. หน้า 23.

วราภรณ์ บุตรเรืองศักดิ์. 2543. การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์กล้วยไม้ช้างกระ (*Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridley) ในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี Vitrification. โครงการพิเศษหลักสูตรวิทยศาสตรบัณฑิต (พฤกษศาสตร์) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

วรรณา เลิศวิจิตรจรัส. 2545. การเก็บรักษาตายอดกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์วอเตอร์โอมายที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยมหิดล.

วัชรี กัลยาลัง อาภารัตน์ มหาขันธ์ และอุษา กลิ่นหอม. 2550. การศึกษาเทคนิค Cryopreservation ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสาหร่ายสกุล *Arthrospira* และ *Spirulina*. การประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 3 วันที่ 21-23 มีนาคม 2550 ณ อาคารมหามกุฏ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศุภกิจ ยงวิฑิตสถิต. 2540. การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์กล้วยไม้ในไนโตรเจนเหลว โครงการพิเศษหลักสูตรวิทยศาสตรบัณฑิต (พฤกษศาสตร์) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

Gupta, S. and Husnara. 2009. Cryopreservation of *in vitro* explants using encapsulation-dehydration technique. Laboratory manual for international training course on in vitro and cryopreservation techniques for conservation of plant genetic resources. November 9-12, 2009. NBPGR, New Delhi, India.

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(1) : 109-115.

Hirai, D. and A. Sakai. 2003. Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by optimizing conditions for osmoprotection. Plant cell Rept. 21 : 961-966.

Lambardi, M., C. Benelli and A. De Carlo. 2005. Cryopreservation as atool for the long-term conservation of woody plant germplasm : development of the technology at the CNR/IVALSA institute of Florence. The role of Biotechnology. Villa Gualino, Turin, Italy 5-7 March, 2005. 181-182.

Montero, M.E.M., J. Martines and F. Engelmann . 2008. Cryopreservation of sugarcane somatic emcryos. Cryo-Letter. 29(3) : 229-242.

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. Cryo-Letters. 16 (4) ; 189-196.

Paulet, F., F. Engelmann and J. C. Glaszmann. 1997. Cryopreservation of apices of in vitro plantlets of sugarcane (Saccharum sp. Hybrids) using Encapsulation/Dehydration. Plant Cell Reports. 12: 525-529.

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

Thammasiri, K. 2000. Cryopresrvation of seeds of a Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vitrification. Cryo-Letters. 21 : 237-244.

Thammasiri, K. 2002. Preservation of seeds of some Thai orchid species by vitrification. Proceedings of the World Orchid Conference. 16 : 248-251.

ภาคผนวก

สูตรอาหาร MS

องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์พื้นฐานสูตร MS

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

ที่มา Murashige and Skoog (1962)